

Atlantis BEH Z-HILIC 登場：ハイブリッド有機/無機粒子に基づく双性イオン固定相

Thomas H. Walter, Kenneth D. Berthelette, Amit Patel, Bonnie A. Alden, Justin McLaughlin, Jessica Field, Nicole Lawrence, Steve Shiner

Waters Corporation

要約

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）に利用できる多くの固定相ケミストリーの中で、スルホベタイン基で修飾した双性イオン材質には、非常に幅広い有用性があることが証明されています。負に帯電した部分と正に帯電した部分が 1 対 1 のモル比で組み込まれている双性イオン固定相は、強い保持を示し、表面の正味電荷はゼロです。ここでは、シリカベースの双性イオン材質より pH 範囲が広く（2～10）、有機ポリマーベースの双性イオンカラムよりも効率が、エチレン架橋型ハイブリッド（BEH）有機/無機粒子をベースとする新しいスルホベタイン型の双性イオン固定相について説明します。この材質の効率、保持、選択性、バッチ間再現性、pH 安定性を実証します。金属の影響を受けやすい分析種のために開発された、MaxPeak High Performance Surfaces カラムハードウェアを採用し、この材質を充填したカラムの優れた性能についても示します。

アプリケーションのメリット

- 高いカラム効率
 - 中性極性分析種に対する強力な保持
 - BEH Amide カラムおよび BEH HILIC カラムに対する補完的選択性
 - 優れた固定相バッチ間再現性
 - 幅広い pH 範囲（2～10）にわたる安定性による分析法の柔軟性
 - 金属の影響を受けやすい分析種に対する優れた回収率とピーク形状
-

はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、極性分析種の分離の最も有用な分析手法の1つです^{1,2}。極性固定相と極性がより低い移動相を採用することにより、分析種の極性が高いほど、HILICの保持が増加します。非結合シリカや、アミド、ポリオール、アミノ、スルホベタイン、およびその他の極性官能基を持つ材質など、さまざまな固定相がHILICに使用されてきました^{3,4}。スルホベタイン型固定相には、負に帯電したスルホン酸基と正に帯電した第4級アンモニウム基がモル比1:1で含まれ、双性イオンを構成しており、pH範囲0～14にわたって正味電荷がゼロです⁵。双性イオン固定相は、表面の正味電荷がゼロであり、イオン化したシラノールの存在によって陽イオンを保持する非誘導体化シリカや、プロトン化アミンとのイオン交換によって陰イオンを保持するアミン基で修飾した材質のような、顕著なイオン交換の挙動を示しません⁴。双性イオン固定相では比較的厚い吸着水層が蓄積されることが示されており、これによってHILICの極性中性化合物に対する保持が強くなります^{6,7}。強い保持とゼロの表面正味電荷の組み合わせにより、メタボロミクス⁸、細胞培養培地の分析⁹、医薬品の不純物プロファイリング¹⁰、食品中毒素の濃度測定など、幅広い用途で、双性イオンカラムは魅力的な選択肢になっています¹¹。

市販されている双性イオン固定相のほとんどはシリカ粒子がベースです。シリカは塩基性溶液に溶解するため、これらの材質はpH2～8の範囲の移動相にのみ適合します。有機ポリマー粒子をベースとする双性イオン固定相も利用可能で、pH2～10で安定すると標榜されています¹²。ただし、ポリマー粒子はシリカより機械的強度が弱く、200 bar (2,900 psi) 未満の圧力での使用に制限されています¹²。その結果、ポリマー粒子のサイズは5 μmに制限されます。ポリマー粒子を充填したカラムは、シリカベースの粒子を充填したカラムより効率が低くなります¹³。高pHでの安定性を改善する別の解決策は、有機/無機ハイブリッド粒子の使用です。エチレン架橋型ハイブリッド（BEH）粒子は、塩基性の移動相に対して良好な安定性と優れた機械的強度があることが示されており¹⁴、UPLCで粒子径2 μm未満を使用できます¹⁵。ここでは、pH2～10で安定で、バッチ間再現性とカラム効率が高いBEH粒子をベースとする新しいスルホベタイン型固定相について説明します。この材質の保持能と選択性について、BEH粒子ベースの他のHILIC固定相と比較して説明します。この材質はMaxPeak High Performance Surfacesカラムハードウェアに充填されており、金属表面との相互作用が緩和されることにより、金属の影響を受けやすい分析種の回収率とピーク形状が改善されます。¹⁶

実験方法

すべてのバッファー溶液のpH値は水溶液として測定し、pHメーターは水性のレファレンスバッファーを用いて校正しました。以下に示すバッファー濃度は、移動相の水溶性部分の濃度です。

効率対流速の試験条件

サンプルには、ホールドアップ時間のマーカーとして 120 µg/mL のアセナフテン、保持される分析種として 80 µg/mL のシトシンが含まれ、これらは移動相中に溶解しました。シトシンの保持係数は 3.3 でした。

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class、TUV 搭載
検出:	254 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 µm、2.1 × 50 mm (製品番号: 186009978)
カラム温度:	30 °C
注入量:	0.5 µL
流速:	0.01 ~ 0.8 mL/分
移動相 A:	80/20 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0)

保持能および選択性の試験条件

6 つの別個のサンプルを使用しました。最初のサンプルには 333 µg/mL p-トルエンスルホン酸ナトリウム (TS) と 333 µg/mL N,N,N-トリメチルフェニルアンモニウムクロリド (TMPA)、2 番目のサンプルには 100 µg/mL 3'-デオキシグアノシン、33.3 µg/mL ビダラビン、33.3 µg/mL 5-メチルウリジン、3 番目のサンプルには 33.3 µg/mL ウリジンと 100 µg/mL 2'-デオキシグアノシン、4 番目のサンプルには 33.3 µg/mL アデノシンと 33.3 µg/mL 2'-デオキシウリジン、5 番目のサンプルには 1.0 mg/mL トルエン (ホールドアップ時間のマーカー)、6 番目のサンプルには 33.3 µg/mL ウリジンと 1.0 mg/mL トルエンが含まれました。サンプルはすべて移動相に溶解しました。TS および TMPA 以外のすべての分析種には、90/10 アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7) が含まれている移動相を使用しました。TS および TMPA は、90/10 アセトニトリル/100 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7) の移動相を使用して分離しました。

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class、PDA 搭載
----------	-----------------------------

検出:	254 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 μ m、2.1 \times 50 mm (製品番号: 186009978) ACQUITY UPLC BEH Amide、1.7 μ m、2.1 \times 50 mm (製品番号 186004800) ACQUITY UPLC BEH HILIC、1.7 μ m、2.1 \times 50 mm (製品番号 186003460)
カラム温度:	30 $^{\circ}$ C
注入量:	3.0 μ L
流速:	0.2 mL/分
移動相 A:	90/10 アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7) または 90/10 アセトニトリル/100 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7)

再現性の試験条件

サンプルには、移動相に溶解した 19 μ g/mL アセナフテン、3.7 μ g/mL チミン、25 μ g/mL フタル酸、3.7 μ g/mL アデニン、7.7 μ g/mL シトシン、25 μ g/mL 5-フルオロオロチン酸が含まれました。

LC システム:	ACQUITY UPLC、TUV 搭載
検出:	254 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 μ m、2.1 \times 50 mm (製品番号: 186009978)
カラム温度:	30 $^{\circ}$ C
注入量:	3.0 μ L

流速:	0.5 mL/分
移動相 A:	90/10 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0)

塩基性環境での安定性試験条件

サンプルには、95/5 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0) に溶解した 19 µg/mL アセナフテン、3.7 µg/mL アデニン、7.7 µg/mL シトシンが含まれました。95/5 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0) の移動相を使用してこのサンプルを分離した後、カラム容量の 75 倍の 60/40 アセトニトリル/10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) をカラムに通してから、50/50 アセトニトリル/水で洗浄し、次に 10/90 アセトニトリル/水で洗浄し、その後 95/5 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0) の試験移動相で平衡化しました。試験を通してカラム温度を 70 °C に維持して、このサイクルを 100 回繰り返しました。

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class、PDA 搭載
検出:	254 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 µm、2.1 × 50 mm (製品番号: 186009978)
カラム温度:	70 °C
注入量:	1.0 µL
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	水
移動相 B:	アセトニトリル
移動相 C:	100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0)
移動相 D6:	60/40 アセトニトリル/10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0)

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D6	曲線
0.00	0.4	0	95	5	0	—
13.73	0.4	0	0	0	100	11
34.30	0.4	0	0	0	100	11
35.97	0.4	50	50	0	0	6
39.27	0.4	50	50	0	0	6
40.93	0.4	10	90	0	0	6
44.23	0.4	10	90	0	0	6
45.90	0.4	0	95	5	0	6
47.57	0.4	0	95	5	0	11
68.13	0.4	0	95	5	0	11

酸性環境での安定性試験条件

サンプルに、移動相に溶解した 19 µg/mL アセナフテン、3.7 µg/mL アデニン、7.7 µg/mL シトシンが含まれました。

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class、PDA 搭載
検出:	254 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 µm、2.1 × 50 mm (製品番号: 186009978)
カラム温度:	70 °C
注入量:	1.0 µL
流速:	0.4 mL/分

移動相 B:	アセトニトリル
移動相 C:	100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 2.0)
アイソクラティック組成:	90/10 B/C

ATP/ADP/AMP の試験条件

移動相に溶解したアデノシンーリン酸二ナトリウム塩、アデノシンニリン酸二ナトリウム塩水和物、アデノシン三リン酸二ナトリウム塩水和物がそれぞれ 50 µg/mL 含まれている、別個のサンプルを使用しました。

LC システム:	ACQUITY Premier BSM、PDA 搭載
検出:	260 nm
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 µm、2.1 × 50 mm (製品番号 186009978) 、 Atlantis BEH Z-HILIC、1.7 µm 粒子を充填した標準カラム
カラム温度:	30 °C
注入量:	0.4 µL
流速:	0.5 mL/分
移動相 A:	70/30 アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.8)

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower 3 FR4
------------------	---------------

結果および考察

Atlantis BEH Z-HILIC の化学的特性および物理的特性

Atlantis BEH Z-HILIC 固定相は、ポアサイズ 95 Å の BEH 粒子をベースとしており、BEH 粒子ベースの他の HILIC 固定相で使用される 130 Å 粒子より、表面積が約 50% 大きくなっています。95 Å 粒子の大きい表面積により、保持が大きくなります。これらの粒子はスルホベタイン基で誘導体化され、図 1 に示されている表面構造になっています。表 1 に、BEH Z-HILIC 固定相の主要な特性と、BEH Amide および BEH HILIC との比較が要約されています。

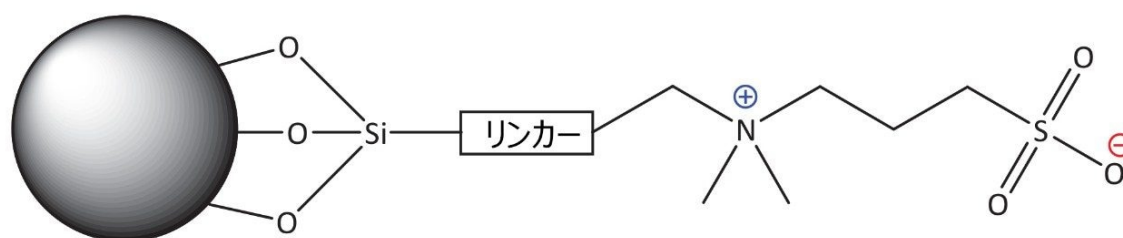


図 1. Atlantis BEH Z-HILIC 用スルホベタイン型固定相の構造

固定相	粒子の特性			固定相の特性	
	ポアサイズ (Å)	ポアボリューム (cm ³ /g)	表面積 (m ² /g)	表面ケミストリー	表面濃度 (μmol/m ²)
BEH Z-HILIC	95	0.7	270	スルホベタイン	3.0
BEH Amide	130	0.7	185	アミド	7.5
BEH HILIC	130	0.7	185	非結合	N/A

表 1. 評価した固定相の化学的特性および物理的特性の比較

効率対流速

1.7 μm BEH Z-HILIC が充填されたカラムは、1.7 μm BEH HILIC カラムおよび BEH Amide カラムと同等の高い効率を示します。図 2 に、1.7 μm、2.1 × 50 mm の Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムの効率対流速のプロットが示されています。結果により、流速 0.13 mL/分のシトシンで、最大 USP 効率 12,100 が達成されたことが示されています。これは、理論段高 4.1 μm、理論段高 2.4 μm の低減、単位長あたりの効率 242,000 段/m に相当します。同様の理論段

高が、以前に BEH HILIC、1.7 μm カラムについて報告されています^{17,18}。

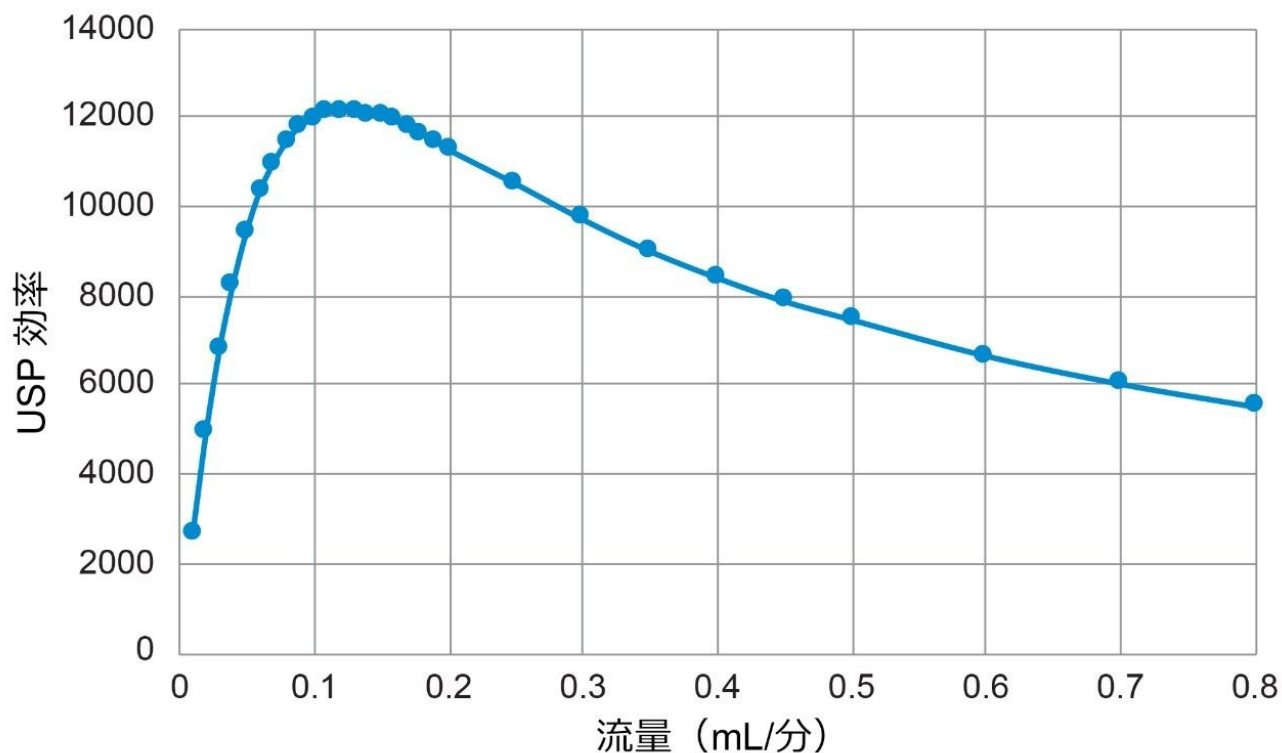


図 2. Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 μm 、2.1 x 50 mm カラムの USP 効率対流速のプロット。分析種はシトシンで、移動相は 80/20 アセトニトリル/100 mM アンモニウム水溶液 (pH 3.00) で、温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ でした。

保持能および選択性

Z-HILIC 固定相の保持能と選択性を評価するために、Kawachi らの論文に記載した試験を実施しました¹⁹。これらの試験では、さまざまな種類の選択性を調べるために選択した分析種のセットを使用します。分析種の構造は図 3 に示されています。ウリジン対 5-メチルウリジンの相対保持 (r) はメチレン基の選択性の尺度であり、ウリジン対 2'-デオキシウリジンの選択性係数はヒドロキシル基の選択性の指標であり、 r (ビダラビン/アデノシン) は立体配置異性体の選択性を確認し、 r (2'-デオキシグアノシン/3'-デオキシグアノシン) は位置異性体の選択性を示し、 r (トリメチルフェニルアンモニウムクロリド/ウリジン) は陽イオン交換の選択性を示し、 r (p-トルエンスルホン酸ナトリウム/ウリジン) は陰イオン交換の選択性を確認します。

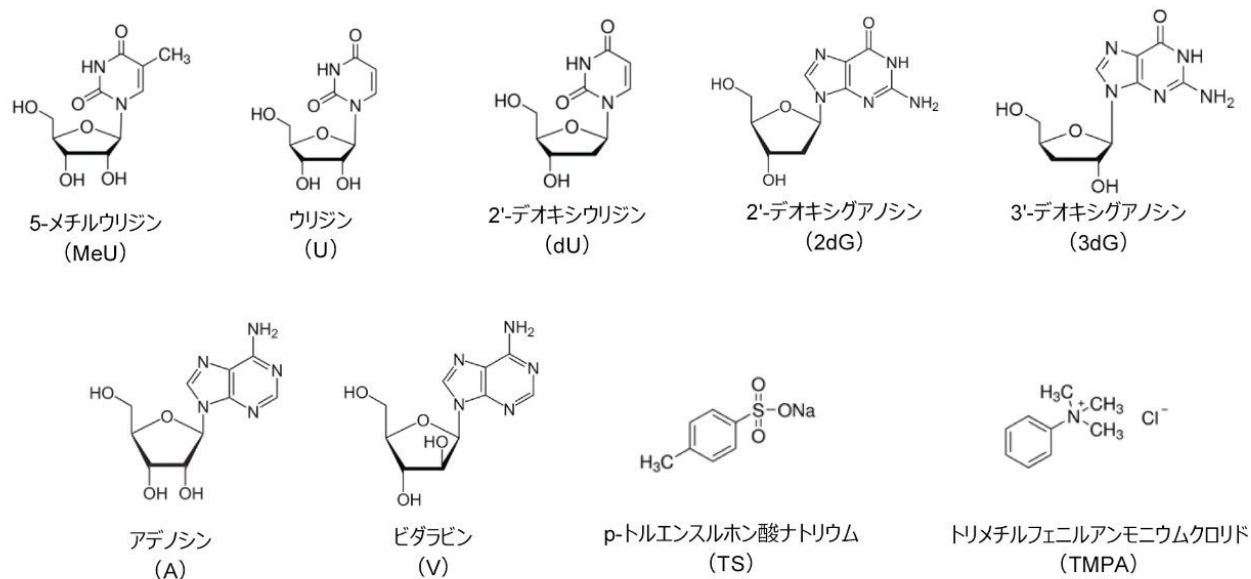


図 3. HILIC の保持能および選択性の評価用の分析種の構造

図 4 に、BEH Z-HILIC カラム、BEH Amide カラム、BEH HILIC カラムを使用して、これらの分析種のうち 7 つについて取得したクロマトグラムの比較が示されています。その結果から、Z-HILIC カラムでは 7 つの化合物すべてに対して保持時間が最高で、BEH HILIC カラムでは保持時間が最低であることが実証されています。ウリジンの保持係数および主要な分析種ペアの選択性係数が、表 2 に要約されています。その結果から、Z-HILIC 材質で、ウリジンに対する保持係数、およびメチレン基、ヒドロキシル基、立体配置異性体のビダラビンとアデニンに対する相対保持が最も高いことが示されています。

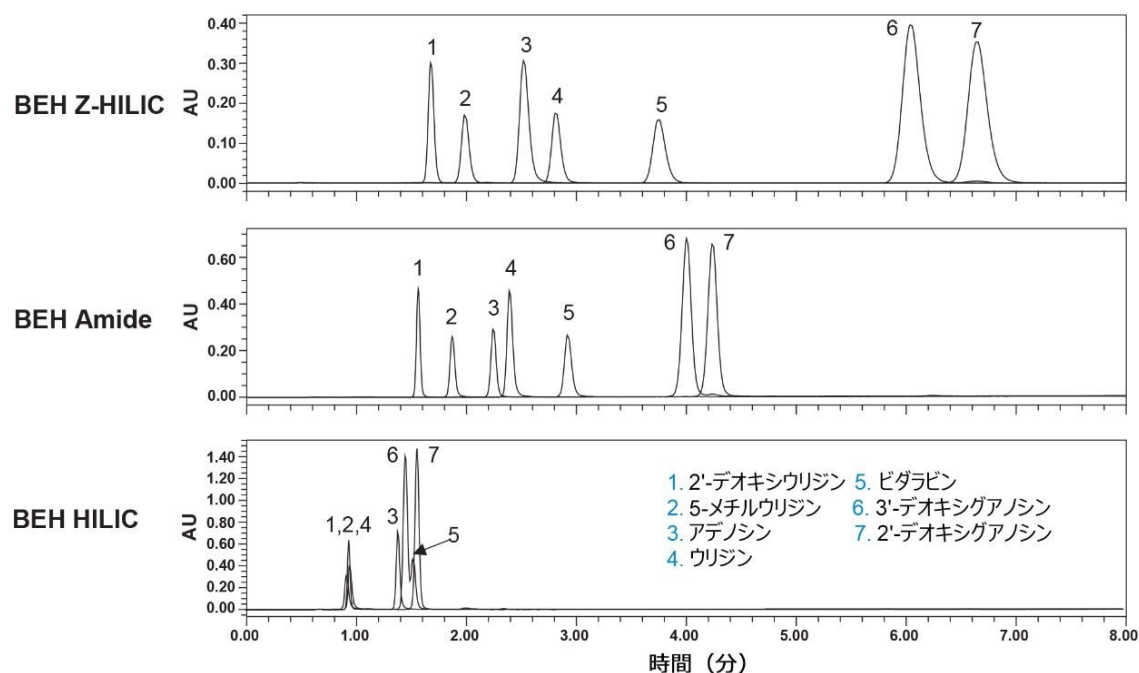


図 4. BEH Z-HILIC カラム、BEH Amide カラム、BEH HILIC カラム（すべて 1.7 μm 、2.1 \times 50 mm）の保持能および選択性の比較。移動相は 90/10 (v/v) アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7) で、流量 0.2 mL/分、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ を使用しました。試験化合物の構造は図 3 に示されています。

パラメーター	特性	BEH Z-HILIC	BEH Amide	BEH HILIC
k' U	保持能	4.81	2.71	0.43
$\alpha(\text{U/MeU})$	メチレン基の選択性	1.55	1.30	1.12
$\alpha(\text{U/dU})$	ヒドロキシル基の選択性	1.96	1.73	1.05
$\alpha(\text{V/A})$	立体配置異性体の選択性	1.60	1.30	1.20
$\alpha(\text{2dG/3dG})$	位置異性体の選択性	1.11	1.07	1.13
$\alpha(\text{TMPA/U})$	陽イオン交換の選択性*	0.36	0.64	7.55
$\alpha(\text{TS/U})$	陰イオン交換の選択性*	0.52	0.25	0.09

表 2. 3 種の BEH 固定相の保持能と相対保持の比較

*移動相の水系成分について、バッファー濃度 100 mM を用いて取得した値

図 5 に示されたように、2 種のイオン性化合物（トリメチルフェニルアンモニウムクロリド (TMPA) および p-トルエン sulfonate ナトリウム (TS)）に対する選択性により、カラム間の最大の差異が明らかになっています。Z-HILIC カ

ラムでは、BEH Amide カラムおよび非結合 BEH カラムより陰イオンの TS に対する保持が高く、陽イオン TMPA に対してはその逆です。このことは、これらの分離条件において、Z-HILIC 固定相は、BEH アミドや非結合 BEH 材質より正の表面電荷が多いことを示しています。BEH HILIC 固定相は TMPA について最大の保持を示しています。このことは、非結合 BEH 粒子での、表面シリノールのイオン化による負の表面電荷と一致しています。これら 3 種の固定相の間での選択性の相違により、これらは、分析法開発中にスクリーニングすべき有用なセットになります。

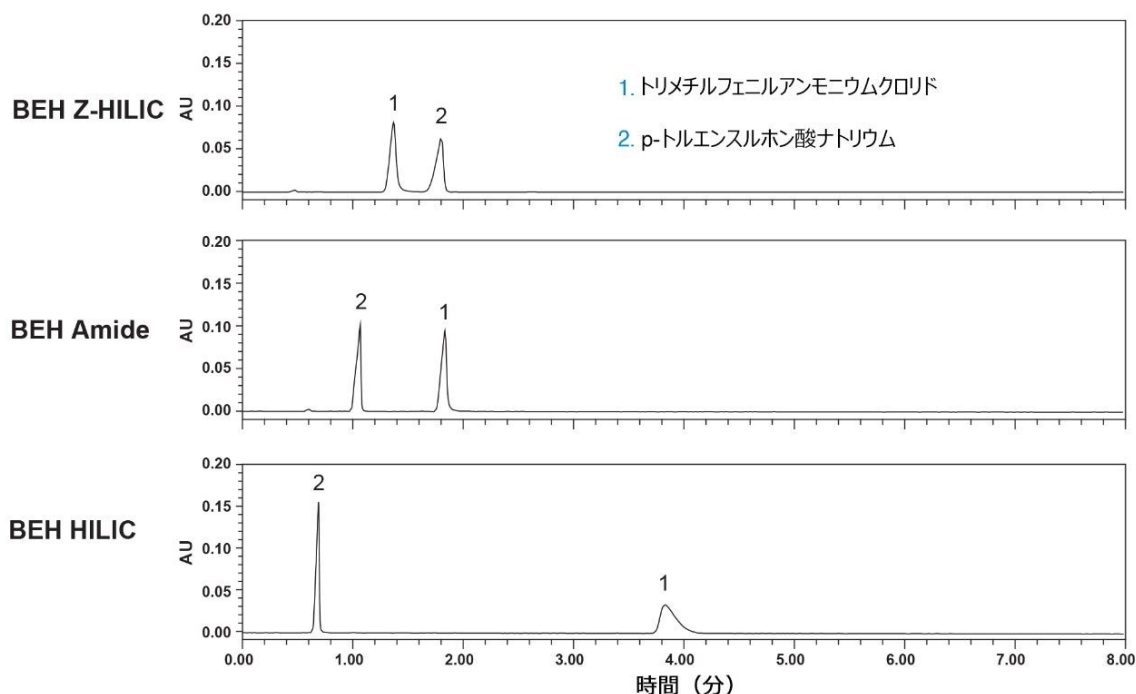
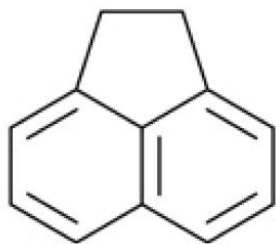


図 5. BEH Z-HILIC カラム、BEH Amide カラム、BEH HILIC カラム（すべて 1.7 μm 、2.1 \times 50 mm）の選択性の比較。移動相は 90/10 (v/v) アセトニトリル/100 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.7) で、流速 0.2 mL/分、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ を使用しました。試験化合物の構造は図 3 に示されています。

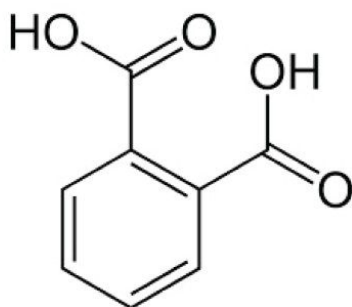
バッチ間再現性

Atlantis BEH Z-HILIC の合成には、グラフト重合法を用いる 95 \AA BEH 粒子の表面修飾が含まれます。表面修飾プロセスを慎重にコントロールすることにより、優れたクロマトグラフィー再現性が達成されます。バッチ間再現性を評価するために、酸性、塩基性、中性の化合物で構成される 5 種の分析種の混合物のアイソクラティック分離を実施しました（図 6 を参照）。1.7 μm Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを使用したこの混合物の代表的な分離が、図 7A に示されています。1.7 μm Atlantis BEH Z-HILIC カラムの 17 の異なるバッチでは、図 7B に示されている相対保持チャートによって実証されているように、非常に類似した分離結果が得られています。チミンの保持係数の相対標準偏差 (RSD) は 2.0% であり、他の分析種と比較したチミンの相対保持の RSD は 0.7 ~ 2.2% の範囲でした。これらの RSD

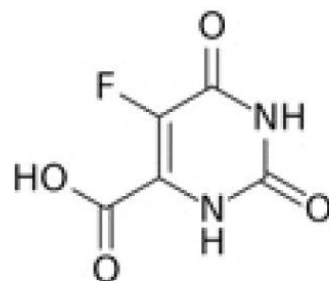
値は、最も再現性の高い C₁₈ カラムの値と同様です²⁰。



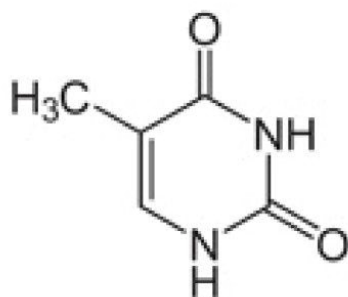
アセナフテン
(ボイドマーカー)



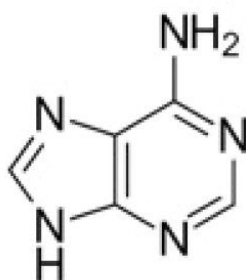
フタル酸
(酸性、 $pK_a1 = 2.92$)



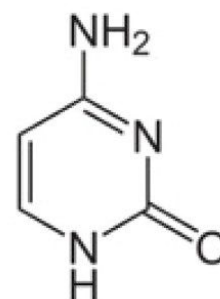
5-フルオロウラチン酸
(酸性、 $pK_a = 2.04$)



チミン
(中性)



アデニン
(塩基性、 $pK_a1 = 4.15$)



シトシン
(塩基性、 $pK_a1 = 4.45$)

図 6. 再現性評価に使用した分析種の構造

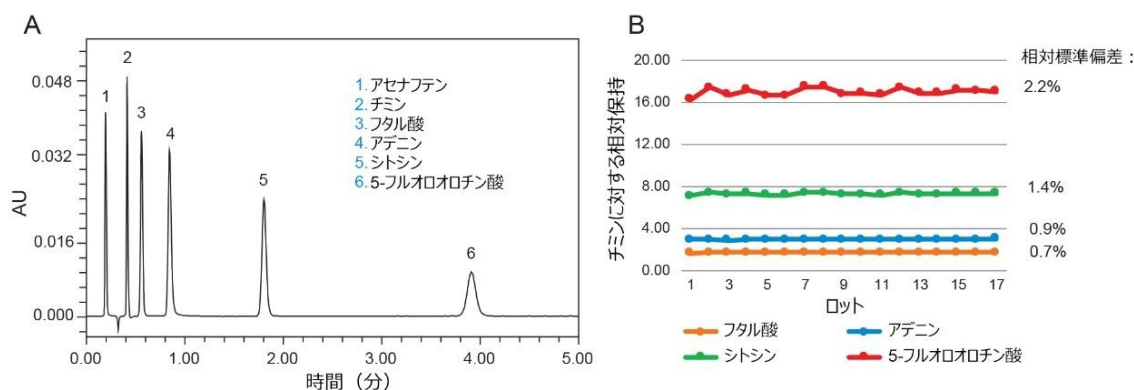


図 7. A) 1.7 μm 、2.1 \times 50 mm の *Atlantis Premier BEH Z-HILIC* カラムを使用した図 6 の混合物の代表的な分離。移動相は 90/10 (v/v) アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0) で、流速 0.5 mL/分、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ を使用しました。B) この分離に使用した 1.7 μm *Atlantis BEH Z-HILIC* の 17 の異なるバッチの相対保持。

pH 安定性

Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムの酸性環境および塩基環境での安定性を評価するため、高温での加速試験を行いました。塩基性環境での安定性評価では、60/40 アセトニトリル/10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) が含まれているチャレンジ移動相、および温度 70 $^{\circ}\text{C}$ を使用しました。カラム効率および保持能は、95/5 (v/v) アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム塩 (pH 3.0) 移動相を使用して、アセナフテン、アデニン、シトシンが含まれている混合物を分離することによって特性解析しました。カラム容量の 75 倍のチャレンジ移動相にさらした後、カラムを 50/50 アセトニトリル/水で洗浄し、次に 90/10 アセトニトリル/水で洗浄してから、効率対保持能の試験用移動相で平衡化しました。この試験-チャレンジ-洗浄-平衡化サイクルを 100 回繰り返しました。この試験では、シリカベースの HILIC カラムは、pH 11 の移動相にシリカ粒子が溶解するため、効率が大きく低下します²¹。ただし、BEH ベースの固定相を充填したカラムは、これらの条件下で優れた安定性を示します。図 8 に、1.7 μm の *Atlantis Premier BEH Z-HILIC* カラムについて、効率と保持能は pH 11 の移動相への曝露時間に依存することが示されています。34 時間曝露した後、シトシンに対する効率が 5.8% 低下し、保持時間が 2.5 ~ 5.0% 増加しました。これらの結果に基づいて、*Atlantis Premier BEH Z-HILIC* カラムの推奨 pH 上限値は 10 です。

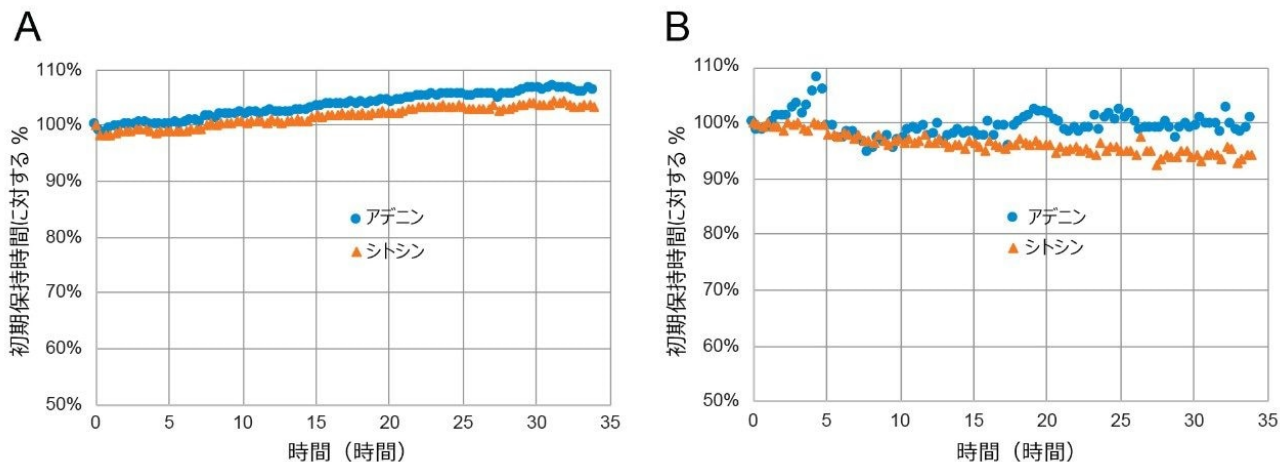


図 8. 1.7 μm 、2.1 \times 50 mm の Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムの塩基性環境での安定性加速試験の結果。各注入サイクルの間、カラムは 60/40 (v/v) アセトニトリル/10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) に、70 $^{\circ}\text{C}$ 、0.4 mL/分で 20.6 分間さらされました。カラムの状態は、95/5 (v/v) アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0) 移動相を 0.4 mL/分で送液して、アセナフテン、アデニン、シトシンの分離を用いてモニターしました。(A) pH 11 に曝露した時間対初期保持時間に対するパーセントのプロット、(B) pH 11 に曝露した時間対初期効率に対するパーセントのプロット。

Atlantis BEH Z-HILIC 固定相の酸性環境での安定性を、90/10 アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 2.0) 移動相を使用して、温度 70 $^{\circ}\text{C}$ で評価しました。カラムの状態は、同一の移動相を用いてアセナフテン、アデニン、シトシンの混合物を分離することによってモニターしました。酸性移動相に曝露することにより、結合相が加水分解され、保持と選択性が変化することがあります²¹。Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムで得られた結果が、移動相に曝露した時間対アデニンおよびシトシンの初期保持時間に対するパーセントのプロットとして、図 9 に示されています。9 時間の曝露後、保持時間の減少は 1% 未満でした。これらの結果に基づき、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムの推奨 pH 下限値は 2 です。

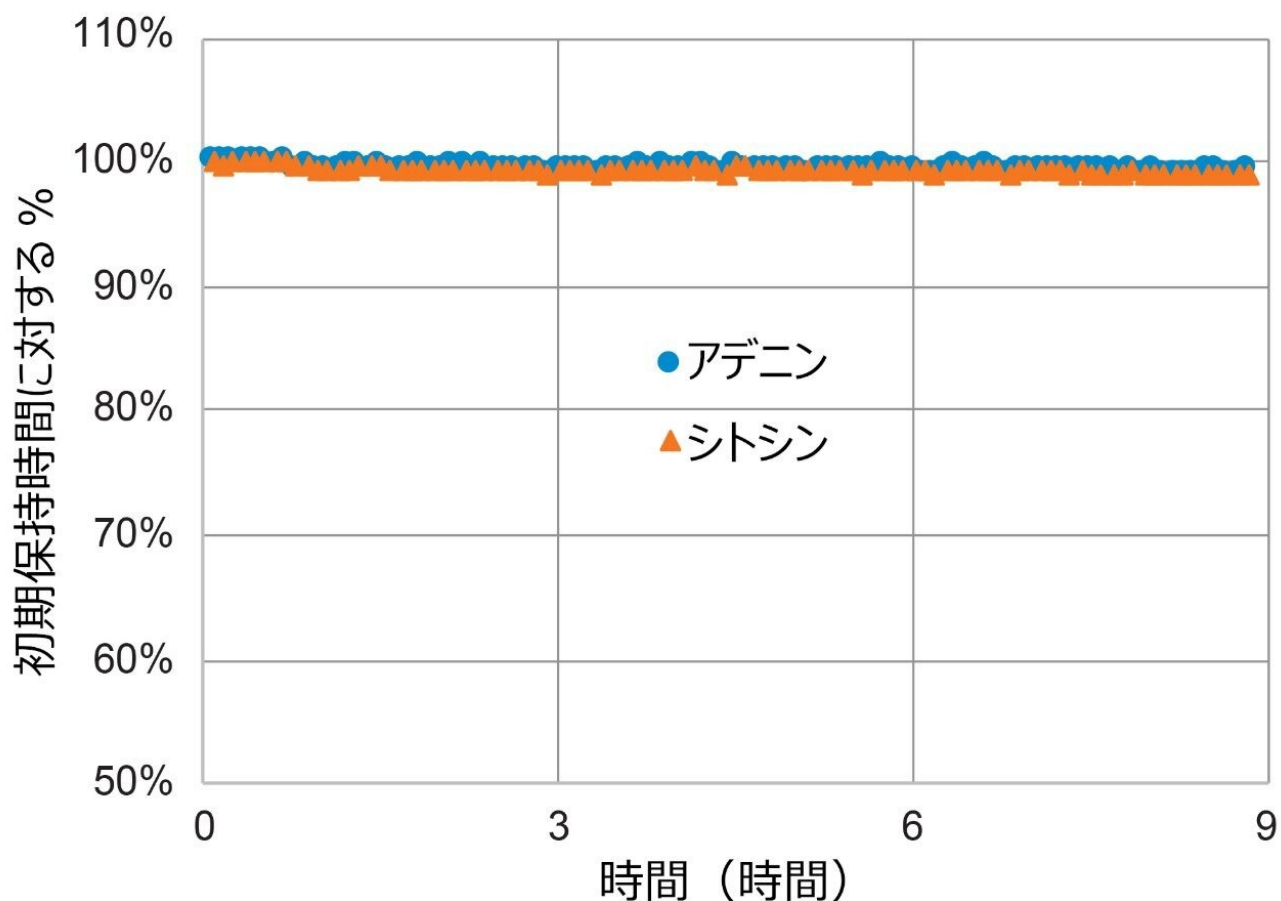


図9. Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 μm 、2.1 \times 50 mm カラムの酸性環境での安定性加速試験の結果。アセナフテン、アデニン、シトシンの混合物を、90/10 (v/v) アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 2.0) の移動相組成を用いて、0.4 mL/分、温度 70 $^{\circ}\text{C}$ で分離しました。この図には、pH 2 への曝露時間対初期保持時間に対するパーセントのプロットが示されています。

金属に吸着しやすい分析種に対する性能

多くの極性化合物、特にカルボキシル基および/またはリン酸基が2つ以上含まれている化合物は、HPLC カラムのステンレススチール表面と相互作用することがあります²²。これらの相互作用の影響は、ピークの広がりやテーリングから分析種のシグナルの完全な喪失にまで、多岐にわたります。これらの相互作用を緩和するために、MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) を採用した Atlantis Premier BEH Z-HILIC 用のカラムハードウェアを使用しました¹⁶。このカラムハードウェアによって提供される大幅な改善が、図 10 に示されています。アデノシン一リン酸 (AMP)、アデノシン二リン酸 (ADP)、アデノシン三リン酸 (ATP) を、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラム、および

びこれと同じ固定相が充填されているが標準ハードウェアを使用したカラムを用いて、分析しました。標準ハードウェアでは、ADP および ATP は幅の広い、テーリングのあるピークとして検出されました。ただし、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラム (MaxPeak HPS ハードウェアを採用) を使用した場合、3 種のヌクレオチドはすべて、予想した面積を持つ対称のピークとして観察されました。この評価は、UPLC 装置での吸着を緩和するために MaxPeak HPS テクノロジーを採用した ACQUITY Premier システムを用いて行いました²³。

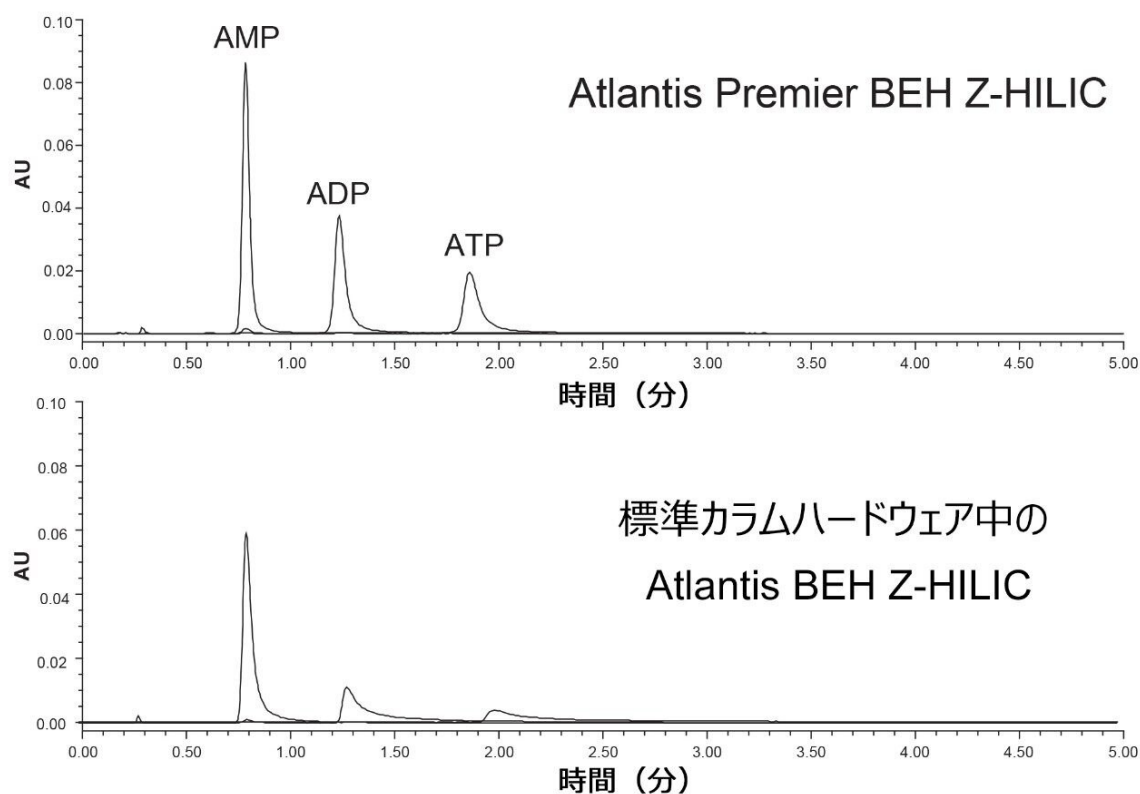


図 10. Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラム、および Atlantis BEH Z-HILIC が充填されている標準カラムを用いた AMP、ADP、ATP の分離。両カラムは $2.1 \times 50 \text{ mm}$ で、 $1.7 \mu\text{m}$ の材質が充填されていました。

結論

これらの結果により、 $1.7 \mu\text{m}$ の Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムの主要な特性が強調されています。このカラムは、スルホベタイン基で誘導体化したエチレン架橋型ハイブリッド粒子が充填されており、高い効率、極性分析種の強力な保持、既存の BEH ベースの HILIC ケミストリーに対する補完的な選択性、優れたバッチ間再現性、 $\text{pH } 2 \sim 10$ で

の安定性、および金属の影響を受けやすい化合物に対する卓越した性能を示しています。これらの特性の組み合わせにより、これらのカラムは、メタボロミクス、細胞培養培地の分析、医薬品不純物の分析、食品検査などの広範なアプリケーションに有用です。

参考文献

1. Alpert, A. J. Hydrophilic Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds. *J. Chromatogr.* 1990, 499, 177–196.
2. Hemström, P.; Irgum, K. Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1784–1821.
3. Jandera, P. Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A Review. *Anal.Chim.Acta* 2011, 692, 1–25.
4. Guo, Y.; Gaiki, S. Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2011, 1218, 5920–5938.
5. Jiang, W.; Irgum, K. Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions. *Anal.Chem.* 1999, 71, 333–344.
6. Dinh, N. P.; Jonsson, T.; Irgum, K. Water Uptake on Polar Stationary Phases Under Conditions for Hydrophilic Interaction Chromatography and Its Relation to Solute Retention. *J. Chromatogr.A* 2013, 1320, 33–47.
7. Soukup, J.; Jandera, P. Adsorption of Water from Aqueous Acetonitrile on Silica-Based Stationary Phases in Aqueous Normal-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2014, 1374, 102–111.
8. Trivedi, D. K.; Jones, H.; Shah, A.; Iles, R. K. Development of Zwitterionic Hydrophilic Liquid Chromatography (ZIC HILIC-MS) Metabolomics Method for Shotgun Analysis of Human Urine. *J. Chromat.Separation Techniq.* 2012, 3, 144–155.
9. Floris, P.; McGillicuddy, N.; Morrissey, B.; Albrecht, S.; Kaisermayer, C.; Hawe, D.; Riordan, L.; Lindeberg, A.; Forestell, S.; Bones, J. A LC-MS/MS Platform for the Identification of Productivity Markers in Industrial Mammalian Cell Culture Media. *Process Biochemistry* 2019, 86, 136–143.
10. Hmelnickis, J.; Pugovics, O.; Kazoka, H.; Viksna, A.; Susinskis, I.; Kokums, K. Application of Hydrophilic Interaction Chromatography for Simultaneous Separation of Six Impurities of Mildronate Substance. *J. Pharm.Biomed.Anal.* 2008, 48, 649–656.

11. Diez C.; Guillaume D.; Sporri A. S.; Cognard E.; Orтели D.; Edder P.; Rudaz S. Aminoglycoside Analysis in Food of Animal Origin with a Zwitterionic Stationary Phase and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal.Chim.Acta* 2015, 882, 127–139.
12. https://www.emdmillipore.com/US/en/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/sequant-zic-hilic-hplc-columns/sequant-zic-philic-polymeric/aP6b.qB.Q4oAAAE_QfJ3.Lxi,nav <https://www.emdmillipore.com/US/en/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/sequant-zic-hilic-hplc-columns/sequant-zic-philic-polymeric/aP6b.qB.Q4oAAAE_QfJ3.Lxi,nav>
13. Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N. Separation Efficiencies in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2008, 1184, 474–503.
14. Wyndham, K. D.; O' Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal.Chem.* 2003, 75, 6781–6788.
15. Mazzeo, J. R.; Neue, U. D.; Kele M.; Plumb, R. S. Advancing LC Performance with Smaller Particles and Higher Pressure. *Anal.Chem.* 2005, 77, 460A–467A.
16. Lauber, M.; Walter, T. H.; Gilar, M.; DeLano, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper, [720006930EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404&lcid=135074403>> , Oct 2020.
17. Grumbach, E. S.; Diehl, D. M.; Neue, U. D. The Application of Novel 1.7 μm Ethylene Bridged Hybrid Particles for Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1511–1518.
18. Heaton, J. C.; McCalley, D. V. Comparison of the Kinetic Performance and Retentivity of sub-2 μm Core-Shell, Hybrid and Conventional Bare Silica Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2014, 1371, 106–116.
19. Kawachi, Y.; Ikegami, T.; Takubo, H.; Ikegami, Y.; Miyamoto, M.; Tanaka, N. Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phases: Hydrophilicity, Charge Effects, Structural Selectivity, and Separation Efficiency. *J. Chromatogr.A* 2011, 1218, 5903–5919.
20. Neue, U. D.; Serowik, E.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Walter, T. H. A Universal Procedure for the Assessment of the Reproducibility and the Classification of Silica-Based Reversed-Phase Packings; 1. Assessment of the Reproducibility of Reversed-Phase Packings. *J. Chromatogr.A* 1999, 849, 87–100.

21. Berthelette, K.; Walter, T. Stability of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) Stationary Phases Under Low and High pH Testing Conditions, presented at HPLC 2019, Jun 2019, https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/APAC%20Webinar%20Summary%20Q%26A/HPLC%20Posters%20%26%20Slides/PW-1064_HPLC2019_Berthelette_HILIC%20Stability_v1.02_A3.pdf <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/APAC%20Webinar%20Summary%20Q%26A/HPLC%20Posters%20%26%20Slides/PW-1064_HPLC2019_Berthelette_HILIC%20Stability_v1.02_A3.pdf>
22. DeLano, M.; Walter, T. H.; Lauber, M. A.; Gilar, M.; Jung, M. C.; Nguyen, J. M.; Boissel, C.; Patel, A. V.; Bates-Harrison, A.; Wyndham, K. D. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.* 2021, 93(14), 5773–5781.
23. Walter, T. H.; Trudeau, M.; Simeone, J.; Rainville, P.; Patel, A. V.; Lauber, M. A.; Kellett, J.; DeLano, M.; Brennan, K.; Boissel, C.; Birdsall, R.; Berthelette, K. Low Adsorption UPLC Systems and Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces: The ACQUITY Premier Solution. Waters White Paper, 720007128EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135079876&lcid=135079875>> , Feb 2021.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC システム <<https://www.waters.com/514207>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower クロマトグラフィータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

Atlantis Premier カラム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513211>>

720007311JA、2021年12月改訂

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)