

フラッシュ精製における失敗事例 TOP 3 解説

有機合成研究者のための実践的アプローチ



Contents

1. はじめに.....	3
2. フラッシュ精製の基本原理.....	4
2.1 順相クロマトグラフィー.....	4
2.2 逆相クロマトグラフィー.....	4
3. 実際の精製で気を付けるべきポイント.....	6
3.1 順相・逆相を選ぶポイント.....	6
3.2 固定相の選定.....	6
3.3 移動相の選定.....	7
3.4 サンプルチャージ.....	8
4. トラブル1：難溶性化合物のチャージ.....	13
4.1 問題の概要と影響.....	13
4.2 解決策.....	13
4.3 方法の選択と最適化.....	18
5. トラブル2：精製中の結晶化.....	19
5.1 問題の概要と影響.....	19
5.2 解決策.....	20
6. トラブル3：カラムへの目的物の吸着.....	24
6.1 問題の概要と影響.....	24
6.2 事前評価の重要性.....	24
6.3 解決策.....	24
参考資料.....	28

1. はじめに

フラッシュクロマトグラフィー、通称フラッシュ精製は、有機合成化学や医薬品開発の現場において不可欠な分離精製技術です。この技術は、1978年に W.C. Still^{*1}によって高速性と簡便性を維持しつつ、適切な分離度が得られることが示されています。以来、その迅速性と効率性により、化学研究や産業界で広く採用されています。

^{*1} Still, W.C., Kahn, M. and Mitra, A. (1978) Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *Journal of Organic Chemistry*, **43**, 2923-2925.

バイオタージは、自動フラッシュ精製装置の販売と保守サポートを提供しており、その過程でフラッシュ精製の現場で直面するさまざまなトラブルについても多くの声をいただいています。当社のアンケート調査で明らかになった、研究者が頻繁に経験するトラブルの上位3つを以下に示します。

1. 難溶性化合物のチャージ
2. 精製中の結晶化
3. カラムへの目的物の吸着

これらの問題は、精製の効率を低下させるだけでなく、貴重なサンプルの損失や実験の遅延を引き起こす可能性があります。また、「どの溶媒でサンプルを溶解すべきか」といった基本的な疑問もアンケート調査の際にフリーコメントで多く寄せられました。

本ホワイトペーパーでは、フラッシュ精製の基本知識を再確認し、続いて困りごとやトラブルの解決方法をご提案します。さらに、自動精製装置 Biotage® Selekt などの最新技術を活用した高度な精製テクニックについても紹介します。なお、本ホワイトペーパーにおける解決策は、トラブルを未然に防ぐ方法に重点を置いています。あらかじめ対策を講じて回避可能なトラブルを防ぐことが、研究のパフォーマンスを最大限に引き出すと考えるためです。問題が発生した際には、どうぞお気軽に担当の営業またはサービスチームにご相談ください。

フラッシュ精製は、適切な知識と技術を持って実施することで、その真価を発揮します。本ホワイトペーパーが、皆様の研究や開発作業の効率向上に貢献し、より優れた成果を生む一助となることを願っています。

2. フラッシュ精製の基本原理

フラッシュ精製は、液体クロマトグラフィーの一種であり、混合物中の化合物を分離・精製するための強力な技術です。この手法の基本原則を理解することは、効果的な精製プロセスの設計と実行において極めて重要です。

フラッシュ精製には主に二つのモード、順相クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーがあります。これらは固定相（カラム充填剤）の性質と、それに応じた移動相（溶媒）の選択によって区別されます。

2.1 順相クロマトグラフィー

順相クロマトグラフィーは、高極性の固定相に対して、固定相よりも極性の低い移動相を使用します。最も一般的な固定相はシリカゲルです。シリカゲルの表面にはシラノール基（Si-OH）が存在し、これが極性の高い性質を示します。

移動相としては、ヘキサン、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチルなどが用いられます。

順相クロマトグラフィーにおける分離の原理は、化合物の親水性の差を利用しています。極性の低い化合物は高極性である固定相との相互作用が弱いため、先に溶出します。一方、極性の高い化合物は固定相との相互作用が強いため、後に溶出します。

この特性により、順相クロマトグラフィーは中程度から高極性の極性を持つ化合物の分離に特に適しています。

2.2 逆相クロマトグラフィー

逆相クロマトグラフィーは、順相とは対照的に、固定相に極性の低い物質を使用します。一般的な固定相としては、C18（オクタデシル）修飾シリカゲルが広く用いられています。この固定相は、シリカゲル表面に長鎖アルキル基（C18）を化学的に結合させたものです。

移動相には、固定相よりも極性の高い溶媒を使用します。典型的な溶媒としては、水、メタノール、アセトニトリルが挙げられます。これらの溶媒は、極性の高い順に水、メタノール、アセトニトリルとなります。

逆相クロマトグラフィーにおける分離の原理は、順相とは逆になります。極性の高い化合物は固定相との相互作用が弱いため、先に溶出します。一方、極性の低い化合物は固定相との相互作用が強いため、後に溶出します。

この特性により、逆相クロマトグラフィーは非極性から中程度の化合物の分離に特に適しています。

適切なモードの選択は、目的化合物の性質や不純物のプロファイルに基づいて行います。一般的に、極性が中程度から高極性の化合物には順相を、非極性から中程度の極性を持つ化合物には逆相を選択することが多いですが、実際の選択には化合物の詳細な性質や分離の目的を考慮する必要があります。



3. 実際の精製で気を付けるべきポイント

3.1 順相・逆相を選ぶポイント

前の章で順相と逆相について理論を簡単に解説しましたが、実際に精製を行う際、どうやって順相か逆相かを決めるのがよいのでしょうか？TLC や HPLC で決めるというのが真っ先に考えられると思いますが、もう一つの観点をご紹介します。

化合物の溶解性、つまり化合物が最も溶けやすい溶媒に基づいて選択することで、順相フラッシュクロマトグラフィーと逆相フラッシュクロマトグラフィーのどちらが適しているかを判断することもできます。

サンプルが有機溶媒に溶解する場合 (DCM、酢酸エチル、トルエン、エーテルなど) は順相、極性溶媒 (アルコール、DMSO、DMF、アセトニトリルなど) に溶解する場合は、まず逆相をお勧めします。サンプルが炭化水素に溶解する場合 (ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサン)、通常は順相を選択することが多いかもしれませんが、逆相が向いている場合もあります。親油性化合物には通常 C と H 以外の官能基がほとんどなく、シリカ上で保持および分離するのが難しい場合があるからです。

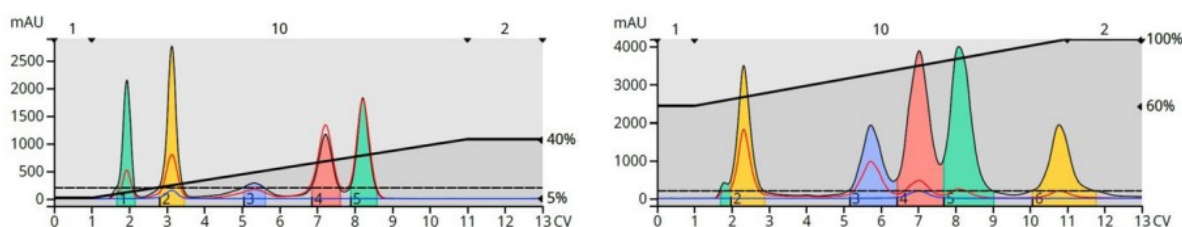


図1：同一サンプルを用いた順相（左）と逆相（右）クロマトグラフィーの比較。順相溶出順：ナフタレン、1-ニトロナフタレン、3,5-ジベンジルオキシアセトフェノン、ブチルパラベン、メチルパラベン。逆相溶出順：メチルパラベン、ブチルパラベン、1-ニトロナフタレン、ナフタレン、3,5-ジベンジルオキシアセトフェノン。

いずれにしても、精製を行う前に、サンプルの溶解性や分離条件を TLC や HPLC で十分に確認して総合的に判断することが重要です。

3.2 固定相の選定

固定相の選定において、重要なパラメータの一つが粒子径です。一般的に、粒子径が小さいほど理論段数が増加し、分離効率が向上します。これは、小さな粒子がより大きな表面積を

提供し、移動相と固定相間の物質移動が効率化されるためです。しかし、粒子径が小さいほど良いとは限りません。目的に応じて適切な戦略を選ぶ必要があります。

粒子径の選択には以下の要因を考慮する必要があります：

1. システムの圧力限界：粒子径が小さくなるほど、カラム内の背圧は二乗に反比例して上昇します。例えば、粒子サイズを半分にすると圧力は4倍に増加します。装置の耐圧限界を超えないよう、適切な粒子径を選択する必要があります。
2. 分析時間：小さな粒子径は必然的に流量が小さくなり、分析時間が長くなります。サンプル数が多い場合や大規模な精製では、この時間的要素は重要な考慮事項となります。

また、結晶性の高い化合物については特に注意が必要です。粒子が小さすぎたり、精製に時間がかかりすぎると、カラム内で再結晶化し、閉塞を引き起こす可能性があります。このため、オープンカラムを使用する際は、太く短いカラムを選び、パックドカラムでは中程度の粒子サイズ（50 μm 以上）を選択して、サンプルの過剰負荷を避けることが推奨されます。小さな粒子径を選ぶ場合、閉塞リスクが高まる点に注意が必要です。

小さな粒子は分離効率を向上させますが、圧力や分析時間、サンプルの特性などの実用的な考慮も重要です。理論段数の高さを優先するあまり、精製が必要以上に時間のかかる煩わしい作業になっていないか、また装置に過度な負荷をかけていないか、慎重に検討する必要があります。小さな粒子径が本当に必要か、目的に応じた合理的な選択であるかを確認することが重要です。

3.3 移動相の選定

3.3.1 順相クロマトグラフィー

移動相の選定は、分離の選択性を最適化する上で極めて重要です。効率的な移動相の選定には、選択性の異なる溶媒の組み合わせ（似ていない溶媒同士）を検討することがポイントです。

Snyder らの研究（Lloyd R. Snyder, et al. Introduction to Modern Liquid Chromatography Third Edition, Wiley）によれば、クロマトグラフィーで使用される溶媒は、その選択性に基づいて8つのグループに分類されます。

表 1：溶媒の選択性グループおよびシリカに対する溶媒強度

Solvent	Strength	Selectivity
Hexane	0.01	0
Heptane	0.01	0
Cyclohexane	0.04	0
Toluene	0.24	VII
Dichloromethane	0.32	V
Ethyl ether	0.40	I
Ethyl acetate	0.43	VI
Acetone	0.50	VI
Acetonitrile	0.51	VI
Tetrahydrofuran	0.53	III
Isopropanol	0.60	II
Ethanol	0.65	II
Methanol	0.71	II
Water	1.00	VIII

※Strength はシリカに対する溶媒の強度

たとえば、「クロロホルム/メタノール」と「クロロホルム/エタノール」はIIグループであるメタノールを同じIIグループに属するエタノールに変更しただけなので、選択性に大きな違いは生じません。このような同じグループ内の溶媒変更では効率が低いと言えます。より大きな違いを求めるなら、IIグループのメタノールをVIグループのアセトニトリルに変更するほうが効率的です。

3.3.2 逆相クロマトグラフィー

逆相フラッシュクロマトグラフィーで最も頻繁に使用される2つの有機溶媒は、アセトニトリルとメタノールです。どちらも極性ですが、アセトニトリルは非プロトン性でメタノールはプロトン性であるため、その違いがあります。また、これらは異なる選択性グループに分類されます。これらの特性の違いにより、同じサンプルでも分離挙動が大きく異なることがあります。そのため、「水/アセトニトリル」と「水/メタノール」の両方について、HPLCでの予備検討か少量でのテスト分取を行い、対象化合物に対してどちらが最良の結果をもたらすかを判断することをお勧めします。

3.4 サンプルチャージ

サンプルチャージは、精製プロセスの成否を左右する重要なステップです。適切なチャージ方法を選択することで、分離効率を最大化し、目的物の回収率を向上させることができます。

3.4.1 順相のサンプルチャージ

サンプルチャージの成否を決めるポイントは「チャージ溶媒」「チャージする液量」の二点です。

1. チャージ溶媒

チャージ溶媒の溶媒は、精製の初期溶出条件以下の濃度でサンプルを調製することが理想的です。例えば、ヘキサン/酢酸エチル = 9/1 の条件で溶出を開始する場合、10%以下の酢酸エチルでサンプルを調製します。これにより、サンプル注入時のサンプルバンドの広がりを最小限に抑え、より良好なクロマトグラフィー挙動を得ることができます。

初期濃度以下の溶媒で溶けない場合は、溶解度の高い溶媒を使用します。

第一選択としてジクロロメタン (DCM) がよく用いられます。ジクロロメタン (DCM) 単独では難しい場合は、低極性化合物の場合はトルエンを、高極性化合物の場合はアセトニトリル (MeCN) や N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) を組み合わせることが多いです。より極性の化合物には、DCM とメタノール (MeOH) の溶媒の組み合わせが必要になることがよくありますが、これは難しい場合があります。DCM/MeOH の代替は DCM/MeCN です。

2. チャージする液量

サンプル調製の際は、「濃く少量」の原則を守ることが重要です。この原則は、バイオタージのカラムに限らず、オープンカラムでも同じことが言えます。サンプル量 (液量) が多すぎると分離効率が低下し、ピークの広がりや分離不良を引き起こす可能性があるためです。

バイオタージのパックドカラム Biotage® Sfär を使用する場合には、カラム容量の 1.5% を上限とすることを推奨します。各カラムサイズの最大インジェクションボリュームを下の表にまとめていますので、参考にしてください。

Column size (g)	CV (mL)	Max. injection volume (mL)
5	9	0.15
10	15	0.25
25	42	0.65
50	80	1.20
100	150	2.25
200	310	4.65
350	530	7.95



図2 : Sfär カラムへの Loading guideline と Biotage® Sfär 外観

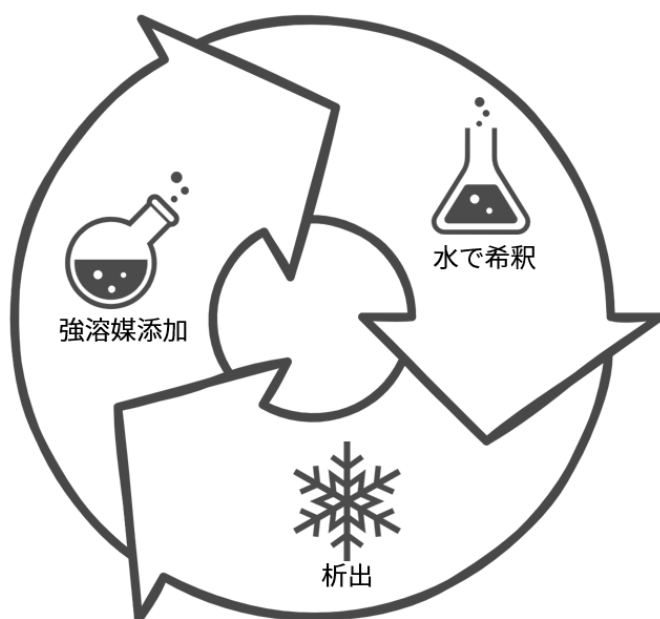
3.4.2 逆相のサンプルチャージ

逆相クロマトグラフィーにおけるサンプルチャージでは、主に二つの方法があります。

一つ目の方法は、順相の時と同様、なるべく少量で溶ける溶媒でチャージする方法です。溶解溶媒中のサンプルの濃度を最大にして分離性能を最大化します。DMSO、メタノール、DMFなどの溶解力の高い溶媒がよく使われると思いますが、溶出力の強いメタノールはなるべく避けたほうが無難です。どの溶媒で溶かしたらよいか迷ったら、DMSOを第一選択で試してみてください。多くの有機化合物に対して高い溶解性を示すため、サンプルを少量の溶媒で溶かしてチャージすることができます。

チャージ量の上限目安は、バイオタージのパックドカラム Sfär の場合、カラム容量の3%とされています。これは順相の場合よりも多めです。これは、逆相では初期の溶出条件が水を多く含む極性の高い溶媒系であるため、有機溶媒でチャージしたサンプルがカラム上部で一時的に濃縮されることによります。

二つ目の方法は、グラジエント条件の初期濃度で溶けるまで、強溶媒と水を交互に加えながら希釈を何度か繰り返す方法です。この方法では、水やメタノールなどの逆相の移動相と同じ系統の溶媒で徐々に希釈し、完全に溶解したサンプルをポンプでカラムに直接ロードします。



グラジエント初期濃度まで希釈を繰り返す

図3：逆相サンプルの希釈方法の概要

この方法は、特に水溶性の高いサンプルや、初期溶出条件に近い状態でカラムにチャージしたい場合に有効です。

さらに、pH を変えることで溶解度を向上させる方法もあります。希塩酸、TFA、アンモニア水、各種バッファーなどを使用して、サンプルのイオン化状態を変化させ、溶解度を向上させることができます。この方法は、特にイオン化可能な官能基を持つ化合物に対して効果的です。

3.4.3 重要なポイント

サンプルチャージにおいて最も重要なのは、サンプルの溶解度と初期溶出条件を十分に考慮して溶媒を選択することです。サンプルが完全に溶解していることはもちろんですが、同時に初期溶出条件との相性も考慮する必要があります。初期溶出条件との相性が悪い場合、析出を起こすリスクがありますので、化合物の特性を見極めながら、サンプルを溶解する溶媒や溶出条件を検討することが大切です。

また、カラム容量に対する適切なチャージ量を守ることも重要です。過剰なサンプル量は、カラムの過負荷を引き起こし、分離能の低下や析出のトラブルにつながる可能性があります。

適切なサンプルチャージは、ピークの形状改善、分離能の向上、そしてトラブルの回避につながります。次章からは、フラッシュ精製における具体的なトラブルとその回避策について詳しく解説していきます。



4. トラブル 1：難溶性化合物のチャージ

4.1 問題の概要と影響

フラッシュ精製において、難溶性化合物のチャージは最も頻繁に遭遇する課題の一つです。実際、トラブルの内容をユーザーにアンケート調査したところ（2021年当社実施）、78%がこの問題を経験したと回答しています。

難溶性化合物のチャージが適切に行われない場合、様々な問題が発生します。まず、サンプルのロスによる回収率の低下が挙げられます。十分に溶解していないサンプルは、カラムに効果的にチャージできず、貴重な化合物が失われる可能性があります。次に、カラム上部で結晶化が生じるリスクが高くなることが問題となります。サンプルが溶媒中で再結晶化すると、カラムの上部で詰まりが生じ、溶出効率が著しく低下します。さらに、不均一なサンプル導入による分離能の低下も重要な問題です。サンプルが均一に導入されないと、ピークの広がりや分離の悪化につながり、精製の質が低下します。

これらの問題は、精製プロセス全体の効率と成功に大きな影響を与えます。そのため、難溶性化合物のチャージ問題を適切に解決することは、フラッシュ精製の成功には不可欠です。

4.2 解決策

難溶性化合物のチャージ問題に対する基本的なアプローチは、「サンプルを確実に溶解し、精製カラム本体とは別の充填剤に吸着させる」ことです。充填剤への吸着には、次の3つの方法が効果的です。

1. 塗し法
2. カラム連結法
3. Samplet 使用法

個々のアプローチの解説に入る前に、要する時間と溶出への影響について図解でまとめました。

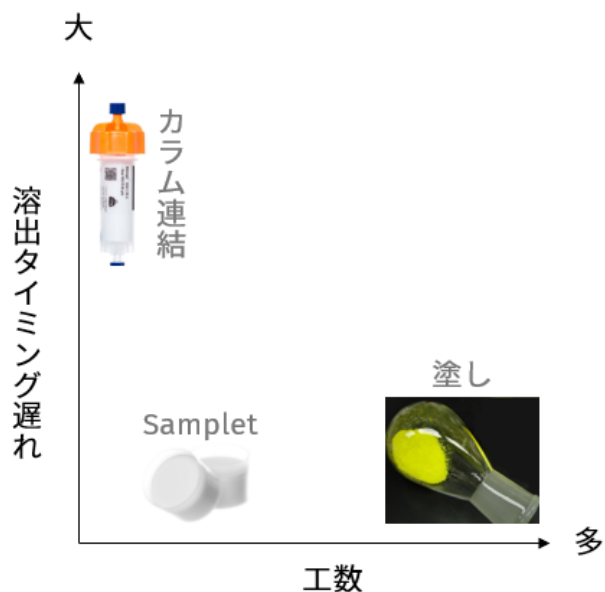


図4：充填剤を使ったサンプルチャージ方法の比較

4.2.1 塗し法

塗し法は、最も伝統的かつ汎用性の高い方法の一つです。この方法では、バルクのシリカゲルを使用してサンプルを固定相に吸着させます。

具体的な手順は以下の通りです。



図5：塗し法の手順の概要

まず、溶け残りの無いようにサンプルを溶媒に溶かします。この段階では、溶出力の高い溶媒を使用しても問題ありません。この後にエバポレーションが控えているので、なるべく少量で溶かすこと、且つ沸点がなるべく低い溶媒で溶かすことがポイントです。

次に、この溶液をシリカゲルに均一に塗布します。この際、サンプルがシリカゲル全体に均一に分布するよう注意深く作業を行います。また、シリカゲルの量が少ないと均一にならず玉状になる場合があるため、適切な量のシリカゲルを使用してください。

その後、溶媒を完全に蒸発させます。最後に、乾燥したシリカゲルをカラムの上部に積層します。Sfär カラムでは、本体カラム 1 本でオープンカラムでの塗しを再現することができます。キャップを開けて中蓋を取ると、シリカゲルを入れる空間ができるので、そこに塗しシリカゲルを積層します。シリカゲルの逆流防止に脱脂綿を使用するとよいでしょう。

塗し法の最大の利点は、溶かす溶媒を気にせずチャージできることです。通常のチャージでは問題となる高極性溶媒や、初期溶出条件と大きく異なる溶媒でもサンプルを溶解させることができます。また、大きなボリュームのサンプルを扱える点も大きな利点です。

一方で、この方法にはいくつかの欠点もあります。まず、プロセス全体に時間がかかります。特に、溶媒の完全な蒸発には十分な時間が必要です。また、均一に塗すにはある程度のコツが必要であり、経験の少ない研究者にとっては難しい場合があります。さらに、エバポレーターが汚染される可能性もあるため、使用する機器の選択と後処理に注意が必要です。

4.2.2 カラム連結法

カラム連結法は、メインのカラムの上に小さな追加カラムを接続することで、難溶性化合物のチャージ問題に対処する方法です。



メインカラム (Si 60 μ m)	チャージ用
Sfär D 10 g	Sfär D 5 g
Sfär D 25 g	Sfär D 10 g
Sfär D 50 g	Sfär D 25 g

図 6：カラム連結時のチャージ用に追加するカラムサイズの選び方

バイオタージの Sfär カラムを使う時の具体的な手順は以下の通りです。

[Step 1] メインカラムの1つ小さいサイズの充填カラムを用意する

例えば、メインカラムが Sfär D 25 g の場合、チャージ用に Sfär D 10 g を使用します。もしくは、Sfär D 10g の Empty カラムに適量の担体（シリカゲルなど）を充填します。

[Step 2] サンプルを溶ける溶媒に溶かし、この追加カラムに注入する

[Step 3] 追加カラムをメインカラムの上部に接続する

[Step 4] 精製開始

カラム連結法の最大の利点は、シリカの量が増えることで理論段を高め、サンプル溶解液の影響を相殺できることです。これにより、難溶性化合物を溶解させるために使用した高極性溶媒や、初期溶出条件と異なる溶媒の影響を軽減することができます。また、サンプルの均一な導入が可能となり、分離効率の向上にもつながります。

一方で、この方法の欠点としては、追加のカラムが必要となることが挙げられます。これにより、コストが増加する可能性があります。また、溶出の遅れが他の2つの方法に比べて大きいことも留意する必要があります。

カラム連結法を成功させるためのポイントは、適切なカラムの組み合わせを選択することです。先述したサイズを選択も重要ですが、シリカゲル以外にも珪藻土など他の種類の担体が効果的な場合もあります。

4.2.3 Samplet 使用法

Samplet 使用法は、Sfär カラム専用のサンプルチャージ用カラム Biotage® Samplet を使用して難溶性化合物のチャージを行う方法です。この方法は、最新の技術を活用した効率的なアプローチといえます。

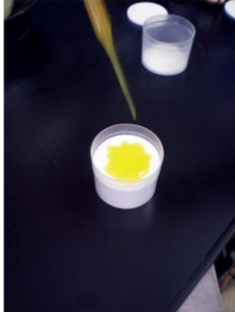
STEP1**浸透****STEP2****乾燥****STEP3****装着**

図7：Samplet の使い方 3 STEP

Samplet 使用法の手順は非常にシンプルです。まず、サンプルを溶媒で完全に溶かし、Samplet に注入します。次に、溶媒をカートリッジ内に浸透させます。その後、溶媒を乾燥させます。乾燥が完了したら、Samplet カートリッジをカラムの上部に装着し、通常の溶出を開始します。より詳しい情報を知りたい方は下記をご覧ください。

[Sfär Samplet - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

[Samplet 使用方法 - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

この方法の最大の利点は、その迅速さと簡便さにあります。わずか3ステップで簡単にチャージを行うことができ、塗り法のような煩雑な操作が不要です。また、カラム連結法は溶出時間の遅れが。さらに、塗り法と同様に、溶媒の選択に関する制約が少ないという利点もあります。

一方で、Samplet 使用法の欠点としては、Samplet カートリッジの追加コストが必要となること挙げられます。また、カートリッジの容量の制限から、大きいボリュームのサンプルを扱う場合には不向きです。

Samplet 使用法は、特に時間の制約などがあり早く精製することが求められる場合や、再現性の高い結果が求められる場合に適しています。また、経験の少ない学生や精製の初心者の方に容易に使用できるという点で、教育現場や新人トレーニングにも適した方法と言えるでしょう。

4.3 方法の選択と最適化

最適なチャージ方法の選択は、以下の要因を総合的に考慮して行う必要があります。

- **サンプルの性質**：化合物の溶解度、安定性、揮発性などの特性を考慮します。例えば、揮発性の高い化合物の場合は塗し法よりも Samplet やカラムを追加する方が適しています。
- **取り扱うサンプル量**：大量のサンプルを扱う場合は塗し法が適していますが、少量のサンプルであれば Samplet 使用法が効率的です。
- **利用可能な時間と資源**：時間に余裕がある場合は塗し法を選択できますが、迅速な処理が必要な場合は Samplet 使用法やカラム連結法が適しています。
- **必要とされる分離の精度**：高度な分離が必要な場合は、カラム連結法が適している可能性があります。これは、カラムを追加することによって理論段数が増加し、より精密な分離が可能になるためです。

結論として、難溶性化合物のチャージ問題に対する最適な解決策は、個々の状況に応じて異なります。塗し法、カラム連結法、Samplet 使用法のそれぞれに長所と短所があり、サンプルの性質、必要な分離効率、利用可能な時間とリソースなどを総合的に考慮して選択する必要があります。さらに、選択した方法を基に、溶媒系、グラジエント条件、スケールアップなどの最適化を行うことで、フラッシュ精製の効率と成功率を大幅に向上させることができます。

最後に、フラッシュ精製は経験と技術の蓄積が重要な分野です。これらの方法を実践し、結果を詳細に記録・分析することで、研究室独自のノウハウを築き上げていくことができます。また、新しい技術や装置の導入にも常に注目し、より効率的で信頼性の高い精製プロセスの確立を目指すことが重要です。

5. トラブル 2：精製中の結晶化

5.1 問題の概要と影響

フラッシュ精製は、有機合成における重要な精製手法ですが、時として予期せぬ問題に直面することがあります。特に厄介なのが、精製中に結晶化が生じることです。この現象は、特に溶解度が低い化合物や、カラムサイズに対して過剰量のサンプルをチャージした際に起こりやすくなります。

結晶化が起こると、以下のような深刻な影響をもたらす可能性があります。

1. 分離効率の低下：カラム内で目的物質が析出すると、物質の移動が妨げられ、分離の効率が著しく低下します。これにより、ピークのブロード化や分離不良が生じ、純度の高い目的物を得ることが困難になります。

2. カラムの損傷リスク：結晶化した物質がカラム内に蓄積されると、カラムの詰まりや圧力上昇を引き起こす可能性があります。これは機器に過度の負荷をかけ、最悪の場合、カラムや装置の損傷につながる恐れがあります。

3. 回収率の低下：結晶化した物質の一部がカラム内に留まってしまうと、目的物質の回収率が大幅に低下する可能性があります。これは特に貴重なサンプルや少量しか合成できない化合物を扱う際に、大きな問題となります。

4. 再現性の低下：結晶化の発生は予測が難しく、同じ条件で精製を行っても結果が安定しないことがあります。これは実験の再現性を損ない、研究や開発のプロセスに支障をきたす可能性があります。

これらの問題は、単に精製の効率や純度を下げるだけでなく、研究全体の進捗やデータの信頼性、さらには再現性にも大きな影響を与える可能性があります。したがって、結晶化の発生を未然に防ぐことは、フラッシュ精製を成功させる上で極めて重要です。

5.2 解決策

フラッシュ精製において、溶解性の低い化合物や結晶化しやすい化合物を扱うことは少なくありません。このような場合、結晶化を防ぐための効果的な対策が重要になります。ここでは、実務で特に有用な3つのアプローチをご紹介します。

5.2.1 ハイスピード精製

結晶化を防ぐ直接的な方法の一つは、化合物がカラム内で結晶化する前に精製を完了させることです。これを実現するのがハイスピード精製です。

バイオタージの自動フラッシュ精製装置 Biotage® Selekt は、この目的に最適な高流速・高耐圧性能を備えています。従来のシステムと比較して2~3倍の速さで精製を行うことができるため、結晶化のリスクを大幅に低減できます。

Biotage® Selekt がどれだけ効率的な精製を実現できるのか、具体例を示します。

例えば、サンプル 100 mg（メチルパラベンとブチルパラベンのミックス）の場合、14CV の精製が5分で完了可能です。

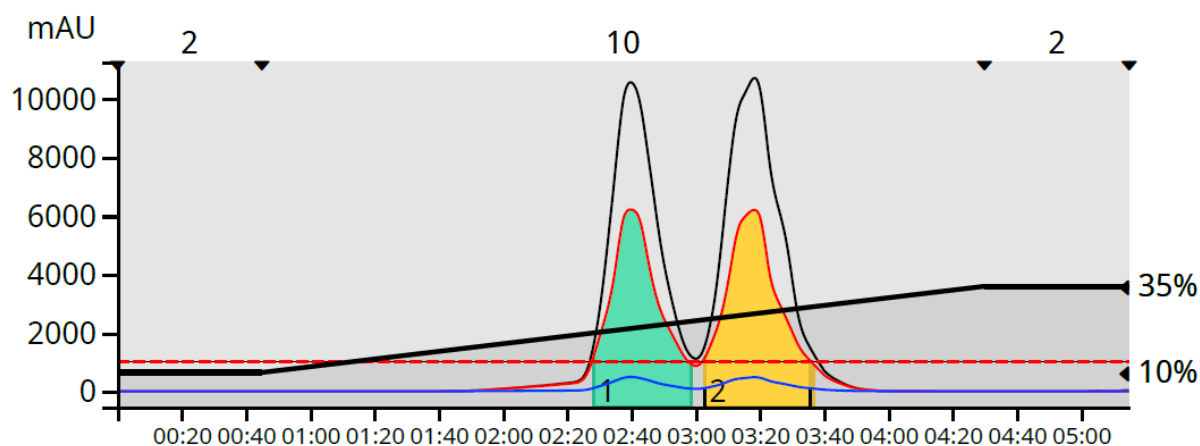


図8 : Biotage® Sfär HC Duo 10g カラム, 40 mL/min. で精製した時のクロマトグラム

この高速精製により、化合物が溶媒中に留まる時間が短縮され、結晶化の機会を大幅に減らすことができます。また、高速での精製は全体的な実験効率の向上にもつながり、一石二鳥の効果が期待できます。

ただし、ハイスピード精製を行う際は、カラムと装置の耐圧性能、圧力の監視に注意を払う必要があります。高流速に耐えられる高性能なカラムを選択し、システムの圧力限界を超え

ないよう注意深くモニタリングすることが重要です。他社の装置を使用される際は、ご利用のメーカーにご確認いただくのがよいと思います。

[Selekt - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

5.2.2 溶媒系の工夫

結晶化問題に対する次のアプローチは、使用する溶媒系の変更です。特にヘキサン/酢酸エチル系で結晶化が起こる場合、以下の2つの方法が効果的です。

a) クロロホルム（またはジクロロメタン）/メタノール系での精製

クロロホルム/メタノール系は、多様な有機化合物に対して高い溶解性を示します。クロロホルムやジクロロメタンは非極性から中程度の極性を有する化合物に適した溶媒であり、一方、メタノールは極性の高い化合物の溶解を促進します。この溶媒の組み合わせにより、幅広い極性範囲の化合物に対応することが可能となります。ただし、溶媒系の変更に伴い、化合物の溶出順序が変わる可能性があるため、事前に TLC などでの分離挙動を確認することをお勧めします。

ハロゲン系の溶媒の使用を避けたい場合は、下記のブログとホワイトペーパーをぜひご覧ください。

有機化学ブログ：[【vol.26】極性反応混合物の精製において、DCM/MeOHの代わりになるものは何ですか？ - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

ホワイトペーパー：[より安全で環境に優しいフラッシュクロマトグラフィーを実現するためのヒント - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

b) バックグラウンド溶媒の添加

もう一つの効果的な方法は、バックグラウンド溶媒を添加することです。具体的には、ヘキサン/酢酸エチル系のグラジエントは変更せず、クロロホルムやジクロロメタンなど、溶解度が高く溶出力の低い溶媒を一定濃度で流し続けます。

この方法の利点についてまとめます。

- 結晶化の抑制：常に高い溶解度を維持することで、結晶化のリスクを低減します。

- 分離への影響が少ない：溶出力の低い溶媒を選択することで、分離性能への影響を最小限に抑えられます。
- 柔軟な調整が可能：バックグラウンド溶媒の濃度を調整することで、結晶化抑制効果と分離性能のバランスを取ることができます。

Biotage® Selekt システムでは、Additive 機能を使用することで、このバックグラウンド溶媒の添加を簡単に行うことができます。システムが自動的に設定した濃度で溶媒を添加するため、操作が簡便で再現性も高くなります。



図9：Biotage® Selekt の操作画面：ヘキサン/酢酸エチルで10%-60%のグラジエント条件、バックグラウンドでジクロロメタンを10%流し続ける設定。
※オレンジ色の点線、囲みは筆者が追加したもの

5.2.3 pH 調整

溶解度が pH に依存する場合、適切な pH 調整が結晶化の抑制に効果的です。逆相精製など極性溶媒中では、化合物をイオン化させる方向に pH を調整することで溶解度を高め、結晶化を抑制する効果が期待できます。一方、非極性溶媒中での効果は限定的ですが、酸性また

は塩基性の添加剤（例：トリフルオロ酢酸やトリエチルアミン）を少量加えることで、化合物の表面電荷や相互作用が変化し、シリカゲルとの吸着・脱着のバランスが調整され、間接的に結晶化リスクの低減効果が見込まれることがあります。

Biotage® Selekt を所持している場合、pH 調整のバッファーもしくは添加剤入り溶媒を Additive 機能で第三の溶媒に設定して、流し続けるすることも可能です。

pH 調整には、以下の添加剤が使用されます。

- 酸性条件…希塩酸、トリフルオロ酢酸（TFA）
- 塩基性条件…アンモニア水、トリエチルアミン（TEA）
- 中性条件維持…リン酸バッファーなどの各種バッファー溶液

pH 調整を行う際は、以下の点に注意してください。

1. 化合物の安定性

極端な pH 条件下では、化合物が分解する可能性があります。化合物の安定性を考慮して pH を選択することが重要です。

2. 分離への影響

pH の変更は化合物の保持挙動に影響を与えるため、分離パターンが変化する可能性があります。事前に TLC などを確認することをお勧めします。

3. 装置への影響

極端な pH 条件は装置を傷める可能性があるため、装置の pH 範囲に適合する条件で実施してください。

結晶化は確かに厄介な問題ですが、本セクションで紹介した戦略とバイオタージの技術を適切に活用することで、効果的に対処することができます。ただし、完璧な解決策は存在せず、化合物の特性や精製の目的に応じて、最適なアプローチを選択することが重要です。

6. トラブル 3：カラムへの目的物の吸着

6.1 問題の概要と影響

フラッシュ精製において、目的物がカラムに強く吸着し、溶出が困難になる問題は、多くのケミストが直面する課題です。この現象は、分子間相互作用に基づいており、主に van der Waals 力、水素結合、静電相互作用などの要因が関与します。これらの相互作用が過度に強くなると、分離効率が著しく低下し、場合によっては目的物の回収が困難になることもあります。

6.2 事前評価の重要性

カラム吸着の問題を未然に防ぐことは、分離プロセスの効率化や目的物の高収率回収を実現する上で非常に重要です。特に、強く吸着する化合物では溶出が困難になり、目的物の分離や回収が不可能になる可能性もあるため、事前にこうしたトラブルを回避する手段を講じる必要があります。このため、TLC（薄層クロマトグラフィー）で目的物の挙動を確認し、固定相と移動相の相互作用を小スケールで再現することが効果的です。TLC プレート上で原点からほとんど移動しない、またはテーリングが強い化合物は、カラムクロマトグラフィーでも強く吸着する可能性が高いと予測され、吸着トラブルの事前評価に役立ちます。

6.3 解決策

事前評価で吸着の可能性が高いと判断された場合、フラッシュ精製を精製する手段として選ぶ場合は以下の項目について最適化を検討します。

1. チャージ方法
2. 移動相
3. カラムの種類

6.3.1 チャージ方法の最適化

吸着性の高い化合物では、シリカゲルとの接触時間を最小限に抑えることが重要です。特に、従来のシリカゲルによる塗布法（塗し法）は、目的物が固定相と長時間接触するため避けるべきです。サンプル溶液を直接カラムにチャージする方法を推奨します。この際、サンプル溶液の濃度を適切に調整し、できるだけ少量でチャージすることで、バンドの広がりを抑制できます。

塗し法よりも手軽にチャージできる方法として『4.2.3 Samplet 使用法』で紹介した Samplet の活用も選択肢の一つです。Samplet には、珪藻土タイプや C18 タイプなど、目的に応じて選択可能な製品が用意されています。特に珪藻土タイプは、シリカゲルと比較して吸着性が低く、目的物との相互作用が弱いため、吸着性の高い化合物のサンプルチャージに適しています。また、極性の高い化合物では、逆相担体である C18 タイプの使用も効果的です。このように、化合物の性質に応じて適切なタイプの Samplet を選択することで、吸着トラブルを回避しつつ、効率的なチャージが可能となります。

[Sfär Samplet - バイオタージ・ジャパン株式会社](#)

6.3.2 移動相の最適化

移動相の pH を適切に調整することで、目的物の溶出を促進できる場合があります。この方法は、化合物のプロトン化状態を変えることで、固定相との相互作用を制御するものです。

例えば、メタノールに少量の TEA（トリエチルアミン）を添加した移動相は、特に塩基性化合物の分離に有効です。これは、TEA がシリカゲルの酸性シラノール基（ $pK_a \approx 4.9-7.1$ ）と競合的に相互作用し、塩基性化合物のプロトン化を抑制するためです。また、TEA が酸性シラノール基のプロトンを取り込み、シリカゲル表面の活性が低下することで、目的物の吸着がさらに抑えられます。

pH を調整することで、化合物のイオン化状態を制御し、固定相との相互作用を最適化することが可能となります。

6.3.3 カラムの種類最適化

シリカゲルへの吸着が強すぎる場合、アミノ基修飾シリカゲルカラム（NH₂ カラム）や C18 修飾シリカゲルカラム（C18 カラム）などの修飾基が付いたカラムに変更することが効果的です。これは、固定相の表面化学を変更することで、目的物との相互作用を制御する方法です。

バイオタージでは、下記の表で示すように4種類の修飾カラムを取り扱っています。

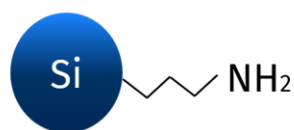
表2：Biotage® Sfär 修飾カラムの種類

Media Type	Model	Silica Size (µm)	Pore Width (Å)
Silica NH2	Amino D	50	60
Silica C18	C18 D	30	100
Silica C18	Bio C18 D	20	300
Silica C4	Bio C4 D	20	300

これらの修飾カラムは、それぞれ特徴的な官能基を持ち、異なる分離メカニズムを示します。アミノ基修飾カラムは弱塩基性の性質を有し、C18 および C4 カラムは疎水性相互作用を示します。

順相フラッシュ精製を第一選択にしている場合はアミノ基修飾カラムが候補となります。ただし、アセトン、アルデヒド、ケトン類との使用は適していないことに留意してください。これらの化合物はアミノ基と相互作用し、化学反応を引き起こしてしまう恐れがあるためです。

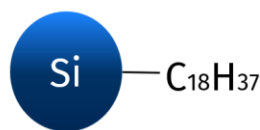
■ NH₂固定相イメージ



修飾基：アミノプロピル基

【NG】アセトン、アルデヒド、ケトン類

■ C18固定相イメージ



修飾基：オクタデシル基

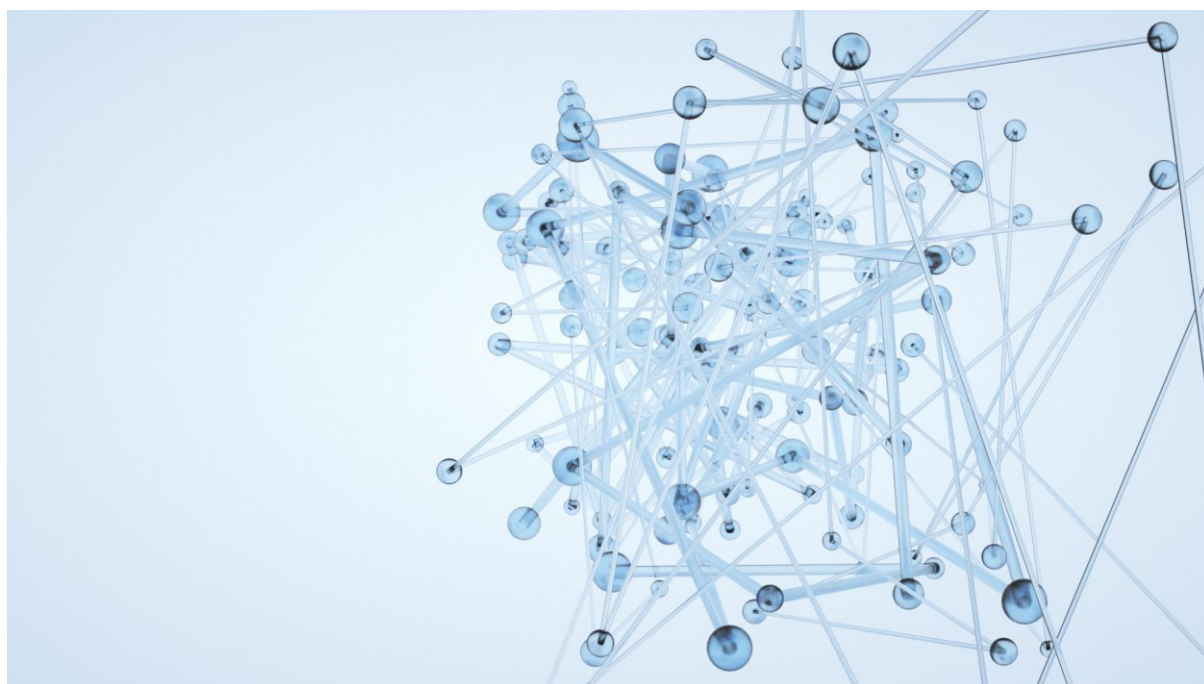
図10：修飾カラム (NH₂, C18) の固定相のイメージ

C18 カラムは第2章「フラッシュ精製の基本原理」で述べた通り、疎水性化合物の分離に適しています。これは、C18 カラムの固定相に結合したオクタデシル基が疎水性相互作用を介して非極性化合物と選択的に結合するためです。一方、シリカゲルに強く吸着する化合物は一般に高い極性を有しており、オクタデシル基との相互作用は比較的弱くなる傾向があります。そのため、シリカゲルで吸着が強く溶出が困難なサンプルに対しては、C18 カラムを試すことで、分離効率が向上する可能性があります。C18 カラムの使用は、吸着によるトラブルを回避し、目的物の効率的な回収をサポートする選択肢として有用です。

C4 修飾シリカゲルカラム (C4 カラム) は一般的に高分子化合物の分離に用いられます。これは、C4 鎖が C18 鎖よりも短いため、立体障害が少なく、高分子量化合物でも固定相と適度に相互作用できるためです。疎水性が C8 や C18 よりも低く、分析物の保持時間が短くな

る傾向があります。この特性により、特定の化合物の分離において、他の逆相カラムとは異なる選択性を示すことがあります。

目的物のカラムへの吸着は精製を困難にするトラブルの一つですが、まずは TLC 等で事前評価することがトラブル回避の第一歩です。シリカゲルへの吸着が強く、且つフラッシュ精製を実施する場合は、試料の物理化学的特性に応じて、先述の三つのアプローチから最適な解決策を検討してください。試料の特性や実験の目的に応じて、最も効果的と考えられるアプローチを選択することが重要です。また、複数のアプローチを組み合わせることで、より良い分離条件を見出せる可能性もあります。



参考資料

Which sample solvents work best with normal-phase flash column chromatography? (biotage.com)

<https://www.biotage.com/blog/which-sample-solvents-work-best-with-normal-phase-flash-column-chromatography>

What is the maximum volume I can load on my reversed-phase flash column? (biotage.com)

<https://www.biotage.com/blog/what-is-the-maximum-volume-i-can-load-on-my-reversed-phase-flash-column>

Can organic solvent choice impact reversed phase flash chromatography separations? (biotage.com)

<https://www.biotage.com/blog/can-organic-solvent-choice-impact-reversed-phase-flash-chromatography-separations>

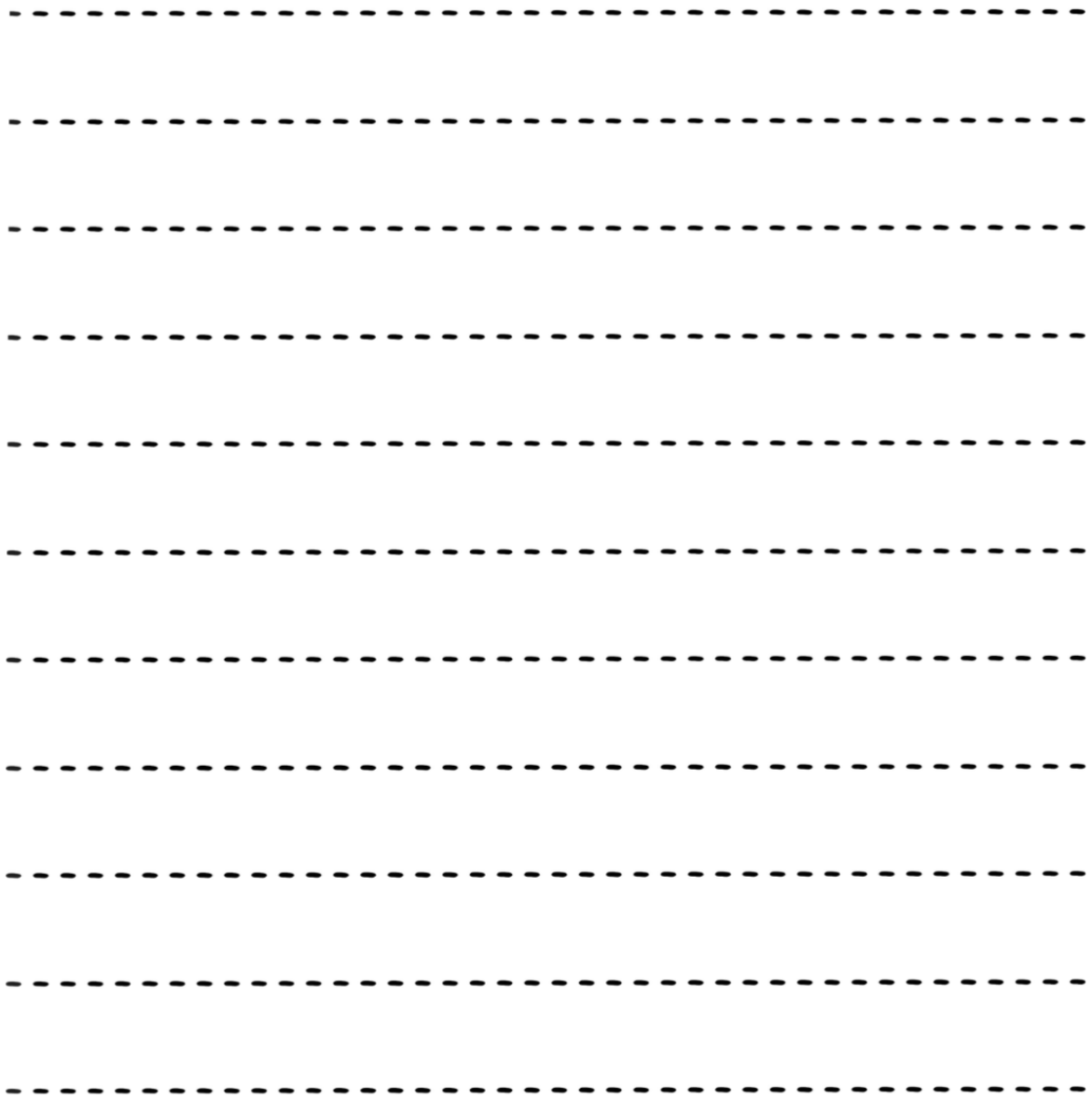
How do I decide between normal- or reversed-phase flash column chromatography? (biotage.com)

<https://www.biotage.com/blog/how-do-i-decide-between-normal-or-reversed-phase-flash-column-chromatography>

Successful Flash Chromatography - A White Paper from Biotage – (biotage.com)

<https://www.biotage.com/hubfs/bynder/Document/PPS490.V.6-biotage-successful-flash-chromatography-white-paper.pdf>





Your Complete Partner for Effective Chemistry

バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121

西日本：〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-28, 4F TEL 06-6397-8180 FAX 06-6397-8170

URL： <http://www.biotage.co.jp/> E-mail： Japan_info@biotage.com

Literature Number: wpjp3_mkt241204

© 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、脱漏等の責任は負いかねます。Biotage ABが所有するすべての商標のリストは、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。

© Biotage 2024

