



Biotage® Sfär Silica HC D
High Capacity Duo 20 µm

Pressure 17 bar/250 psi
Flowrate 80 mL/min
Capacity 0.5 g Si
M. 42.000

Biotage® flash cartridges User Guide

1. いまさら聞けない！理論編

5分で分かるフラッシュクロマトグラフィーの原理

1.1. シリカゲルに吸着??

フラッシュクロマトグラフィーによる精製では、シリカゲルが広く用いられています。化合物がシリカゲルに吸着するとよく言われますが、その原理が活性炭のような細孔への吸着ではなく、シリカゲル表面（順相の場合は水酸基：-OH、逆相の場合はオクタデシル基：C18）と化合物ならびに移動相との相互作用だという点はあまり着目されていません。

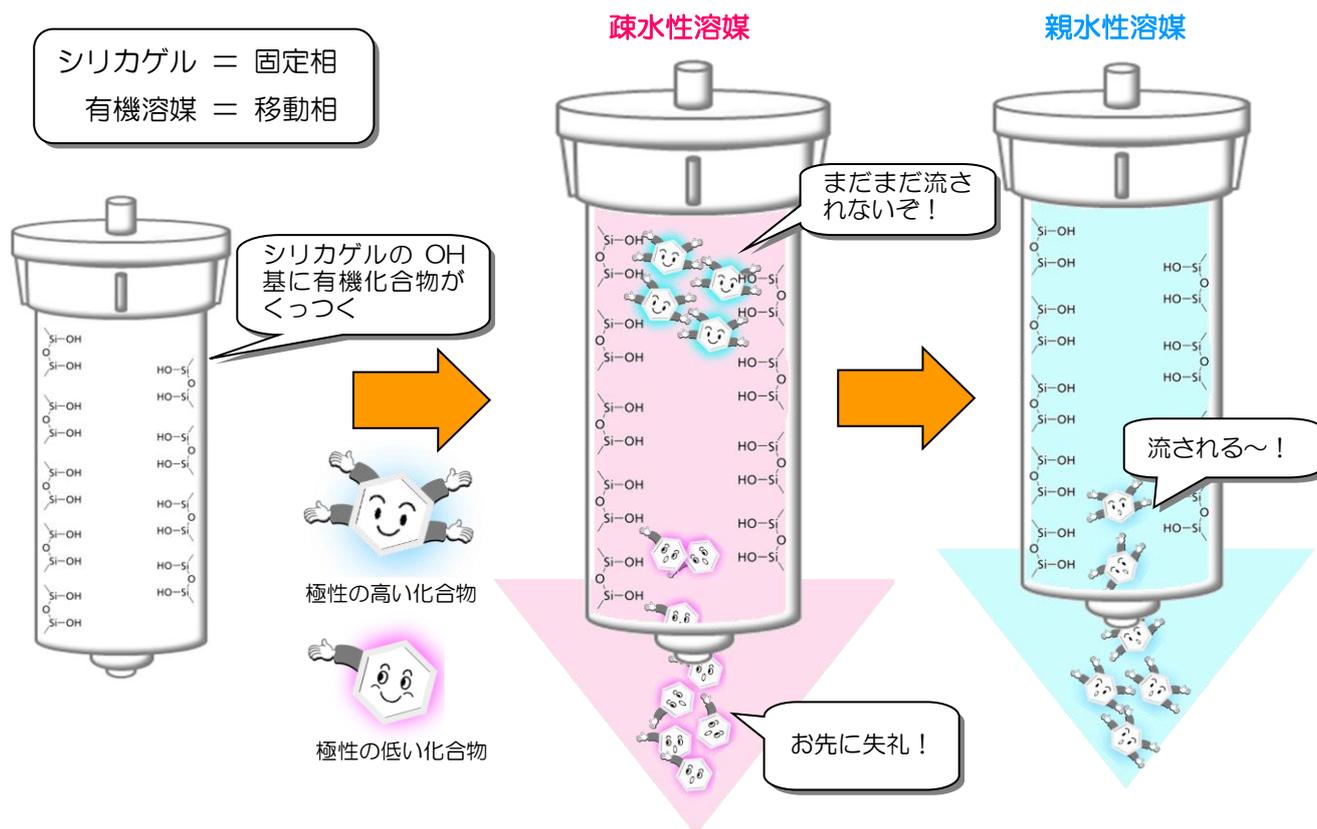


図1. シリカゲル表面と化合物および有溶媒との相互作用

1.2. 移動相について

シリカゲルが「固定相」と呼ばれるのに対し、カラム内を流れる液体を「移動相」と言います。クロマトグラフィーの場合、一般に疎水性溶媒と親水性溶媒を組み合わせた移動相を利用します。

例えば、順相クロマトグラフィーにおいて、酢酸エチルとヘキサンの組み合わせを移動相に用いた場合、酢酸エチル（親水性）の濃度が低い時は、疎水性化合物がカラムから溶出され、酢酸エチルの濃度が上がるにつれて親水性化合物がシリカゲルから引き離されていきます。

ただし、疎水性/親水性の相互作用のみでなく、溶媒特性も溶出に影響を与えますので注意が必要です。たとえばDCM（ジクロロメタン）等を使用すると全く違ったクロマトグラムになることもあります。

1.3. カラムボリュームとは？

カラムボリュームとは、シリカゲルカラム内に存在する隙間の体積を指します。その隙間を移動相で満たすために必要な溶媒量を1カラムボリュームと呼びます。カラムボリュームを基本として考えることでクロマトグラフィーを理論的に説明することができます。

1.4. Rf値とカラムボリューム値（CV値）の関係

カラムボリュームはカラムの大きさが変われば値も変化する絶対値ですが、CV値はTLCのRf値を逆数にした相対値です。（CV値 = 1 ÷ Rf値） **相対値であるCV値でクロマトグラフィーを考えると非常に分かりやすくなります。**この項ではCV値について、もっと詳しく説明していきます。

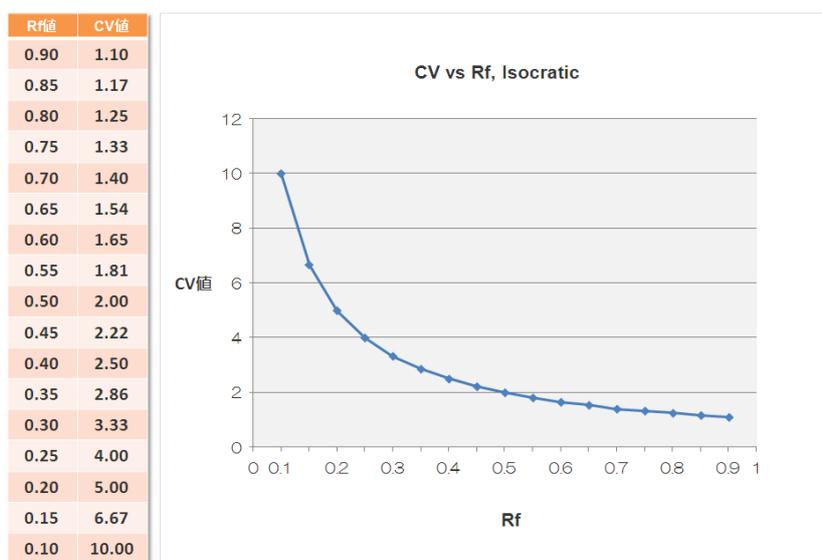


図2. Rf値とCV値の相関関係

図2は、Rf値とCV値の相関関係を表しています。例えば、Rf値が0.5の化合物はCV値が2なので、2カラムボリュームで溶出されます。また、Rf値0.2の場合は5CV流さなければ溶出しません。CV値はフラッシュカラムでの化合物の挙動と一致するので目的化合物のCV値を確認することは、カラムの前処理や分取を行う際に非常に有効です。

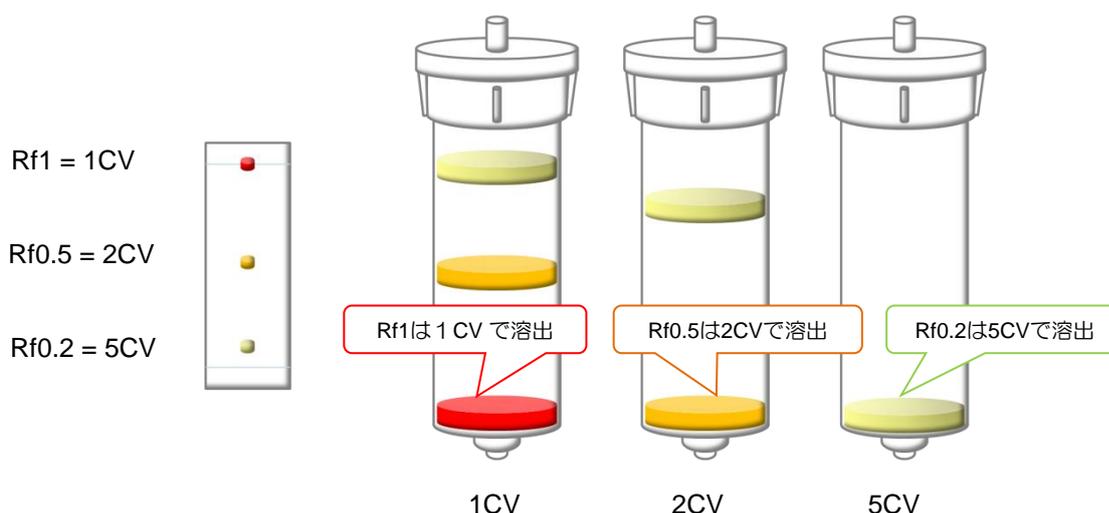
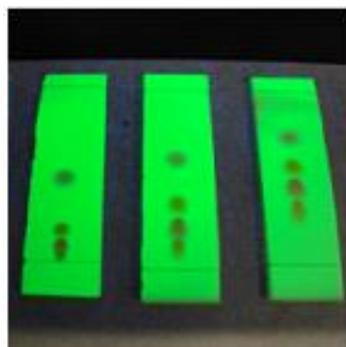


図3. TLCからカラムへ変換したイメージ

1.5. Rf値からクロマトグラムをイメージすると・・・。

Rf値からクロマトグラムをイメージすると、スポット間の距離を重視してしまいます。TLCでは、その距離を最大化する溶媒比率が最も分離が良好な条件ですが、その条件はフラッシュクロマトに転用できません。フラッシュクロマトの場合、TLCスポットが原点に近いほど、ピーク間の距離が離れていきます。

サンプル:
 1-Nitronaphthalene 0.2mg
 o-Nitroaniline 0.2mg
 m-Nitroaniline 0.2mg
 p-Nitroaniline 0.2mg

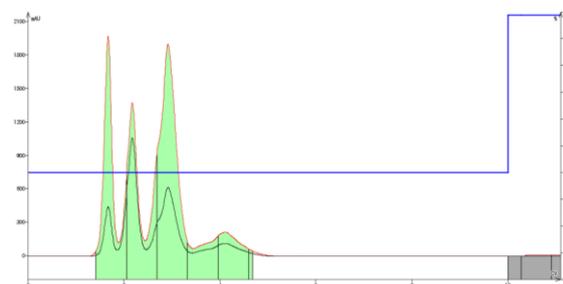


8 : 2 7 : 3 6 : 4

図4. Rfとクロマトグラフィーの関係

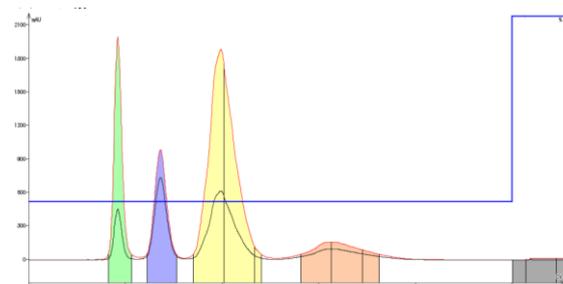
クロマト1.
ヘキサン/酢酸エチル

6 : 4



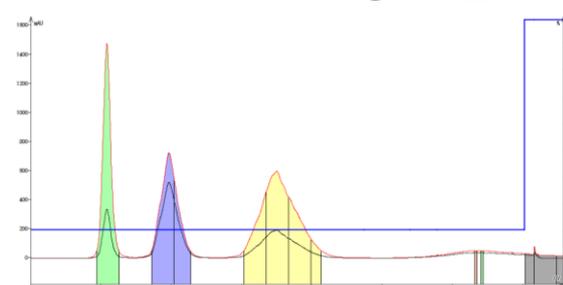
クロマト2.
ヘキサン/酢酸エチル

7 : 3



クロマト3.
ヘキサン/酢酸エチル

8 : 2



【溶媒強度の最適化】 詳細はQRへ

混合溶媒の強度計算は他の混合溶媒と比較する際に、例えば、強度が同じで選択性の異なる混合溶媒を用いた検討を行う場合に役立ちます。

混合溶媒の強度計算式:

$(A \text{ 溶媒の比率} \times \text{強度}) + (B \text{ 溶媒の比率} \times \text{強度})$

ヘキサン/酢酸エチル=60:40の場合

溶媒強度 = $(0.6 \times 0.01) +$

$(0.4 \times 0.58) = 0.24$



図3のTLCからは、スポット間が適度に離れている6:4の混合比率が適正と判断してしまいそうですが、クロマト1の様に結果は良好な分離が得られていません。また、原点付近に近すぎるとクロマト3の様にサンプルが拡散してしまって4つ目のピークが見えなくなってしまう危険性があります。つまり、Rf値だけでクロマトグラムを予想する事は難しい事が分かります。

良好な分離を得るには、移動相の溶媒組成を変更して必要な化合物のRf値を「0.15 - 0.35」に調整する事が重要です。

1.6. CV値からクロマトグラムをイメージする

CV値を求める事で、おおよそのクロマトグラムを事前に予想する事ができます。TLCからCV値を計算すると、化合物が溶出するタイミングから精製に必要な溶媒量まで計算が可能となります。下記に Sfär25gカートリッジを利用した場合の例を明記します。

Sfär25g : 1CV = 42 mL

化合物A : Rf0.55 = CV値1.74 = 73 mL後にピークトップを迎える

化合物B : Rf0.35 = CV値2.86 = 120 mL後にピークトップを迎える

化合物C : Rf0.20 = CV値5.00 = 210 mL後にピークトップを迎える

化合物D : Rf0.13 = CV値8.00 = 336 mL後にピークトップを迎える

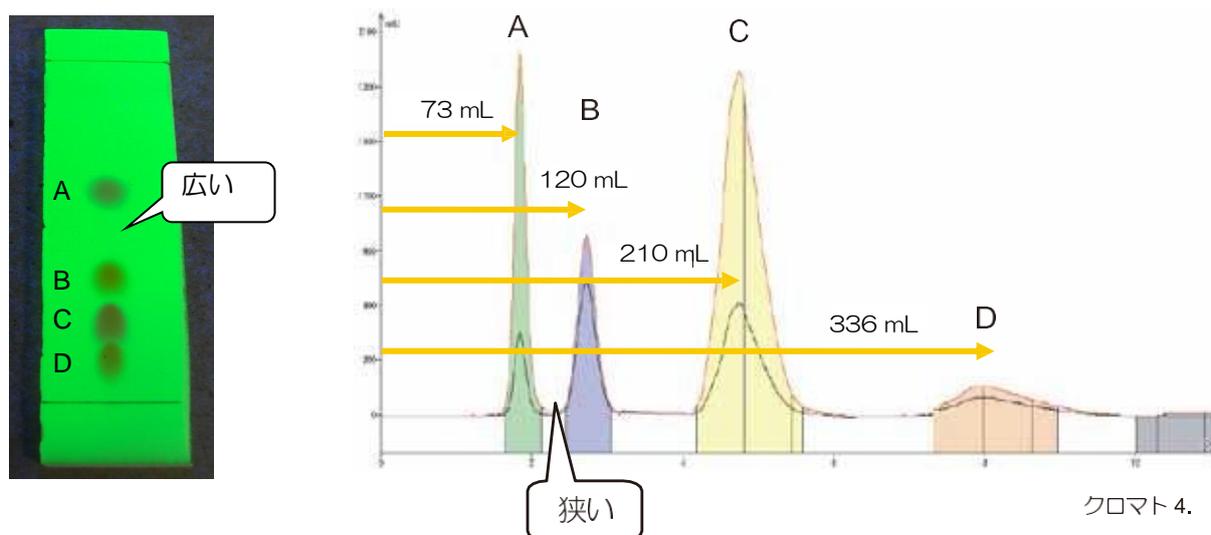


図5. クロマトグラフィーと使用溶媒量

1.7. 次はグラジエントを作きましょう！

グラジエントは一定のルールに則れば、どなたでも簡単に作成することができます。

【グラジエント作成のStep】

- 1) TLC溶媒比率の1/4濃度をスタートに設定して1CVキープ
- 2) 10CV かけてTLC溶媒比率の2倍に最終濃度を設定
- 3) 最終濃度を2CVキープ

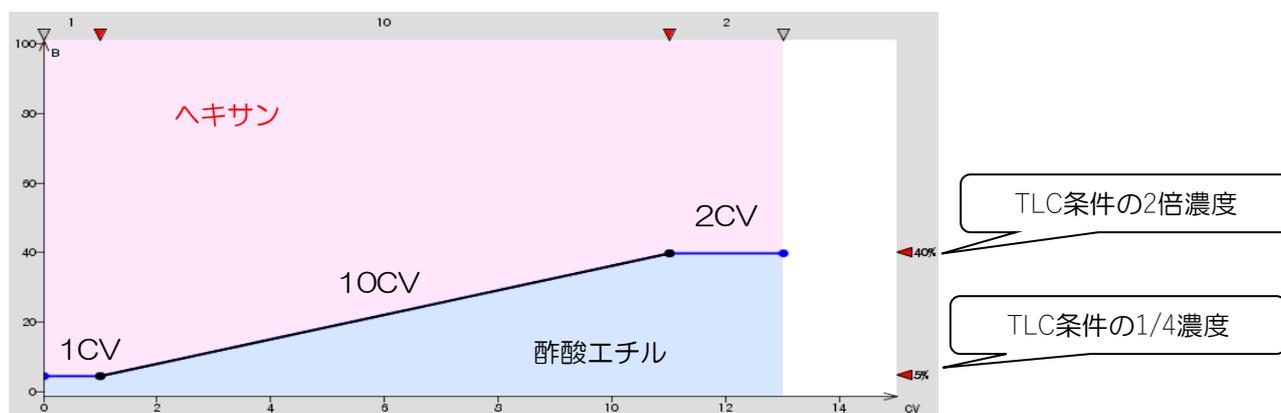


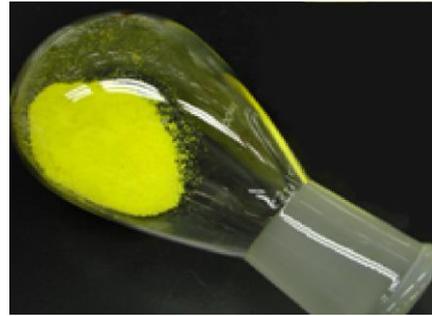
図6. グラジエント作成例

2. 難溶性化合物の精製には塗しが有効

難溶性サンプルには、シリカゲルに吸着させカラムに乗せるといったテクニックがあります。一般的に塗しと呼ばれています。その際、シリカゲルの量が少ないと均一に塗せず玉状になってしまう場合があります。一方で玉状にならないようにシリカゲルの量を増やすと、バンドが拡散して分離が悪くなる事があります。そのような場合は、シリカゲルの代わりに珪藻土（けいそうど）を利用する事をお勧めします。またシリカゲルに吸着させると不安定で分解してしまうようなサンプルの場合も珪藻土は有効です。

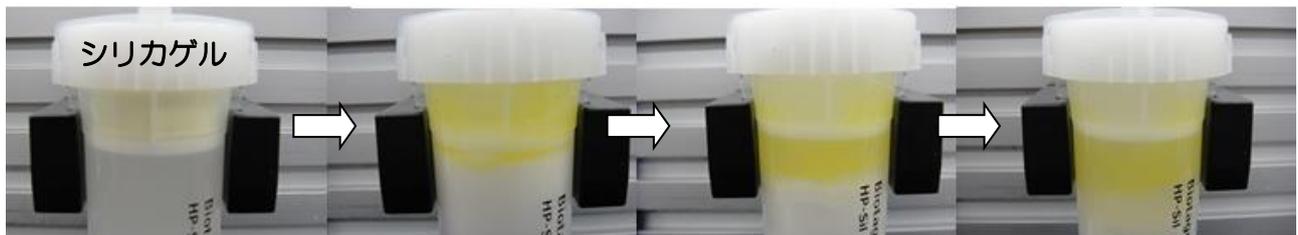
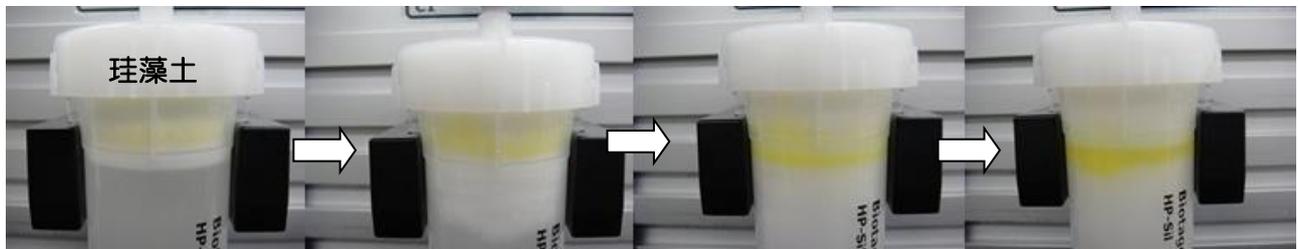


シリカゲル塗しの写真 (3g)



珪藻土塗しの写真 (3g)

珪藻土は、シリカゲルと違いサンプルとの相互作用がないので、バンドの広がりを抑えます。また、吸湿性に大変優れているので、少量できれいに塗す事ができます。



珪藻土バルク

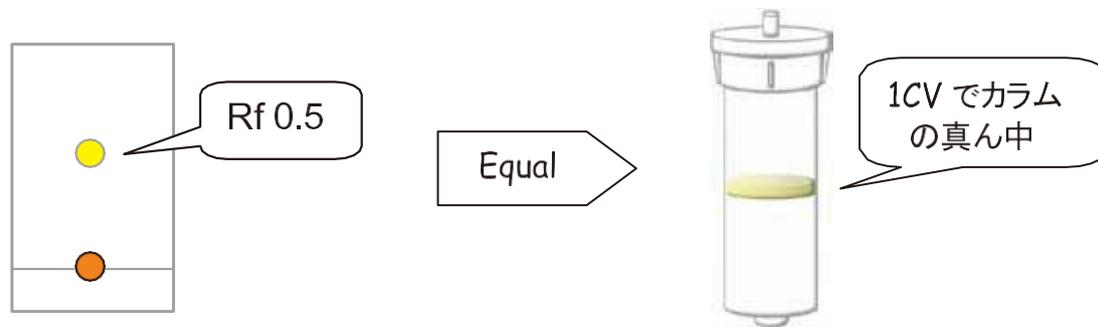
Parts Number	Description	Quantity
9800-0500	ISOLUTE HM-N, Bulk	500 g
9800-1000	ISOLUTE HM-N, Bulk	1 Kg
9800-0500	ISOLUTE HM-N, Bulk	5 Kg

3. カラムカートリッジCV値情報

3.1. フラッシュクロマトグラフィーのヒント

フラッシュクロマトグラフィーに限らず、すべてのクロマトグラフィーの基本となる考え方がカラムボリューム（CV値）です。CV値とは、シリカゲルが充填された状態で、カラム内がどれくらいの溶媒量で満たされるかを表しています。CV値を基本として考えることで、クロマトグラフィーを理論的に説明することができます。

TLCを1回展開した際のRf0.5の化合物は、1CVでカラムの真ん中に保持されていることとなります。



例：Rf = 0.5 → CV = 2 となり、2CV相当の溶媒量で溶出してくると予測

カートリッジ	充填量 (g)	カラムボリューム (mL)	サンプルチャージ量	流量 (mL/min)
Sfär D 10g	10	15	100-1000 mg	40
Sfär D 25g	25	42	200-2000 mg	80
Sfär D 50g	50	80	0.5-5 g	120
Sfär D 100g	100	150	1-10 g	120
Sfär D 350g	350	530	3.5-35 g	200
Sfär HC D 10g	10	15	200-2000 mg	40
Sfär HC D 25g	25	42	0.5-5 g	80
Sfär HC D 50g	50	80	1-10 g	120
Sfär HC D 100g	100	150	2-20 g	120
Sfär HC D 350g	350	530	7-70 g	200

上記テーブルは、自動精製装置にSfärカートリッジを接続した際のグラジエント作成に非常に有効な情報となります。また、前処理で流す溶媒量やカラム洗浄時の送液量など、精製作業で必要な情報として活用することができます。

3.2. 移動相にメタノールを使用する場合の注意

- ▶ メタノール100%でのサンプルチャージは適当ではありません。サンプルがカラムに保持せずに溶出します。
- ▶ 移動相のメタノール濃度が3%以下の場合には、予め1/10に希釈した溶媒を移動相として用意して、10%以上の設定でグラジエントを作成してください。

カラムカートリッジの製品情報は [こちら](https://data.biotage.co.jp/pdf/catalogue/Biotage_Sfar_flash_column.pdf) QRからも確認できます

https://data.biotage.co.jp/pdf/catalogue/Biotage_Sfar_flash_column.pdf



化学の最適な ソリューションを 提供するパートナー

Biotageは、実験室およびプロセス化学者の作業を容易にするために設計された機器およびアクセサリの世界的なサプライヤーです。業界、学術関係者、社内R&Dチームの深い知識により、お客様の課題に最適なソリューションを提供できます。お客様の個々のニーズを満たす柔軟性と能力に大きな誇りを持っています。分析、有機およびプロセス化学の強力な基盤により、当社は、市場で入手可能な最も幅広いソリューションを提供しています。

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

西日本営業所 : 〒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

SUG210415

Biotage® flash cartridges User Guide © Biotage

