

# Application News

## No. L445

高速液体クロマトグラフィー  
High Performance Liquid Chromatography

## イオンペア試薬を含む移動相のオンライン調製による分離条件検討の効率化

Effective Method Development Using Online Blending of Ion-Pair Reagents for Mobile Phase Preparation

HPLC における分析条件の検討では、分離に用いる移動相の選択は分離に与える影響が大きく非常に重要です。逆相イオンペアモードの分析では、添加するイオンペア試薬の濃度によりカラムへの保持強度が変わります。よって条件検討時にイオンペア試薬濃度の検討は非常に重要となります。しかし分析者にとっては、分析条件の検討時に様々なイオンペア試薬濃度の移動相を都度調製して分析に用いる必要があり、多大な時間と労力を要します。

ここでは、濃度の異なるイオンペア試薬を含む移動相をオンラインで調製し、分析に用いる手法をご紹介します。

H. Terada

### ■移動相オンライン調製システム

Online Mobile Phase Blending System

低圧グラジエントユニットが付いたポンプを用いて、予め用意した複数の溶液をオンラインで混合することにより、移動相中のイオンペア試薬濃度を調整します。流路図の例を Fig. 1 に示します。このシステムでは、各ポンプにそれぞれ最大 4 種類の溶液を任意の比率で混合することができる低圧グラジエントユニットが接続された高圧グラジエント分離システムで、ここではポンプ A でイオンペア試薬を含む水系移動相を、ポンプ B では有機溶媒系移動相<sup>\*1</sup>をオンライン調製する際の設定例を記載しています。

<sup>\*1</sup> 有機溶媒のオンライン調製については ANL443 をご参照ください。

### ■イオンペア試薬濃度と保持への影響

Effects on Retention Due to Concentration of Ion-Pair Reagent

イオン性化合物は pH によりイオン解離の平衡状態が変わります。分析種が解離状態にある場合には親水性が高くなり、逆相モードでは保持が小さくなってしまいます。よって、逆相モードでこれらの物質を分離する場合には、分析種が解離しない pH 領域の緩衝液を含む移動相を用いて分析するのが一般的です。しかし、目的の分析種が強酸性物質や強塩基性物質の場合には分析に使用できる移動相では非解離の状態にすることは不可能です。また、弱酸性物質や弱塩基性物質であっても、カラムや試料の溶解性などで分析種が解離する pH 領域の移動相で分析しなければならない場合もあります。このような場合、逆相イオンペアモードが適応されます。

移動相に解離した分析種と反対の電荷を有するイオン性物質（イオンペア試薬）を添加して、イオンペアを形成させることで逆相モードでの保持を大きくさせることができ、目的の分析種を分離することができます。一般的に保持の大きさはイオンペア試薬の種類、その濃度と移動相 pH<sup>\*2</sup> により大きく変動します。よって、分析条件の設定時にこれらのパラメータを検討することは非常に重要です。

<sup>\*2</sup> 水系移動相の pH についてもオンラインで調整することができます。本システムは 4 液まで混合することができるため、移動相 pH とイオンペア試薬濃度の両方をオンラインで変更・調整することができます。水系移動相のオンライン pH 調整については ANL444 をご参照ください。

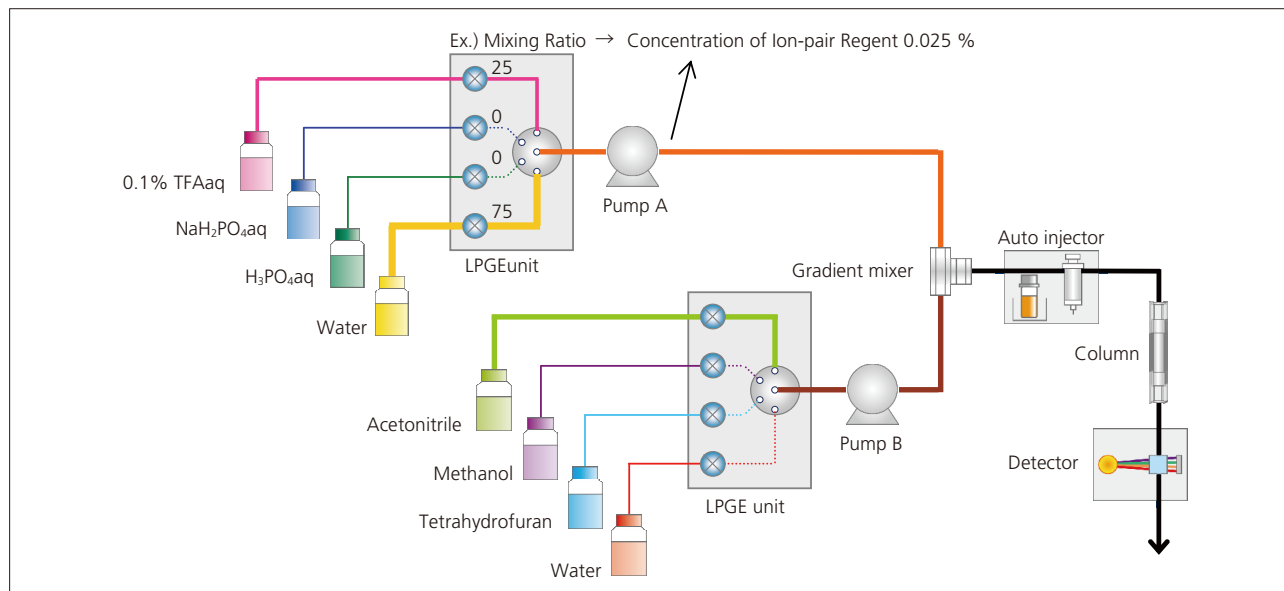


Fig. 1 オンライン調製システム流路図  
Flow Diagram of Online Mobile Phase Blending System

## ■イオンペア試薬のオンライン調製

## Online Blending of Ion-Pair Reagent

「(I) 0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA)」と「(II) 水」をオンラインで種々の比率で混合して調製した移動相を用いて、アンジオテンシン II 標準試料の分析を行なったクロマトグラムを Fig. 2 に示します。分析条件は Table 1, 2 に示します。

移動相中の TFA (本分析ではイオンペア試薬として働く) の濃度によりアンジオテンシン II の保持が大きく変動しているのが分かります。

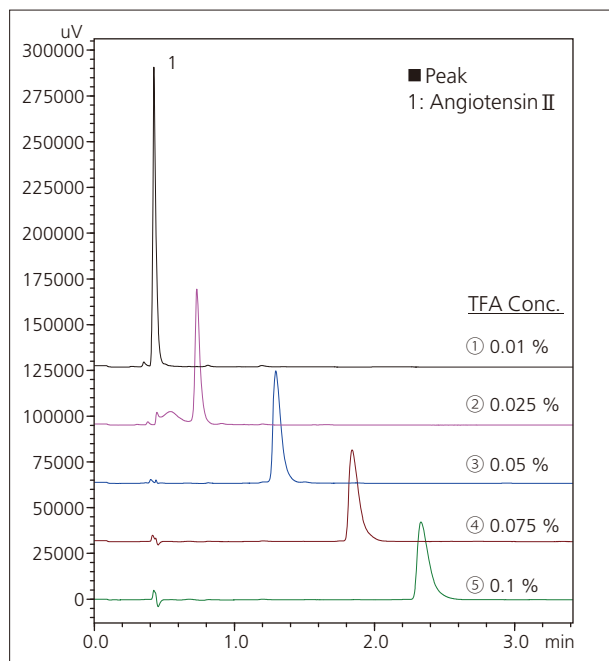


Fig. 2 オンライン調製緩衝液によるアンジオテンシン II (1 mg/mL) のクロマトグラム  
Chromatograms of a Standard Solution of Angiotensin II (1 mg/mL)

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

|                |                                                                                                                                                  |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column         | : Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)                                                                                              |
| Mobile Phase   | : A: Online blended 0.01 ~ 0.1 % Trifluoroacetic acid (TFA)<br>(I) : 0.1 % TFA<br>(II) : Water<br>Mixing Ratios of (I)/(II) are shown in Table 2 |
|                | : B: Acetonitrile<br>A/B=8/2(v/v)                                                                                                                |
| Flow Rate      | : 1.0 mL/min                                                                                                                                     |
| Column Temp.   | : 40 °C                                                                                                                                          |
| Detection      | : SPD-M20A at (220 nm)                                                                                                                           |
| Injection Vol. | : 1 μL                                                                                                                                           |

Table 2 溶液 (I) / (II) のオンライン混合比率  
Online Mixing Ratios of Solution (I) and (II)

| No. | Mixing ratio (I)/(II) | TFA Concentration (%) |
|-----|-----------------------|-----------------------|
| ①   | 10/90                 | 0.01                  |
| ②   | 25/75                 | 0.025                 |
| ③   | 50/50                 | 0.05                  |
| ④   | 75/25                 | 0.075                 |
| ⑤   | 100/0                 | 0.1                   |

## ■オフライン調製条件との比較と保持時間再現性

## Comparison of Chromatograms and Retention Time Repeatability Obtained Using Online - and Offline - Blended Mobile Phases

Fig. 3 に TFA 濃度 0.05 % の条件 (溶液 (I) / (II) = 50/50) でオンライン調製した移動相を用いてアンジオテンシン II を 5 回連続で分析したクロマトグラムと、オフラインで調製した同移動相を用いて分析したクロマトグラムを示します。

オンライン調製とオフライン調製のクロマトグラムで良い一致を示しています。

また、Table 3 にオンラインとオフライン調製の両方で 5 回連続分析を行なった結果の保持時間再現性を示します。保持時間再現性も両方で同等の結果が得られました。

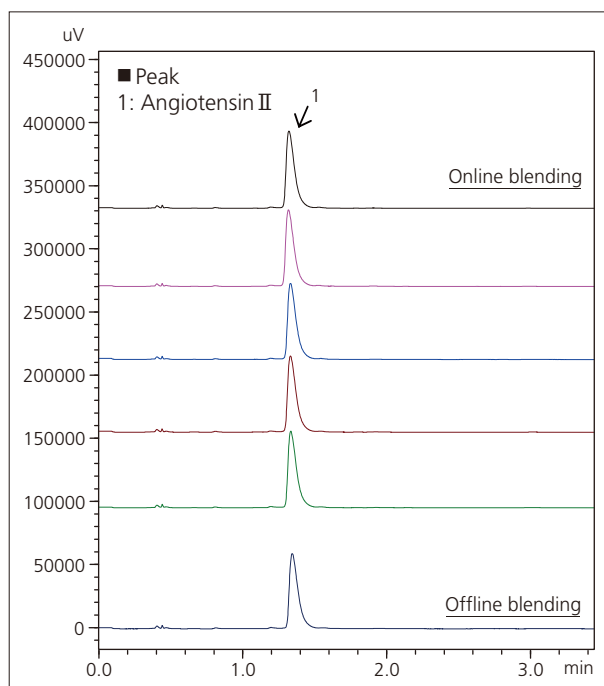


Fig. 3 TFA 濃度 0.05 % の条件 (溶液 (I) / (II) = 50/50) のオンライン調製とオフライン調製のクロマトグラム  
Chromatograms Obtained Using Online Blending and Offline Blending of 0.05 % TFA (I) / (II) = 50/50

Table 3 保持時間再現性  
Repeatability of Retention Time

| Compound       | Repeatability of retention time RSD (%) n5 |                  |
|----------------|--------------------------------------------|------------------|
|                | Online blending                            | Offline blending |
| Angiotensin II | 0.191                                      | 0.24             |