技術概要

Agilent
Trusted Answers

親水性相互作用クロマトグラフィーのメソッド開発およびトラブルシューティング

はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分野で急成長している手法です。非常に極性の高い化合物でも、逆相 HPLC と同じシステムや溶媒を用いて分離することができます。

HILIC では、誘導体化、イオン交換、イオンペアリング、順相 HPLC といった従来の手法と比較して、極性分析のコストや労力の多くを削減できます。ただし、メソッド開発およびトラブルシューティングについては、経験を積んだ研究者にとっても困難な場合があります。最近になって、HILIC カラムは十分に確立された逆相ケミストリに匹敵する性能と再現性を提供できるようになってきました。

この技術概要では、HILIC およびメソッド開発の基本を再確認し、最後にトラブルシューティングを説明します。

HILIC および極性分析の理解

HILIC モードで作動するカラムは中〜高極性化合物を保持します。この範囲の化合物は逆相 HPLC 内の C18 とわずかにオーバーラップするため、中程度の極性〜無極性の化合物を保持します。

HILIC 固定相は極性が高く親水性であるため、移動相から水分を吸収して表面に薄い水層を形成します。このフィルムを形成するには、固定相によって異なりますが、およそ 3 % の水が必要です。移動相の含水率を増加させると、分離効果は弱まってしまい、移動相がおよそ 50 % の水を含むと完全に消失します。この時点で、化合物は HILIC のメカニズムでは保持されなくなります。

さらに極性の高い移動相は強力な溶媒で、逆相 HPLC の場合と逆です。水は HILIC で最も強い移動相で、その後にメタノールが続きます。図 1 に溶媒強度の増加を示します。緩衝液塩も溶媒強度を高めますが、それほど顕著ではありません。

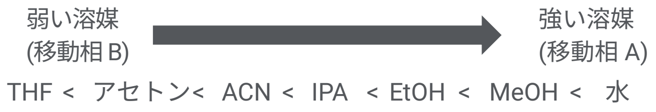

図 1. 溶媒の強度

ただし、逆相 HPLC とは異なり、純粋なメタノール (MeOH) は大半の HILIC 分離用の溶媒としては強すぎます。アセトニトリル (ACN) は推奨される弱い溶媒ですが、アルコールを添加すると、緩衝液の溶解度を上昇させるか、選択性をわずかに変更することができます。

極性化合物のための手法: HILIC と他のメソッドとの比較

極性化合物分析にはさまざまな手法があります。表 1 に示すとおり、これらの異なるアプローチにはそれぞれ利点と欠点があります。

比較することで、HILIC が強力で柔軟な手法であることがわかります。表 2 をご参照ください。

表 1. 従来型手法の利点と欠点

分析手法	利点	欠点
イオンペアリング	高速分析 標準 HPLC システムおよび逆相カラムの使用	システム汚染の頻発 イオン抑制を引き起こす可能性 ポジティブまたはネガティブモードの MS に限定
イオンクロマトグラフィー	シンプルなメカニズム、強力なリテンション、および分離の予測可能性 独自の検出モード	最新の HPLC/UHPLC にスピードで劣る、システムおよび消耗品が高価 カチオンとアニオンの同時分離不可 MS との互換性は困難
イオン交換	シンプルなメカニズム、強力なリテンション、および分離の予測可能性 培地が安価で利用可能	HPLC にスピードで劣る カチオンとアニオンの同時分離不可 MS との互換性は困難
順相	高速分析 標準 HPLC システムおよび一般的なカラムの使用	有機溶媒の安全性および互換性 固定相の選択肢が少ない サンプルの溶解度の問題
誘導体化	高速分析 特別な選択性 発色団または蛍光色素分子の追加	サンプル前処理の長さ 再現性の問題 複雑な MS スペクトル 有毒な誘導体化試薬

表 2. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の利点と欠点

分析手法	利点	欠点
HILIC	高速分析 逆相 HPLC と同様のシステムと溶媒を使用 1 回の分析でカチオン、アニオン、および極性中立物を分離 逆相 HPLC と同等もしくはそれ以上の MS 性能	高有機溶媒でのサンプル溶解度 100 % メタノールが有機相としては不適切 ハードウェアの不活性要件

HILIC の使用開始にあたり

カラム選択は HILIC メソッド開発の第一歩です。無極性の逆相固定相とは対照的に、HILIC カラムは極性固定相を用います。最も古くから非常に幅広く用いられる HILIC 相は未修飾シリカです。ただし、未修飾シリカ表面のばらつきや酸性度のために、一般的な極性化合物の多くを確実に分析することは困難です。さまざまな HILIC 結合相が開発され、選択肢が広がり信頼性が向上しています。最新の HILIC 相では、逆相ケミストリと同等の分離能、ピーク形状、および信頼性が実現されています。

HILIC では、適切なカラムを選択するだけでなく、逆相分離に使用するパラメータも一部変更する必要があります。こうした変更は極性とリテンションとの関係性が逆となるためです。すなわち、極性化合物は保持されるものの、無極性化合物は保持されず、極性溶媒は強く、無極性溶媒は弱いというものです。

開始パラメータ

固定相

- 固定相が違えば、選択性も異なります。
- 近年の結合相では卓越したピーク形状が得られ、イオン交換からの二次的反応は最小限に抑えられています。
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 (粒子径 2.7 µm) の相 3 種は以下のとおりです。
  - **InfinityLab Poroshell HILIC-Z:** 強力な分離、広範囲な pH 領域全体での安定性、および優れたピーク形状を提供する独自の結合手法による両性イオン型ケミストリ
  - **InfinityLab Poroshell HILIC-OH5:** 広範囲の極性化合物用の代替選択性および優れたピーク形状によるフルクタンケミストリ
  - **InfinityLab Poroshell HILIC:** 従来型の未修飾シリカ相

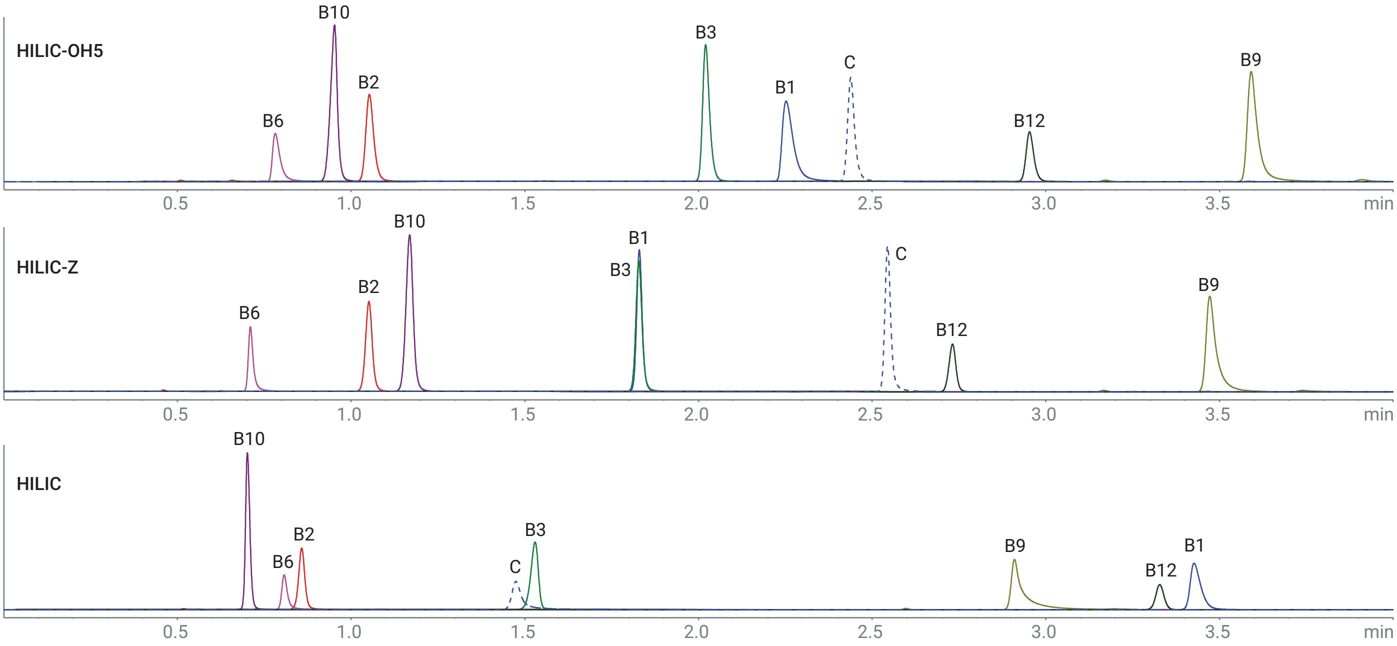

図 2. 水溶性ビタミンの分離。カラム: 2.1 × 100 mm、2.7 µm (相については図を参照)。移動相 A: 100 mM 酢酸アンモニウム + 0.5 % の酢酸 (約 pH 4.6) の水溶液。移動相 B: アセトニトリル。流量: 0.5 mL/min、グラジエント: 1 分間で 87 %B、4 分間で 87 %B から 50 %B に変化。再平衡: 3 分。注入量: 個別ビタミン基準 (各 0.1 ~ 0.4 mg/mL) の 1 µL。カラム温度: 40 ° C。検出: UV、260 nm、80 Hz。

移動相の組成:

- 水は溶出力の強い溶媒です。含水量を減らすとリテンションが高まります。
- 極性の低い化合物には高い有機性が保持される必要があります。
- 緩衝液濃度を高めるとリテンションが低下しピーク形状が改善しますが、検出器の反応に影響を及ぼす可能性があります。

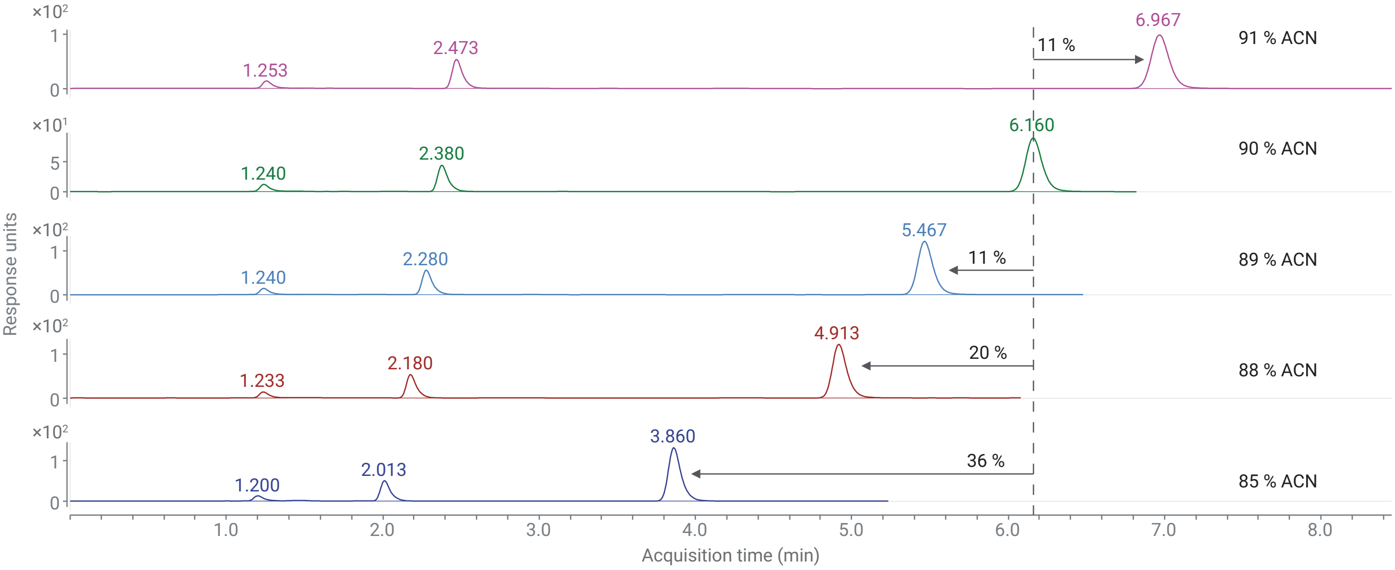

図 3. HILIC 分析は移動相組成中の小さな変化に高感度を示します。カラム: InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (PEEK ライニング) 2.1 × 150 mm (2.7 µm)。移動相 A: 100 mM pH 3 ギ酸アンモニウム水溶液、pH 3。移動相 B: アセトニトリル。イソクラティック溶出: %B については図を参照。流量: 0.25 mL/min。カラム温度:30 ° C。注入量: トルエン、シトシン、ウラシル QC 混合液 1 µL。検出: UV (254 nm)。

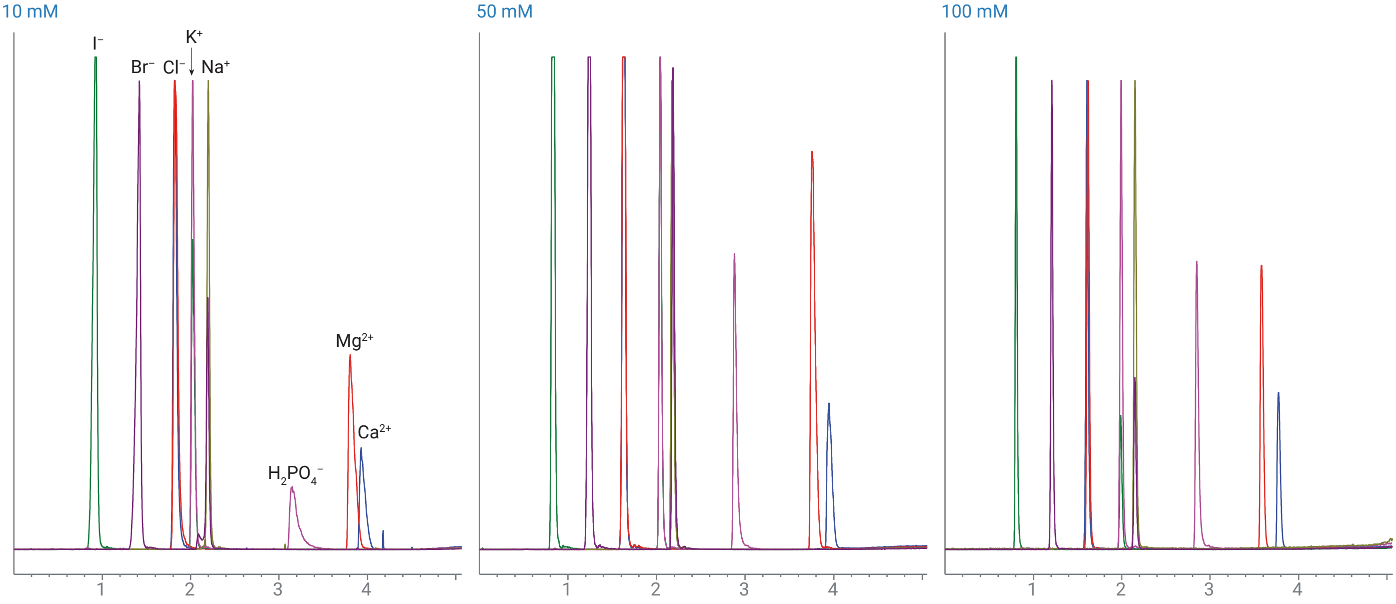

図 4. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、2.1 × 100 mm、2.7 µm カラムを用いた無機イオンの分離。移動相 A: 10、50、または 100 mM の pH 3 ギ酸アンモニウム。移動相 B: アセトニトリル。グラジエント: 5 分間で 80 %B から 20 %B へ変化。再平衡: 3 分。流量: 0.4 mL/min。カラム温度: 30 ° C。注入量: 個別基準 (0.3 ～ 0.5 mg/mL) を 2 µL。検出: ELSD、40 ° C、3.5 psi、30 Hz。

移動相の pH:

- サンプルのイオン化および粒子表面電荷のコントロール (シリカ、NH2、および旧型 HILIC 結合相の二次的メカニズム)。
- 化合物は帯電状態で多く保持され、逆相の場合とは逆になります。
- 酸は高 pH で分析し、塩基は低 pH で分析します。

温度:

- 温度を上げるとリテンションが低下します。
- 温度を上げるとカラム効率も上昇します。
- 温度を下げることで選択性を改善できます。

移動相

一般的な移動相:

低 pH	移動相 A: 10 ～ 20 mM ギ酸アンモニウム、ギ酸により pH 2.8 ～ 4.8 に調整 移動相 B: ACN:H_2O が 90:10 の 20 mM ギ酸アンモニウム、ギ酸により pH 2.8 ～ 4.8 に調整
中 pH	移動相 A: 10 ～ 20 mM 酢酸アンモニウム、酢酸により pH 3.8 ～ 5.8 に調整 移動相 B: ACN:H_2O が 90:10 の 10 mM 酢酸アンモニウム、酢酸により pH 4.8 ～ 7 に調整
高 pH	移動相 A: 0.3 % 水酸化アンモニウム水溶液 移動相 B: 0.3 % 水酸化アンモニウム ACN 溶液

開始条件:

イソクラティック条件	90 % ACN – 極性の低い対象化合物 80 % ACN – 極性対象化合物、混合物 70 % ACN – きわめて高極性の対象化合物 50 % ACN – カラム洗浄 (リテンションなし、イソクラティックモードの 80 % を超える ACN で動作した場合の事後分析の推奨)
グラジエント分析条件	90 % ～ 50 % ACN – スカウティンググラジエント 重要な化合物ペアの分離には、イソクラティック分離または浅いグラジエント (1 ～ 3 %/min) が推奨されます。

注記:

- 高濃度のリン酸緩衝液は推奨されません。さらに詳しくは「緩衝液の溶解度」のセクションをご参照ください。
- 高有機濃度では、リテンションは小さな有機濃度の変化に対して、高い反応性を示す可能性があります。溶媒は正確に測定し、ミキサーは正常に稼働させなければなりません。
- MeOH やその他のアルコールには、選択性をわずかに変更するために少量 (25 % 未満) のアセトニトリルを混合することができます。
- 緩衝液濃度を上げると一般的にピーク形状が改善されますが、LC/MS の感度が低下し、ELSD でのベースラインノイズが生じます。
- 追加された塩類の緩衝範囲内で稼働させることが推奨されますが、分析にとって、特に低サンプルローディングの場合には、それほど重要ではありません。
  - 酢酸アンモニウム: pH 2.8 ～ 4.8、8.2 ～ 10.2
  - ギ酸アンモニウム: pH 3.8 ～ 5.8、8.2 ～ 10.2

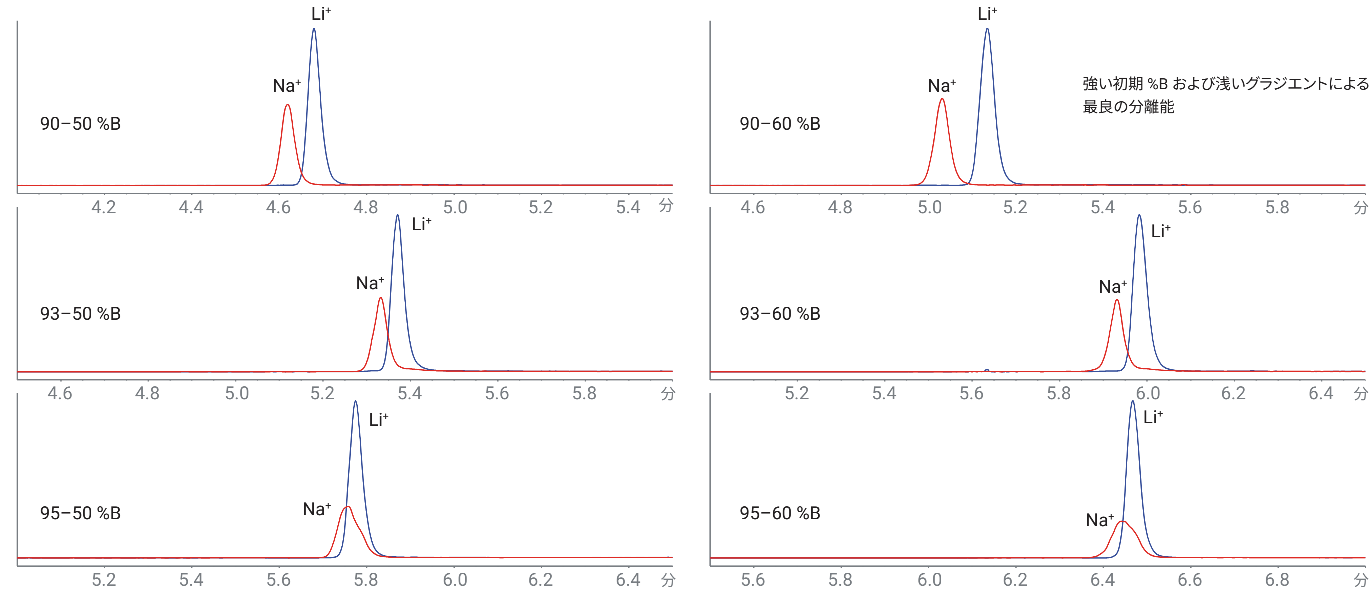

図 5. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、2.1 × 100 mm、2.7 µm カラムを用いた重要な化合物ペア (Na+ および Li+) の分離。
移動相 A: 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3。移動相 B: アセトニトリル。グラジエント: 10 分間の %B については図を参照。再平衡: 3 分。
流量: 0.4 mL/min。カラム温度: 30 ° C。注入量: 個別基準 (0.3 ～ 0.5 mg/mL) を 2 µL。検出: ELSD、40 ° C、3.5 psi、30 Hz。

平衡化

カラム平衡化および再平衡化は移動相の含水量に直接的に関連します。各分析において高水性移動相による水層のリフレッシュが必要であり、その後、移動相中の水濃度は次の分析の開始条件にまで下げることができます。

グラジエント内または洗浄ステップで、カラムの含水率が 20 % 以上であった場合、カラムは高有機条件に戻されると素早く平衡化します。グラジエント分析の大半はこの濃度に容易に達するため、再平衡化時間は逆相分析の場合に類似しています。

分析を高有機状態のイソクラティック条件で行う場合、強固に付着している化合物、例えば無機塩類やその他の極性化合物などを取り除くために、高水性移動相での短時間の分析後洗浄が必要になることがあります。

緩衝液の溶解度

純粋なアセトニトリルは一般的な緩衝液の多くには簡単に溶解しません。酢酸アンモニウムやギ酸にさえ溶解しません。アセトニトリル:水を 90:10 で混合すると、緩衝液の溶解度が大きく改善します。リン酸塩などの一般的な逆相緩衝塩の一部は HILIC に用いられる移動相組成の大半で溶解がきわめて困難です。

濃縮された水溶性緩衝液が、緩衝液の沈殿に十分な量の有機溶媒と混合された場合、著しい詰まりやシステムへの損傷の可能性が生じる可能性があります。こうした事態はナトリウム、カリウム、リン酸、あるいはホウ酸塩イオンを含む緩衝液を用いる場合に容易に発生し得ます。

この事態を防ぐためのベストプラクティスの 1 つは、高有機相を有機溶媒ボトル内で緩衝液と事前に混合し、濁りや結晶化を観察することです。これは、任意量のナトリウム、カリウム、リン酸、あるいはホウ酸塩イオンを含む緩衝液、および 90 % を上回るアセトニトリルと 10 mmol を超える酢酸アンモニウムまたはギ酸とを含む緩衝液を用いて行うことができます。

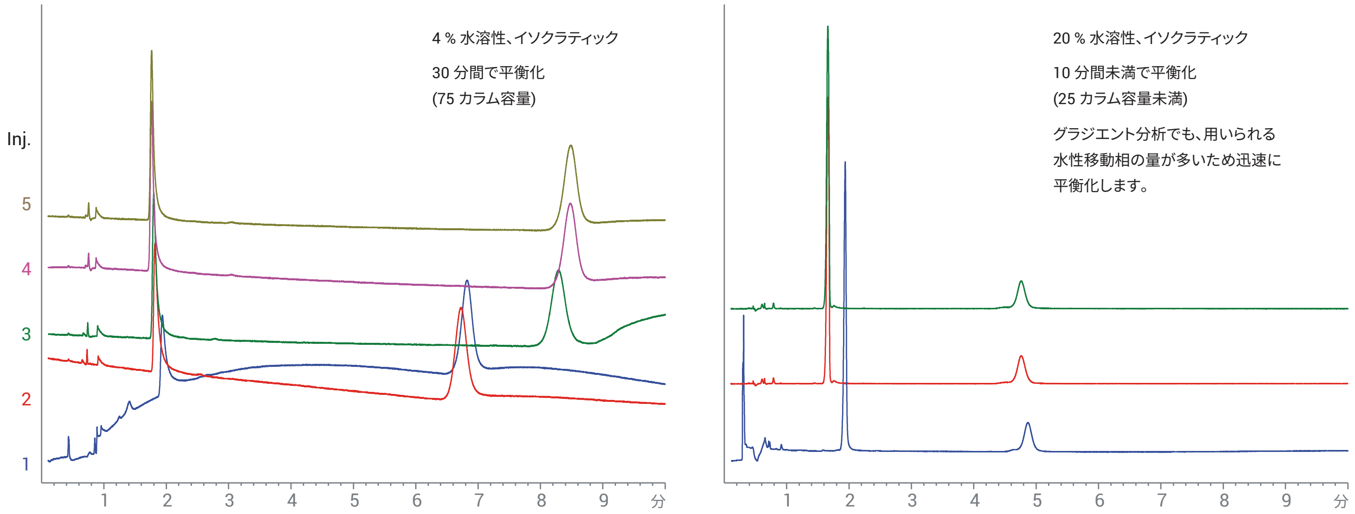

図 6. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 µm カラムを用いたビタミン B 群の分離。
左: カラムは分析前に 100 % アセトニトリルに保管。移動相 A: 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3.0。移動相 B: アセトニトリル。イソクラティック条件: 96 %B。流量: 0.5 mL/min。注入量: B2 + B6 の 1 µL。カラム温度: 25 ° C。検出: 260 nm、80 Hz。右: カラムは分析前に 100 % アセトニトリルに保管。移動相 A: 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3.0、移動相 B: アセトニトリル。イソクラティック条件: 80 %B。流量: 0.5 mL/min。注入量: B9 + B12 の 1 µL。カラム温度: 25 ° C。検出: 260 nm、80 Hz。

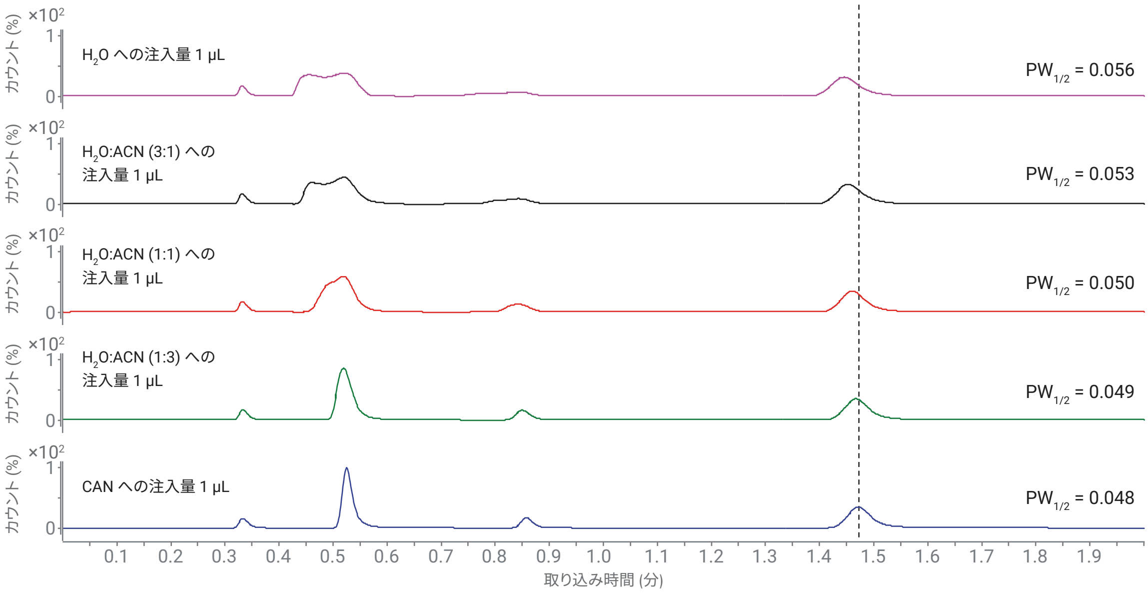

図 7. イソクラティック溶出によるビタミン B 群の分離。カラム: Agilent ZORBAX RRHD HILIC、2.1 × 50 mm、1.8 µm。移動相: アセトニトリル/100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3.2 水溶液 (9:1)。イソクラティック溶出:0.4 mL/min。注入量: 4- アミノ安息香酸、ニコチン酸アミド、リボフラビン、ニコチン酸の各 5.7 µg/mL の 1 µL。25 ° C、MS ソース: ESI+、200 ° C、10 L/min、30 psi、4,000 V。SIM: 138、123、377、124。

サンプル溶媒および注入量

水は HILIC モードにおけるきわめて溶解力の強い溶媒であるため、100 % の水系溶媒に溶解されたサンプルは、カラム上では十分に保持されず、ピーク形状が悪化する可能性があります。これは 100 % クロロホルムあるいはヘキサンに溶解したサンプルを逆相カラム上に注入した場合と類似しています。

水にのみ溶けやすい化合物については、注入量はばらつきを排除するために十分に低容量にします。

ピークの分裂の正確な発生は分析ごとに異なります。以下の表にメソッドの大半に推奨される最大開始値を示します。

サンプル溶媒	2.1 × 50 mm	3.0 × 50 mm	4.6 × 50 mm
100 % H_2O	≤1 µL	≤2 µL	≤3 µL
50:50 ACN:H_2O	≤2 µL	≤4 µL	≤6 µL
80:20 ACN:H_2O	≤5 µL	≤10 µL	≤15 µL

カラムが長いほど注入量を増加させることができます。次の乗数を上記の値に使用することができます。

カラム長	50 mm	100 mm	150 mm
注入量	1 倍	1.5 倍	2 倍

ピークは濃度が高くなると広がり、これがピーク形状や分離能に影響を及ぼし始めると、カラムはオーバーロードになります。高濃縮のサンプルは必ず低容量で注入するか、希釈する必要があります。

LC/MS には希薄溶液が常に推奨されますが、これは目的の分析対象物を不明瞭にしない狭いピークとして干渉化合物を分離できるためです。この方法が強力なのは、HILIC が無機イオンを保持するためであり、ナトリウム、カリウム、および有機不純物を分離することができます。高ローディングの場合には、これらの干渉ピークが広くなり、主要化合物とのオーバーラップや干渉の可能性が出てきます。

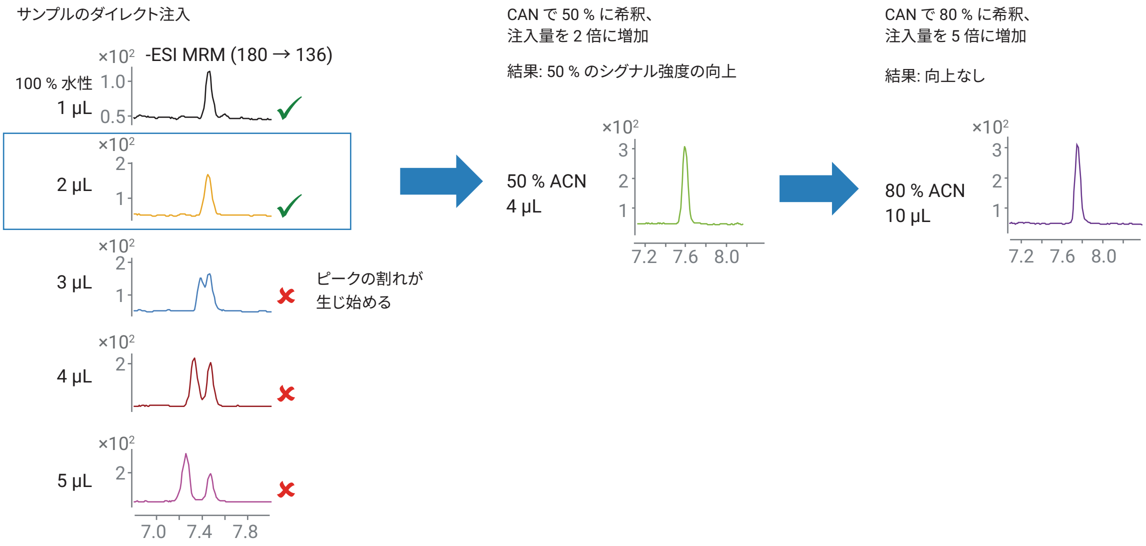

図 8. 感度はアセトニトリル希釈液および注入量の増加で維持または改善が可能。システム: Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS。サンプル: グルホシネート、100 ppb。カラム: InfinityLab Poroshell HILIC-Z、2.1 × 100 mm。移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 9。移動相 B: 100 mM 酢酸アンモニウム、pH 9、90 % アセトニトリル (最終濃度: 10 mM)。流量: 0.6 mL/min。グラジエント: 10 分間で 90 %B から 60 %B へ変化。カラム温度: 30 ° C。注: システムにはテーリング防止のために 0.5 % リン酸による洗浄が必要でした。優れたピーク形状は、注入量を減らす方法と溶出力の弱い溶媒 (例: アセトニトリル) でサンプルを希釈する方法の両方で維持することができます。希釈サンプルを大量に注入することで、シグナルを増加させることができ、一般的な使用法としてよく用いられます。

検出

HILIC は、使用する検出器が従来の逆相クロマトグラフィーと多少異なります。質量分析計は HILIC に最適な検出器ですが、UV-Vis は逆相モードの場合ほど適用可能でない傾向があります。最後に、示差屈折率検出器 (RI) および蒸発光散乱検出器 (ELSD) などの汎用検出器は極性分析でよく用いられます。

MS 検出:

質量分析は極性対象化合物のための優れた検出メソッドであり、イオン化効率が高く感度が優れています。さらに、HILIC は高有機濃度で作動し、揮発性緩衝液を十分に取り扱うことができるため、高効率のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) が可能です。

UV-Vis 検出:

極性化合物の多くには発色団、すなわち、糖、アミノ酸、および無機イオンが含まれていません。これは、UV 活性基の多く (フェニル環、エステル、アミド、C=C 結合) はやや無極性であるものの、極性基 (-OH、$-NH_2$、C-O-C) には一般的な緩衝液や溶媒とオーバーラップする吸光度があるためです。それにもかかわらず、UV は有機酸などの強い UV 反応を示す極性基を持つ化合物用の安価で高感度のオプションです。

蒸発光散乱検出器:

蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、糖、金属、高分子などの不揮発性化合物に対して優れた感度と反応を示します。ELSD は MS と同様に揮発性緩衝液を必要としますが、高緩衝液濃度に対して、糖分析の厳しい条件 (高 pH または高温) と同様に対応することができます。

揮発性化合物、例えば低分子有機酸やアミンの場合は、別の検出器が必要になることがあります。

示差屈折率検出器:

示差屈折率検出器 (RI) も任意の化合物を実際に検出することができますが、感度が低く、グラジエント溶出を取り扱うことができません。

RI は高緩衝液濃度に対応でき、ELSD では通常検出されない揮発性化合物を検出することができます。これにより、RI はアルコールや低分子有機酸などの揮発性化合物を含む混合物のための最適な検出器となっています。

その他の検出手法:

極性対象化合物は、現在アジレントが取り扱っていない他の検出メソッドでも測定することができます。以下に例を示します。

- 無機イオン用の伝導度検出器
- 糖およびアミン用のアンペロメトリック電気化学検出器 (PAD)
- 汎用検出のための帯電エアロゾル検出器 (CAD) (ELSD に類似)

表 3. 検出手法の概要

検出器	利点	一般的な分析対象物	短所
UV-Vis	一般的で安価 高感度 低分散	分析対象物には発色団、すなわち、芳香環、カルボン酸、エステルなどが必須 ヌクレオシド、ヌクレオチド、有機酸	低波長 (約 210 nm) の場合にギ酸エステル/緩衝酢酸溶液でのノイズが大きい 感度が限定的
LC/MS – ポジティブモード	最高の感度	アミン類および有機酸	互換性のある緩衝液および低濃度 (約 10 mmol/L) の使用が必須
LC/MS – ネガティブモード	高感度 検出範囲の選択肢	有機酸およびリン酸化合物	互換性のある緩衝液および低濃度 (約 10 mmol/L) の使用が必須
示差屈折率検出	「汎用的な」検出 低コスト 高緩衝液濃度に互換性あり	発色団のない化合物や混合物 糖、無機イオン、アミノ酸	低感度 イソクラティック条件が必要 起動時間の長さ
蒸発光散乱検出	「汎用的な」検出 高感度 (UV-Vis と同程度)	発色団のない化合物や混合物 糖、無機イオン、アミノ酸	揮発性化合物 (アルコール、有機酸) の検出不可 揮発性緩衝液の使用必須 古いモデルの多くでキャリブレーションカーブが非線形

粘性サンプル、不活性化、および不活性ハードウェア

すべてのグレードおよびタイプのスチールには、表面に腐食防止の金属酸化物層があります。さらに、これらの金属酸化物には、あるクラスの粘性の極性分子と結合する部分があります。

最も高活性な分子:

- リン酸化された代謝物およびリン酸エステル
- 有機リン系化合物とリン酸
- ジカルボン酸およびトリカルボン酸ならびにキレート剤

一般的に使用される分野:

- 農薬分析 (グリホサート、AMPA、グルホシネート)
- 発酵 (クエン酸回路、有機酸モニタリング)
- メタボロミクス (ヌクレオチド、糖リン酸、クエン酸回路)
- 無機分析 (鉄モニタリング、EDTA 分析)

これらの化合物は、スチールと相互作用を起こすと、高濃度でしばしばテーリングを起こし、低濃度で完全に消失します。従来、分析メソッドは通常、誘導体化、極端な pH、イオンペアリング、または競合するキレート剤により、これらのクラスの化合物を測定します。

このアプローチへの単純な代替策は、スチール表面上の金属部位を不活性化することであり、低濃度のリン酸による洗浄 (アセトニトリル : 水が 90 : 10 の 0.5 % リン酸) により可能です。リン酸はシステムの活性点に強く結合するため、粘性化合物の十分な分析が可能になります。一般に、有機溶媒を扱うポンプヘッド (ポンプ B) には、水性ポンプ (ポンプ A) より頻繁に不活性化が必要になります。

B 相ボトル内をアセトニトリル:水の 90:10 に切り替え、ガラスボトルとバイアルを HDPE などのプラスチックに切り替えることで、感度をさらに高めることができます。

最後に、スチールのコンポーネントを PEEK あるいは PEEK ライニングのステンレスに取り替えると、クロマトグラフィーで一層の利点を得られます。PEEK ライニングされたカラムやキャピラリはアジレントのシステムおよびカラムで利用可能です。

オプション	詳細
1. アセトニトリル内の水性相 10 % の使用	100 % のアセトニトリルはスチールと相互作用を起こして不純物を取り込む可能性があります。10 % の水相を追加することでこれを除去できます。
2. 0.5 % リン酸による洗浄	低濃度のリン酸溶液で洗浄することで、スチール上の活性点を一時的に不活性化することができます。
4. プラスチック製の溶媒ボトルおよびバイアルへの切り替え	検査室用ガラスから溶出する Na、K、Ca、BO_3、および SiO_4 からのシグナル抑制を排除します。
3. PEEK ライニングハードウェアへの切り替え	スチールを PEEK ライニングハードウェアに切り替えることで、結合部の数を減らすことができます (ただし、すべてが除去されないことが稀にあるため、水洗が必要な場合があります)。

段階的なシステム洗浄手順

操作時間: 30 分

総待機時間: 3 時間 + 一晩 (約 15 時間)

1. MS を設定してソースを安全に取り扱えるようにします。通常は、ソースクリーニングに使用されるのと同じ設定です (以下の注記を参照)。
2. 流量を 0 mL/min に変更して、溶媒を純水に切り替えます。
3. システムを Purge On (パージオン) に設定して廃液に流すか、HPLC カラムから注入口キャピラリを取り外し、適切な廃液容器に入れます (以下の注記を参照)。
4. 5 mL/min で 5 分間、水で HPLC ポンプをパージします。
5. システムを Purge Off (パージオフ) に設定するか、フローを止めて HILIC カラムを再接続します。
6. 水の流量については、直径 4.6 および 3.0 mm のカラムの場合は 0.5 mL/min、直径 2.1 mm のカラムの場合は 0.25 mL/min に設定します。システムおよびカラムを通して 30 分間流します。
7. 流量を 0 mL/min に変更し、溶媒を 0.5 % リン酸 (アセトニトリル : 水 = 9:1) に切り替えます。
8. MS またはネブライザ付きの他の検出器を用いる場合、スプレーニードルを取り外し、スプレー選択を適切な廃液容器に入れた後、注入口キャピラリを再接続します (以下の注記を参照)。
9. システムを Purge On (パージオン) に設定して廃液に流すか、HPLC カラムから注入口キャピラリを取り外し、適切な廃液容器に入れます。
10. 5 mL/min で 5 分間、0.5 % のリン酸で HPLC ポンプをパージします。
11. システムを Purge Off (パージオフ) に設定するか、フローを止めて HILIC カラムを再接続します。
12. 0.5 % のリン酸の流量を 0.1 mL/min に設定し、一晩 (12 時間以上) 実行します。
13. 流量を 0 mL/min に変更して、溶媒を純水に切り替えます。
14. システムを Purge On (パージオン) に設定して廃液に流すか、HPLC カラムから注入口キャピラリを取り外し、適切な廃液容器に入れます。
15. 5 mL/min で 5 分間、水でパージします。
16. システムを Purge Off (パージオフ) に設定するか、フローを止めて HILIC カラムを再接続します。
17. 水の流量については、直径 4.6 および 3.0 mm のカラムの場合は 0.5 mL/min、直径 2.1 mm のカラムの場合は 0.25 mL/min に設定します。システムおよびカラムを通して 1 時間流します。
18. 流量を 0 mL/min に変更し、溶媒を目的の移動相に切り替えます。
19. システムを Purge On (パージオン) に設定して廃液に流すか、HPLC カラムから注入口キャピラリを取り外し、適切な廃液容器に入れます。
20. 5 mL/min で 5 分間、移動相でパージします。
21. システムを Purge Off (パージオフ) に設定するか、フローを止めて HILIC カラムを再接続します。
22. 移動相の流量については、直径 4.6 および 3.0 mm カラムの場合は 0.5 mL/min、直径 2.1 mm カラムの場合は 0.25 mL/min に設定します。システムおよびカラムを通して 1 時間流します。
23. ネブライザを MS に再接続して分析を継続します。

注記:

- ソースの適切な取り扱い方法についてのお問い合わせは、MS 製造業者のテクニカルサポートにご連絡ください。
- 適切な廃液容器は、清潔で空の状態で、溶媒と互換性をもち、廃溶媒がこぼれることなく収容可能な容積を持つ必要があります。大型のガラス製ビーカーや溶媒ボトルが一般に推奨されます。
- ESI ニードルキャピラリおよびその他のコンポーネントは、溶媒や廃液に浸漬しないようにしてください。容器は定期的に空にしてください。
- ネブライザニードルが簡単に取り外せない場合、MS システムに接続されているキャピラリの先端の場合と同じ手順に従うこともできます。ただし、相互作用がニードル内に発生する場合があります。
- 流路内、すなわち、HPLC システム、キャピラリ、カラム、および検出器はできる限り不動態化します。
- 溶媒および HPLC コンポーネントすべての取り扱いについては、適切な安全対策を用いてください。
- MS にリン酸を使用しないでください。

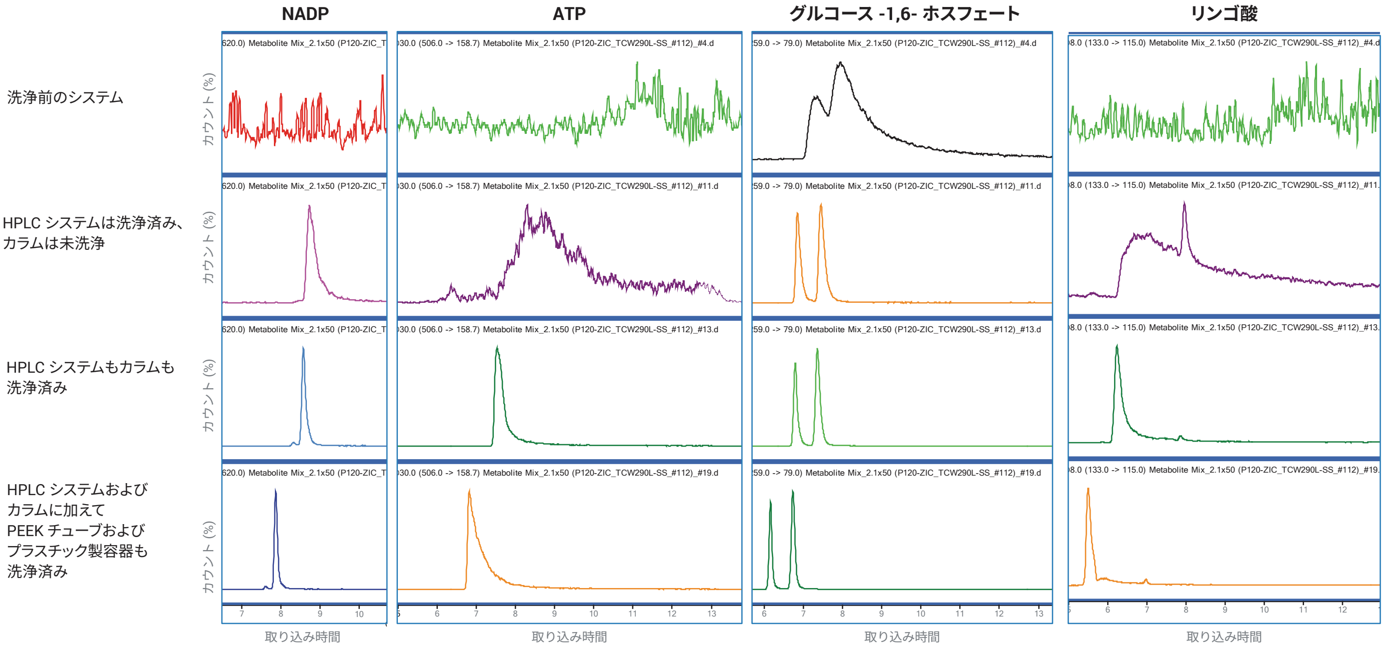

図 9. リン酸化された代謝物のスチールとの相互作用 (洗浄前後)。カラム: InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (PEEK ライニングステンレス)、2.1 × 100 mm、2.7 µm。移動相 A: pH 6.8 の 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液。移動相 B: アセトニトリル + 10 mM ギ酸アンモニウム、pH 6.8。グラジエント: 10 分間で 95 %B から 30 %B に変化。流量: 0.25 mL/min。注入量: 0.2 µL (カラム上に各 5 ng)。検出: MS、ESI ソース、ネガティブモード。

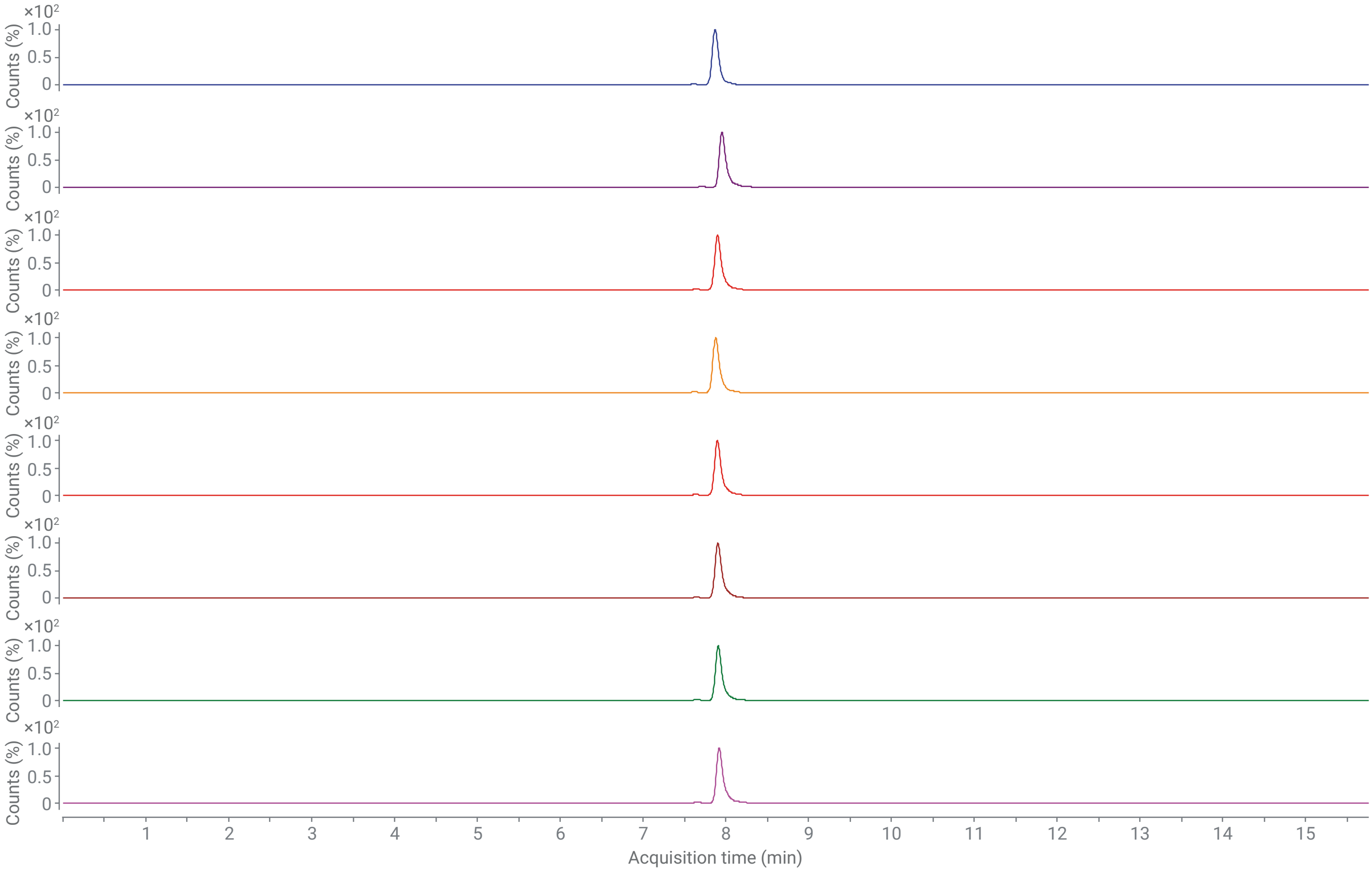

図 10. 8 時間の不動態化後の連続注入によって示された洗浄後の NADP の再現性

トラブルシューティング

再現性や平衡化などの問題は、HILIC の内在する弱点と考えられることもあります。実際には、こうした問題は適切なトラブルシューティングによって排除することができます。

再平衡化の遅延 - 最も多く認められる問題

原因	移動相における含水量不足
解決策	「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。移動相には、各分析時に表層面をリフレッシュするための十分な水がなければなりません。迅速な再平衡化を保証するには、実行時にカラムには 20 % 以上の水を確保してください。推奨量は 50 % です。

再現性 - 2 番目に多く認められる問題

原因	次の分析前に再平衡化されない サンプル溶媒が強すぎるため、カラム平衡化に影響を及ぼしている システムのステンレス上の活性点との相互作用
解決策	カラムが完全に再平衡化されていません。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。移動相には、各分析時に表層面をリフレッシュするための十分な水がなければなりません。そうでない場合、再平衡化時間を延長する必要があります。 サンプル溶媒はリテンションに影響を与えます。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。サンプル溶媒中の有機物含有量の増加、および/または注入量の減少を行います。 ターゲット化合物がシステムのスチールに吸着しています。「粘性サンプル、不活性化、および不活性ハードウェア」セクションを確認してください。サンプルが「粘性」化合物のカテゴリのうちの 1 つにあてはまる場合は、リン酸洗浄および不活性ハードウェアについて検討してください。

サンプルの溶解度 - サンプル固有の問題

原因	高有機溶媒は最適なサンプル溶媒ですが、塩類および他の極性対象化合物にとって不十分な溶媒である可能性があります。
解決策	「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。溶解度が許容できる範囲でアセトニトリル中にサンプルを希釈した後、ピーク形状および再現性が許容できるところまで注入量を減らしてください。

ピーク形状 - サンプル固有の問題

原因	システムに溶出力の強い溶媒が大量注入されると、ピークの割れやピークテーリングが生じる可能性があります。 サンプルはシステムのスチールの活性点に吸着すると、テーリングを生じさせる場合があります。 HILIC 相の一部、例えばシリカでは、二次的なイオン交換相互作用が生じ、アニオンまたはカチオンの過度のリテンションやテーリングを引き起こします。
解決策	溶出力のより弱い溶媒 (アセトニトリル) でサンプルを希釈してください。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。 サンプルが「粘性」化合物のカテゴリのうちの 1 つにあてはまる場合は、「粘性サンプル、不活性化、および不活性ハードウェア」セクションを確認してください。システム洗浄および不活性ハードウェアについて検討してください。 結合相を切り替えてください。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。二次的リテンションは古い HILIC 相では一般的です。 緩衝液濃度を上げてください。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。緩衝液を追加することでピーク形状を改善できますが、MS の場合は感度に、ELSD および UV の場合はベースラインの安定性に影響が及ぶおそれがあります。

緩衝液の溶解度

原因	HILIC モードで極性対象化合物をあまり保持しないようにするには、高有機溶媒が必要ですが、緩衝液の多くの溶解度は十分ではありません。
解決策	少量の水を加えると、アセトニトリル中の緩衝液溶解度を大きく高めることができます。「HILIC の使用開始にあたり」セクションを確認してください。一般に、10 % の水をアセトニトリルに加えると、溶解度が向上し、高有機濃度で高緩衝液濃度の混合物の溶解度を常に検査することができます。

結論

HILIC は非常に極性の高い化合物に対しても、強力で信頼性の高い分析手法の 1 つです。HILIC は、逆相クロマトグラフィーを用いているラボに容易に導入できるものの、明確な相違点がいくつかあり、HILIC メソッドを開発または採用する前に十分に理解しておく必要があります。

要点:

- HILIC では溶離液およびサンプル溶媒のいずれの場合も、溶媒強度が逆になります。この点が経験を積んだ研究者にとっても最初の混乱の元になります。
- 有機物比率の高い混合物は極性化合物用の溶媒としては十分でない可能性があります。サンプルの損失や詰まりを防止するために、高アセトニトリル溶媒でのサンプルおよび緩衝液塩の溶解度を確認してください。
- 迅速な平衡化や優れた再現性はメソッド条件が正しければ可能です。ユーザーは、粒子上の水層と平衡化速度との関連を理解する必要があります。
- 極性化合物はステンレスと相互作用を起こす可能性がきわめて高く、HILIC では従来の逆相分析よりも「貼りつき」に関する問題がより多く発生します。共通の症状は低濃度における著しいテーリングやシグナル抑制です。低濃度のリン酸で洗浄することで、スチール上の活性点の多くを不活性化することができますが、不活性ハードウェアへ切り替えることでそれらすべてを除去することができます。

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
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. 2018
Printed in Japan, May 1, 2018
5991-9271JAJP

Agilent
Trusted Answers