

HILIC ベースの LC-MS クロマトグラフィーを メタボロミクス研究に使用する場合の、極性低 分子に対するクロマトグラフィー性能の評価

Adam King, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

本アプリケーションブリーフでは、HILIC および BEH Amide カラムケミストリーの、親水性極性代謝物の分離における性能と頑健性、およびそれらの代謝物プロファイリング研究に対する適合性を評価しています。

アプリケーションのメリット

BEH Amide カラムは、極性化合物保持能、クロマトグラフィーピーク形状、および標準混合物とヒト尿の分析における再現性において優れていることが実証され、大規模なメタボロミクス研究に適していることが証明されました。

はじめに

代謝物プロファイリング研究で通常使用される生物学的マトリックスは、多くの生化学的プロセスできわめて重要なさまざま低分子で構成されます。クエン酸サイクルやアミノ酸代謝に関連する経路には、逆相 (RP) クロマトグラフィー条件での保持と分離が困難な極性の高い化合物が含まれます。親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) は、極性の代謝物の分析に適した技法で、これらの化合物の親水性の性質をカラムへの保持に利用します。HILIC カラムは通常、極性官能基を含む一部の固定相と非修飾シリカ粒子で構成され、広範な極性、pKa、構造的部分にわたる極

性分析化合物の保持および分離が改善しています。生体マトリックスに存在する分子の多様性、そして物理化学的特性における基本的な差異により、プロファイリング実験における修飾固定相の、非修飾固定相と比較した場合の真価がわかります。

結果および考察

極性の保持/分離における非修飾固定相と修飾固定相の違いを評価するために、Waters BEH HILIC 非修飾シリカカラム（製品番号：186003461）およびBEH Amide カラム（製品番号：186004801）の 2 つの HILIC カラムを、調査用に選びました。カラム特性の違いを評価するため、Waters LCMS QC レファレンス標準試料混合物（製品番号：186006963）および極性内因性化合物のカスタマイズした混合物を、4 種の異なる移動相条件（表 1）で分析しました。カスタマイズした極性化合物混合物には、フェニルアラニン、タウリン、ベタイン、クレアチニン、馬尿酸、安息香酸を含めました。100% 水溶液として供給された各標準溶液をアセトニトリルで 1:4 に希釈し、繰り返し注入しました（n = 6）。すべてのカラムおよび移動相条件において、カラム温度は 40 °C に維持し、グラジエントプロファイルは 7 分間で 0 ~ 100% A でした。移動相の流量も、すべての条件において 0.5 mL/分に維持しました。

Mobile Phase		
	A	B
MP 1	95:5 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid	5:95 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid
MP 2	95:5 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 5 mM ammonium acetate	5:95 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 5 mM ammonium acetate
MP 3	95:5 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 10 mM ammonium acetate	5:95 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 10 mM ammonium acetate
MP 4	95:5 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 20 mM ammonium acetate	5:95 Water:acetonitrile with 0.1% formic acid and 20 mM ammonium acetate

表 1. BEH HILIC カラムおよび BEH Amide カラムのカラム特性を調べるために使用した移動相（MP）条件

すべてのデータは、分解能モードで動作する Waters SYNAPT XS システムを使用して取り込み、ポジティブイオン化モードでデータを収集しました。各標準試料の抽出イオンクロマトグラムを、MassLynx および Skyline（MacCoss Lab, University of Washington, Seattle, USA）を使用して解析しました。ここでは、評価したあらゆる条件にわたって最適なカラムを決定するために、ピーク幅（W_b）、保持係数（K）、選択性（α）、理論段数（N）などのクロマトグラフィー性能の特性を計算しました。

生成したピーク幅の範囲を調べることにより、アミドカラムの方が、4種の移動相条件すべてにわたって平均幅4～5秒と、一貫性にはるかに優れていることがわかりました（図1）。BEH HILICカラムではピーク幅がより大きくばらつき、酢酸アンモニウムを加えることによって改善することがわかりましたが（図2）、ピーク幅は最終的に2～9秒の範囲でした。

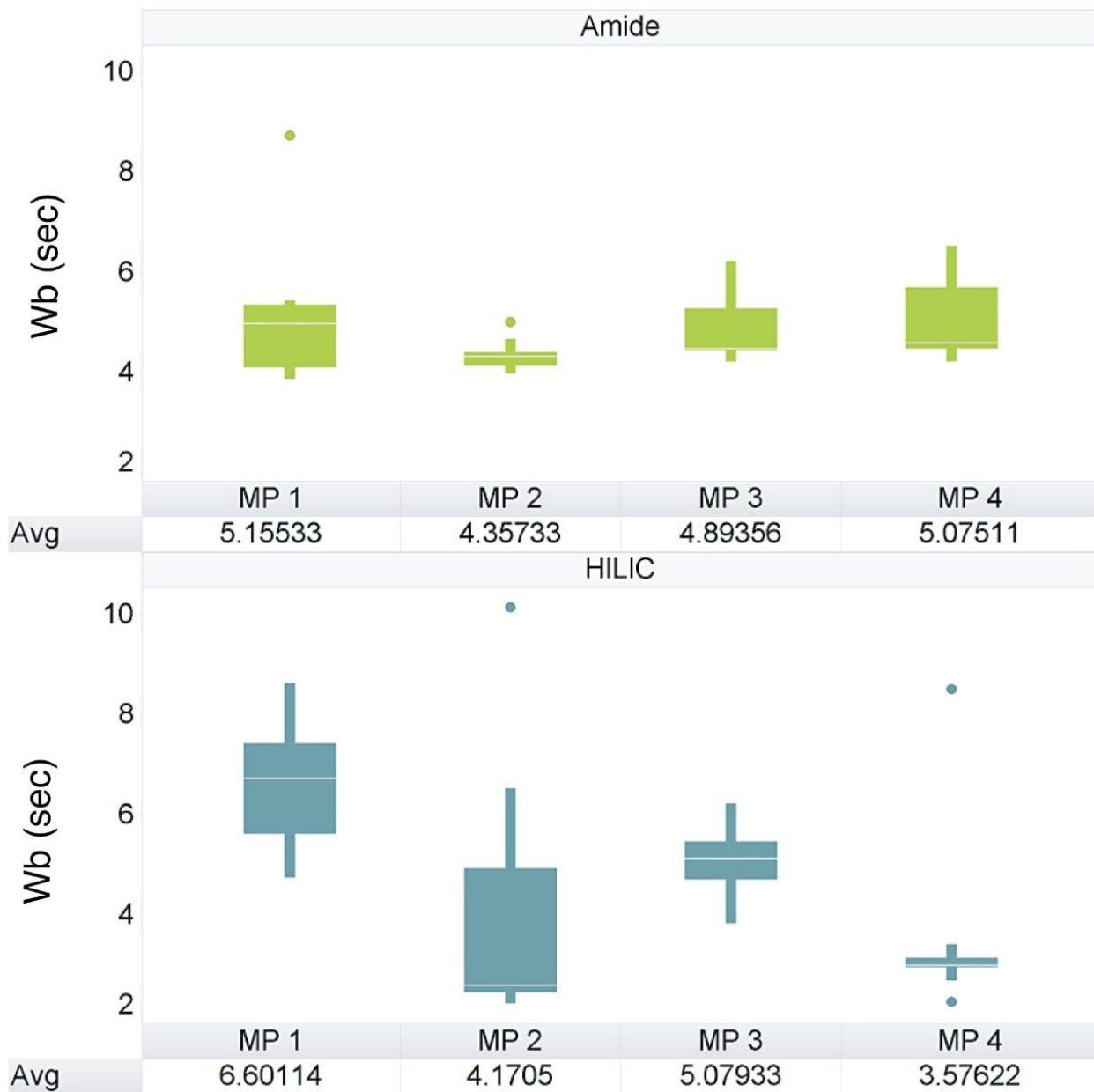


図1. ベースでの LCMS QC レファレンス標準試料のピーク幅の比較 (W_b)。評価した4種の移動相条件 (MP1～MP4) について、BEH Amide カラムのデータ（上段）および BEH HILIC カラムのデータ（下段）を示しています。

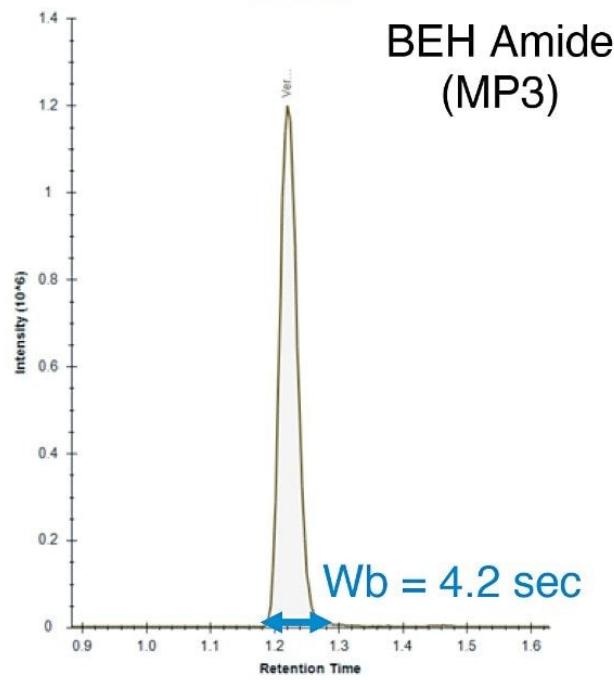
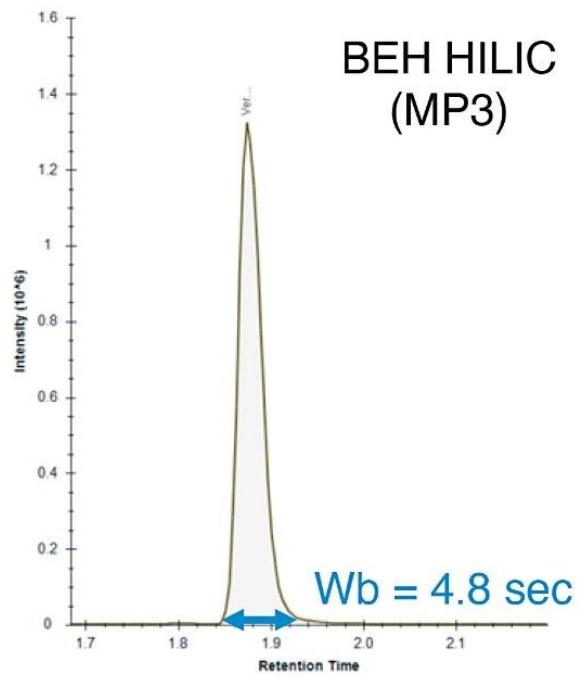
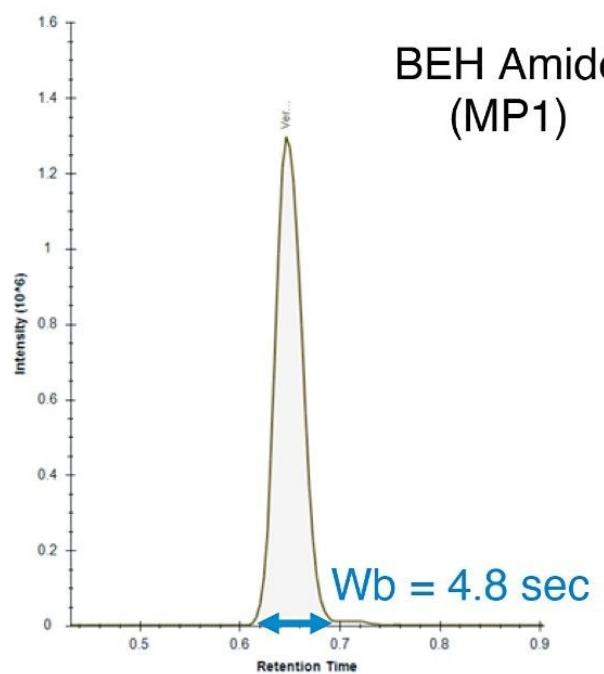
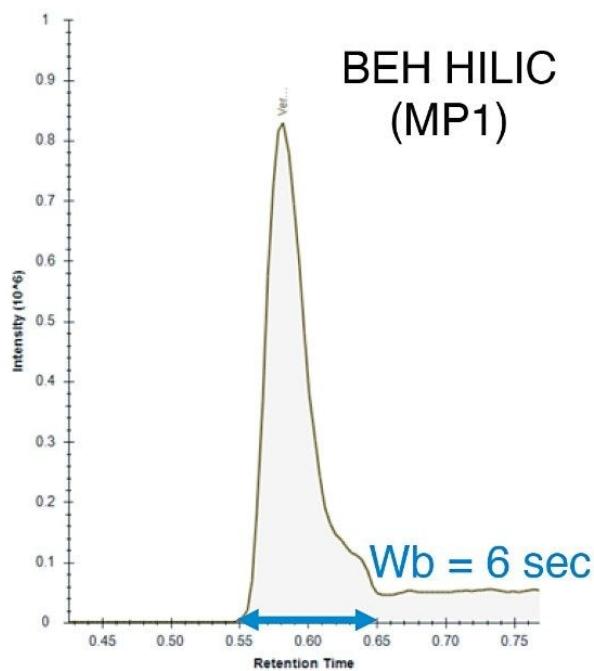


図2. 化合物ベラパミルのクロマトグラムの比較。BEH HILIC および Amide カラムで移動相 1 と 3 を使用する場合、ベースでのピーク幅 (Wb) がばらつきます。

保持係数 (K') は、カラムの保持性能および保持容量の指標です。 K' 値 1 ~ 10 は通常、分析法の開発およびバリデー

ションでは許容可能と考えられています¹。図3に、両方のカラムを使用して4種の移動相条件すべてで分離したLCMS QC レファレンス化合物の平均 K' 値を示しています。両方のカラムで、評価した移動相条件のほとんどで1.5を超える平均 K' 値が得られていますが、BEH Amide カラムの方が、4種の移動相条件すべてにおいてより一貫していることがわかります。

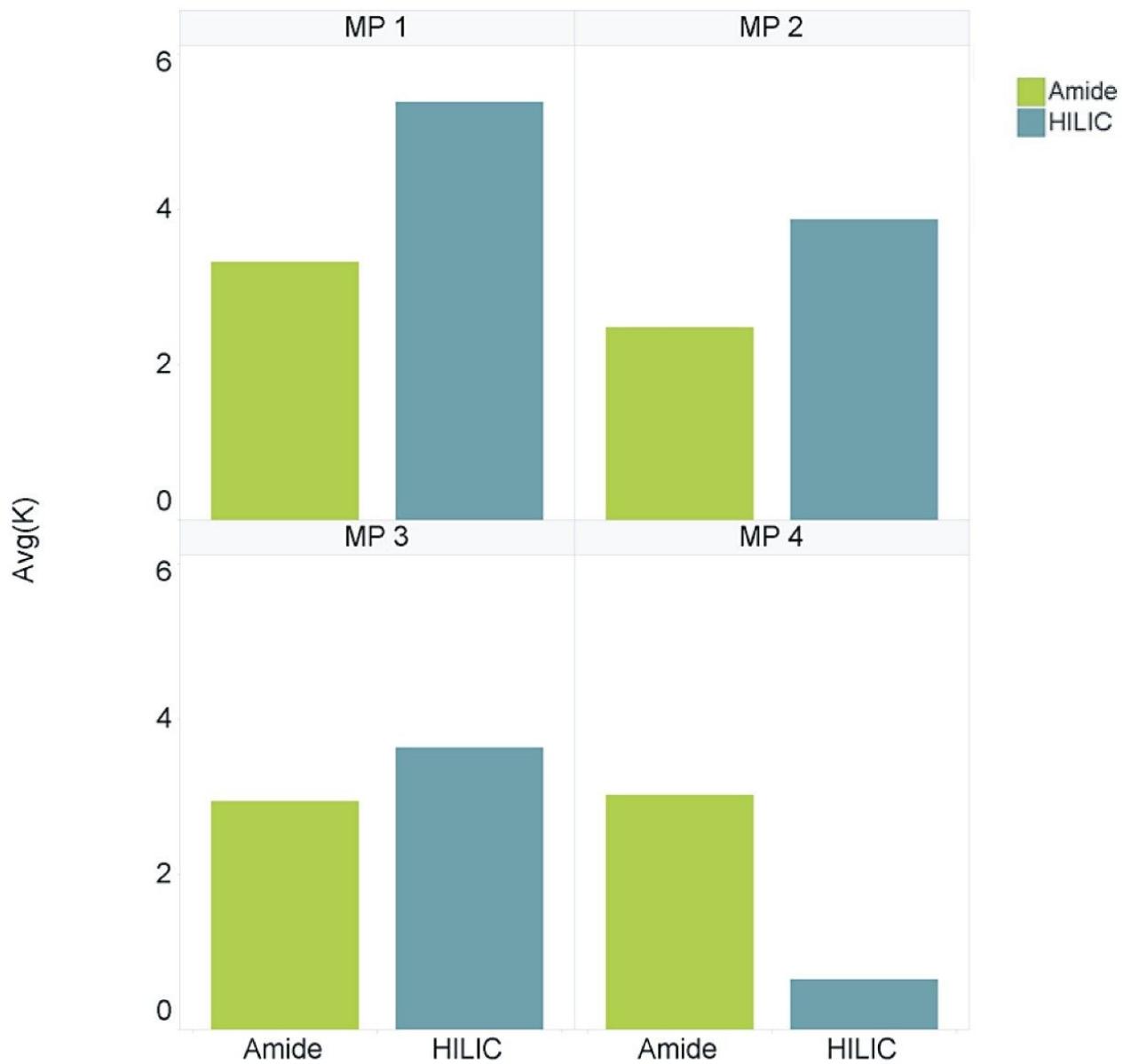


図 3. BEH Amide カラムおよび HILIC カラムについて評価した 4 種の移動相条件での、LCMS QC レファレンス標準試料に基づく平均保持係数 (K')。

これらの観察結果に基づき、両方のカラムについて、移動相 3 (10 mM 酢酸アンモニウム) で最適なクロマトグラム性能が得られ、同様のピーク幅と K' 値が得られました (それぞれ図 1 および図 3)。図 4 のクロマトグラムからわかるように、BEH Amide カラムの方が、LCMS QC レファレンス標準試料の分離に優れており、多くの極性標準試料に対す

る保持能がより良好でした。

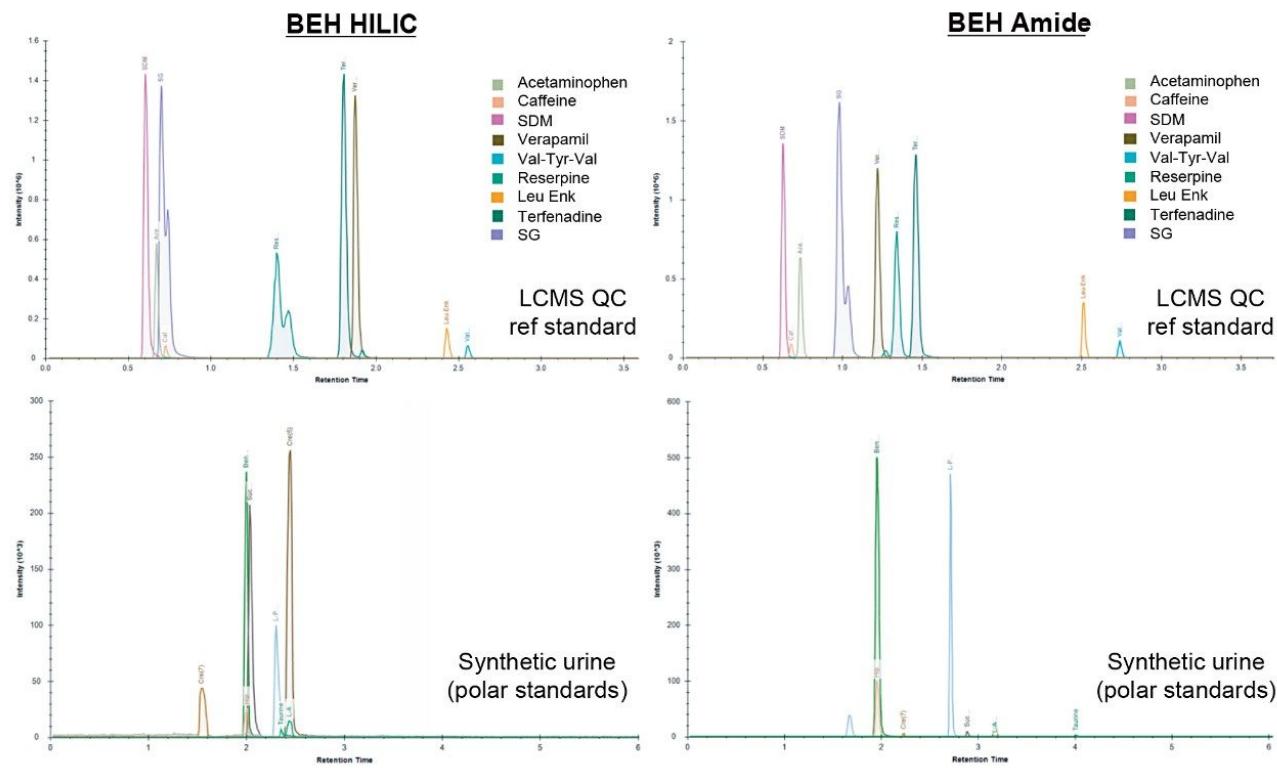


図 4. 10 mM 酢酸アンモニウムバッファーの移動相を使用して BEH Amide カラム（右図）および BEH HILIC カラム（左図）に注入した LCMS QC レファレンスおよび合成尿標準品のクロマトグラム例

概説した評価に基づいて、最適化したクロマトグラフィー条件を使用したヒト尿の 200 回の注入を取り込む（分析時間 34 時間）ことにより、BEH Amide カラムの再現性を評価しました。これらの結果により、分析期間全体にわたって再現性が優れていることが実証されました（図 5）。

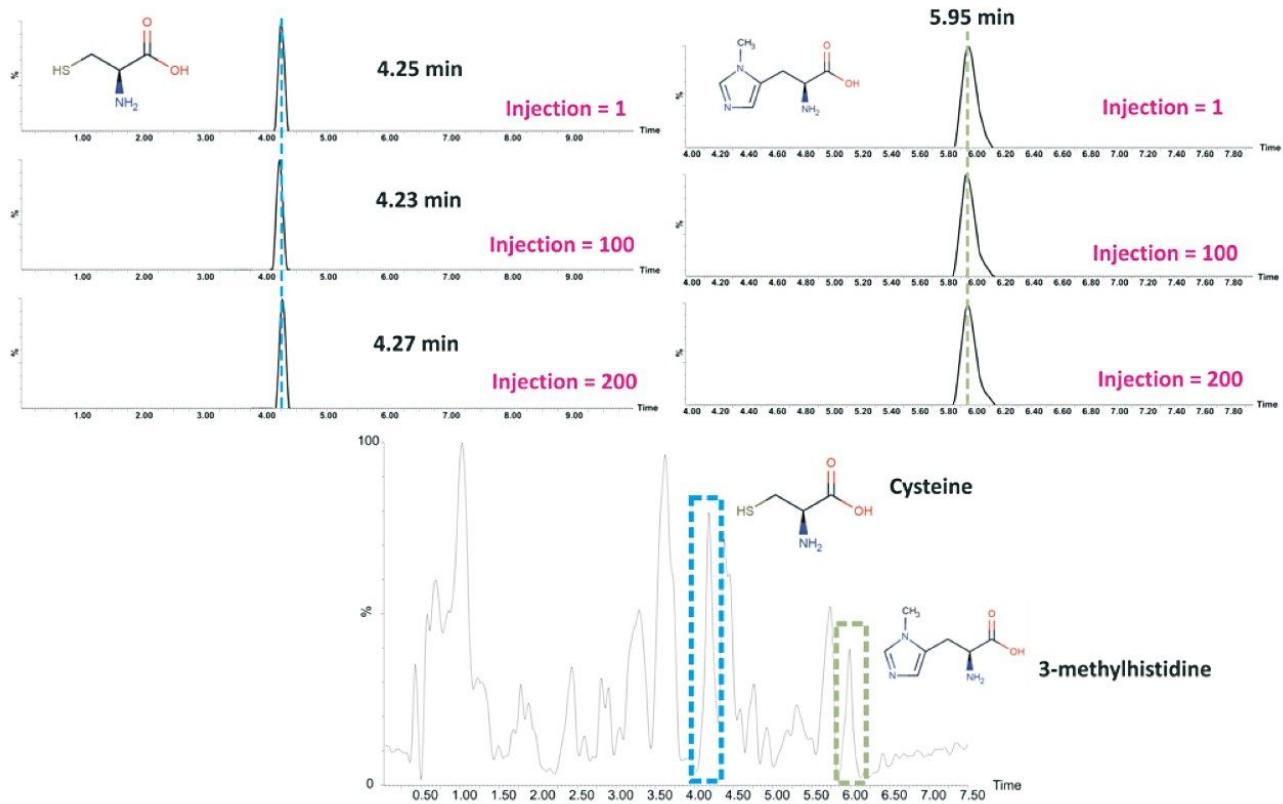


図 5. 10 mM ギ酸アンモニウムで構成されるバッファー移動相を使用した BEH Amide カラムにおける、ヒト尿からの既知の内因性代謝物に対する保持時間の再現性。システインおよび 3-メチルヒスチジンの変動係数 (CV) は、200 回の連続注入にわたってそれぞれ 2.8% および 0.6% でした。

結論

この調査により、包括的代謝物プロファイリング試験における、修飾固定相カラムの、従来の非修飾 HILIC カラムと比較した場合の利点が明らかになりました。複雑なマトリックス中の極性化合物の分析において、化合物保持、ピーク形状、再現性が向上していることが実証されました。BEH Amide カラムは、LCMS QC レファレンス標準品において、選択性が向上し、ピーク分離度が高いことが実証されました。

さらに、バッファー移動相の追加によって、化合物と固定相の相互作用が強化され、ピークがシャープになってクロマトグラフィー分離が向上しました。ヒト尿内にスパイクしたレファレンス標準品の評価により、HILIC Amide カラムを使用する最適化した分析法において、200 回の注入にわたって再現性が優れていることがわかりました。

参考文献

1. Reviewer Guidance – Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November 1994.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

SYNAPT XS 高分解能質量分析計 <<https://www.waters.com/135020928>>

720006934JA、2020 年 6 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [環境設定](#)