

不活性な HPLC カラムハードウェアによる クロマトグラフィー分離の改善

不活性度、安定性、分析感度の包括的な評価

著者

Jordy Hsiao,
Mohammadali Masigol,
Richard Closser,
Lucas Serge, Li-Chih Hu,
Norwin von-Doehren,
Andrea Angelo P. Tripodi, and
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

生体関連分子について信頼性の高いクロマトグラフィー分離を実現することは、分析科学における持続的な課題です。親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を用いた初期の研究は、誘導体化されていないアミノ酸の分離に有用な結果を示しましたが¹、複数のリン酸基やカルボン酸基を含む酸性代謝物などの検出と分離には限界があることが明らかになりました²。これらの化合物は、トリカルボン酸 (TCA) 回路のような細胞経路において非常に重要な役割を果たすため、正確に分析する必要があります。

この課題により、サンプル流路における金属表面と分析対象物の相互作用という広範な問題を調査することになりました³。文献調査および社内研究により、リン酸化ペプチド^{4~5}、リン酸化グリカン⁶、モノクローナル抗体⁷、医薬品化合物⁸の分析において、逆相、イオン交換、サイズ排除など、さまざまな固定相にわたり、広範なシグナル抑制とピーク形状の不良が明確になりました。これらの影響は、多くの場合、カラムやシステムハードウェアの金属表面との相互作用に関連していました。

これに対応するため、不活性度を考慮して高感度の分離に最適化されたウルトライナートテクノロジーを採用した、Agilent Altura HPLC カラムプラットフォームを開発しました。このカラムプラットフォームは、ステンレス (SS) にコーティングを施したものであり、不活性なコーティングにより分析対象物と金属との相互作用を阻止すると同時に、SS カラムハードウェアの強度、一貫性、高圧の利点は維持しています。

このホワイトペーパーでは、Altura カラムがさまざまな分析対象物および条件で示す性能について説明し、金属と相互作用しやすい化合物に対してクロマトグラフィー分離能と分析感度が向上することを実証するとともに、化学的安定性とバッチ間再現性を確保していることを示します。目標は、分析科学者がハードウェア関連の一般的な制約を克服して、分析困難な生体分子のメソッド開発を加速するのに役に立つ知見を共有することです。

実験方法

サンプル

- 有機酸（すなわち、グルタミン、グルタミン酸、リンゴ酸）およびリン酸化ヌクレオチド（例えば、AMP、ADP、ATP）を含む極性代謝物は、Sigma-Aldrich から購入しました。
- リン酸化ペプチドサンプルは AnaSpec から入手し (AS-61145)、その配列およびリン酸化残基を表 1 に示しています。

表 1. 本研究で使用したリン酸化ペプチドの配列。(pS)

はリン酸化セリン、(pY) はリン酸化チロシンを示しています。

識別記号	シーケンス
a	SFVLNPTNIGM(pS)KSSQGHVTK
b	FQ(pS)EEQQQTEDELQDK
c	TRDIYETD(pY)YRK
d	TRDI(pY)ETD(pY)(pY)RK

分析カラム

- Agilent HILIC-Z カラム、SS カラムハードウェアを使用、
100 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm
- Agilent Altura HILIC-Z カラム、ウルトライナートテクノロジーを採用、100 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm
- Agilent C18 カラム、SS カラムハードウェアを使用、
120 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm
- Agilent Altura C18 カラム、ウルトライナートテクノロジーを採用、
120 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm
- 他社 1 C18 カラム、不活性カラムハードウェアを使用、
130 Å、2.1 × 150 mm、2.5 µm
- 他社 2 C18 カラム、不活性カラムハードウェアを使用、
300 Å、2.1 × 150 mm、1.9 µm

機器

LC/MS 分析は、以下の機器構成を使用して実施しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプラー、サンプルサーモスタット付き (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

表 2. 図 4 の他社との比較における LC パラメータ

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム		
移動相 A	水 + 0.1 % ギ酸	
移動相 B	アセトニトリル + 0.1 % ギ酸	
カラム温度	40 °C	
流量	0.4 mL/min	
サンプル温度	8 °C	
	時間 (分)	%B
グラジェント	0	2
	1.5	2
	11.5	32
	12	2
	18	2

表 3. 図 4 の他社との比較における MS パラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
イオン源	Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源
極性	正
ガス温度	325 °C
乾燥ガス流量	8 L/min
ネブライザ	35 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	11 L/min
キャビラリ電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	175 V
スキマ電圧	65 V
リファレンス質量	322.0481、922.0098
MS1 範囲	m/z 300 ~ 1,250
取り込みレート	1 スペクトル/秒

結果と考察

不活性なカラムハードウェアがクロマトグラフィー性能に与える影響の実証

新たなイナートカラムプラットフォームの実用的な利点を評価するためには、さまざまな生体関連分析対象物を用いて、従来の SS ハードウェアと性能を比較しました。図 1 に示すように、ウルトライナートテクノロジーを採用した Altura カラムは、3 種類の代表的な化合物種において、一貫して SS カラムを上回る性能を示しました。

最初の比較では、複数の酸性残基またはリン酸基を含むペプチド（ペプチド「b」およびペプチド「d」）は、SS ハードウェア使用時には検出できませんでした。また、リン酸化チロシン残基を含むペプチド「c」は、SS ハードウェア使用時のシグナルのピーク高さが 50 % 低下しました。特筆すべき点として、ペプチド「a」のシグナルは、SS ハードウェアと不活性ハードウェア間で同等でした。これらの結果は、多様なペプチド配列と酸性修飾における金属吸着に対して、感度に差があることを明確に示しています。

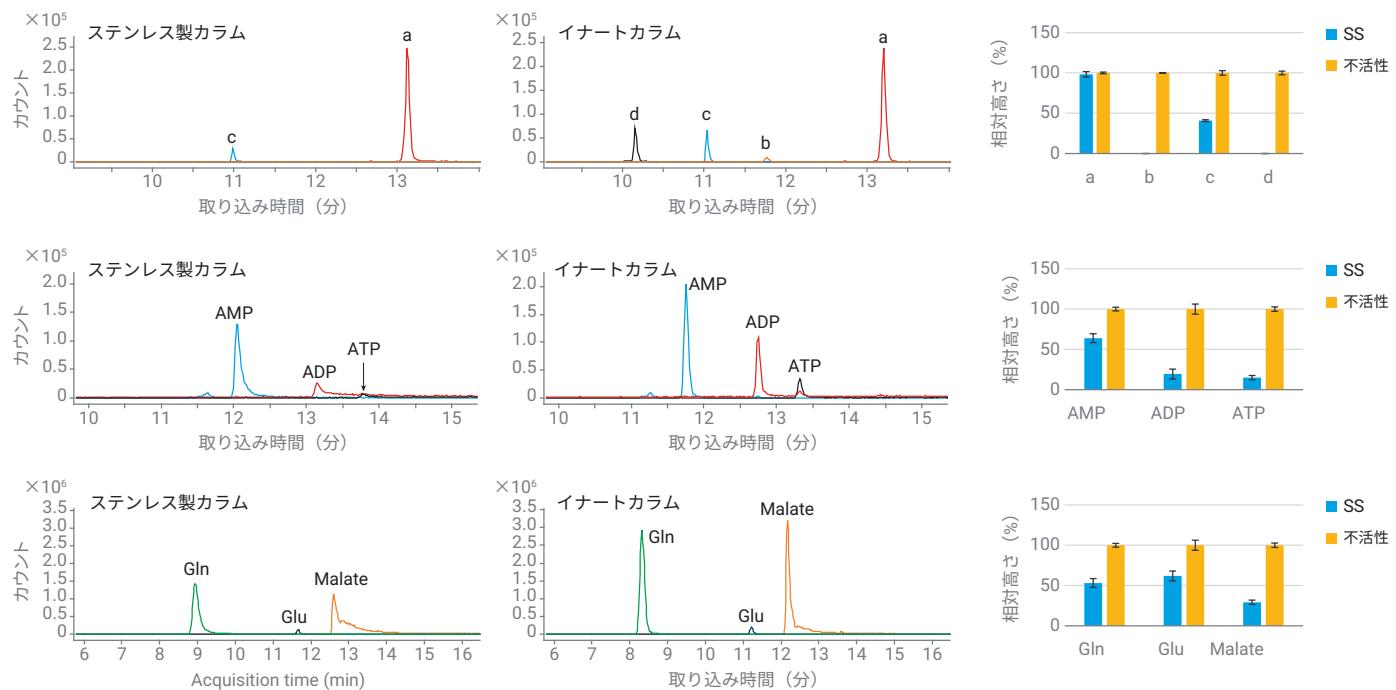


図 1. 合成ペプチド、リン酸化ヌクレオチド（AMP、ADP、ATP）、酸性代謝物（グルタミン、グルタミン酸、リンゴ酸）の 3 種類の化合物種における、ステンレス（SS）と Agilent Altura ウルトライナート HPLC カラムハードウェアのクロマトグラフィー性能の比較。合成ペプチドは、逆相（RP）分離により分離され、リン酸化ヌクレオチドおよび酸性代謝物は、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）により分離されました。クロマトグラムと対応する棒グラフは、Altura カラムで相対シグナル強度が大幅に高いことを示しており、その優れた不活性度および分析対象物の回収率の向上を明確に示しています。

さらに、新しい Altura カラムの不活性度が、分析対象物の損失を低減することも示しています。同様に、2 番目のセットでは、リン酸化ヌクレオチド (AMP、ADP、ATP) において、不活性カラム使用時に大幅に高いシグナル強度と改善されたピーク形状が観察されており、これは金属表面との相互作用が低減したことを示しています。最後に、グルタミン、グルタミン酸、リンゴ酸などの酸性代謝物は、回収率が向上してピークがシャープになっており、新しい不活性カラムが吸着の影響を軽減できることも実証しました。

示されている棒グラフは、これらの改善内容を定量した結果ですが、ウルトライナートテクノロジーを採用した Altura カラムが、すべての化合物種において最大2～3 倍高い相対シグナル強度を実現していることを示しています。さらに、ウルトライナートカラムハードウェア使用時に、テーリングファクターの低減が観察されていることからわかるように、ほとんどのターゲット化合物において、ピーク分離能が大幅に向上了しました（表 4）。これらの結果は、特に金属との相互作用を起こしやすい分析対象物において、信頼性の高い高感度の分離を実現する際に、ハードウェア表面のケミストリが重要な役割を果たしていることを明確に示しています。

表 4. 不活性カラムハードウェアによるピーク形状の改善。これらの結果は、金属と相互作用しやすい分析対象物において、テーリングファクターが改善されていることを明確に示しています。完全な吸着により結果が定量できなくなったため、一部の分析対象物は記載されていません。ペプチド「a」およびペプチド「c」の配列については、表 1 を参照してください。

	テーリングファクター (TF)					
	ペプチド		代謝物			
	a	c	グルタミン	グルタミン酸	AMP	ADP
SS	1.2	1.9	1.8	1.4	2.6	4.8
不活性	1.0	1.4	1.2	1.3	1.3	1.7
ΔTF (不活性 - SS)	-0.2	-0.5	-0.6	-0.1	-1.3	-3.1

過酷な条件下における化学的安定性の評価

カラムハードウェアでは、特にアグレッシブな移動相や高温に曝露される場合、クロマトグラフィー性能に加えて、長期の化学的安定性が非常に重要な要件になります。ウルトライナートテクノロジーを採用した Altura カラムハードウェアの耐久性を評価するために、実際の分析条件をシミュレートした一連のストレステストを実施しました。

図 2 は、実験機器の設定と結果を示しており、パネル A は、寿命試験の構成を示しています。空の不活性カラムを曝露させ、Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブシステムを用いて、6 週間にわたり規定の化学溶媒を循環させました。パネル B は、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 質量分析計を組み合わせ、MP35N または PEEK 接続キャビラリを用いて、サンプル流路における金属媒介の干渉なしに、分析対象物の回収率とシグナルの完全性を高い信頼性でモニタリングする、LC/MS 分析ワークフローの詳細を示しています。

結果として、不活性カラムは、強酸、強塩基、濃縮リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、高温でのイオンペア試薬など、さまざまな化学的処理において、卓越した化学的耐性（図 2C および 2D）を示すことが明らかになりました。不活性カラムは、最も過酷な条件下でも、シグナル損失は最低限でした。

これらの結果は、ウルトライナートカラムテクノロジーが、分析対象物の回収率を向上させるだけではなく、化学的に要求の厳しいワークフローへの長期的な曝露に対しても耐性があることを立証しており、高感度の生体分子分析のための堅牢なソリューションであることを示しています。

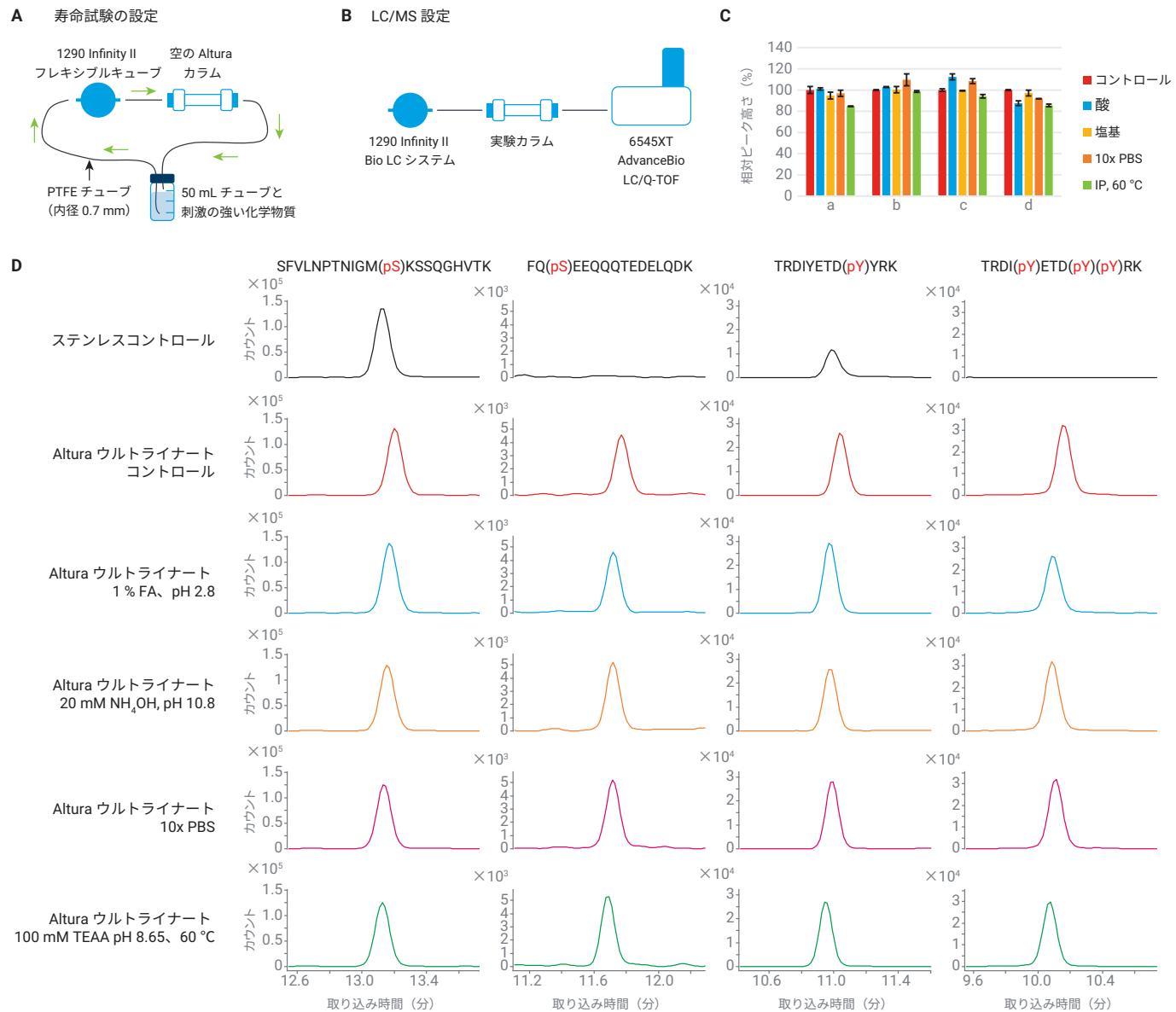


図 2. 過酷な化学的条件下における Agilent Altura ウルトライナートカラムの耐久性の評価。(A) Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブを用いた寿命試験の設定。(B) Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による LC/MS 分析ワークフロー。(C) 酸、塩基、濃縮 PBS、またはイオンペア試薬に高温で曝露した後の相対シグナル強度を示す棒グラフ。未処理カラムをコントロールとして使用しています。(D) 化学的処理を施したカラムハードウェアの定性的な違いを示すクロマトグラム

コーティング済みカラムバッチ間での再現性の確保

再現性は、信頼性の高い分析ワークフローの基盤であり、特に製造ロット間の一貫性が不可欠なバイオ医薬品環境において重要です。バッチ間性能を評価するために、Altura ウルトライナートカラムの生産ロットを複数評価し、SS カラムと比較しました。

図 3 に示すように、4 つの不活性カラムバッチ（ラベル #1 ~ #4）はすべて、繰り返し分析において一貫して高い相対シグナル強度を示しました。対照的に、SS コントロールカラムは、低いシグナル回収率を示しました。バッチ間において相対シグナル強度に一貫性があることは、ハードウェアの不活性表面のケミストリと製造プロセスの再現性をさらに明確に示しています。これらの結果は、Altura カラムプラットフォームが、生産ロット全体で信頼性の高い性能を実現していることも立証しており、ハイスループットかつ品質が重要なアプリケーション向けの堅牢で拡張性があるソリューションとなっています。

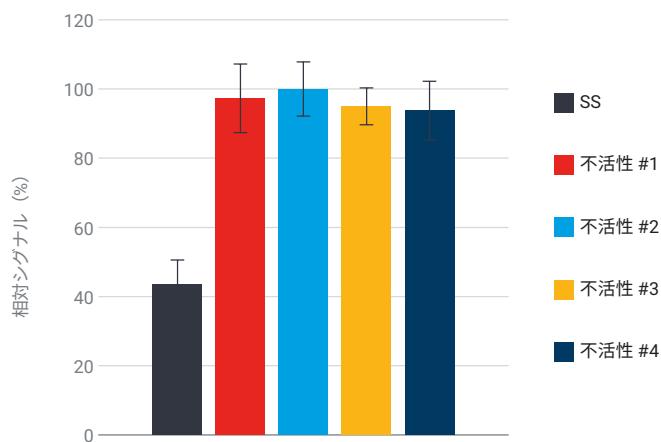


図 3. 4 つの生産ロットの Altura ウルトライナートカラムハードウェアのバッチ間一貫性の評価。ステンレス（SS）カラムと比較したものです。棒グラフは、リン酸化ペプチドのエラーバー付きの相対シグナル強度（ピーク高さ）を示しています（n = 8）。

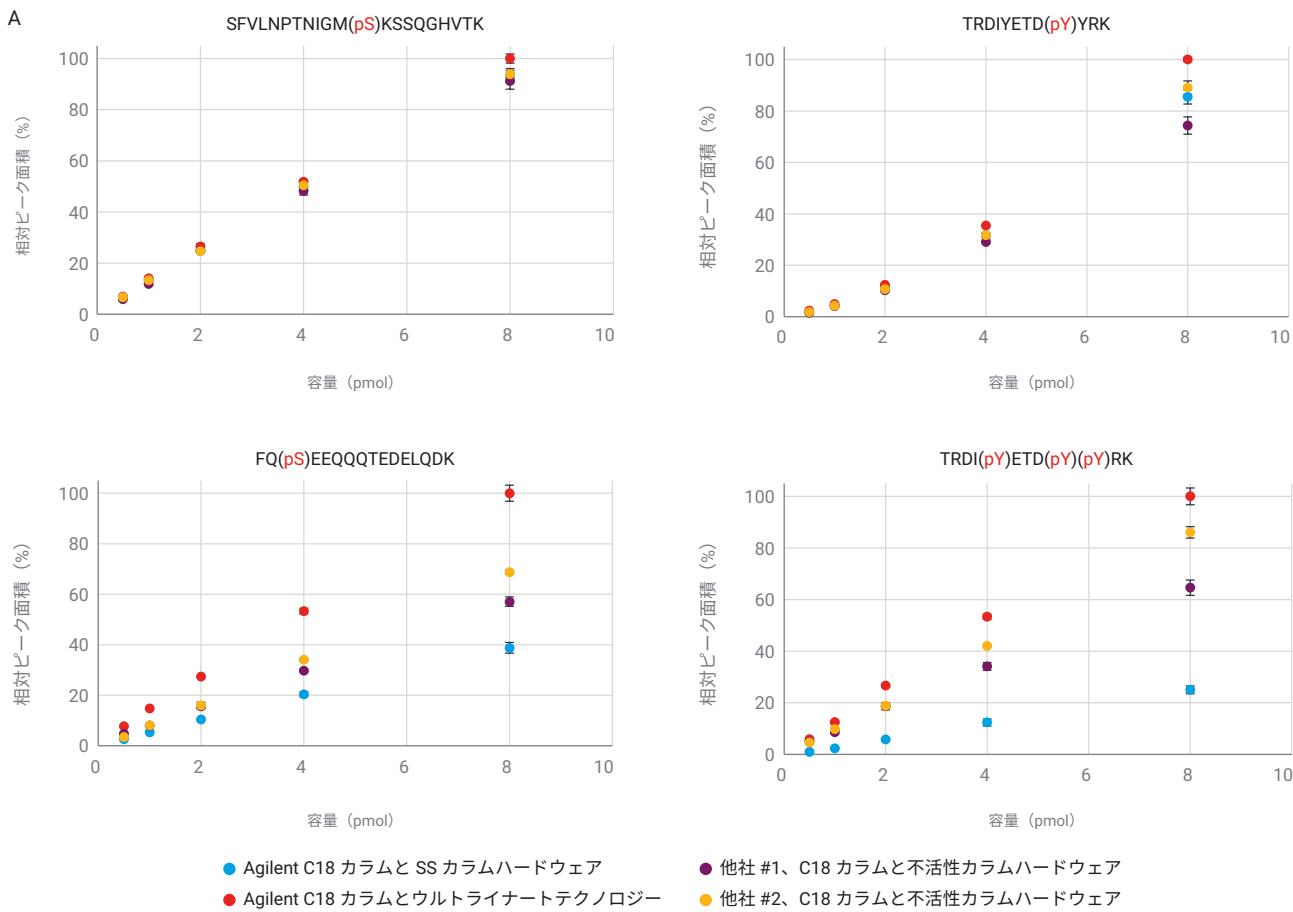
リン酸化ペプチドの優れた検出

リン酸化ペプチドは、金属表面に対する親和性が高く、分析がきわめて困難です。多くの場合、分析対象物の回収率の低下や分析シグナルの低下を引き起こします。Altura 不活性カラムの性能を業界標準の別の製品とベンチマークテストするために、代表的な 4 種類のリン酸化ペプチド配列を用いた比較実験を実施しました。

エンドキャップされた C18 を充填したウルトライナートカラムハードウェアは、同一の C18 固定相を充填した SS カラム、および不活性ハードウェアを備えた他社の 2 種類の C18 カラムと比較して、幅広いペプチド濃度範囲において一貫して高い相対ピーク面積を示しました（図 4A）。各散布図は、特定のリン酸化ペプチド配列ごとに、ペプチド量 (pmol) とシグナル応答間の関係を示しています。すべての場合において、Altura イナートカラム（赤）が、他のカラムを上回る性能を示しました。これらの定量結果は、0.5 pmol 注入時の各ペプチドのクロマトグラムを示す図 4B でさらに詳細に示されています。Altura イナートカラムは、TRDI(pY) ETD(pY)(pY)RK などの多重リン酸化配列を含むすべてのペプチドにおいて、よりシャープで強いピークを生成しており、その不活性度と感度が優れていることを明確に示しています。

合わせて、これらの図は、不安定で金属と相互作用しやすい分析対象物において、Altura カラムが、シグナルの完全性を維持して感度を向上させることができることを実証しています。この性能は、検出感度と定量精度が最も重要な、リン酸化プロテオミクスワークフローやその他のアプリケーションにおいて特に有用です。

A



B

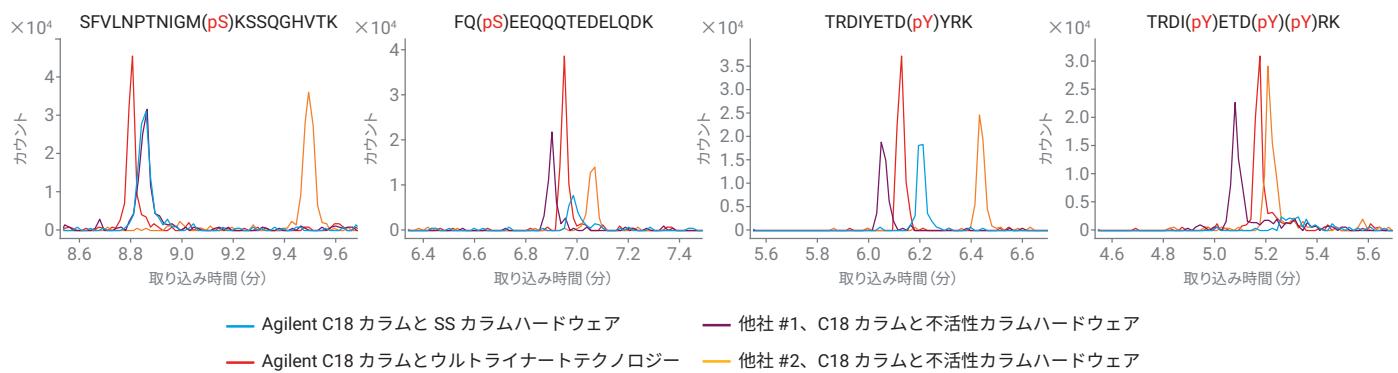


図4. リン酸化ペプチド検出における他社との比較。(A) 4種類のリン酸化ペプチド配列における、4種類のC18カラムでの相対ピーク面積とペプチド量を示す散布図：SSカラムハードウェアでのAgilent C18、ウルトライナートカラムハードウェアでのAgilent C18、不活性カラムハードウェアでの他社#1 C18、不活性カラムハードウェアでの他社#2 C18。(B) 各ペプチドに対応するクロマトグラムは、指定されたペプチドを0.5 pmol注入した場合の、Agilent Alturaカラムの感度とピーク品質が優れていることを示しています。

システム全体の不活性度：カラムと LC プラットフォームの相乗効果

カラムハードウェアは、分析対象物の損失を最小限に抑えるうえで重要な役割を果たしますが、広範な LC システムも、最適なクロマトグラフィー性能の実現に貢献します。カラムとシステムの不活性度の複合的な影響を評価するために、イナートカラムおよび SS カラムを、生体適合性 LC システム (Bio LC) または標準の SS ベース LC システムのいずれかと組み合わせた 4 種類の構成で試験しました。

図 5 に示すように、Altura カラムと組み合わせた Bio LC システム (パネル i) は、リン酸化ペプチドにおいて最高のシグナル強度を示しており、流路全体において金属の相互作用を最小限に抑えることの重要性を立証しました。

対照的に、SS カラムを用いた標準の LC システム (パネル iv) は、シグナル回収率が最も低く、不活性でない表面が累積的な影響を及ぼすことが明確に示されました。SS カラムを用いた標準の LC システム (パネル iv) と、完全に不活性な構成 (パネル i) の変化を見ると、ペプチド b のピーク面積は 25 倍増加しました。

興味深いことに、パネル iv とパネル ii を比較すると、SS カラムから不活性カラムに切り替えることにより、相対シグナル強度が大幅に改善されました。この単純なカラム置換により、ペプチド b のピーク面積は 14 倍増加しました。これらの結果は、SS LC 使用時に分析シグナルを最大化するには、不活性カラムが重要になることを示唆しており、既存の SS LC システムから高い感度を得ることが可能になります。

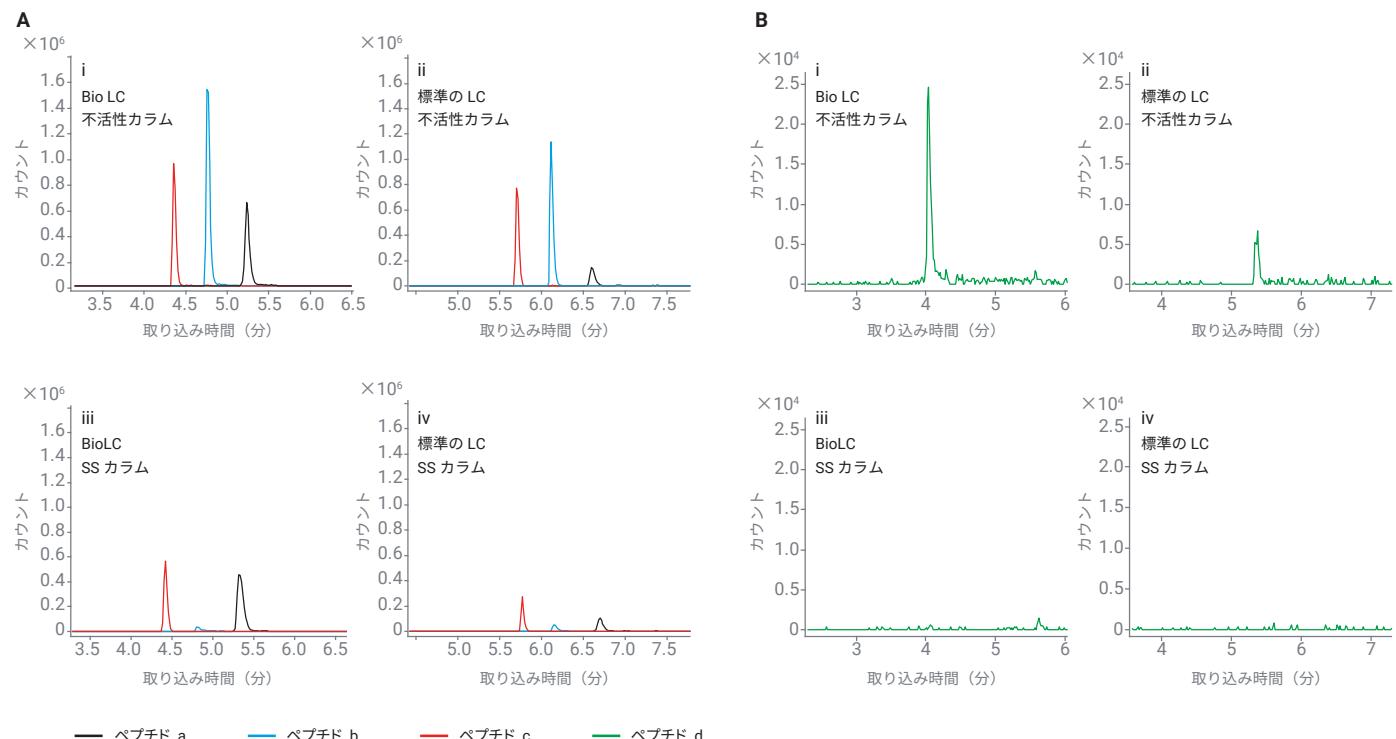


図 5. リン酸化ペプチドを用いた不活性カラムおよび LC システムの評価。4 種類のシステム構成におけるリン酸化ペプチド (0.5 pmol) のシグナル回収率の比較：(i) 不活性カラムと Bio LC、(ii) 不活性カラムと標準の SS ベース LC、(iii) SS カラムと Bio LC、(iv) SS カラムと標準の SS ベース LC。完全に不活性な流路が最高のシグナル強度を示した一方、標準の LC + SS カラム設定では最低値を示しました。この結果は、最適なリン酸化ペプチド検出におけるシステム全体の不活性度の重要性、および既存の SS システムにおける不活性カラムの有用性を明確に示しています。ペプチド d は、ペプチド a ~ c よりもシグナル応答が低いため、明確にするために別に示しています。ペプチド配列については、表 1 を参照してください。

結論

このホワイトペーパーでは、生体関連性が高く金属と反応しやすい化合物のクロマトグラフィー分析における長年の課題に対処するために設計された、ウルトライナート HPLC カラムテクノロジーを包括的に評価しました。一連のターゲット実験を通して、特に酸性代謝物およびリン酸化ペプチドにおいて、Agilent Altura カラムが、分析対象物の回収率、シグナル強度、ピーク形状において大幅な改善をもたらすことを実証しています。

得られた主な結果は以下のとおりです。

- 多様な化合物種でのクロマトグラフィー性能の向上。よりシャープなピークと高いシグナル強度を実現（図 1）
- 過酷な条件下での卓越した化学的安定性。長期耐久性と一貫した性能を保証（図 2）
- 信頼性の高いバッチ間再現性。ハイスループット環境での導入をサポート（図 3）
- リン酸化ペプチドの優れた検出。感度とピーク形状の両方において、従来のカラムテクノロジーを上回る性能を実現（図 4）
- システム全体の不活性度の重要性。Altura カラムを Bio LC システムと組み合わせることにより、最適な結果を実現（図 5）

また、これらの結果は、Altura カラムが、困難な分離に対する堅牢で高性能のソリューションであることを明確に示しています。このウルトライナートテクノロジーは、不要な相互作用を最小限に抑えて、シグナル忠実度を最大化することにより、信頼性の高い定量、幅広い分析対応範囲、およびメソッド開発の効率向上を実現します。

参考文献

1. Wei, T.; et al. The use of HILIC Zwitterionic Phase Superficially Porous Particles for Metabolomics Analysis. *LCGC Suppl.* **2018**, 36(6), 30–35.
2. Hsiao, J.; et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457–9464.
3. Hsiao, J.; et al. Troubleshooting LC Separations of Biomolecules, Part 1: Background, and the Meaning of Inertness. *LCGC Eur.* **2020**, 33(3), 122-126.
4. Fleitz, A.; et al. Enhanced Detection of Multiply Phosphorylated Peptides and Identification of Their Sites of Modification. *Anal. Chem.* **2013**, 85(18), 8566-8576.
5. Winter, D.; et al. Citrate Boosts the Performance of Phosphopeptide Analysis by UPLC-ESI-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2009**, 8(1), 418-424.
6. Sandra, P.; et al. Analyzing Phosphorylated N-Glycans with Recovery on Bio-Inert LC Systems and PEEK-Lined HILIC Columns. *LCGC Eur.* **2018**, 31(10), 566-571.
7. Rivera, B.; et al. Bioinert Versus Biocompatible: The Benefits of Different Column Materials in Liquid Chromatography Separations. *LCGC Suppl.* **2018**, 36(6), 24–29.
8. De Pra, M.; et al. Effects of Titanium Contamination Caused by Iron-Free High-Performance Liquid Chromatography Systems on Peak Shape and Retention of Drugs with Chelating Properties. *J. Chromatogr A* **2020**, 1611, 460619.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

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。

DE-009624

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, September 11, 2025

5994-8618JAJP