

XBridge Premier BEH Amide カラムを使用した 17 種類の遊離アミノ酸の HILIC-MS 分離の開発および最適化

Kenneth D. Berthelette, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

要約

分析法開発は、根気のいる作業になる場合があります。分析法のスクリーニングには、関連付けられた明確に定義済みのプロセスがありますが、最適化の作業は十分に実証されておらず、多くの場合、必要に迫られて行われています。最適化を必要とする可能性のある一般的なパラメーターには、グラジエントの傾き、カラム温度、移動相添加剤濃度、pH などがあります。

このアプリケーションノートでは、段階的で系統的なアプローチを使用してカラムと移動相 pH のスクリーニングおよび分析法の最適化を行った、17 種類の遊離アミノ酸の HILIC 分離法の開発について説明します。これらの分析種には有効な発色団がないため、ACQUITY QDa 検出器を用いた質量検出を用いました。最終的な分析法では、水のグラジエントだけでなく、バッファー濃度のグラジエントも使用しています。同重体化合物であるイソロイシンとロイシンが良く分離し、17 種類のアミノ酸すべてで許容できるピーク形状が得られました。

アプリケーションのメリット

- 同重体化合物イソロイシンおよびロイシンのベースライン分離
 - 17 種類のアミノ酸すべてで許容できるピーク形状
 - 段階的アプローチによる HILIC 分析法の最適化
 - HILIC 分析法のスクリーニング作業の概要
-

はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、極性分析種を分離するために特別に設計された手法です¹。この手法では、極性の固定相とこれより極性の低い移動相を使用します。固定相が移動相の水系成分の一部を吸着し、分析種が分配される固定化水層が形成されます。分配の量は、吸着された水層の容量と分析種の化学的特性に依存します。イオン性相互作用と水素結合相互作用も HILIC での保持に寄与します。HILIC では、逆相クロマトグラフィーとは異なり、極性の高い分析種がよく保持され、極性の低い化合物は保持が弱くなります。HILIC に存在するマルチモードの保持メカニズムにより、分析法開発は逆相クロマトグラフィーほど単純ではありません。

それでも逆相アッセイ用に開発された通常分析法開発アプローチは HILIC 分離にも適用できます。固定相が保持および分離の質に大きな影響を及ぼす可能性があるため、カラムおよび移動相の pH をスクリーニングすることが HILIC の分析法開発の最初のステップとして非常に有用です。ただし、逆相クロマトグラフィーとは異なり、固定相に吸着された水層を形成するのに水が必要であるため、強溶媒のスクリーニングは通常行いません。HILIC における最も弱い溶媒の 1 つであるアセトニトリルの代替となる溶媒として、メタノール、エタノール、プロパノールなどがあります。これらの極性溶媒は、HILIC での溶出強度では水よりも弱いですが、それでも溶出を引き起こして、固定相に吸着した水層を破壊する可能性があります。そのため、通常スクリーニングパラメーターはカラムの固定相と移動相 pH に限定されます。最適なカラムと移動相 pH を選択したら、分析法の最適化を行います。HILIC 分離においては、分離を改善する方法が多数あり、意図した最適化の効果が他の要因によって複雑になる可能性があるため、最適化にはカラムスクリーニングよりもかなり長時間かかる場合があります。

グラジエントの傾きの調整は、カラム容量あたりの水系の割合に関するもので、最適化の 1 ステップです。グラジエントの傾きを小さくすると、分析種がカラム上に滞留する時間が長くなるため、分析種と固定相の間の相互作用がより強くなる可能性があります。これがクリティカルペアを分離するのに役立つ場合があります。最適化のもう 1 つのステップはバッファー濃度の調整です。バッファー濃度は、イオン性相互作用に影響するだけでなく、吸着された水層の容量、ひいては分配メカニズムにも影響する可能性があります。バッファー濃度を調整すると、ピーク形状に影響が出る場合があります。場合によっては、イオン性相互作用および分配の変化により、選択性もわずかに変わる場合があります。場合によっては、最適化にバッファーのグラジエントの使用が必要になることがあります。この場合、グラジエントの進行に伴って、バッファー濃度を水系組成とともに変化させます。これはイオン交換クロマトグラフィーに一般に見られることであり、HILIC でのピーク形状の改善や選択性の変更にも有益です。

今回示す研究では、遊離アミノ酸の HILIC 分離のための分析法開発および最適化プロセスを紹介します。17 種類のアミノ酸の標準品混合物を使用して、低 pH 移動相および高 pH 移動相の両方で 3 種類の固定相をスクリーニングしました。固定相と移動相の最適な組み合わせを選択した後、段階的で系統的なアプローチで分析法の最適化を行いました。アッセイの最終的な分析法では、XBridge Premier BEH Amide カラムで pH 3 のギ酸アンモニウムバッファーを使用し、水およびバッファーのグラジエントの両方を採用しました。遊離アミノ酸の多くは UV 検出に有効な発色団を持たないため、このアッセイには MS 検出を使用しました。

実験方法

サンプルの説明

アミノ酸加水分解物標準品（製品番号: WAT088122 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/wat088122-amino-acid-standard-accq-tag-pico-tag-accq-tag-ultra.html>>）のサンプルを開封し、分析用にシステムに配置しました。この標準品には、100%水系溶液中に、濃度 2.5 µmol/mL の 17 種類のアミノ酸が含まれています（グルタミン酸（2.6 µmol/mL）、イソロイシン（2.6 µmol/mL）、アラニン（2.6 µmol/mL）、シスチン（1.27 µmol/mL）を除く）。

LC 条件

LC システム:	オプションの溶媒選択バルブ付きのクォータナリーソルベントマネージャー (QSM)、サンプルマネージャーフロースルーニードル (SM-FTN)、カラムマネージャー、カラムマネージャー Aux、QDa 質量検出器を搭載した ACQUITY UPLC H-Class Plus システム
検出:	MS フルスキャン (ESI+) 最終的な分析法で測定したアミノ酸の SIR
カラム:	XBridge Premier BEH Amide カラム 2.1 × 50 mm、2.5 µm（製品番号: 186009928） Atlantis™ Premier BEH Z-HILIC カラム 2.1 × 50 mm、2.5 µm（製品番号 186009985） CORTECS™ HILIC カラム、2.1 × 50 mm 2.7 µm（製品番号: 186007380）
カラム温度:	30 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	1.0 µL

流速:	0.15 mL/分
移動相 A:	Milli-Q 水
移動相 B:	アセトニトリル
移動相 D1:	HILIC 入門書 ¹ の説明に従って調製した 200 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0)
移動相 D6:	HILIC 入門書 ¹ の説明に従って調製した 200 mM 酢酸アンモニウム (pH 9.0)
グラジエント条件のスクリーニング:	一貫した添加剤濃度を保つために、グラジエント全体にわたって一定の 5% Dx を維持しました。11.50 分かけて 0 ~ 45% A の直線的グラジエント。45% A で 3.8 分間ホールド。0% A の開始条件に戻り、15 分間ホールド。合計分析時間: 31.0 分。最適化されたグラジエントの詳細が図のキャプションに示されています。

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: Empower 3 Feature Release 4

結果および考察

HILIC 分析法開発の最初のステップは、固定相および移動相 pH 値のスクリーニングです。高 pH バッファースystemを導入する場合は、このステップで注意を払い、高 pH の安定した固定相を使用する必要があります。高 pH で安定性の高いカラムの例として、ハイブリッド有機/無機ベースパーティクルを利用した BEH Amide カラムや BEH Z-HILIC カラムなどがあります。シリカベースのカラムは、推奨 pH よりも高い pH 値で使用すべきではありません。これは、シリカ粒子が溶解しやすく、カラムの劣化につながるためです²。

カラムを選択する際に考慮する主な要因は、結合リガンド、および異なるカラムケミストリーの間の選択性の違いです

。HILIC カラムの選択性は、多くの研究の対象となってきました³。理想的には、分離に適した固定相が見つかる可能性を高めるために、分析法開発に選択するカラムの選択性が幅広い範囲にまたがっている必要があります。本研究では、XBridge Premier BEH Amide カラム、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラム、CORTECS HILIC カラムの3種類のカラムを選択しました。アミド相および Z-HILIC 相はハイブリッド粒子をベースにしており、高 pH および低 pH の両方で使用できます。ソリッドコアシリカ粒子により高い効率が得られる CORTECS HILIC カラムは、高 pH では安定しないため、低 pH でのみ使用しました。

選択したカラムハードウェアには、さらに以下の考慮すべき点があります。システムおよびカラムハードウェアの金属部品の表面に存在する金属酸化物層が、イオン性相互作用を介して分析種と相互作用し、非特異的吸着をもたらす可能性があります。これが、得られるクロマトグラフィーに、ばらつきやピーク面積の減少、ピーク形状の悪化となって現れます。MaxPeak Premier カラムで使用されている Waters MaxPeak High-Performance Surfaces (HPS) ハードウェアは、逆相アプリケーションおよび HILIC アプリケーションの両方で、これらの相互作用を軽減することが証明されています⁴⁻⁷。MaxPeak HPS は、金属表面の結合ハイブリッド有機/無機修飾を利用することで機能します⁸。観測される分析種の挙動が固定相との相互作用によるものかカラムハードウェアとの相互作用によるものかが分析者には分からないため、金属表面の存在により分析法開発が複雑になる場合があります。MaxPeak Premier カラムを使用することで、分析者は、観測される結果が、純粋に分析種の移動相および固定相との相互作用のみに起因し、他の予測不可能な原因によるものではないという確信が得られます。

以前に発表された研究に基づくと、選択するカラムはそれぞれ異なる保持特性を有するため、このグループの化合物に対して異なる選択性が得られると考えられます⁷。未結合の CORTECS HILIC カラムは陽イオン交換体として機能し、イオン性相互作用によって塩基性分析種が優先的に保持されます。XBridge Premier BEH Amide カラムは中性相であり、主に分配によって保持が生じ、これより弱いイオン性相互作用も生じます。最後に、両性イオン性の Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムは、水系吸着容量が最も大きく、したがって分配による保持が最も大きくなります⁹。また、スルホベタインリガンドの2つの荷電基は、イオン性相互作用に寄与するだけでなく、双極子相互作用にも寄与します。これら3種類の固定相をすべて試験することで、適切な分離を見つけられる可能性が高くなります。

新しい分析法を開発する作業では、達成しなければならない目標を設定することが重要です。このような目標を設定する際は、分離度、ピーク形状、保持などのパラメーターを検討する必要があります。分析法の使用目的に応じて、その他のパラメーターを含める場合もあります。アミノ酸の分離では、サンプルの性質が複雑であることを考慮して、分離の要件を同重体化合物であるイソロイシンおよびロイシンについてのみ設定しました。これらの分析種は、質量分析計内で生じるプリカーサーイオンとプロダクトイオンが同じであるため、保持時間を基にして同定できるように、ベースライン分離が得られることが重要です。この混合物中の他のアミノ酸には固有の質量があるため、ベースライン分離はそれほど重要ではありません。この研究で重要なその他のパラメーターとしてピーク形状があります。幅の狭い良好なピーク形状を得ることは、正確な定量と高感度の検出のために重要です。理想的には、USP テーリング係数で測定したピーク形状が、すべてのアミノ酸について 0.8 ~ 1.2 であるべきです。ただし、この範囲外の値がケースバイケースで許容される場合があります。

図 1 に、17 種類のアミノ酸の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を使用した高 pH でのスクリーニングの結果を示します。Savitsky-Golay スムージングをレベル 15 で使用しました。いずれのカラムでも、イソロイシン/ロイシンの同重体ペア (星印の付いたピーク) は完全には分離されませんでした。この場合、これらの分析種の定量が困難になります。理想的ではないものの、いずれのカラムも、最適化してこの分離をさらに改善することができます。XBridge Premier BEH Amide カラムでは、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムで得られた結果と比較して、他の分析種についてわずかにより良好なピーク形状が得られました。これは、双性イオンリガンドとアミノ酸の間の二次相互作用に起因する可能性があります。さらに、BEH Z-HILIC カラムでは水系吸着容量が大きいいため、分析種の水層への分配がより多くなる可能性があります。これにより、ピーク幅が広がる可能性もあります⁹。この分離では、低 pH 移動相条件でより良好な結果が得られる場合があります。図 2 に、3 種類の低 pH で安定性の高い固定相でのアミノ酸の分離を示します。

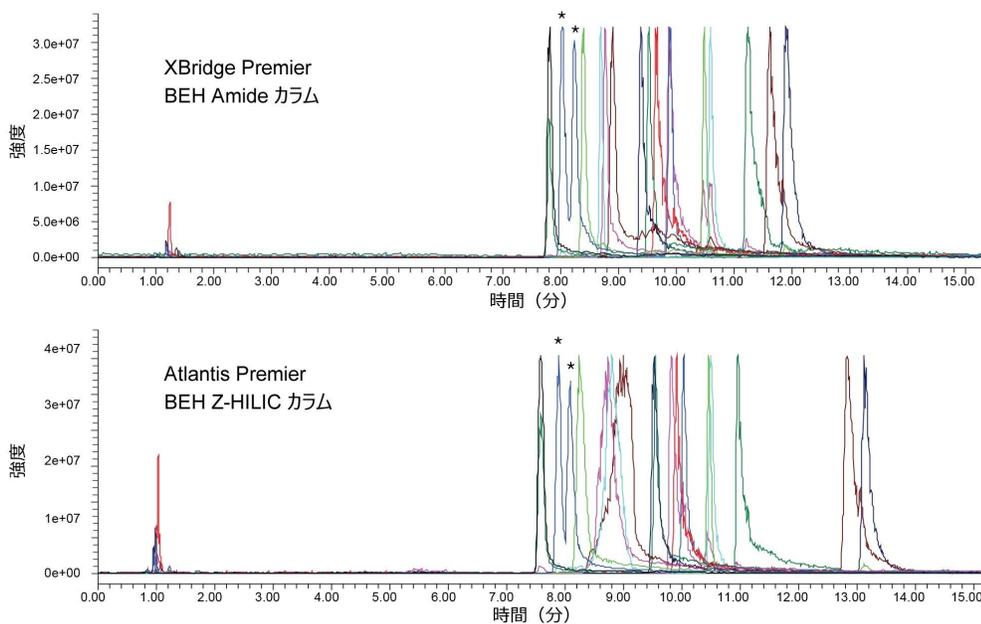


図 1. 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 9.0) 移動相を使用し、示したカラムで得られた 16 の EIC の重ね描き。11.5 分間にわたる 5 ~ 50% の水系リニアグラジエント (高水含量で 4 分間保持) を使用しました。バッファー濃度はグラジエント全体にわたって 10 mM に維持しました。タグ付けしたピークは同重体のイソロイシンとロイシンであるため、同じ EIC を使用しています。

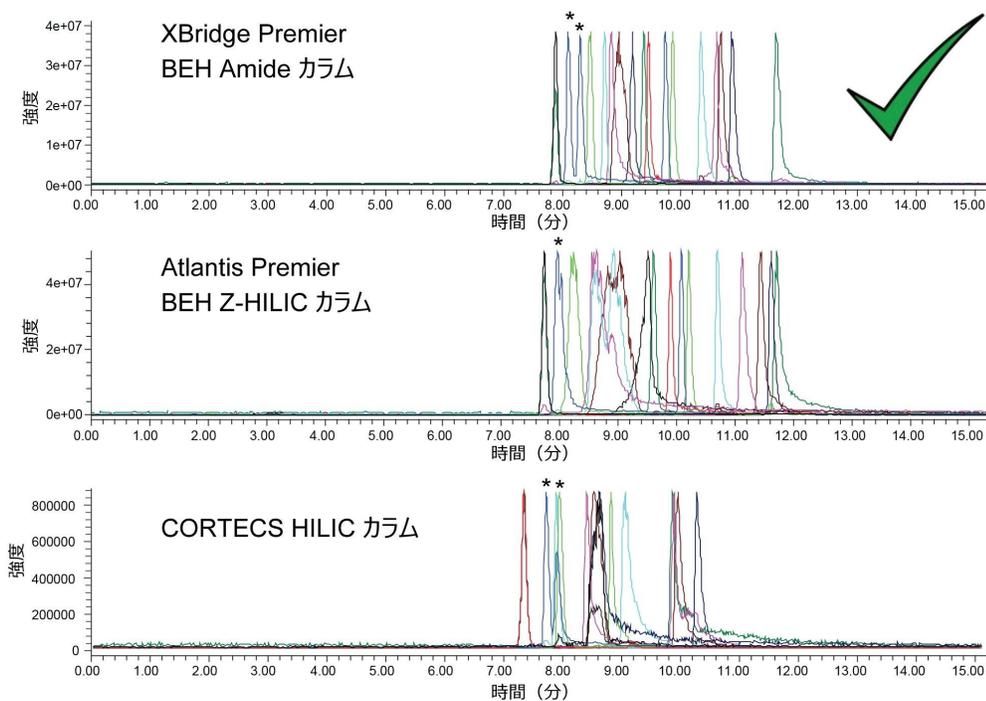


図 2. 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0) 移動相を使用し、示したカラムで得られた 16 の EIC の重ね描き。11.5 分間にわたる 5 ~ 50% の水系リニアグラジエント（高水含量で 4 分間保持）を使用しました。バッファー濃度はグラジエント全体にわたって 10 mM に維持しました。タグ付けしたピークは同重体のイソロイシンとロイシンであるため、同じ EIC を使用しています。

低 pH での BEH Z-HILIC カラムは、これらの条件を使用する分析に適さないことが明らかです。イソロイシンとロイシンがほぼ完全に共溶出しており、一部の分析種のピーク形状も許容範囲外です。CORTECS HILIC カラムでは、ロイシン/イソロイシンのペアについては妥当な分離が見られますが、かなり多くの分析種でピーク形状が悪く、MS シグナルが低いことがわかります。さらに、多くの化合物の分離が悪く、理想とは程遠い結果となりました。低 pH での BEH Amide カラムでは、同重体化合物がほどよく分離しており、他のアミノ酸のほとんどについても妥当なピーク形状が見られます。まだすべての基準を満たしてはいないものの、低 pH 移動相バッファーを使用する BEH Amide カラムを最適化に選択しました。最適化により、同重体化合物のピーク形状の改善および分離の向上が得られます。

サンプルが複雑であるため、この分析法の最適化は容易な作業ではありませんが、プロセスを一度に 1 ステップずつ進めることで、許容範囲内の分離が得られました。まず、グラジエントの勾配を調整し、具体的には勾配を緩やかにしました。グラジエントを緩やかにすることで、分析種が固定相と相互作用する時間が長くなり、分離の質が向上する可能性があります。グラジエントの勾配は、カラム容量あたりの強溶媒（この場合は水系移動相）の割合として測定されま

す。図3に、3種類のグラジエントの傾きを用いて得られた分離を示します。このケースでは、それぞれの分離を異なる水系濃度で開始し、グラジエント時間および最終水系濃度は維持しています。

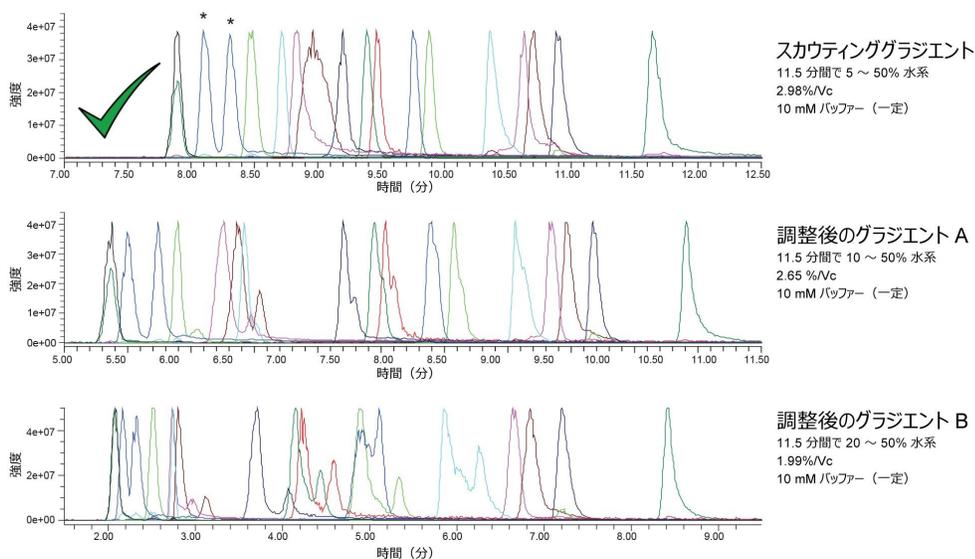


図3. XBridge Premier BEH Amide カラムで、10 mM で一定濃度のギ酸アンモニウム (pH 3.0) バッファーを使用し、徐々に緩やかになるグラジエントの傾きを使用したアミノ酸の分離改善の試み

この図からわかるように、グラジエントの傾きを小さくしても分離の質は改善しませんでした。実際まったく逆で、傾きが小さいほどイソロイシンとロイシンの共溶出の程度が大きくなり、一部のピークでは同じ質量に2番目のピークが現れています。すべての分析種がこの影響を受けるわけではありません。例えば、最も遅く溶出する4化合物では2番目のピークが見られませんが、その他の化合物では見られます。最初のスクリーニンググラジエントで、これらの化合物について全体として最適な分離が得られ、このグラジエントを次のステップのバッファー濃度の調整に使用しました。

バッファー濃度の調整は通常、以下の2つの方法のいずれかで行えます。最初に、10 mM バッファーではなく、20 mM などの異なる濃度を分析法に使用して、グラジエント全体にわたって濃度を一定のままに保ちます。ただし、グラジエントの傾きと5 ~ 50% の水系グラジエントにより、現在の分析法は、溶解度の問題による制限がやや生じます。代わりに、水系グラジエントとともにバッファーグラジエントを使用するという別の方法でバッファー濃度を調整しました。これにより、高有機移動相にバッファーが溶解しないという問題を回避できるとともに、分析種と固定相の間のイオン性相互作用に影響を及ぼすことにより、ピーク形状や選択性の問題に対処できます。図4に、2種類のバッファーグラジエントを、10 mM で一定のバッファー濃度を使用した最初のスクリーニンググラジエントと比較して示しま

す。

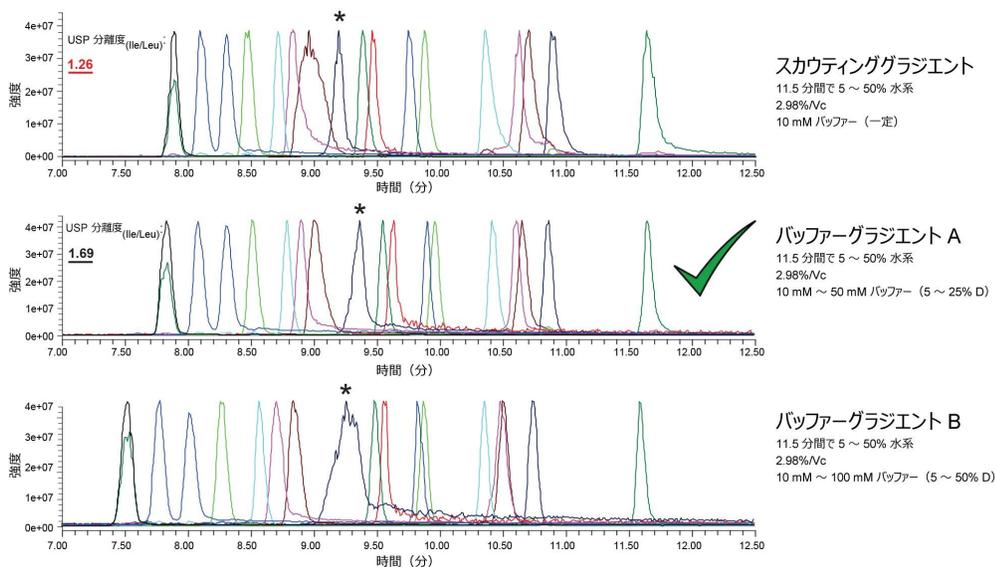


図 4. XBridge Premier BEH Amide カラムでのバッファーグラジエントの比較。バッファー条件および移動相条件を図に示しています。* はアラニンのピークを示します。

10 ~ 50 mM のグラジエントのバッファーを使用すると、イソロイシンとロイシンのペアの分離度が 1.26 から 1.69 に向上し、このアッセイの分離基準が満たされました。分離の詳細を観察すると、多くの化合物でピーク形状も改善されています。10 ~ 50 mM のグラジエントを使用した場合、10 mM で一定のバッファー濃度の場合と比較して、1 つのピークのみがより悪いピーク形状を示しました。これはアラニンのピークであり、バッファーのグラジエントを使用することでわずかに幅が広くなりました。逆に、アラニンの直前に溶出するプロリンのピークは、10 ~ 50 mM バッファーのグラジエントを使用することで、はるかに対称性が良く、幅が狭いピークになっています。これは、プロリンと固定相の間のイオン性相互作用の軽減に起因する可能性があります。

10 ~ 100 mM バッファーのグラジエントも試しましたが、アラニンのピーク形状がかなり悪化しました。イソロイシンとロイシンの分離は 2 種類のバッファーグラジエントの間でほぼ同じでしたが、アラニンのピーク形状がより良好な 10 ~ 50 mM のバッファーを最終試験に選択しました。最終的な分析法の条件を、サンプルの繰り返し注入および分析種のシングルイオンレコーディング (SIR) を用いて試験しました。MS シグナルを改善するためにスケジュールした SIR を使用し、繰り返し注入の積み重ねプロットを図 5 に示します。

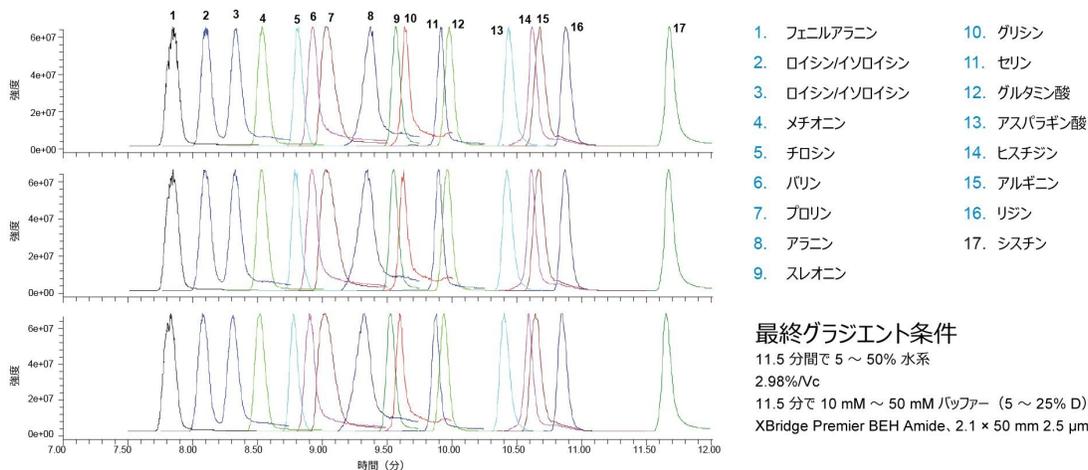


図 5. XBridge Premier BEH Amide カラムで、バッファーと水系グラジエントを使用したアミノ酸標準品混合物の 3 回繰り返し注入。バッファー濃度は 11.5 分にわたって 10 ~ 50 mM の範囲で変化させ、水系含有量も同じ時間にわたって 5 ~ 50% になるように調整しました。スケジュールした SIR を使用して分析種を検出しました。1) フェニルアラニン、2/3) イソロイシン/ロイシン、4) メチオニン、5) チロシン、6) バリン、7) プロリン、8) アラニン、9) スレオニン、10) グリシン、11) セリン、12) グルタミン酸、13) アスパラギン酸、14) ヒスチジン、15) アルギニン、16) リジン、17) シスチン。

最終的な分析法は、一部の例外を除き、先に設定した基準を満たしています。イソロイシンとロイシンのベースライン分離が達成されており、ほとんどの化合物で USP テーリング係数が目標の範囲内でした。プロリン、アラニン、グリシン、アルギニンのみが、USP テーリング係数が 0.8 ~ 1.2 の範囲外の分析種ですが、得られた値はそれでも 2.0 未満であり、これらの 4 化合物の USP テーリング係数はそれぞれ 1.5、1.5、1.7、1.7 でした。バッファー濃度を変更すると分析種にさまざまな影響が出るという分析法開発において見られた結果からすると、選択した分析法は、ピーク形状に関して最良の妥協点と言えます。この分析法は、バリデーション済みワークフローへの移行や、実際のサンプル中のアミノ酸の定量など、今後の研究に使用できます。

結論

HILIC を用いた遊離アミノ酸の分析について、ステップバイステップの分析法開発手順を示しました。まず、3 種類の HILIC 固定相と 2 種類の移動相 pH 値を用いて、カラムおよび移動相のスクリーニングを行いました。最初のスカウティングの結果から、XBridge Premier BEH Amide カラムおよび pH 3.0 のギ酸アンモニウム移動相バッファーを使用することで、最良の結果が得られることがわかりました。次に、異なるグラジエントの傾きやバッファー濃度のグラジエ

ントを試験することなどで、分析法の最適化を行いました。最終的な分析法には、水系グラジエントとバッファーグラジエントの両方が含まれています。これらにより、同重体化合物であるイソロイシンとロイシンが良好に分離されるとともに、サンプル中に存在するその他の 15 種類のアミノ酸について妥当なピーク形状が得られました。HILIC の分析法開発に体系的アプローチを用いることで、困難な極性分析種の混合物を分離するための有効な分析法を開発することができました。

参考文献

1. Grumbach E, Fountain K. Comprehensive Guide to HILIC Hydrophilic Interaction Chromatography. Waters Corporation, 2010. Pg 46–47.
2. Walter TH, Alden BA, Berthelette K. Evaluation of the Base Stability of Hydrophilic Interaction Chromatography Columns Packed with Silica or Ethylene-Bridged Hybrid Particles, *Separations*, 9 (2022) 146.
3. Gilar M, Berthelette K, Walter TH. Contribution of ionic interactions to stationary phase selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 1–12.
4. Clements B, Rainville P. Improved Chromatographic Analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Using CORTECS Premier Columns That Feature MaxPeak High Performance Surface HPS Technology. Waters Application note. [720007751](#). January 2023.
5. Berthelette K, Turner J, Walter TH. Isocratic Separation of RNA Nucleotide Triphosphates Including Pseudouridine using an Atlantis Premier BEH Z-HILIC Column. Waters Application Note. [720007704](#). August 2022.
6. Layton C, Rainville P. Advantages of Using MaxPeak HPS Technology for the Analysis of Targeted Cancer Growth Inhibitor Therapies. Waters Application Note. [720007565](#). March 2022.
7. Walter TH, Berthelette K, Patel A, Alden BA, McLaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Introducing Atlantis BEH Z-HILIC: A Zwitterionic Stationary Phase Based on Hybrid Organic/Inorganic Particles. Waters Application Note. [720007311](#). December 2021.
8. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.* 93 (2021) 5773–5781.
9. Gritti F, Alden B, McLaughlin J, Walter TH. Retention and mass transfer properties of the series of unbonded,

amide-bonded, and alkylsulfobetaine-bonded ethylene bridged hybrid hydrophilic interaction liquid chromatography columns.*J. Chromatogr. A*1692 (2023) 463828.

ソリューション提供製品

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

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

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

720008010JA、2023 年 7 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)