

極性分子の保持と分離 — HILIC カラムと 逆相 LC カラムの使い分けに関する考察

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.

概要

今回の研究では、保持されにくい極性およびイオン化低分子を分析する際に、親水性相互作用 LC (HILIC) カラムと逆相 LC (RPLC) カラムをそれぞれどのような場合に使用すべきかについて調査しました。調査で得られたデータから、成分/サンプル、移動相、検出モード、およびその他のメソッド適合性要件 (保持、分解能、感度、ピーク形状) がカラムの選択に影響することがわかりました。

はじめに

極性低分子を逆相液体クロマトグラフィーで十分に保持し、分離するのは、容易な作業ではありません。LC メソッドの開発では、出発点として C18 などのアルキル固定相の LC カラムが一般に使用されています。ただし、極性の高い成分は、非極性の C18 固定相に対する親和性が低く、ほとんど保持されません。逆相モードでこれらの化合物を保持させるための手段として、移動相へのイオンペア試薬の添加や成分の誘導体化など、複数の手法が考えられます。ところが、イオンペア試薬は LC カラムや LC システムを汚染する可能性があるため、通常は LC/MS に適していません。誘導体化についても、この煩雑な追加ステップによってサンプル前処理時間が長くなり、誤差や再現性の問題につながる可能性もあります。

極性成分を適切に保持し、分離するためのより確実な方法は、利用可能な幅広い固定相充填剤を試すことです。保持および分離が困難な極性成分に適した充填剤もいくつかあります。逆相モードでは、より極性の高い充填剤を代わりに使用することで、極性成分と固定相との相互作用を高めることができます。これらの固定相の多くは、100 % の水性移動相など、溶出力が非常に弱い移動相にも対応できるため、水性移動相を使用して極性化合物の保持力を高めることも可能です。逆相充填剤の他、親水性相互作用固定相の LC (HILIC) カラムも市販されています。HILIC モードでは、極性成分を保持するために極性固定相を使用します。特定の成分に最適なカラムと LC モードは、充填剤に加え、成分の溶解性、移動相、望ましい検出モードなどのメソッド要因にもとづいて判断することができます。

最新の LC カラムには、通常、表面多孔質粒子が充填されています。表面多孔質粒子カラムは、低い背圧で高効率分離できることで知られています。この分離効率の高さが、近接して溶出するピークの分解能を高め、また低い背圧により、使用できる LC 機器の幅が広がります。

今回の研究により、論理的で段階的な手法を用いることで、表面多孔質粒子の LC カラムで目的とする極性成分を最適に保持、分離、検出できることがわかりました。

実験方法

今回の実験では、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent Ultivo LC/TQ を使用しました。システムボリュームと分散を抑えるために、標準構成のシステムに改良を加えました。表 1 に、詳細なシステム構成を示します。

表 1. システム構成

Agilent 1290 Infinity II LC システムの構成	
Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)	- デガッサ - シールウォッシュポンプ 35 µL 溶媒ミキサー：Agilent Jet Weaver, 35 µL/100 µL (p/n G4220-60006) - ファームウェア: B.07.23 [0009]
Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)	- サンプルサーモスタット (p/n G7167-60101) - 計量パラメータ: シートアセンブリ、PEEK、0.12 mm、サンプルループ 20 µL、分析ヘッド 20 µL - オートサンブラ & ヒーター：キャピラリー、ステンレス製、0.12 × 105 mm、SL/SL (p/n 5500-1238) - バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716) - キャップ、スクリュ、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個 (p/n 5182-0717) - バイアルインサート、250 µL、ガラス製、樹脂足付き、100 個 (p/n 5181-1270) - ファームウェア: D.07.23 [0009]
Agilent InfinityLab LC シリーズ一体型カラムコンパートメント (G7130A)	- 内蔵タイプ: G7129B 3.0 µL 熱交換器 - ヒーター & カラム: InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.075 mm (p/n 5067-5961) - カラム & フローセル: キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm、SV/SLV (p/n 5067-4784) - ファームウェア: B.07.23 [0009]
Agilent Ultivo LC/TQ (G6465A)	Agilent Jet Stream ESI イオン源
Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)	- 超低分散 Max-Light カートリッジフローセル、10 mm、0.60 µL (p/n G4212-60038) - UV ランプ (5190-0917) - ファームウェア: D.07.23 [0009]
Agilent LC カラム	- Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 685775-924) - Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695775-408) - Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695775-912) - Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 685775-601) - Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 µm (p/n 959758-902) - Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus、2.1 × 100 mm、1.8 µm (p/n 959758-901)

図 1 に、今回の研究に使用したアジレントの固定相を示します。すべてのカラムは、2.1 × 100 mm フォーマットのものを使用しました。各カラムの部品番号については、表 1 をご覧ください。

詳細な LC メソッドパラメータは、本書の各図に示します。

今回の研究に使用したすべての成分および移動相添加剤は、Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。また、アセトニトリルは、Honeywell 社 (Burdick and Jackson、米国ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。水は、Milli-Q システム (Millipore 社、米国マサチューセッツ州バーリントン) で製造し、0.2 μm フィルタでろ過した 18 MW のものを使用しました。

結果と考察

親水性相互作用 LC (HILIC) と逆相 LC (RPLC) は、相補的なクロマトグラフィー法です。表 2 に、2 つの LC 法の主な特性をまとめます。多くの RPLC カラムでは非極性固定相 (C18、C8 など) が使用され、HILIC カラムでは極性固定相 (シリカ、アミドなど) が使用されています。どちらの分析法も、移動相は一般にアセトニトリルと水で構成されるため、この 2 つの LC モードを簡単かつ柔軟に切り替えることが可能です。HILIC と RPLC の移動相の主な違いは、溶媒の溶出強度です。RPLC では、アセトニトリルが溶出強度の高い

溶媒であるのに対し、HILIC の場合は、水が溶出強度の高い溶媒になります。また、結果的なクロマトグラフィーは、通常、RPLC では極性の高い成分から非極性成分まで順に溶出するのに対し、HILIC では逆の順序になります。この溶出順序の逆転により、より広く使用されている RPLC を HILIC で都合よく補うことができます。これは、HILIC モードで長く保持される極性成分やイオン化成分について特に言えることです。

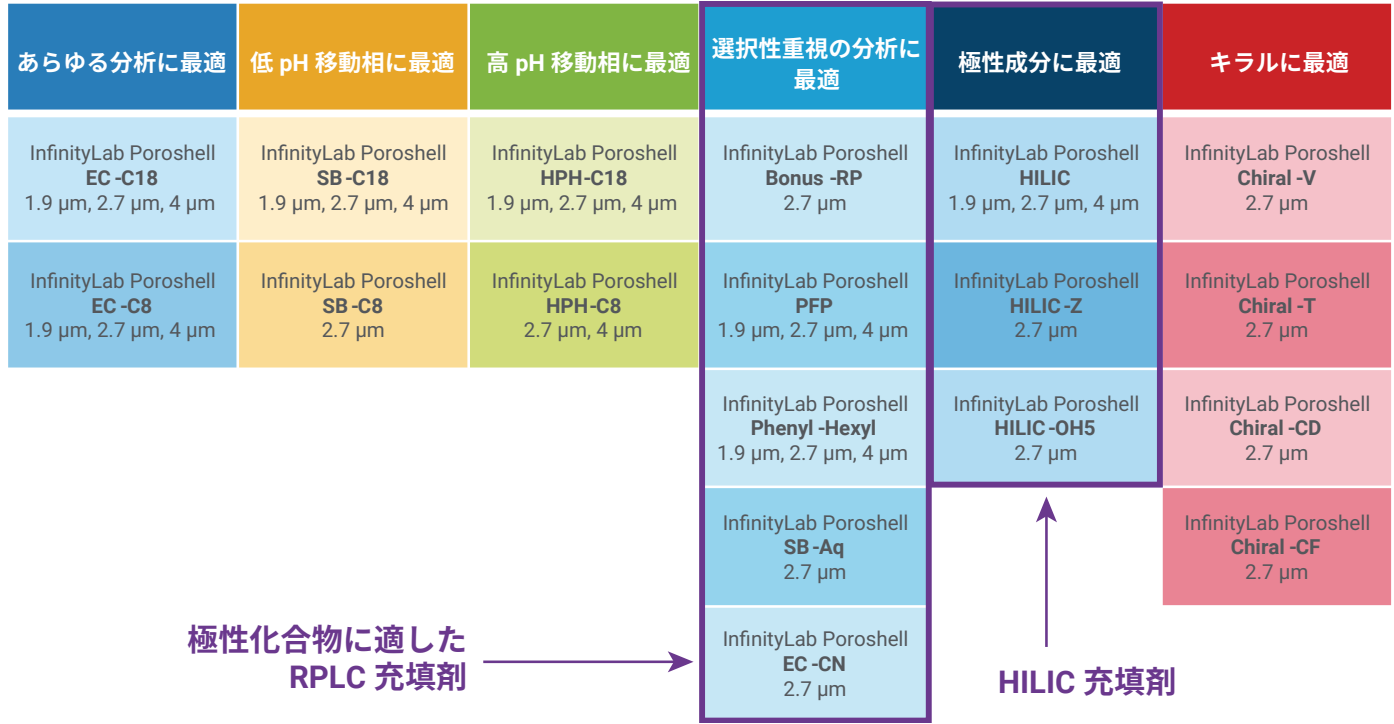


図 1. 低分子分離用の Agilent InfinityLab Poroshell 120 ポートフォリオ

表 2. HILIC と RPLC の相補関係

逆相 LC	親水性相互作用 LC
非極性固定相 (C18 など)	極性固定相 (シリカなど)
極性移動相 ・ 水/アセトニトリル、水/メタノール	極性移動相 ・ 水/アセトニトリル
移動相の極性の低下に伴って保持が低下 ・ 移動相中のアセトニトリル含量を増やすと、保持が低下	移動相の極性の増加に伴って保持が低下 ・ 移動相中の水含量を増やすと、保持が低下
溶出順序: 極性から非極性へ	溶出順序: 非極性から極性へ

極性化合物成分にどの LC 分析法を使用すべきかの判断は、必ずしも容易ではありません。どのタイプのメソッドなら分離要件が満たされ、サンプルとの最適な相互作用が得られるのか、またどのタイプの検出器が適しているのかを慎重に検討する必要があります。

カラムの選択肢

極性化合物を分析するときは、幅広い固定相充填剤を検討します。今回の研究では、簡潔にするために、特定の LC カラムファミリーを試しました。その固定相を図 1 に示します。Agilent InfinityLab Poroshell 120 ファミリの LC カラムには、独自のカラム充填剤が 18 種類用意されており、それぞれ拡張可能な 3 種類の表面多孔質粒子サイズで提供されていま

す。極性化合物の分析には、図 1 の太枠内の固定相を評価するべきでしょう。一般に、極性化合物の分析では、HILIC 充填剤がデフォルトとして考えられていますが、良好な結果が得られる RPLC 充填剤もいくつかあります。図 1 の太枠内の RPLC 固定相では、100 % の水性移動相を使用でき、ディウエットング (移動相が粒子ポアから排除され浸透しない現象) のリスクが生じないことから、極性またはイオン化合物の保持に役立てることができます。

多くの場合、目的化合物を適切に保持して分離でき、良好なピーク形状が得られるものが、分析に最適なカラムです。それ以外のメソッド適合性基準が要求されることもあります。ダイオードアレイ検出器 (DAD)、蛍光検出器

(FLD)、蒸発光散乱検出器 (ELSD)、示差屈折率検出器 (RID) など、非選択的な検出器を使用する場合は、分解能が特に重要になります。質量分析計 (MS) を使用する場合は、同重体が存在するときは、高いクロマトグラフィー分解能が必要になることがあります。

図 2 に示すアミノ酸の分離例を見てみましょう。HILIC カラムでは、ロイシンとイソロイシンの異性体ペアも含め、成分が良好に保持され、分離されています。一方、RPLC カラムでは、これらの遊離アミノ酸のほとんどが保持されずにボイド直後に溶出し、クロマトグラフィー分離できていません。この分析に MS を使用したことで、これらの化合物も分離され、積分できていますが、溶出するすべての化

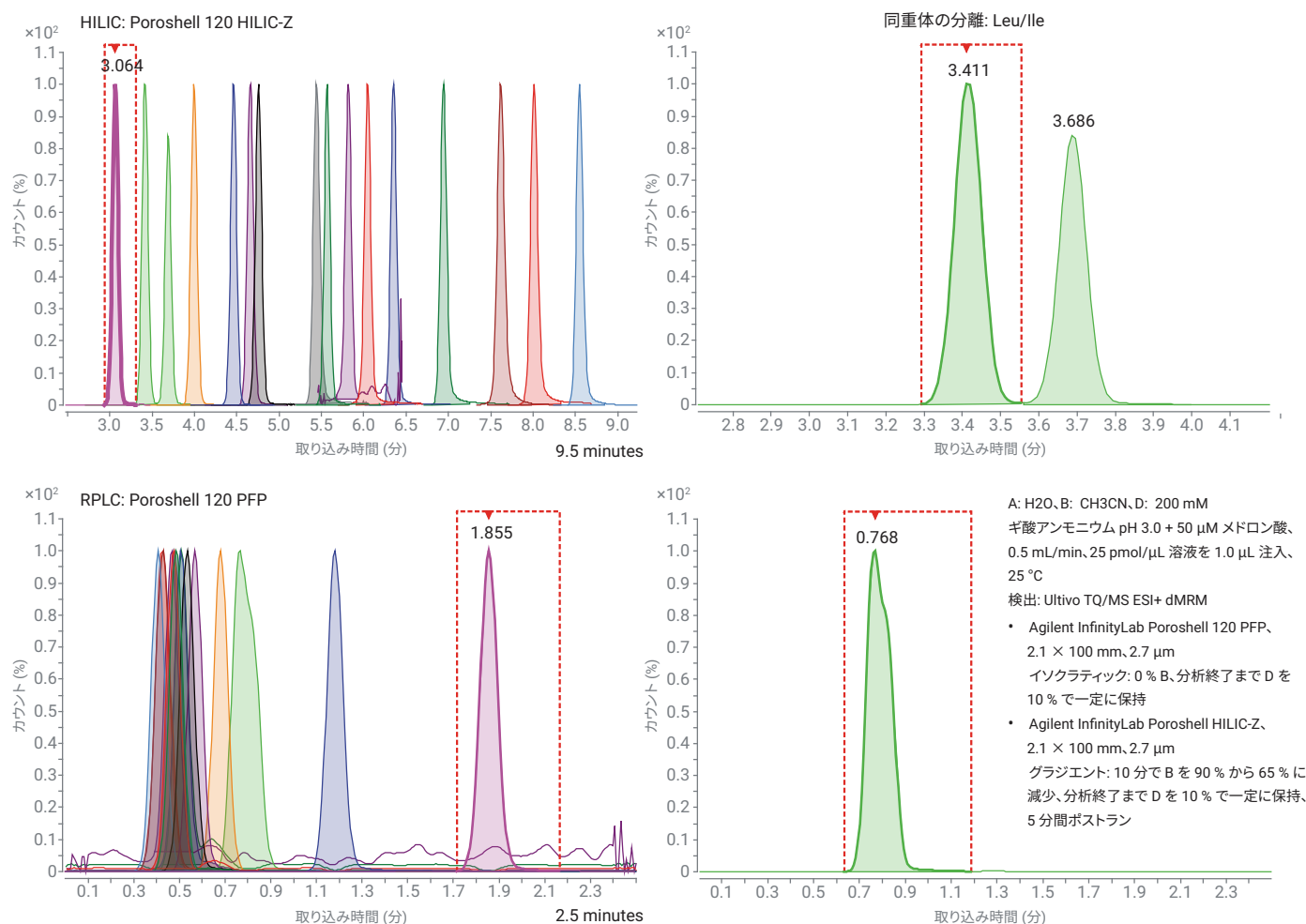


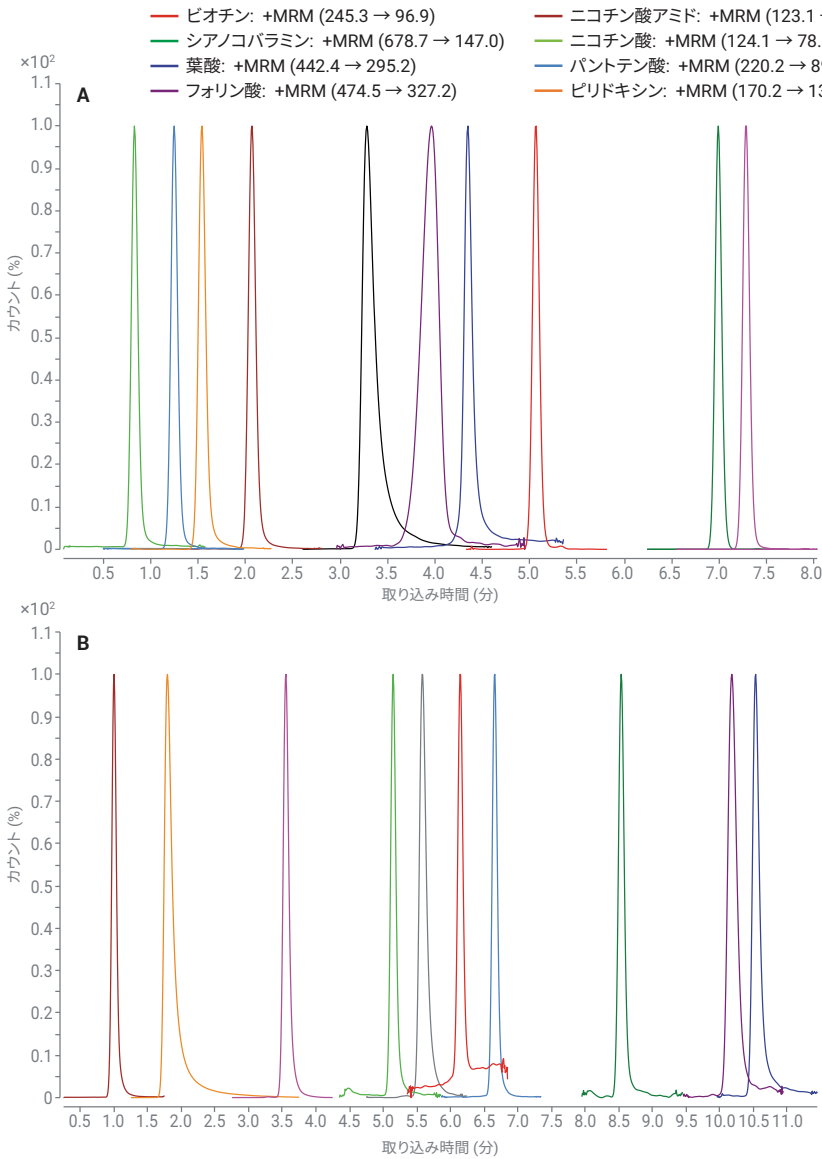
図 2. HILIC では、アミノ酸が保持され、同重体が分離されていますが、RPLC では保持・分離できていません。

学種でイオン抑制が生じる可能性があります。また、同重体であるロイシンとイソロイシンは十分に分離されていません。このような遊離アミノ酸や、RPLC では成分を保持できないその他サンプルには、RPLC よりも HILIC の方が適しています。

注: アミノ酸は、事前に OPA/FMOC で誘導体化することにより、RPLC/UV でも分析できます。これについては、アプリケーションノート 5991-5571EN¹ をご覧ください。

アミノ酸などのサンプルでは、どの LC モードを選択すべきか迷うことはありませんでしょう。一方、RPLC と HILIC のどちらでも良好に分離できるサンプルもあります。図 3 の水溶性ビタミンの分析結果をご覧ください。RPLC および HILIC の両方のカラムで、10 種

類すべてのビタミン化合物がベースライン分離されています。このように、どちらの分析法でも分離できる場合は、サンプルと望ましい検出モードに基づいて、RPLC と HILIC のどちらが最適かを判断することをおすすめします。



移動相 A	H ₂ O
移動相 B	CH ₃ CN
移動相 D	200 mM 酢酸アンモニウム + 0.2% 酢酸、pH 約 5.3
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 % B で 1 分間、8 分で B を 0 % から 25 % に増加、分析終了まで D を 5 % で一定に保持、3 分間ポストラン
注入	ビタミン標準物質の 0.4 µg/mL H ₂ O 溶液を 0.5 µL 注入
カラム	25 ° C、Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、2.1 × 100 mm、2.7 µm
検出	Agilent Ultivo TQ/MS ESI+ dMRM、DAD Sig = 260 nm、80 Hz

移動相 A	H ₂ O
移動相 B	CH ₃ CN
移動相 D	200 mM 酢酸アンモニウム (pH 未調整)、pH 約 6.7
流量	0.5 mL/min
グラジエント	10 分で B を 95 % から 65 % に減少、分析終了まで D を 5 % で一定に保持、5 分間ポストラン
注入	ビタミン標準物質の 0.4 µg/mL CH ₃ CN 溶液を 0.5 µL 注入
カラム	25 ° C、Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 µm
検出	Agilent Ultivo TQ/MS ESI+ dMRM (パラメータは上記を参照)、DAD Sig = 260 nm、80 Hz

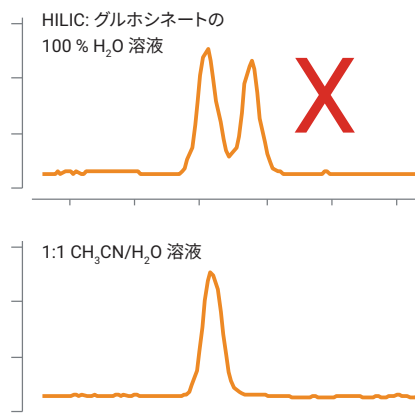
図 3. RPLC (A) および HILIC (B) のどちらの LC モードでも、水溶性ビタミンが保持され、分離されています。RPLC: Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、HILIC: Agilent Poroshell 120 HILIC-OH5。

サンプルに関する考慮事項

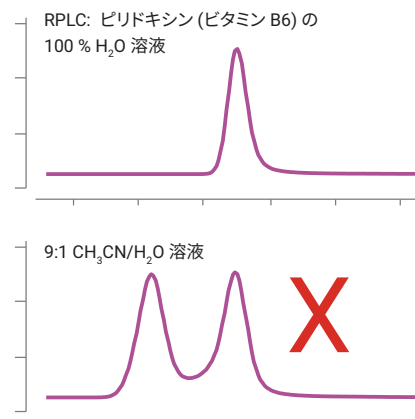
RPLC と HILIC のどちらを使用する場合も、カラムに強溶媒を注入してはなりません。RPLC の場合、溶出力の弱いサンプル希釈液は、ほぼ水で構成され、HILIC の場合は、ほぼアセトニトリルで構成されます。図 4 に、両方の分析法において強溶媒を注入した場合のピーク形状への悪影響を示します。一方、溶出力の弱いサンプル溶媒を注入した場合は、どちらの分析法でも対称で明確なピークが得られています。

注入する溶媒の強度による影響は、早く溶出する化合物やイソクラシック分析において、より顕著に現れます。また、図 5 に示すように、注入量が多くなるほど強溶媒の影響は大きくなります。一方、溶出力の弱いサンプル溶媒を使用した場合は、注入量が増えても性能を維持できます。つまり、HILIC と RPLC のどちらの LC モードでも、クロマトグラフィー性能を維持するためには、サンプル溶媒の強度と注入量のバランスをとることが必要です。

サンプル溶媒の強度を調整するときは、成分の溶解性に細心の注意を払う必要があります。図 6 は、3 種類のビタミンの HILIC 分析結果です。各ビタミンは、原液濃度 4 µg/mL とし調製した後、水またはアセトニトリルで 9:1 に希釈しました。これは HILIC 分析であるため、サンプルの調製に望ましいのは、アセトニトリル含量の多いサンプル溶媒です。最初のニコチン酸の分析結果を見ると、水サンプルとアセトニトリルサンプルで同等のピーク面積が得られています。これは、注入されたそれぞれのサンプルに同量のニコチン酸が含まれていたことを示します。一方、チアミンおよびシアノコバラミンについては、アセトニトリルサンプルのピーク面積が、水で調製したサンプルの約半分になっています。このピーク面積の低下は、アセトニトリルに対するチアミンおよびシアノコバラミンの溶解性の低さが原因です。



移動相 A	10 mM 酢酸アンモニウム、pH 9
移動相 B	100 mM 酢酸アンモニウム、pH 9、90 % ACN 溶液 (最終濃度: 10 mM)
流量	0.6 mL/min
グラジエント	10 分で B を 90 % から 60 % に減少
注入	100 ppb グルホシネートを 4 µL 注入
カラム	InfinityLab Poroshell HILIC-Z、2.1 × 100 mm
温度	30 °C
システム	Agilent 6490 LC/QQQ



移動相 A	H ₂ O
移動相 B	CH ₃ CN
移動相 D	200 mM 酢酸アンモニウム + 0.2 % 酢酸、pH 約 5.3
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 % B で 1 分間、8 分で B を 0 % から 25 % に増加、分析終了まで D を 5 % で一定に保持
注入	13 µg/mL ピリドキシンを 0.5 µL 注入
カラム	25 °C、Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、2.1 × 100 mm、2.7 µm
検出	Agilent Ultivo TQ/MS ESI+ dMRM

図 4. HILIC および RPLC のどちらの LC モードでも、強溶媒の注入によってピーク形状が歪んでいます。

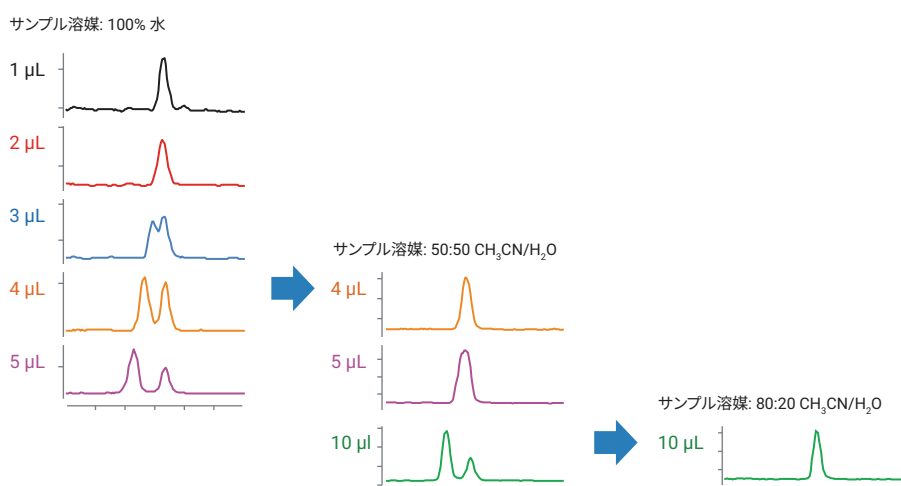


図 5. 注入量が増えるほど、強溶媒の影響が大きくなっています。メソッドパラメータは、図 4 のものと同じです。

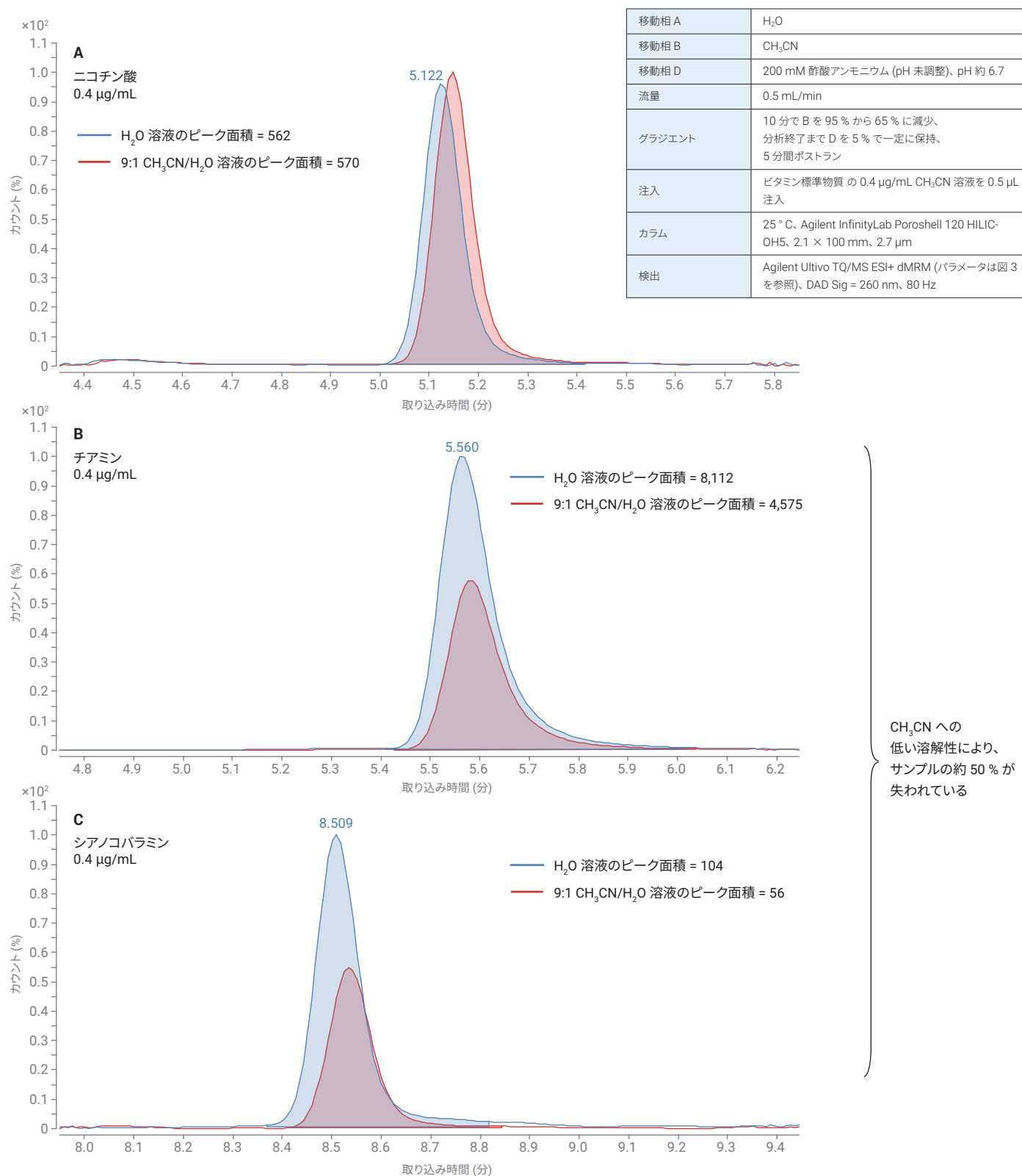


図 6. サンプルを完全に溶解できる溶媒を選択する必要があります。サンプル溶媒として水および 9:1 CH₃CN/H₂O を使用した 0.4 µg/mL のビタミン 3 種の HILIC 分析結果。

この分析を改善するには、チアミンおよびシアノコバラミンをアセトニトリル含量の多い溶液で溶解可能な濃度に希釈します。または、感度を高めるためにサンプルの濃度を高くする必要があります場合は、これらの化合物を RPLC 分析するのが望ましいでしょう。極性化合物は、水に溶解しやすい傾向にあります。そのため、高濃度のサンプルが必要な場合は、望ま

しい LC モードが RPLC である可能性があります。

検出モード

HPLC 分析に使用できる検出器は複数あります。表 3 に、一般的なものをいくつか示します。どの検出器を選択するかは、成分の特性と分析の感度要件によって異なります。図 7

に、MS では分析でき、UV では分析できない化合物の例を示します。この例では、260 nm で検出できないビタミン B7 および B5 が、MS では分析できています。したがって、分析において B7 および B5 が重要になる場合は、UV ではなく MS での検出が必要になります。

表 3. 一般的な HPLC 検出器

検出器タイプ	
UV-Vis 吸光	吸光化合物用
屈折率	汎用、ただし低感度、イソクラディックにのみ対応
蒸発光散乱	非揮発性成分用
質量分析計	分子量にもとづく優れた検出下限
蛍光分光分析	蛍光化合物、または誘導体化により蛍光可能な化合物用

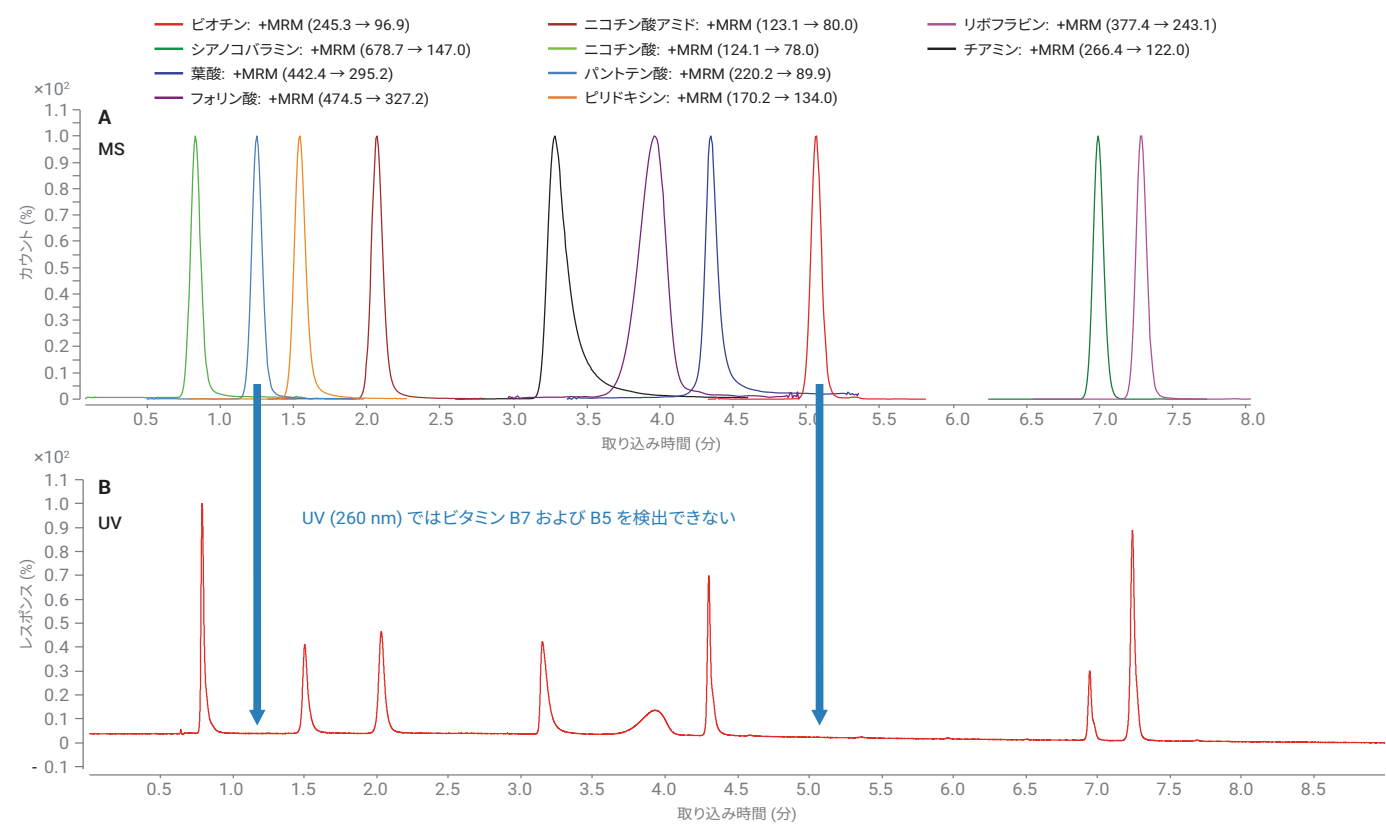


図 7. 目的化合物を分析できる検出器を選択する必要があります。メソッドパラメータは、図 3 のものと同じです。

成分によって必然的に検出タイプが決まる場合は、分析に HILIC と RPLC のどちらを使用するかという問題になります。HILIC は MS と組み合わせることで、図 8 のような良好な結果が得られます。HILIC モードで使用する緩衝液は、アセトニトリルへの溶解性が高い

ものでなければなりません。HILIC モードの緩衝液として一般的に使用されているギ酸や酢酸は揮発性でもあるため、LC/MS の必須条件が満たされます。図 8 に示すように、揮発性の HILIC 緩衝液と、ほぼアセトニトリルからなる高揮発性の移動相との相乗効果によ

り、LC/MS 分析のイオン化が促進されます。図 8 では、HILIC 分析の方がベースラインノイズが低く、モルヒネ代謝物 M6G のピークが高くなっています。

移動相 A	10 mM ギ酸アンモニウム pH 3.2 水溶液
移動相 B	アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム pH 3.2 水溶液 (9:1)
流量	0.4 mL/min
溶出	イソクラティック
注入	1 µg/mL のモルヒネ-3-β-D-グルクロニドとモルヒネ-6-β-D-グルクロニドを 2 µL 注入
カラム	2.1 × 100 mm、1.8 µm
温度	25 °C
MS ソース	ESI+, 200 V、250 °C、11 L/min、30 psi、4,000 V
SIM	462、フラグメント電圧 170 V
アジレント資料番号 5991-0245EN	

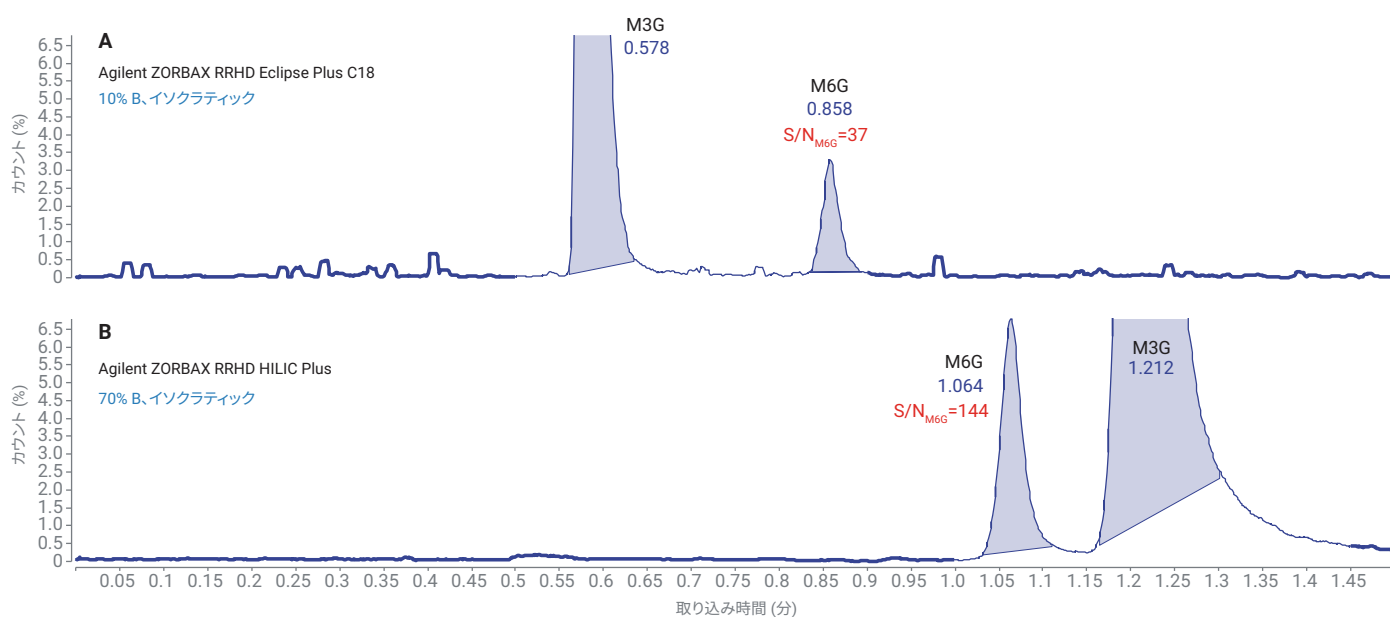


図 8. HILIC と LC/MS を組み合わせることで、オピオイド代謝物に対する感度を RPLC より高めることができます。

HILIC でのメソッド開発が難しく、移動相にさらに柔軟性が必要な場合は、RPLC と UV 検出の組み合わせが望ましいでしょう。RPLC と UV 検出の組み合わせでは、表 4 に示す一般的な緩衝液の選択肢をすべて使用できます。これとは対照的に、HILIC と MS による分析は、低 pH の緩衝液の大半とリン酸に対応できません。したがって、酸性化合物など非常に低い pH が分析に必要な場合は、RPLC の方が望ましい可能性があります。

結論

目的成分がすべて保持され、分離される最適なカラムを見つけてください。

- RPLC では、保持できない極性/イオン化成分もありますが、HILIC はこれらの成分に対して有効です。
- 成分によっては、どちらの LC モードでも同等に良好に保持し、分離することができます。

サンプルについて、成分の溶解性とサンプル溶媒を考慮してください。

- RPLC および HILIC のどちらにおいても、強溶媒を注入すると、クロマトグラフィーの品質に悪影響がおよびます。
- 強溶媒の悪影響は、注入量が増えるほど大きくなります。
- 一般に、極性化合物はアセトニトリルより水に溶解しやすく、この点に関しては RPLC に好都合です。

表 4. 逆相 LC と UV 検出の組み合わせは、低 pH のものも含め、より幅広い移動相に対応できます。

移動相	使用可能な pH 範囲	HILIC に推奨	MS に推奨	RPLC と UV に推奨
TFA	< 2	なし	なし	あり
リン酸一塩基塩	1.1-3.1	なし	なし	あり
ギ酸	< 2.8	なし	あり	あり
酢酸	< 3.8	なし	あり	あり
ギ酸アンモニウム	2.8-4.8	あり	あり	あり
酢酸アンモニウム	3.8-5.8	あり	あり	あり
炭酸アンモニウム	5.4-7.4	あり	あり	あり
リン酸二塩基塩	6.2-8.2	なし	なし	あり
炭酸水素アンモニウム	6.6-8.6	あり	あり	あり
アンモニア	8.2-10.2	あり	あり	あり
リン酸三塩基塩	11.3-13.3	なし	なし	あり

どのタイプの検出器を利用できるのかを検討してください。

- 成分が、選択した検出器に対応していること、また必要な感度が得られることを確認してください。
- HILIC では、移動相の揮発性が高いため、LC/MS の分析性能を高めることができます。
- UV と RPLC の組み合わせは、より幅広い移動相に対応しているため、成分の保持と分解能を向上できる場合があります。

HILIC か RPLC かの選択は、クロマトグラフィーの分離要件、成分の極性と溶解性、サンプル溶媒の性質、および使用可能な検出法を注意深く検討し、各条件の最適なバランスを探る作業です。

参考文献

1. Long, W. Automated Amino Acid Analysis Using an Agilent Poroshell HPH-C18 Column. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5571EN, **2017**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, July 15, 2019
5994-1137JAJP