

【vol. 33】 HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）を用いた極性化合物の分取精製

Bob Bickler

極性有機化合物の精製は非常に困難な場合があります。以前の投稿で、逆相フラッシュクロマトグラフィーを使って、イオン化可能な化合物やイオン性化合物を保持し、精製することについて述べました。私の同僚である Elizabeth Denton 博士も、非常に極性の高いペプチドの精製に関するブログを投稿しています。しかし、逆相でいくら努力しても成功しないこともあります。そんな時、あなたは どうしますか？

この投稿では、[HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）](#) の一種である水性溶媒を用いた順相フラッシュクロマトグラフィーを使って、逆相メディアでは十分に保持されない化合物を精製する方法について説明します。

順相クロマトグラフィーはシリカと有機溶媒だけではありません。極性結合相など、他の順相メディアも存在します。そのようなメディアの例として、プロピルアミン結合シリカがあります。

このメディアは、[有機アミンを精製する](#)際に、化合物とシリカの相互作用を最小限に抑える「塩基シールド」を形成するだけでなく、イオン交換を行うことができるアミン官能基を持つ非常にユニークなメディアです。しかしこの記事では、このメディアが炭水化物のような極性の高い水溶性化合物の保持と分離にどのように使用できるかについてお話ししたいと思います。

糖類はクロマトグラフィーで精製するのが特に難しい場合があります。極性の高い化合物は、逆相クロマトグラフィーで可能なパーティショニングを最小限に抑えます。単糖は通常、カラムのポイドボリュームで溶出しますが、それ以上の糖類は保持されることがあります。逆相における分配から親水性相互作用における H-結合（この場合）へと分離メカニズムを反転させることで、アミン結合シリカの使用は精製戦略として成功する可能性があります。このタイプの分離には興味深い工夫があります。逆相溶媒を使用しますが、強溶媒としてアセトニトリル（あるいはメタノール）ではなく水を使用します！その結果、極性の高い化合物がよく保持され、粗混合物のクロマトグラフィー分離が可能になります。下の表は、HILIC と逆相および順相クロマトグラフィーの違いをまとめたものです。

	Normal-phase	Reversed-phase	HILIC
Media	Silica	C18 bonded silica	Propyl NH2 bonded silica
	Alumina	C8 bonded silica	Diol bonded silica
		C4 bonded silica	Nitrile bonded silica
Typical solvents	Hexane/EtOAc	MeOH/water	MeCN/water
	Heptane/EtOAc	MeCN/water	(typically, aprotic organic solvents + water)
	DCM/MeOH		
	DCM/MeCN		
Separation mechanism	Adsorption/desorption	Partitioning	H-bonding
	H-bonding		Partitioning

サッカリンは人工甘味料 Sweet & Low® に含まれ、ブドウ糖とステアリン酸カルシウムと結合しています。最近、あるプロジェクトで炭水化物の精製を行う機会がありました。このプロジェクトでは、フラッシュグレードのメディアで糖と糖代替物を分離する能力を調べました。私は、台所にある（あるいはほとんどのレストランにある）一般的なもの、すなわちテーブルシュガー（スクロース）と人工甘味料（サッカリン）を手に取りました。

炭水化物は紫外線を透過するので、化合物を検出するために質量検出器（ESI またはエレクトロスプレーイオン化源を備えた Isolera Dalton® 2000）を使用しました。pH の最適化を追加することなく、最も効果的であったメソッドは、Biotage ISOLUTE® NH2 メディアを充填した Biotage® SNAP カートリッジで、アセトニトリル中 20% から 40% の水を素早くグラジエントするメソッドでした（図 1）。このような極性溶媒と極性固定相の組み合わせは、HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）と呼ばれることがあります。

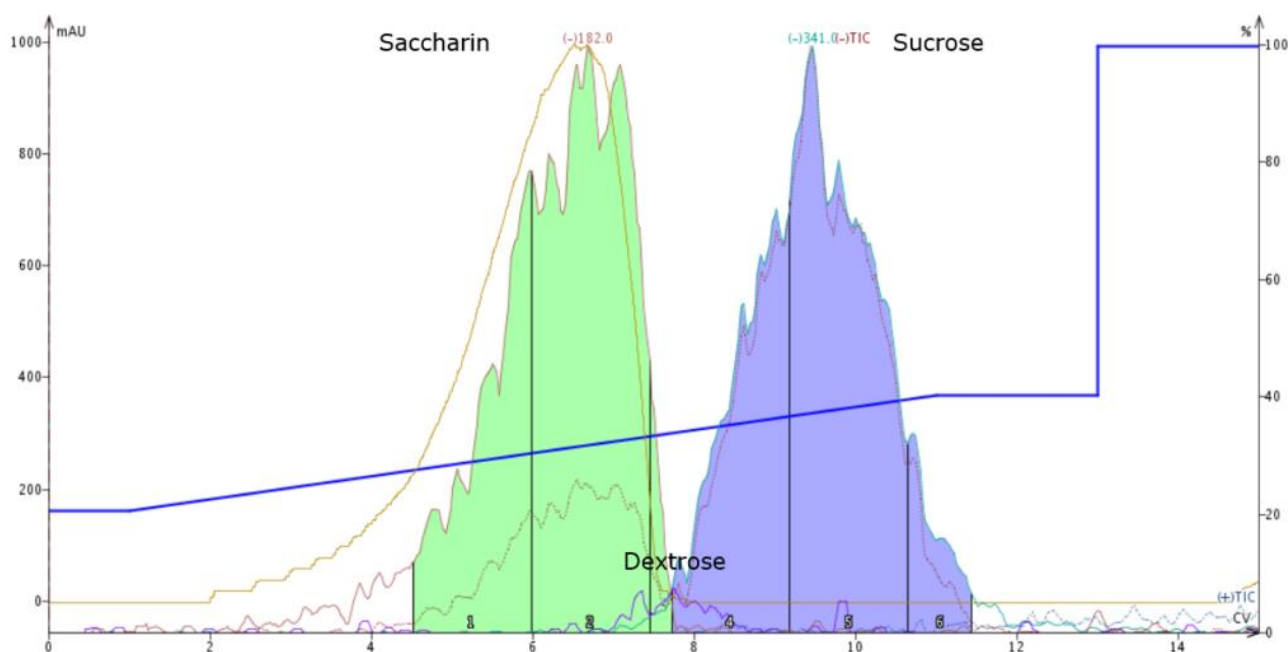


図 1. ネガティブ m/z モードでの ESI 質量検出を用いた HILIC、スクロースと混合した Sweet and Low。サッカリン (m/z 182) は部分的にイオン化しているため、わずかに前に出ています。スクロース (m/z 341) はきれいに保持され、サッカリンからうまく分離しています。デキストロース (m/z 179) はイオン化が不十分ですが、検出されています（2つのメインピーク間の紫色のトレース）。

糖類の分離にアミン結合シリカを使用する場合、極性の固定相と相互作用するヒドロキシル基の数によって保持が異なる傾向があります。小さな糖は、より多くのヒドロキシル基を含む大きな糖よりも早く溶出します。上の例では、単糖であるデキストロースは二糖であるスクロースよりわずかに早く溶出します。疎水性の高いサッカリンはさらに早く溶出します。

フラッシュクロマトグラフィーについて詳しく学ぶには、ホワイトペーパー「Successful Flash Chromatography」をダウンロードしてください。

[Learn More](#)

元の記事 ; <https://www.biotage.com/blog/very-polar-compound-purification-using-aqueous-normal-phase-flash-column-chromatography>