

逆相フラッシュ クロマトグラフィー 負荷容量の決定方法

White paper





フラッシュカラムのサンプル負荷量は、いくつかの要因によって変化しますが、主にターゲット化合物の選択性と、最も近い溶出隣接化合物からの分離能に依存します（順相フラッシュでの薄層クロマトグラフィー（TLC）分離データを想像してみてください）。ですが、逆相ローディングキャパシティの決定は通常、サンプルロードとスカウティングラン（後述）を数回繰り返す、経験則に基づくプロセスとなっています。

一般的に逆相カラムは順相シリカカラムに比べ、逆相メディアの表面積が小さく（C18とシリカの結合により表面積が減少するため）、分離メカニズムが異なるため、負荷容量が低くなります。

（シリカやアルミナの表面積と極性化合物が相互作用する「吸着」と「脱離(Link)」の分離メカニズム＝順相 Vs. 疎水性相互作用を利用する逆相）フラッシュカラムはいずれも一般的に、サンプルの担持量はメディア重量の10%から20%までと記載されています。一方、一般的に公表されている逆相の容量は、メディア重量の1~2%です。これらは推奨される最大負荷量であり、必ずしもすべての精製に適用できるわけではありません。繰り返しますが、分離がどの程度良好であるかは、先に述べた他の基準にも依存します。

この文書では、簡単な実証的スカウティングラン（後述）から計算された分離度（Rs）を利用して、特定の目的物の純度目標を維持しながら、可能な限り最大のサンプルロード量を提案する方法を紹介します。

ローディングキャパシティ（試料負荷量）

カラムの負荷能力は、いくつかの要素に基づいて決定されます。

サンプルの複雑さ（化合物数）

1. サンプル分離方法
 - a. アイソクラティック
 - b. リニアグラジエント
 - c. ステップグラジエント
2. サンプル分離（ターゲットと副生成物や不純物の分離具合）
 - a. 保持
 - b. 選択性
 - c. 分離度
3. サンプル溶解度
 - a. 移動相
 - b. 溶解用溶媒
4. 化合物ケミストリー - 中性、酸性、塩基性、極性、親油性
5. ロード方法
 - a. 液体
 - i. 溶解溶媒の選択
 - ii. 試料の濃度
 - b. 乾燥
 - i. 使用した吸着剤
 - ii. 試料と吸着剤の比率
6. 純度および収率の目標
 - a. 高純度＝低負荷
 - b. 収率向上＝高負荷

特に創薬化学の現場では、中間体化合物の純度よりも収率の方が重要であり、おおよそ80%以上の純度が許容されると考えられています。これまでは中間体の精製に順相での分取が一般的でしたが、合成品の極性が高く複雑になってきたことや、近年溶媒留去の技術が向上したこともあり、多くの科学者が逆相に移行し始めています。

このような逆相への移行に伴い、本ホワイトペーパー資料では、重要性が増している逆相フラッシュでの負荷容量を理解し決定するための実例をご案内します。

メソッドスカウティング

どのようなクロマトグラフィーでもそうですが、対象となる化合物とその直近の溶出不純物を分離する適切なメソッドを開発する必要があります。メソッドスカウティングは、フラッシュカラムと同じメディア（粒子径および修飾基）を充填した分析用HPLCスケーリングカラムで行うのが最適です（Bickler, J. Robert, 2015）。または、スケーリングカラムとHPLCシステムがなく、十分なサンプルがある場合は、小型フラッシュカラムでメソッドを開発することも可能です。

本ホワイトペーパーでは、Biotage® Initiator+（マイクロウェーブ合成装置）を用いて自社で合成した4種類の反応混合物を用いて、12 g フラッシュC18カラム（Biotage® Sfär C18）の負荷容量を評価しました。

合成後、各反応混合物をバイアルに移して溶媒を留去（濃縮）し、以下の重量を得ました。

- › 反応1 – 638 mg
- › 反応2 – 545 mg
- › 反応3 – 852 mg
- › 反応4 – 862 mg

その後、各バイアルの内容物をDMSOに溶解させました。

反応物1と2は最終容量が5mLになるようにDMSOに溶解し、反応物3と4は2mLに溶解しました。DMSOは溶解性が高く、逆相クロマトグラフィーでの保持が非常に低いことから選択しました。

反応混合物1と2は10CVの25-60%メタノールグラジエントで分離でき、反応3と4は10CVの35-85%メタノールグラジエントが必要でした。

少量ずつ（～10～20 mg）を12 gのSfär C18カラムに注入し、適切なグラジエントをかけて、存在する化合物の数、目的生成物の溶出位置、選択性と分離度の両方を測定しました。

その結果、各反応で生成物と副生成物が生成していることが分かりました（図1）。

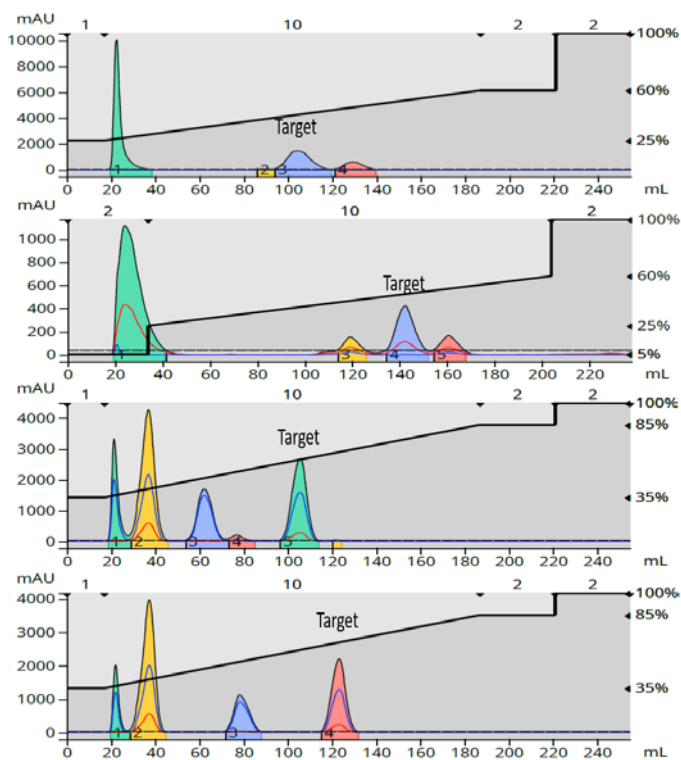


図1. 分離度の値を決定するためのスカウティング・ラン。上から、反応1、反応2、反応3、反応4。

スカウティング・ランの結果、反応3と4では、反応生成物が最後に溶出し、先に溶出した副生成物から非常によく分離されることがわかりました。しかし、反応1と2の分離では、主要なピークが他の2つの密接に溶出するピークの間位置しており、目的化合物の精製はより困難であることがわかりました。

各反応混合物の分離効率と最大負荷量を決定するために、目的生成物と直前に溶出する副生成物のピークの保持量 (mL) とそのピーク体積 (mL) を測定しました。

フラッシュシステム (Biotage® Selekt) を用いて、ベースラインで測定したピーク分画開始時と終了時の体積差の値を求め、集計しました (図2)。

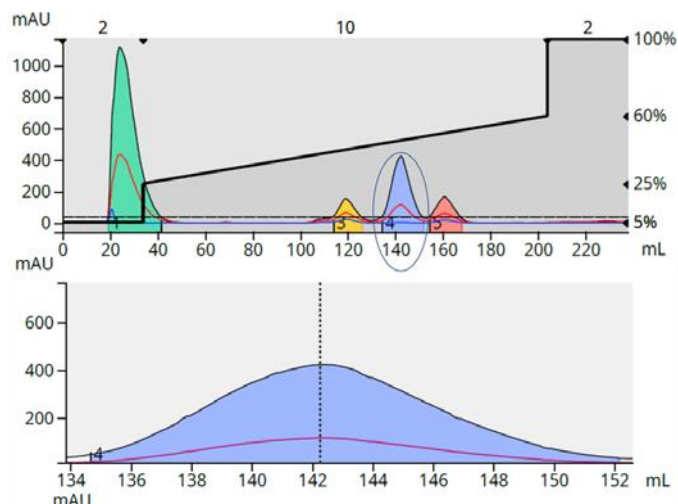


図2. ピークの保持量と溶出量は、目的のピークを中心にクロマトグラムを拡大することで測定します。溶出量は分画開始時と終了時の差、保持量はピークの頂点です。

このデータをもとに、各近隣ピークからターゲット化合物の分離度を算出し、ロードキャパシティを決定しました (表1)。

分離度は次のように計算されます...

$$R_s = \frac{2(V_2 - V_1)}{W_1 + W_2}$$

- › Rs = 分離度 (Resolution)
- › V1 は近接ピークのトップ溶出量 (保持時間)
- › V2 はプロダクトピークのトップ溶出量 (保持時間)
- › W1 は、近接ピークのピークボリューム (幅)
- › W2 はプロダクトピークのピークボリューム (幅)

では、試料負荷量を決めるという点ではどうなのでしょう。まず、分離度が大きいほど、負荷量は増えます。Rs が 2.76 である反応混合物 4 で、最も負荷が高い (または分離が良い) のが見られるはず。反応混合物 3 と 4 は生成物が最後に溶出するので、生成物とその手前に溶出する副生成物間の分離度のみを計算しました。反応 1 と 2 は、目的化合物が 2 つの副生成物の間に溶出するため、2 つの分離度を計算する必要があります。このような状況では、低い分離度の値が制限因子となるため、分離度が 0.91 である反応 1 が最も低い負荷量になるはず。反応 2 の分離度では、同様に 1.21 です。

表 1. スカウティングラン分離データ

	反応 1				反応 2		反応 3		反応 4	
	不純物 1	ターゲット	不純物 2	不純物 1	ターゲット	不純物 2	副生成物	ターゲット	副生成物	ターゲット
ピークボリューム (mL)	8	25	18.5	12	17.5	13	13	17	16	17
ピークトップ溶出量 (mL)	89	104	129.5	119	142	160.5	77	105.5	78	123.5
分離度 不純物 1/ターゲット		0.91			1.56			1.90		2.76
分離度 不純物 2/ターゲット		1.17			1.21					

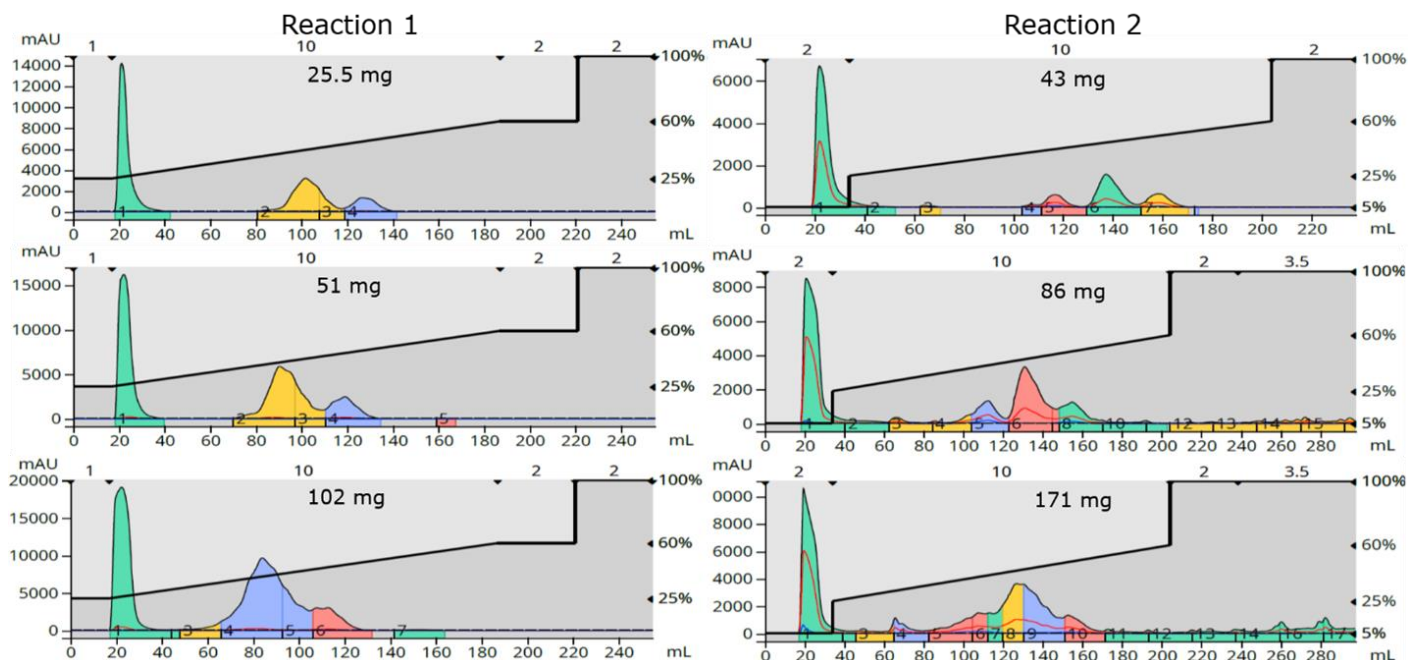


図3. 反応1および反応2のスケールアップクロマトグラムは、試料負荷の増加とともに分離度が低下していることがわかります。

スケールアップした精製ラン

分離度を試料負荷量に直接変換する方法は存在しないため、負荷量を増加させた一連の分離を行い、経験的に最大容量を決定しました。この作業は、図3に示すように、完全に分離度が低下するまで、反応1と2を用いて、前回の負荷の2倍の量を注入して行われました。

純度評価

各精製の中間ピークをBiotage® V-10 Touchで溶媒を留去（濃縮）させ、DMSOに再溶解し、同じフラッシュ法とカラムを用いて純度を分析しました。予想通り、結果から、負荷量の増加とともに副生成物が増加することがわかりました。

ピーク純度を算出するために、保持された各ピークのUVスペクトルをmAUで測定しました。各化合物の全紫外線吸収スペクトル（200～300 nm）を網羅する全波長機能（Biotage Spektra機能による。：Flash装置SelektまたはIsoleraオプション）を使用したため、ピークの高さ＝UVスペクトルの比は比較のために有効な測定値となります。全波長UVスペクトルの積算値に対する目的化合物のスペクトル比を算出し、純度測定に使用しました（表2）。

反応1では、102 mgの負荷で80%以上の純度目標を達成し、この粗混合物の負荷量となりました。しかし、反応混合物2については、スケーリングスタディにより、最大負荷量が171 mg未満で86 mg以上であることが判明し、86 mgと171 mgの間の負荷量で再度精製テストが必要となりました。

表2. ターゲット化合物の純度結果

反応 1				反応 2			
Load (mg)	目的物ピーク高さ (mAU)	副生成物高さの合計 (mAU)	%純度	Load (mg)	目的物ピーク高さ (mAU)	副生成物高さの合計 (mAU)	%純度
25.6	204	20	91%	21.4	902	22	98%
51.2	761	79	91%	42.8	492	11	98%
102.4	1167	250	82%	85.6	1029	51	95%
				171.2	1477	507	74%

最大負荷量の算出

最大負荷量を決定するために、純度対ロード量のプロットは、80%の目標を達成するために必要なロード量を決定するのに有効な線形関係を示しています（図4）。

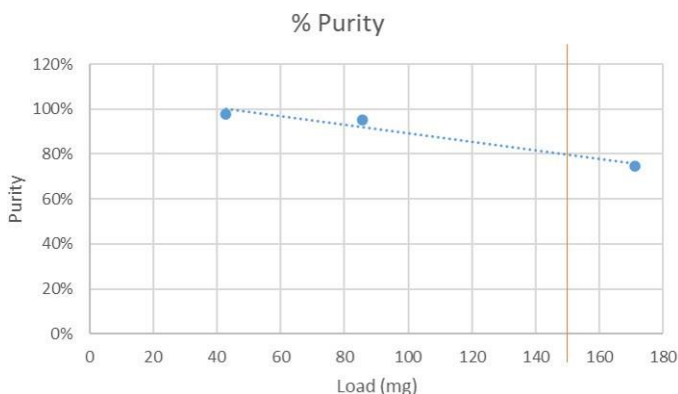


図4. 反応2の負荷量と純度の関係から、150 mg程度の負荷量で80%以上の純度を達成できることがわかります。

このグラフから、150mg程度の負荷量までであれば、精製目標を達成できることがわかりました。しかし、残念ながら反応物2は139 mgしか残りませんでした。計算上の負荷量より少ないものの、クロマトグラフィーの結果、副生成物からよく分離された生成物が確認されました（図5）。生成物の純度は89%であり、最大負荷量150 mg、すなわち負荷量1.3%（粗重量/カラム媒体重量）に相当することが確認されました（表3）。

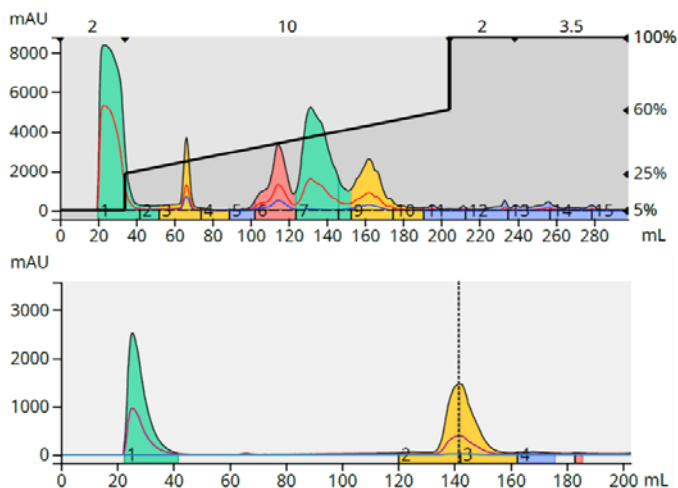


図5. 推定最大負荷の反応2の精製と分析。上図 - 139 mg負荷の精製では、生成物であるピーク7（緑）が隣接する副生成物からよく分離されていることがわかります。下 - フラクション7の純度分析により、高純度であることがわかります。

表3. 反応2、ロード量139 mgの純度分析。

Load (mg)	目的物ピーク高さ (mAU)	副生成物高さの合計 (mAU)	%純度
139	1473	189	89%

限界に挑む

これまでの検討により、低分離精製における最大負荷量を決定するための道筋が見えてきました。

しかし、反応3と4は、はるかに優れた分離度の値を持ち、潜在的な汚染物質として主要な副生成物は1つだけで、ローディングとスループットを向上させることが可能な状況でした。

前データの最大負荷と分離度（Rs 0.91=102 mg、Rs 1.21=150 mg）、反応3と4の分離度および粗合成質量を用いて負荷の対数をプロットすると、それぞれの反応の全粗混合物の精製をテストするのに十分な直線性（ $R^2=0.9004$ ）の関係性が得られました（図6）。

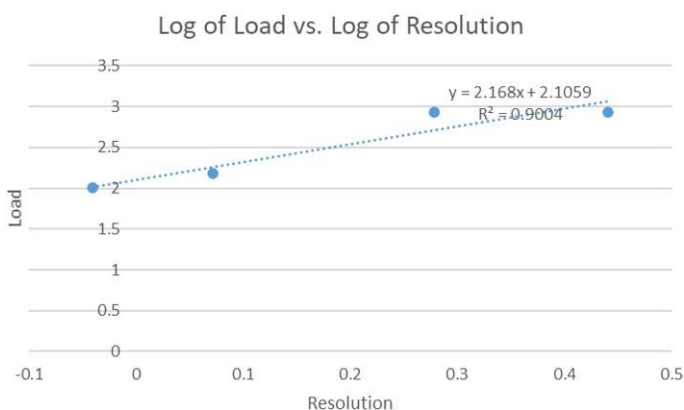


図6. 対数ロードvs対数分離度のプロットは、反応3と4の負荷容量を予測するのに十分な直線性を示しています。

各粗混合物は、同じ12-gの Sfär C18カラムを用いて全量をロードしました（ $RxN\ 3 = 852\ mg$ および $RxN\ 4 = 862\ mg$ ）（図7および図8）。精製の結果、反応3は86%、反応4は95%の生成物純度が得られ、両粗混合物の負荷容量が7%を超えていることが示されました（表4）。

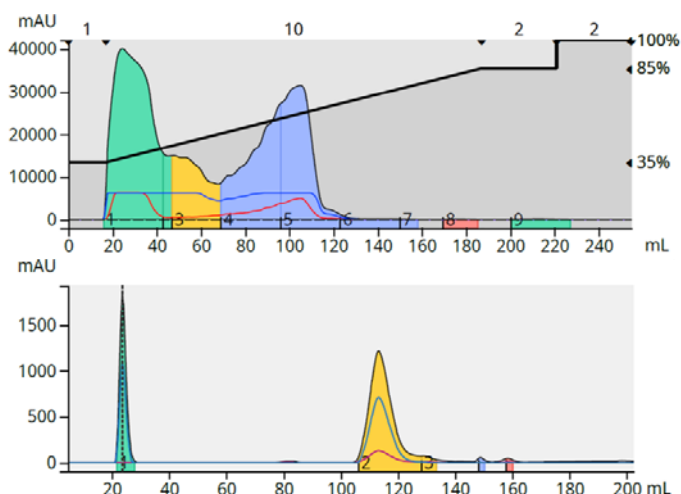


図7. 反応3の精製（852 mg）および純度分析。上図-粗反応混合物の精製では、生成物はフラクション4および5に溶出（青色ピーク）。下-フラクション4+5の分析により、高い純度が示されました。

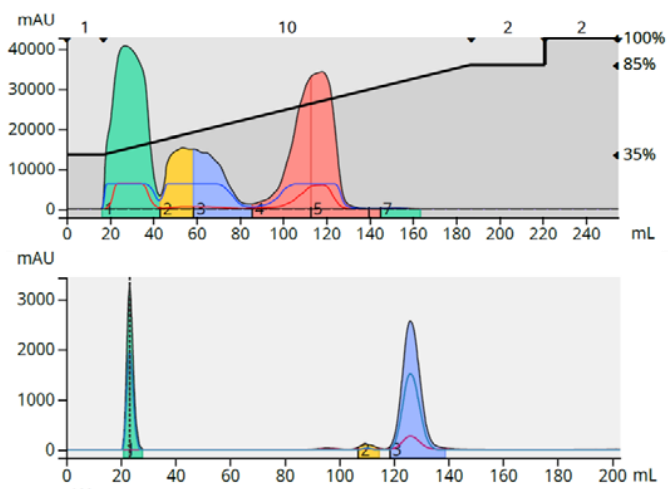


図8. 反応4の精製 (862 mg) と純度分析。上-粗反応混合物精製、生成物はフラクション4および5 (ピンク色のピーク)。下 - 非常に高い生成物の純度を示すフラクション4と5の分析。

表4. 反応3および4の精製後の純度評価。

	反応 3	反応 4
Load (mg)	852	862
目的物ピーク高さ (mAU)	1218	2558
副生成物高さの合計 (mAU)	195	140
プロダクト純度(%)	86	95
試料負荷量 (%)	7.1	7.2

予想通り、最高の分離度 (2.76) で最高の負荷 (862 mg) が達成され、95%の生成物純度を達成することができました。

反応3および4の精製中に興味深い現象が起こりました。生成物は直ちに回収容器内で結晶化し始め、これは高いフラクション純度を示しています (図9)。

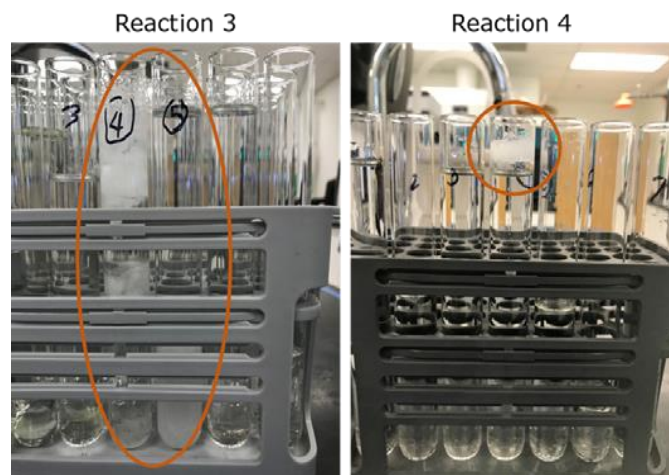


図9. 分画中に結晶化する反応3、反応4。

結論

逆相フラッシュクロマトグラフィーのローディングキャパシティは、わずか数回の小規模精製から得られた粗混合物について、最も近い溶出副生物から目的化合物の分離度を計算することによって決定することができます。逆相フラッシュクロマトグラフィーでは、分離度を最大にすれば、高いローディングキャパシティを達成することができます。

上記の例では、生成物の分離度が1.90以上で、反応混合物の溶解溶媒としてDMSOを使用した場合、2つの粗反応混合物で~7%のロードが可能でした。

化学における 最適なパートナー

Biotage 社は、ライフサイエンス分野の研究作業を容易にする機器やアクセサリを世界中に提供しています。業界に関する深い知識、学術機関との連携、社内の研究開発チームにより、お客様の課題に最適なソリューションをお届けします。当社は、お客様の個々のニーズに応えられる柔軟性と能力に誇りを持っています。分析化学、有機化学、プロセス化学、生物分子化学において強力な基盤を持つ当社は、市場で最も幅広いソリューションを提供することができます。

EUROPE

Main Office: +46 18 565900
Fax: +46 18 591922
Order Tel: +46 18 565710
Order Fax: +46 18 565705
order@biotage.com
Support Tel: +46 18 56 59 11
Support Fax: + 46 18 56 57 11
eu-1-pointsupport@biotage.com

NORTH & LATIN AMERICA

Main Office: +1 704 654 4900
Toll Free: +1 800 446 4752
Fax: +1 704 654 4917
Order Tel: +1 800 446 4752
Order Fax: +1 704 654 4917
ordermailbox@biotage.com
Support Tel: +1 800 446 4752
us-1-pointsupport@biotage.com

JAPAN

Tel: +81 3 5627 3123
Fax: +81 3 5627 3121
jp_order@biotage.com
jp-1-pointsupport@biotage.com

CHINA

Tel: +86 21 68162810
Fax: +86 21 68162829
cn_order@biotage.com
cn-1-pointsupport@biotage.com

KOREA

Tel: +82 31 706 8500
Fax: +82 31 706 8510
korea_info@biotage.com
kr-1-pointsupport@biotage.com

INDIA

Tel: +91 11 45653772
india@biotage.com

Distributors in other regions are listed on www.biotage.com

文献番号: UI468 JP_220610Mkt

© 2022 Biotage. 無断複写・転載を禁じます。Biotage社の書面による許可なく、資料を複製、出版することはできません。

本書に記載されている情報は、予告なく変更されるもので、Biotage社による確約を示すものではありません。誤記、脱字等の責任は負いかねます。

Biotage ABが所有する全商標のリストは、www.biotage.com/legalから確認することができます。本書に記載されているその他の製品および会社名は、

各所有者の商標または登録商標または役務商標である可能性があります。これらは、説明および所有者の利益のためにのみ使用されるもので、権利を侵害する意図はありません。

