

使用XBridge Premier BEH Amide色谱柱开发并优化分离17种游离氨基酸的HILIC-MS方法

Kenneth D. Berthelette, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

方法开发往往是一项艰巨的任务。虽然方法筛选可能有明确定义的流程，却鲜有文献报道如何进行方法优化，因此人们通常视具体需求开展优化工作。可能有必要优化的一些常见参数包括梯度斜率、柱温、流动相添加剂浓度和pH。

在本应用纪要中，我们采用一套逐步、系统化的方案筛选色谱柱和流动相pH并优化方法，成功开发出一种可以分离17种游离氨基酸的HILIC方法。由于这些分析物缺少明显的发色团，本研究使用了ACQUITY QDa质谱检测器来检测它们。最终方法不仅采用水梯度，还采用了缓冲液浓度梯度。异亮氨酸和亮氨酸这对同分异构体分离良好，17种氨基酸全都获得了可接受的峰形。

优势

- 异亮氨酸和亮氨酸这对同分异构体实现了基线分离
 - 所有17种氨基酸全都获得了可接受的峰形
 - 逐步优化HILIC方法
 - HILIC方法筛选步骤概览
-

简介

亲水作用色谱(HILIC)是一种专门分离极性分析物的技术¹。该技术使用极性固定相和极性较弱的流动相。固定相会吸附流动相中的一部分水相组分，形成固定化水相层，分析物可能会被分配到这个水相层中。分配的量取决于被吸附的水相层的体积，以及分析物的化学性质。离子和氢键相互作用也会影响HILIC的保留。与反相色谱不同，HILIC对强极性分析物的保留性更强，对弱极性化合物的保留性更弱。由于HILIC基于多模式保留机制，开发HILIC方法的难度比开发反相色谱方法更大。

反相分析方法的典型方法开发策略也适用于开发HILIC分离方法。开发HILIC方法时，筛选色谱柱和流动相pH是非常重要的第一步，因为固定相会对保留性和分离质量产生巨大影响。但与反相色谱不同，筛选强溶剂并不是典型步骤，因为必须有水才能在固定相上形成吸附的水相层。乙腈（HILIC中最弱的溶剂之一）的替代溶剂包括甲醇、乙醇和丙醇。这些极性溶剂虽然在HILIC洗脱强度方面比水弱，但仍然有引起洗脱的能力，并且可能破坏固定相上吸附的水相层。因此，要筛选的典型参数仅限于色谱柱固定相和流动相pH。选好色谱柱和流动相pH后，即可开始优化方法。对于HILIC分离方法，优化所需的时间可能会比筛选色谱柱更长，这是因为可以改善分离效果的方法有很多，而优化的预期效果可能受到其他因素的干扰。

优化的步骤之一是根据单位柱体积的水相百分比调整梯度斜率。减小梯度斜率会增加分析物滞留在色谱柱上的时间，进而可使分析物与固定相之间发生更多潜在的相互作用。这有利于分离关键分析物对。另一个优化步骤是调整缓冲液浓度，这不仅会影响离子相互作用，还会影响吸附水相层的体积，从而影响分配机制。调整缓冲液浓度可能影响峰形，并且由于离子相互作用和分配发生了变化，还可能导致选择性略微变化。在某些情况下，优化时可能得采用缓冲液梯度，在梯度进展过程中，让缓冲液浓度随着水相组成而变化。这是离子交换色谱的常规做法，对改善HILIC的峰形或改变其选择性也有帮助。

本文中的研究开发并优化了一种分离游离氨基酸的HILIC方法。使用17种氨基酸的混标，在低pH和高pH流动相条件下筛选了三种固定相。确定最佳的固定相与流动相组合后，采用逐步、系统化的方案对方法做了优化。最终分析方法采用水梯度和缓冲液梯度，使用pH = 3的甲酸铵缓冲液和XBridge Premier BEH Amide色谱柱。由于许多游离氨基酸没有明显的发色团，无法进行UV检测，该方法采用的是质谱检测器。

实验

样品描述

打开盛装氨基酸水解产物标准品的安瓿瓶（P/N: [WAT088122](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/wat088122-amino-acid-standard-accq-tag-pico-tag-accq-tag-ultra.html>) , 放入系统等待分析。该标准品是17种氨基酸的100%水溶液, 除谷氨酸(2.6 μmol/mL)、异亮氨酸(2.6 μmol/mL)、丙氨酸(2.6 μmol/mL)和胱氨酸(1.27 μmol/mL)外, 其他氨基酸的浓度均为2.5 μmol/mL。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class Plus系统, 配备四元溶剂管理器(QSM)和可选的溶剂选择阀、流通针式样品管理器(SM-FTN)、色谱柱管理器、辅助色谱柱管理器和QDa质谱检测器
检测:	MS全扫描(ESI+) 使用最终方法确定的氨基酸SIR
色谱柱:	XBridge Premier BEH Amide色谱柱, 2.1 x 50 mm, 2.5 μm (P/N: 186009928) Atlantis™ Premier BEH Z-HILIC色谱柱, 2.1 x 50 mm, 2.5 μm (P/N: 186009985) CORTECS™ HILIC色谱柱, 2.1 x 50 mm 2.7 μm (P/N: 186007380)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μL
流速:	0.15 mL/min
流动相A:	Milli-Q水

流动相B:	乙腈
流动相D1:	按照HILIC入门指南 ¹ 中所述制备200 mM甲酸铵(pH 3.0)
流动相D6:	按照HILIC入门指南 ¹ 中所述制备200 mM乙酸铵(pH 9.0)
筛选梯度条件:	流动相Dx在整个梯度中始终保持在5%以确保添加剂浓度一致。线性梯度，流动相A在11.50 min内从0增加至45%。45% A保持3.8 min。返回到0% A的起始条件并保持15 min。总运行时间为31.0 min。优化梯度的详细信息见图片说明。

数据管理

色谱软件:	Empower 3 Feature Release 4
-------	-----------------------------

结果与讨论

开发HILIC方法的第一步是筛选固定相和流动相pH值。如果要采用高pH的缓冲液体系，这一步应注意选用在高pH下稳定的固定相。在高pH条件下可保持稳定的色谱柱包括填充有机/无机杂化基质颗粒的BEH Amide和BEH Z-HILIC色谱柱。硅胶基质色谱柱不应在高于推荐pH值的条件下使用，因为硅胶颗粒易溶解，会导致色谱柱降解²。

选择色谱柱时要考虑的主要因素是键合相以及不同色谱柱填料之间的选择性差异。HILIC色谱柱的选择性一直都是许多人研究的主题³。理想情况下，开发方法时选择的色谱柱应覆盖比较宽的选择性范围，以增加为分离找到合适固定相的几率。本研究选择了XBridge Premier BEH Amide、Atlantis Premier BEH Z-HILIC和CORTECS HILIC这三款色谱柱。Amide和Z-HILIC固定相基于杂化颗粒，因此在高pH和低pH条件下均可使用。CORTECS HILIC色谱柱基于实心核硅胶颗粒，柱效较高，但在高pH条件下不稳定，因此只能在低pH条件下使用。

此外，还应谨慎选择色谱柱硬件。系统和色谱柱硬件金属组件表面的金属氧化物层可通过离子相互作用与分析物

发生相互作用，导致非特异性吸附，具体表现为最终色谱图中的峰面积改变和变小、峰形变差。实验证明，MaxPeak Premier色谱柱配备的沃特世MaxPeak高性能表面(HPS)硬件可以减轻反相和HILIC应用中的这些相互作用⁴⁻⁷。MaxPeak HPS技术发挥作用的原理是对金属表面施以键合杂化有机/无机修饰⁸。金属表面可能干扰方法开发，因为分析人员会难以判断观察到的分析物行为是由于它们与固定相发生了相互作用，还是与色谱柱硬件发生了相互作用。使用MaxPeak Premier色谱柱，分析人员可以确保观察到的任何结果都只来自分析物与流动相和固定相之间的相互作用，而不是其他不可预测的来源。

根据我们之前发布的一篇应用纪要，考虑到每种化合物的保留特性各不相同，选用的色谱柱对这组化合物的选择性应当有一定差异⁷。未键合的CORTECS HILIC色谱柱充当阳离子交换型色谱柱，通过离子相互作用优先保留碱性分析物。XBridge Premier BEH Amide色谱柱为中性固定相，其保留机制主要是分配，辅以一些同步发生的弱离子相互作用。最后，两性离子Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱的吸附水相层体积最大，因此基于分配机制的保留性能最高⁹。此外，磺基甜菜碱键相上的两个带电基团对离子相互作用有利，但它们也会加强偶极相互作用。通过测试这三种固定相，可以增加找到合适分离方法的可能性。

在任何开发新方法的活动，确立必须实现的目标都非常重要。设定这些目标时，应考虑分离度、峰形和保留性等参数。根据方法的预期用途，还可以纳入其他参数。对于氨基酸分离，鉴于样品本身就比较复杂，我们只针对异亮氨酸和亮氨酸这对同分异构体设定了分离度要求。这两种分析物在质谱分析中具有相同的母离子和子离子，因此必须让它们实现基线分离，以便根据保留时间进行鉴定，这一点至关重要。混标中的其他氨基酸都具有独特的质量数，因此实现基线分离并不是必要条件。本研究的另一个重要参数是峰形。获得峰形良好的窄峰对于实现准确定量和灵敏检测非常重要。理想情况下，所有氨基酸的峰形（通过USP拖尾因子衡量）应介于0.8~1.2之间。但是，允许视具体情况判断是否接受超出该范围的值。

图1显示了在高pH条件下使用17种氨基酸的提取离子流色谱图(EIC)进行筛查的结果。采用水平为15的Savitsky-Golay平滑。两根色谱柱都没能完全分离异亮氨酸/亮氨酸这对同分异构体对（带星号的峰），给定量这些分析物带来了挑战。虽然结果不够理想，但两根色谱柱都有优化的空间，有望进一步改善分离。与Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱获得的结果相比，XBridge Premier BEH Amide色谱柱分离其他分析物的峰形稍微好一些。这可能是两性离子键合相与氨基酸之间的次级相互作用所致。此外，由于BEH Z-HILIC色谱柱上吸附水相层的体积更大，分析物可能会更多地分配到水相层中，这也可能导致峰变宽⁹。低pH流动相条件下的分离结果可能会更好。图2显示了这三种在低pH条件下稳定的固定相分离氨基酸的结果。

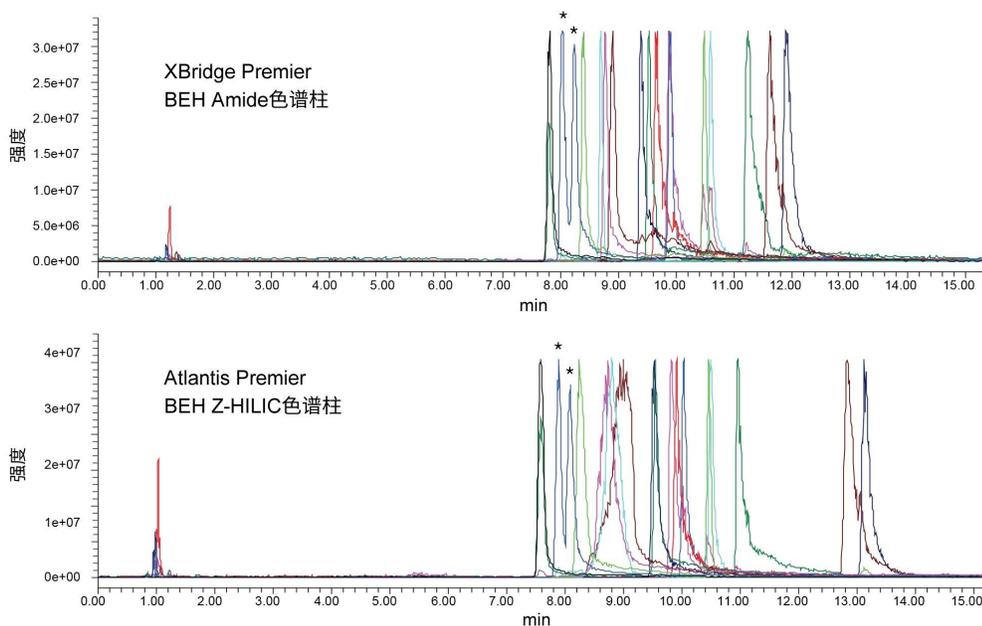


图1.使用10 mM乙酸铵(pH 9.0)流动相在指定色谱柱上采集到的16幅EIC的叠加图。使用线性水相梯度,水相在11.5 min内从5%增加至50%,并在高水相比例下保持4 min。在整个梯度中,缓冲液浓度保持10 mM。带标记的峰是异亮氨酸和亮氨酸,它们互为同分异构体,因此使用相同的EIC。

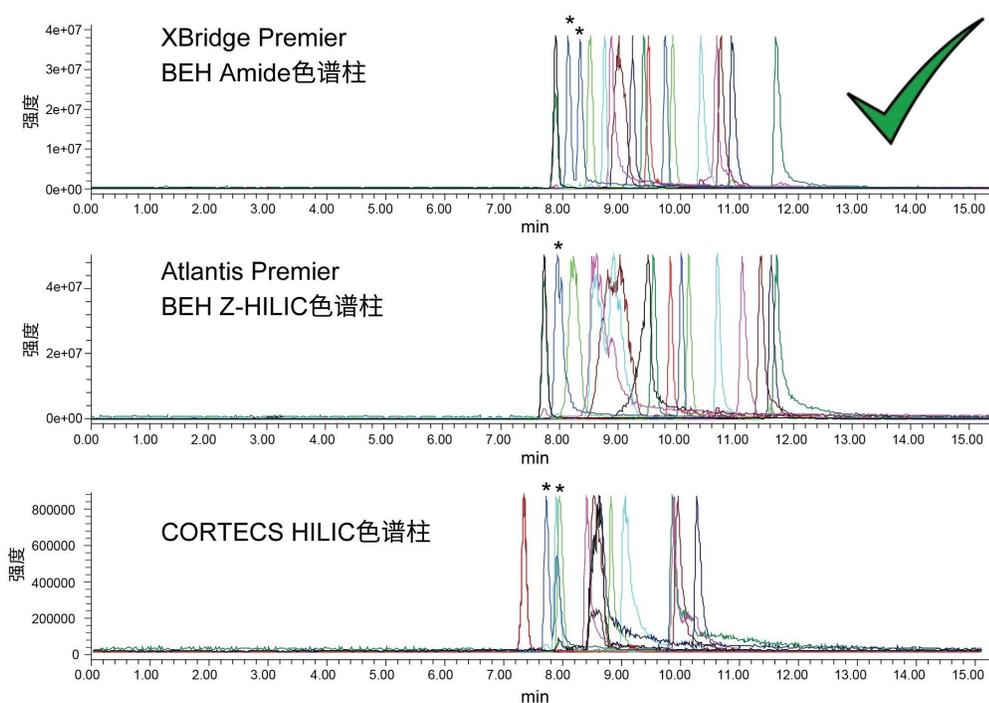


图2.使用10 mM 甲酸铵(pH 3.0)流动相在指定色谱柱上采集到的16幅EIC的叠加图。使用线性水相梯度,水相在11.5 min内从5%增加至50%,并在高水相比例下保持4 min。在整个梯度中,缓冲液浓度保持10 mM。带标记的峰是异亮氨酸和亮氨酸,它们互为同分异构体,因此使用相同的EIC。

由图可以明显看出, BEH Z-HILIC 色谱柱不适合在低pH条件下采用这些条件运行分析。异亮氨酸和亮氨酸几乎完全共流出,某些分析物的峰形也不可接受。CORTECS HILIC 色谱柱对亮氨酸/异亮氨酸这对分析物的分离效果尚可,但大部分分析物都峰形较差且MS信号较低。此外,许多化合物的分离度都比较差,远称不上理想。BEH Amide 色谱柱在低pH条件下对同分异构体化合物的分离效果很不错,且大多数其他氨基酸的峰形也尚可接受。虽然仍未满足所有标准,但我们选择在BEH Amide 色谱柱和低pH流动相缓冲液的基础上进行优化。通过优化可以改善峰形和提高同分异构体化合物的分离度。

由于样品比较复杂,优化该方法并非易事,但我们通过逐步优化获得了可接受的分离效果。首先调整梯度的倾斜度,具体而言,是要降低倾斜度。通过将梯度变得更平缓,可以留给分析物更多时间与固定相相互作用,有望改善分离质量。梯度倾斜度以每柱体积的强溶剂(在本例中为水相流动相)百分比衡量。图3展示了三种不同梯度斜率下获得的分离结果。在本例中,每次分离以不同的水相浓度开始,而梯度时间和结束水相浓度保持不变。

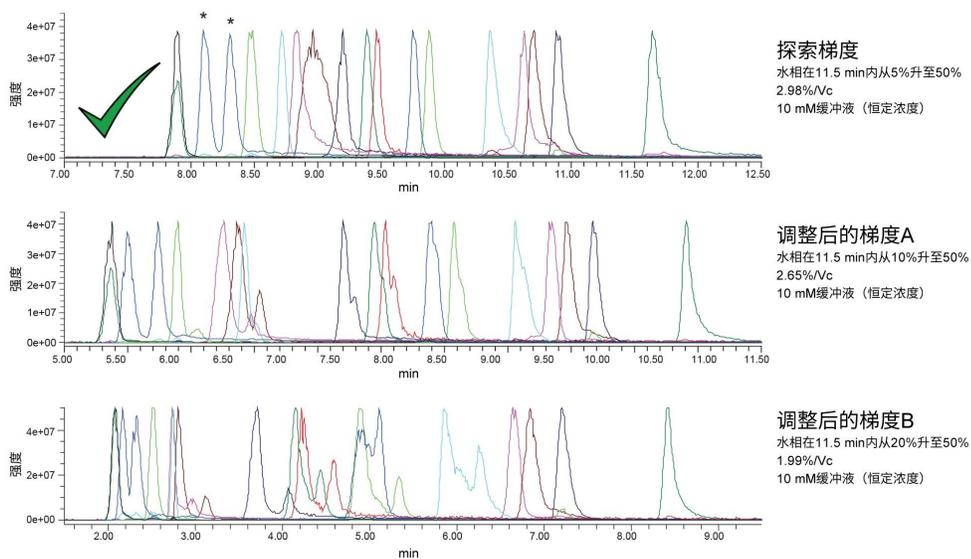


图3.在XBridge Premier BEH Amide色谱柱和恒定浓度的10 mM甲酸铵(pH 3.0)缓冲液条件下, 尝试采用逐渐平缓的梯度斜率改善氨基酸分离结果。

如图所示, 减小梯度斜率并不能改善分离质量。事实恰恰相反, 随着梯度斜率变平缓, 异亮氨酸和亮氨酸的共流出现象愈发严重, 某些峰的质量数处还出现了第二个峰。并非所有分析物都会受到这种影响。例如, 最后洗脱的四种化合物没有形成任何次峰, 而其他化合物却有。初始探索梯度对这些化合物的总体分离效果较为理想, 因此被用于下一个优化步骤, 即调整缓冲液浓度。

一般通过以下两种方式之一来调整缓冲液浓度。首先, 可以使用其他浓度的缓冲液(例如20 mM)代替该方法使用的10 mM缓冲液, 并在整个梯度中保持恒定。但是, 梯度斜率和5%~50%的水相梯度使得当前方法可能会因潜在的溶解度问题而受到一定程度的限制。我们转而采用了另一种方式来调整缓冲液浓度, 也就是同时使用缓冲液梯度和水相梯度。这种方式避免了缓冲液不溶于高比例有机溶剂流动相的潜在问题, 同时仍能通过影响分析物与固定相之间的离子相互作用解决峰形或选择性问题。图4对比了两种不同的缓冲液梯度与初始筛选梯度(使用恒定浓度为10 mM的缓冲液)得到的结果。

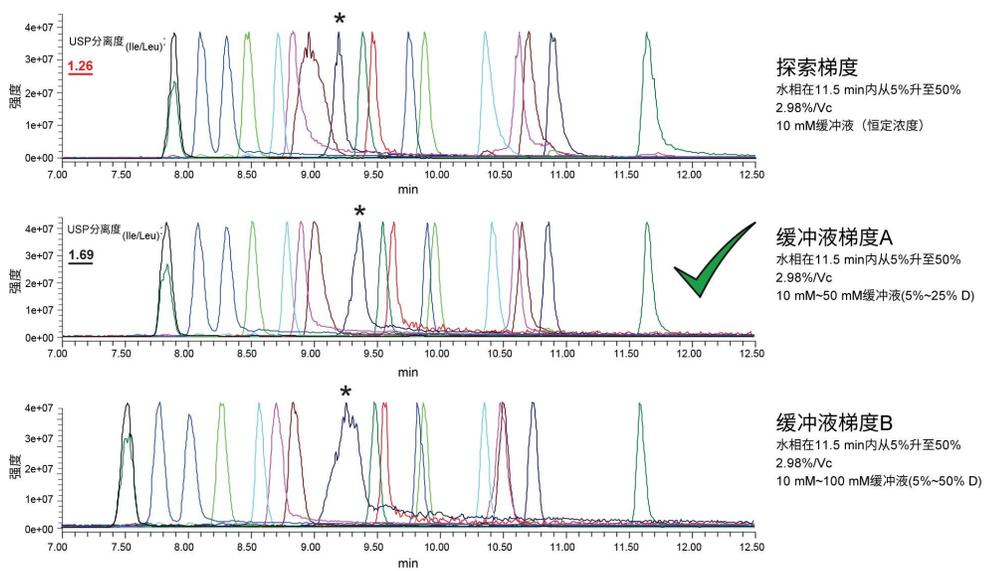
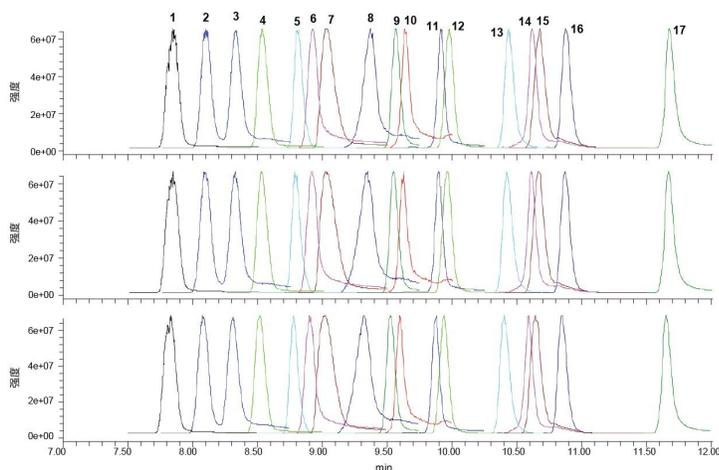


图4.XBridge Premier BEH Amide色谱柱上的缓冲液梯度比较。缓冲液和流动相条件如图中所示。*表示丙氨酸峰。

使用10~50 mM缓冲液梯度可将异亮氨酸和亮氨酸这对分析物的分离度从1.26提高至1.69，满足我们对该分析方法的分离度要求。仔细观察分离结果可以发现，许多化合物的峰形也得到了改善。与使用恒定浓度的10 mM缓冲液相比，使用10~50 mM梯度时只有一个峰的峰形变差，那就是丙氨酸峰，该峰在使用缓冲液梯度的条件下稍微变宽了一些。而与此相反，使用10~50 mM缓冲液梯度时，在丙氨酸之前紧邻它洗脱的峰（脯氨酸）变得更加对称且更窄。这可能是脯氨酸与固定相之间的离子相互作用减弱所致。

我们还尝试了10~100 mM的缓冲液梯度，但丙氨酸的峰形明显变差。在这两种缓冲液梯度下，异亮氨酸和亮氨酸的分离效果大致相同，但10~50 mM缓冲液梯度下的丙氨酸峰形更好，因此我们选用该梯度择进行最终测试。通过重复进样和运行分析物的单离子扫描(SIR)来测试最终方法条件。使用设定好的SIR改善MS信号，重复进样的叠加图如图5所示。



- | | |
|-------------|----------|
| 1. 苯丙氨酸 | 10. 甘氨酸 |
| 2. 亮氨酸/异亮氨酸 | 11. 丝氨酸 |
| 3. 亮氨酸/异亮氨酸 | 12. 谷氨酸 |
| 4. 甲硫氨酸 | 13. 天冬氨酸 |
| 5. 酪氨酸 | 14. 组氨酸 |
| 6. 缬氨酸 | 15. 精氨酸 |
| 7. 脯氨酸 | 16. 赖氨酸 |
| 8. 丙氨酸 | 17. 胱氨酸 |
| 9. 苏氨酸 | |

最终梯度条件

水相在11.5 min内从5%升至50%
 2.98%/Vc
 缓冲液在11.5 min内从10 mM增加到50 mM (5%~25% D)
 XBridge Premier BEH Amide, 2.1 x 50 mm 2.5 μm

图5.氨基酸混标在XBridge Premier BEH Amide色谱柱上重复进样三次并采用缓冲液梯度和水相梯度运行分析得到的结果。缓冲液浓度在11.5 min内从10 mM变化至50 mM，水相含量也在同一时间段内从5%升至50%。采用设定好的SIR检测分析物。1)苯丙氨酸；2/3)异亮氨酸/亮氨酸；4)甲硫氨酸；5)酪氨酸；6)缬氨酸；7)脯氨酸；8)丙氨酸；9)苏氨酸；10)甘氨酸；11)丝氨酸；12)谷氨酸；13)天冬氨酸；14)组氨酸；15)精氨酸；16)赖氨酸；17)胱氨酸。

最终方法符合之前设定的标准，但存在一些例外情况。异亮氨酸和亮氨酸实现了基线分离，并且大多数化合物的USP拖尾因子都在目标范围内。USP拖尾因子在0.8~1.2这个范围之外的分析物只有脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸和精氨酸，但这四种化合物的USP拖尾因子值都在2.0以下，分别为1.5、1.5、1.7和1.7。基于方法开发过程中观察到的结果（即改变缓冲液浓度会以不同方式影响分析物结果），我们选择的是权衡了峰形影响的理想方法。该方法可用于未来的研究，包括转换到经过验证的工作流程或用于定量实际样品中的氨基酸。

结论

本文展示了一套氨基酸HILIC分析方法的逐步开发方案。首先在三种不同的HILIC固定相和pH不同的两种流动相中筛选色谱柱和流动相。初步探索结果表明，使用XBridge Premier BEH Amide色谱柱和pH 3.0的甲酸铵流动相缓冲液可获得理想结果。接下来优化方法，包括测试不同的梯度斜率和缓冲液浓度梯度。最终方法同时使用水相梯度和缓冲液梯度，让异亮氨酸和亮氨酸这对同分异构体实现了良好的分离，样品中其他15种氨基酸的峰形也尚可接受。采用系统性的HILIC方法开发方案，可以开发出有效的方法用于分离棘手的极性分析物混合物。

参考资料

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. 借助采用MaxPeak高性能表面HPS技术的CORTECS Premier色谱柱改进非甾体抗炎药(NSAID)的色谱分析, 沃特世应用纪要, [720007751ZH](#), 2023年1月.
5. Berthelette K, Turner J, Walter TH. 使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱对包括假尿苷在内的RNA核苷三磷酸进行等度分离, 沃特世应用纪要, [720007704ZH](#), 2022年8月.
6. Layton C, Rainville P. 使用MaxPeak HPS技术分析靶向癌症生长抑制剂治疗药物的优势, 沃特世应用纪要, [720007565ZH](#), 2022年3月.
7. Walter TH, Berthelette K, Patel A, Alden BA, McLaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Atlantis BEH Z-HILIC简介: 一种基于有机/无机杂化颗粒的两性离子固定相, 沃特世应用纪要, [720007311ZH](#), 2021年12月.
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.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720008010ZH, 2023年7月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)