

# Application News

## No. L443

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

### 有機溶媒組成の異なる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 Organic Solvents 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。逆相モードの分析などで、分析種が有機溶媒の種類によりカラムへの保持挙動が大きく変わる場合には、様々な有機溶媒を混合して用いることで、分離状況を改善できることがあります。しかし分析者にとっては、分析条件の検討時に様々な種類の有機溶媒混合液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、複数の有機溶媒をオンラインで混合することにより移動相を調製し、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有機溶媒をオンラインで混合することにより、有機溶媒系移動相を調製します。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 で水系移動相<sup>\*1</sup>を、ポンプ B では有機溶媒系移動相をオンライン調製する際の設定例を記載しています。

\*1 水系移動相のオンライン調製については ANL444, ANL445 をご参照ください。

#### 有機溶媒の種類と保持への影響

Effects on Retention Due to Organic Solvents

逆相分析において有機溶媒の種類により保持挙動が大きく変わることがあります。HPLC で分析に用いられることの多いアセトニトリルとメタノールは、一般的にアセトニトリルの方が極性が低いため、カラムからの溶出力は強くなります。この他に、分析種によっては分離に用いる溶媒のプロトン供与性が保持に影響を与えることがあります。この場合、アセトニトリルなどの非プロトン性溶媒とメタノールなどのプロトン性溶媒の違いにより、保持挙動が大きく異なることになります。また、プロトン供与性の違いが、ピーク形状に影響を与えることもあります。シリカ基材の逆相カラムの場合、充填剤表面のシラノール基とメタノールは水素結合を行うため、分析種によってはピーク形状に影響を受けることがあります。この場合、アセトニトリルよりもメタノールを用いた方がシャープなピークが得られることとなります。このように、分離に用いる有機溶媒の種類により分析種の保持へ影響は大きく、単一の有機溶媒では分離が困難な場合やピーク形状を改善したい場合などには、複数の有機溶媒を混合することで分離やピーク形状を改善できることがあります。

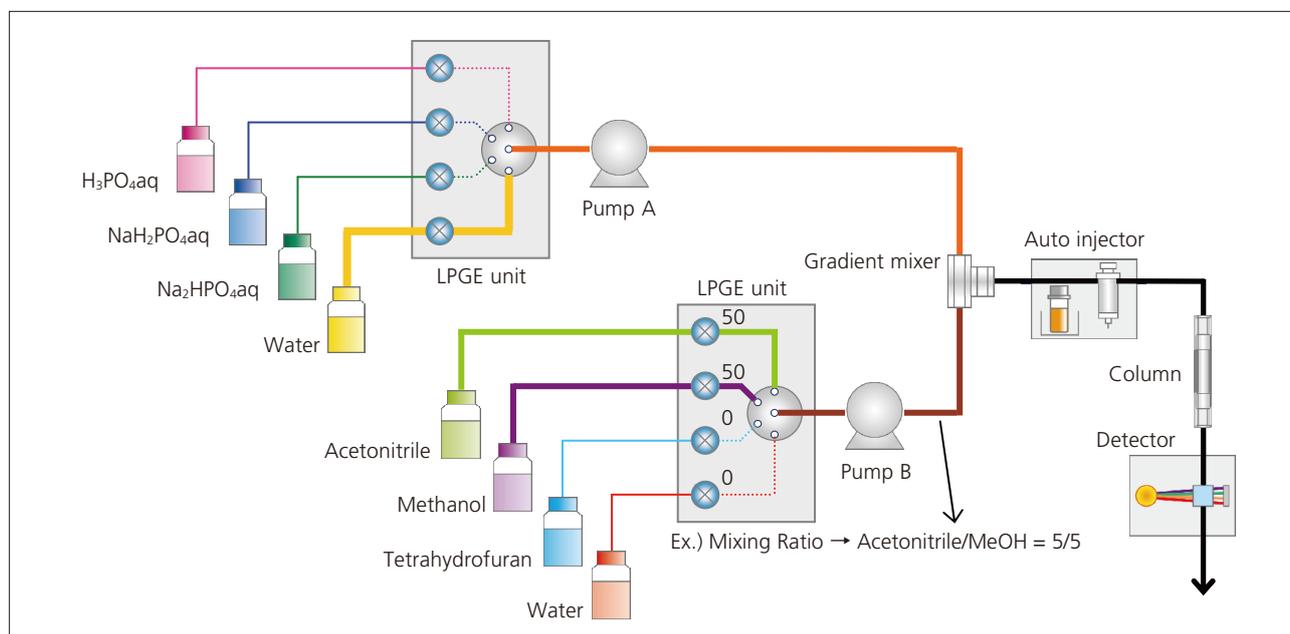


Fig. 1 オンライン調製システム流路図  
Flow Diagram of Online Mobile Phase Blending System

## ■有機溶媒系移動相のオンライン調製

### Online Blending of Organic Solvents

「(I) アセトニトリル」と「(II) メタノール」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、カフェイン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 2, 3 に示します。

有機溶媒系移動相中のアセトニトリルとメタノールの混合比率の違いで、カフェインの保持は大きく変動しているのが分かります。

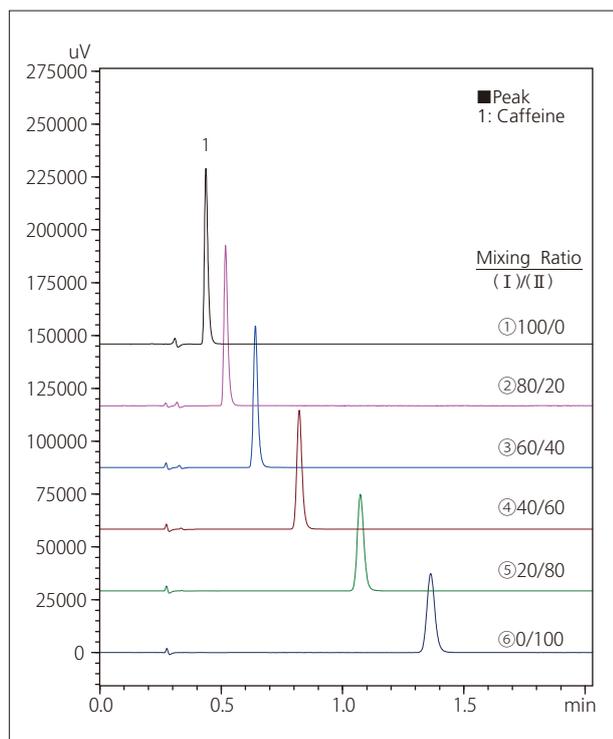


Fig. 2 オンライン調製緩衝液によるカフェイン (100 mg/L) のクロマトグラム  
Chromatograms of a Standard Solution of Caffeine (100 mg/L)

Table 2 分析条件  
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mm L. x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A : Water : B : Online blended organic solvents (I) Acetonitrile (II) Methanol
	Mixing Ratios of (I)/(II) are shown in Table 3 A/B = 8/2 (v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A at (260 nm)
Injection Vol.	: 1 μL

Table 3 有機溶媒 (I)/(II) のオンライン混合比率  
Mixing Ratios of Organic Solvents (I) and (II)

No.	Mixing ratio (I)/(II)
①	100/0
②	80/20
③	60/40
④	40/60
⑤	20/80
⑥	0/100

## ■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 に有機溶媒 (I) / (II) = 60/40 の条件でオンライン調製した移動相を用いてカフェインを 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 4 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より、両調製方法による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。

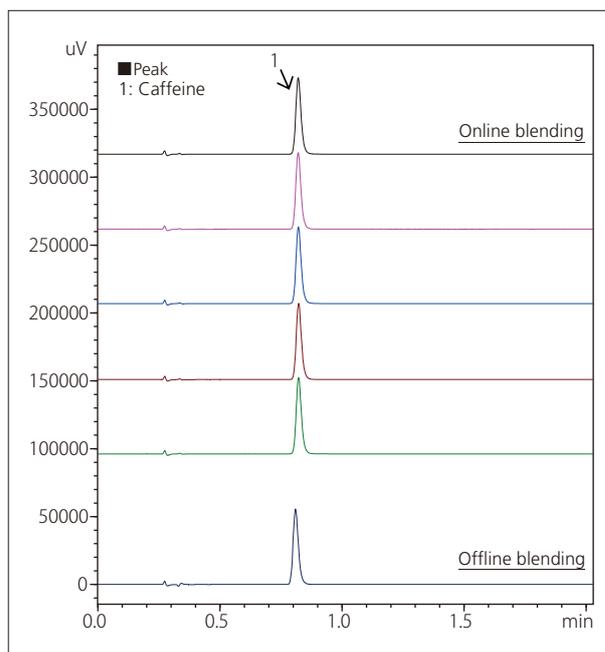


Fig. 3 有機溶媒 (I) / (II) = 60/40 のオンライン調製とオフライン調製のクロマトグラム  
Chromatograms Obtained Using Online Blending and Offline Blending (I) / (II) = 60/40

Table 4 保持時間再現性  
Repeatability of Retention Time

Compound	Repeatability of retention time RSD (%) n5	
	Online blending	Offline blending
Caffeine	0.09	0.07