

评估基于HILIC的LC-MS色谱方法在代谢组学研究中分析极性小分子化合物的色谱性能

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

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报评估了HILIC和BEH Amide色谱柱用于亲水性极性代谢物分离的性能和稳定性，及其在代谢物分布研究中的适用性。

优势

BEH Amide色谱柱在混标和人尿样的分析中表现出优异的极性化合物保留性能、色谱峰形和重现性，证明其适用于大规模代谢组学研究。

简介

代谢物分布研究通常采用的生物基质中包含各种小分子，这些小分子在许多生化过程中发挥着重要作用。柠檬酸循环途径以及与氨基酸代谢相关的途径包含强极性化合物，这些化合物在反相(RP)色谱条件下难以保留和分离。亲水作用液相色谱(HILIC)技术更适用于分析这些极性代谢物，该技术是利用化合物的亲水性使其保留在色谱柱上。HILIC色谱柱往往由未键合的硅胶颗粒组成，其中一些固定相含有极性官能团，对于具有各种极性、pKa值和结构的极性分析物，能够改善保留性能和分离效果。由于生物基质中存在各种不同的分子以及它们在理化性质方面

的根本差异，本研究评估了键合固定相与未键合固定相在代谢物分布实验中的真正优势。

结果与讨论

为评估未键合固定相与键合固定相在极性化合物保留/分离方面的差异，本研究选择了两种HILIC色谱柱：Waters BEH HILIC未键合硅胶色谱柱（部件号：186003461）和BEH Amide色谱柱（部件号：186004801）。为评估色谱柱特性的差异，在四种不同的流动相条件下（表1）对Waters LCMS QC参比混标（部件号：186006963）和定制的极性内源性化合物混合物进行分析。定制的极性化合物混合物包含苯丙氨酸、牛磺酸、甜菜碱、肌酸酐、马尿酸和苯甲酸。用100%的水配制各标准溶液，然后用乙腈按1:4的比例稀释，重复进样(n=6)。所有色谱柱和流动相条件下的柱温均维持在40°C，梯度曲线设置为A在7 min内由0增加至100%。所有条件下的流动相流速均保持在0.5 mL/min。

	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.研究BEH HILIC和BEH Amide色谱柱特性使用的流动相(MP)条件

所有数据均使用Waters SYNAPT XS系统进行采集，该系统在分辨率模式下运行，并在正离子模式下采集数据。使用MassLynx和Skyline（美国西雅图华盛顿大学MacCoss实验室）处理每种标准品的提取离子流图，计算色谱性能，包括峰宽(Wb)、保留因子(K')、选择性(α)和理论塔板数(N)，以便确定所有评估条件下的最佳色谱柱。

检查得到的峰宽范围，表明Amide色谱柱提供的一致性更高，所有四种流动相条件下的平均峰宽在4~5 s之间（图1）。BEH HILIC色谱柱在峰宽方面表现出较大的变化，其随着乙酸铵的添加逐渐改善（图2），但最终峰宽在2~9 s的范围内。

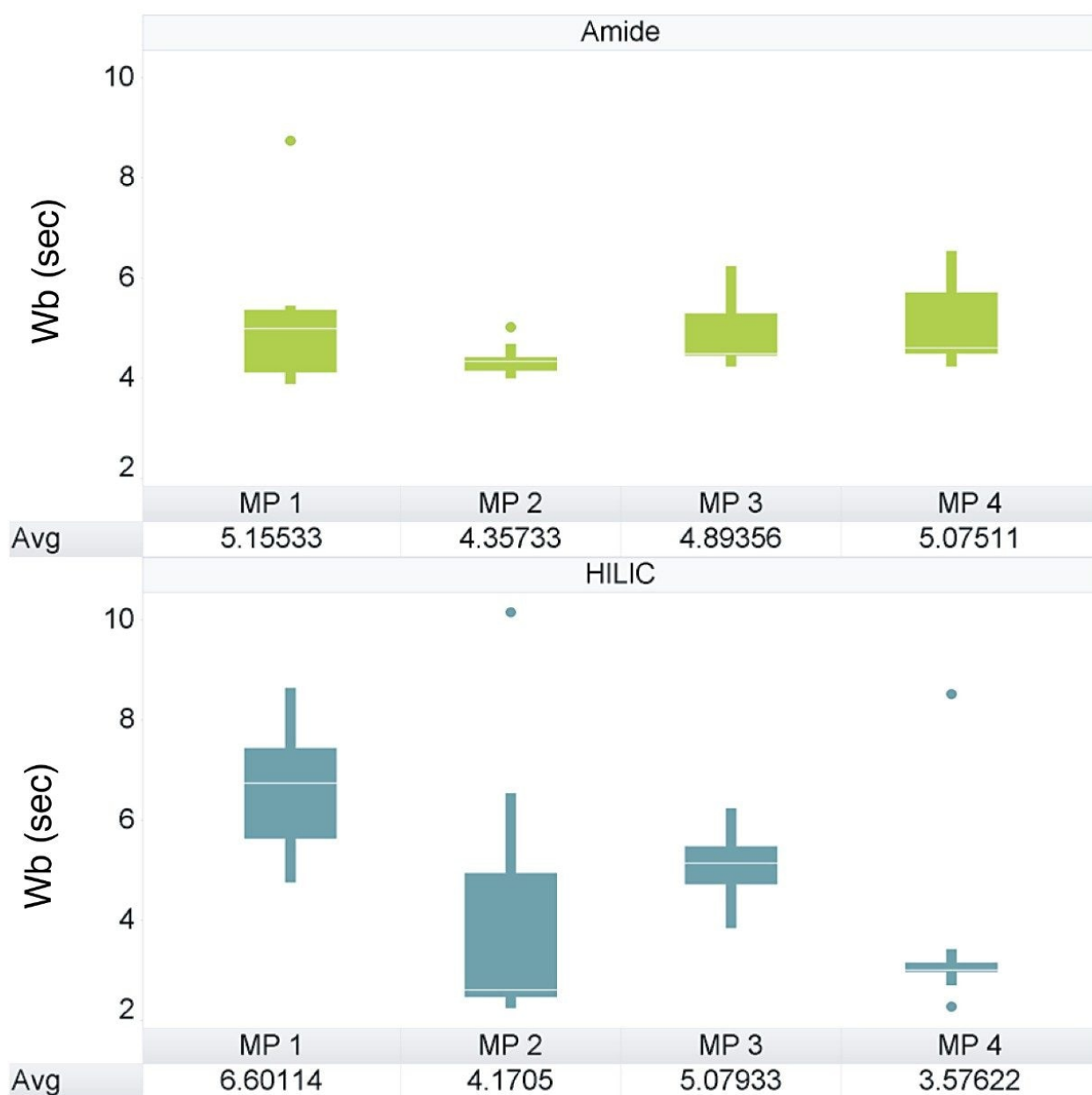


图1.LCMS QC参比标准品的基线峰宽(Wb)比较。展示了在评估的四种流动相条件下(MP1~MP4)得到的BEH Amide (上图) 和BEH HILIC (下图) 色谱柱的结果。

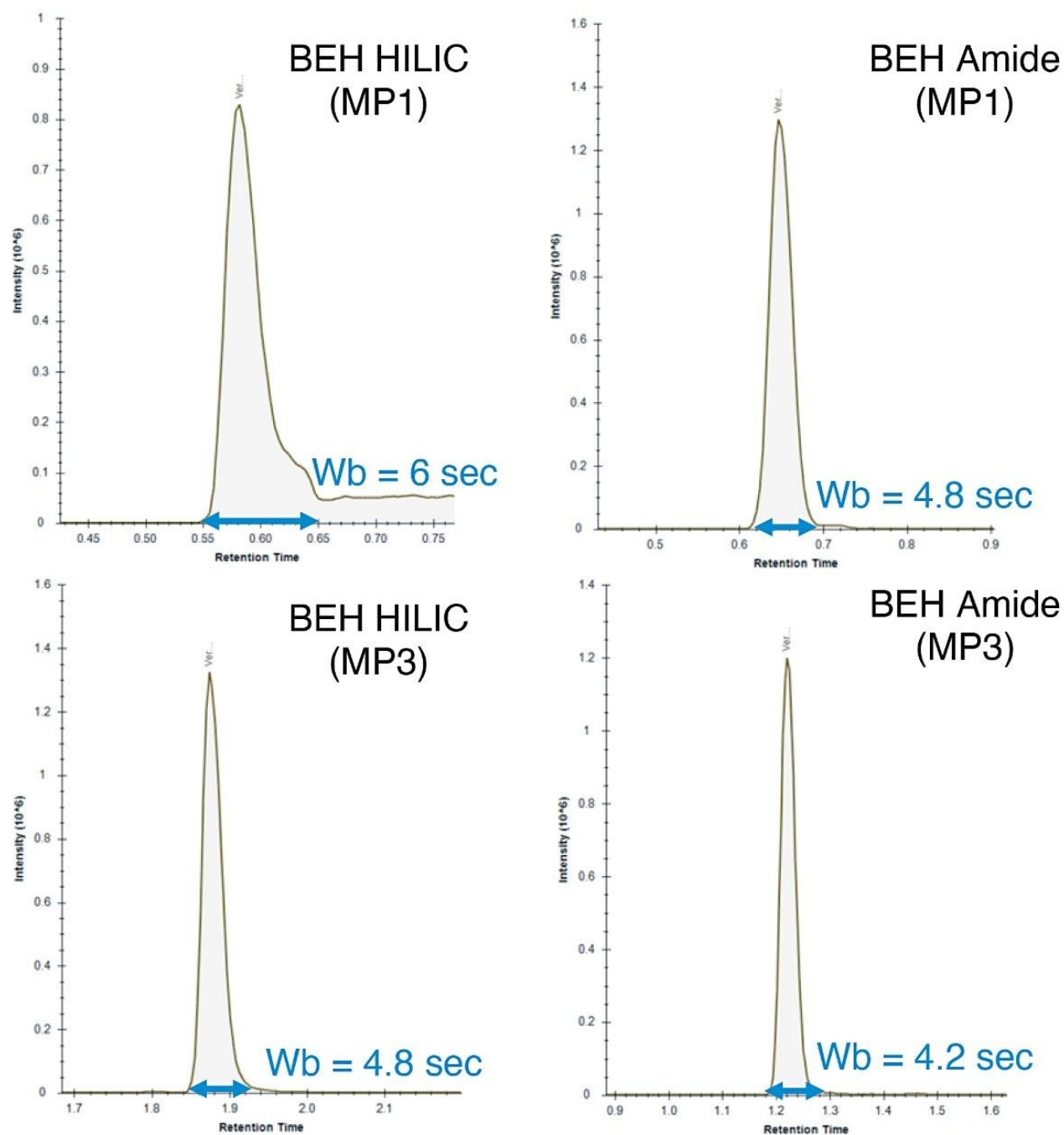


图2.使用流动相1和3时，BEH HILIC和Amide色谱柱分析化合物维拉帕米的基线峰宽(Wb)变化的对比色谱图。

保留因子(K')是色谱柱保留性能和容量的衡量指标。在方法开发和验证过程中，通常将1~10之间的K'值视为可接

受¹。图3显示了在所有四种流动相条件下使用两种色谱柱分离LCMS QC参比化合物得到的平均K'。在评估的大多数流动相条件下，两种色谱柱的平均K'均大于1.5，但BEH Amide色谱柱在所有四种流动相条件下表现出更高的一致性。

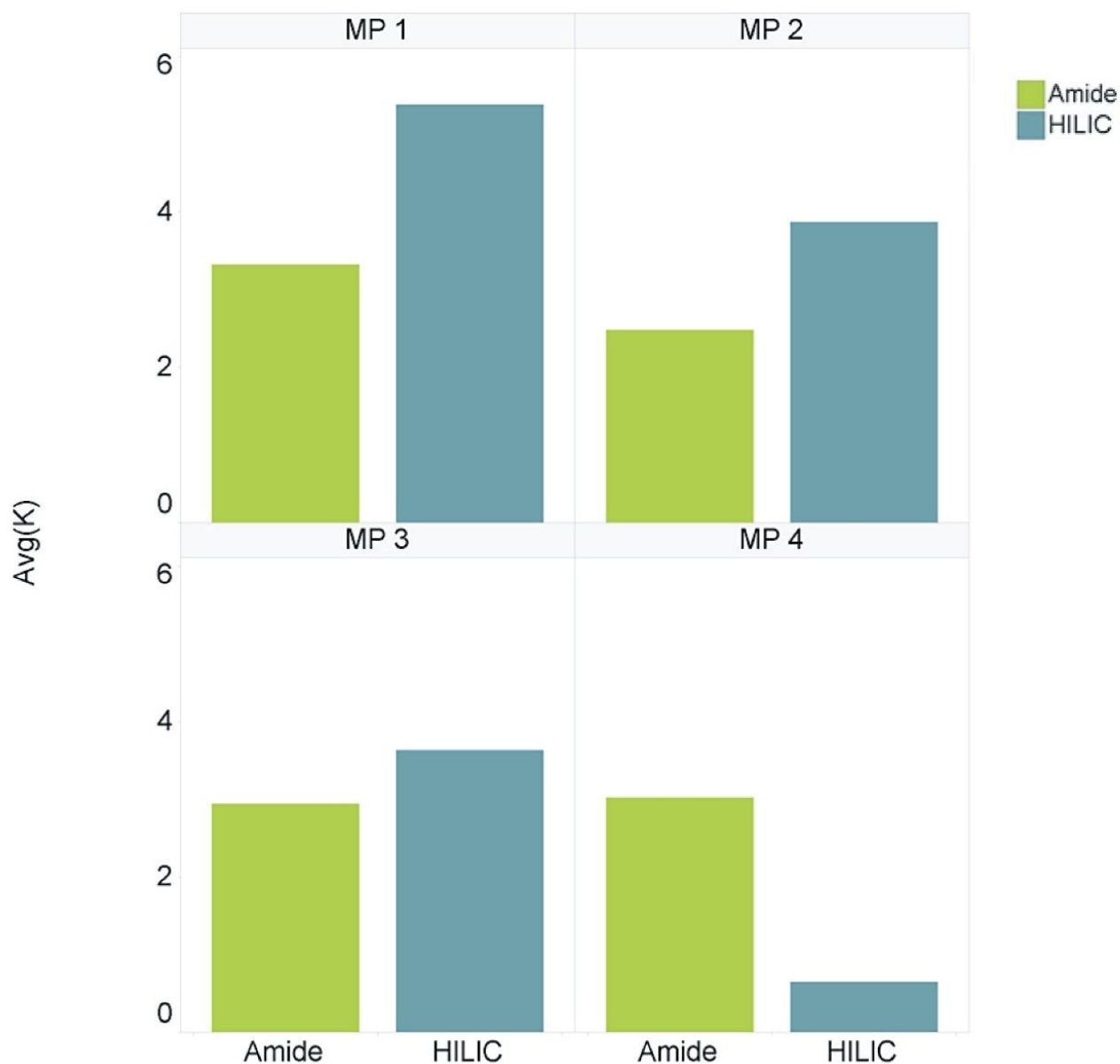


图3.在评估的四种流动相条件下，BEH Amide和HILIC色谱柱分析LCMS QC参比标准品得到的平均保留因子(K')。

由上述观察结果可知，在流动相3（10 mM乙酸铵）条件下，两种色谱柱均获得了最佳色谱性能，得到相似的峰宽和K'（分别如图1和图3所示）。从图4的色谱图中可以看出，BEH Amide色谱柱使LCMS QC参比标准品实现了更好的分离，并为许多极性标准品提供了更出色的保留性能。

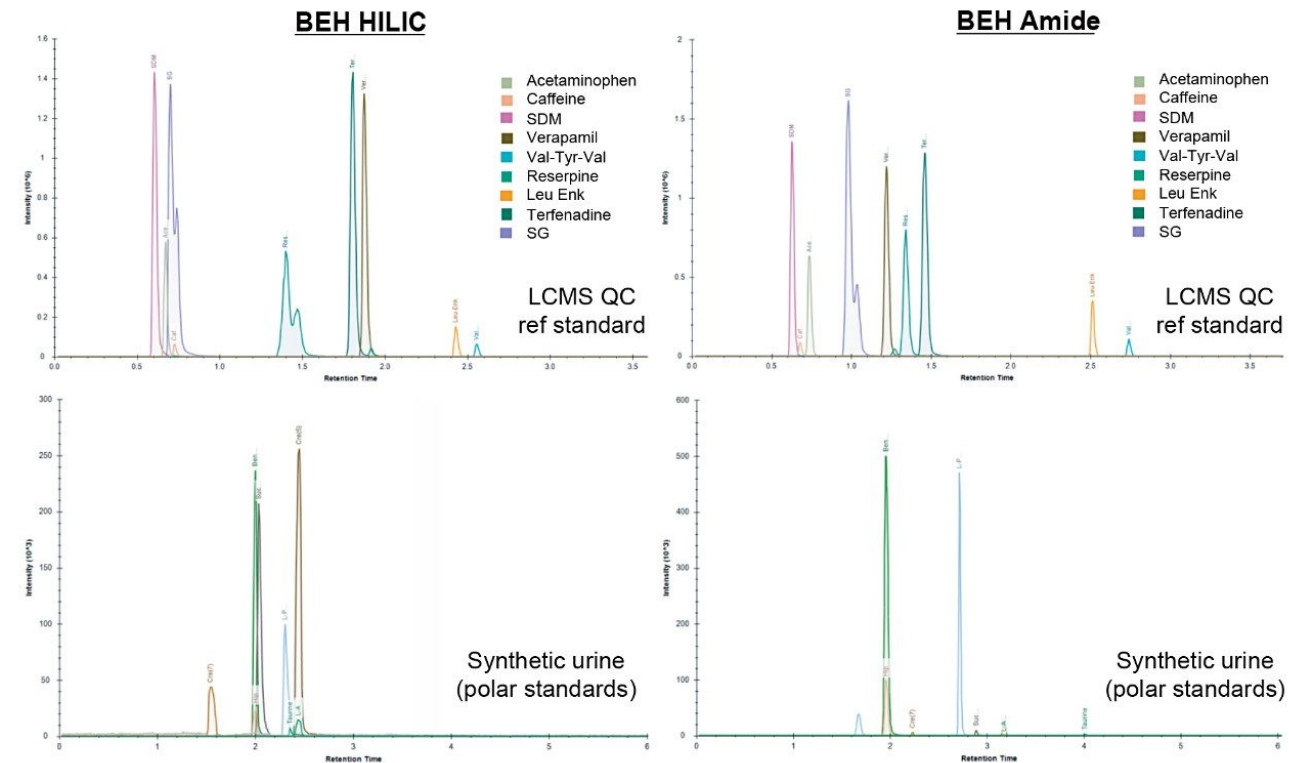


图4.使用10 mM乙酸铵缓冲流动相将LCMS QC参比标准品和合成尿液标准品进样至BEH Amide（右图）和BEH HILIC（左图）色谱柱得到的示例色谱图

根据概述的评估方法，在优化的色谱条件下采集人尿样的200次进样（分析时间34 h），评估BEH Amide色谱柱的重现性。结果证明在整个分析过程中获得了优异的重现性（图5）。

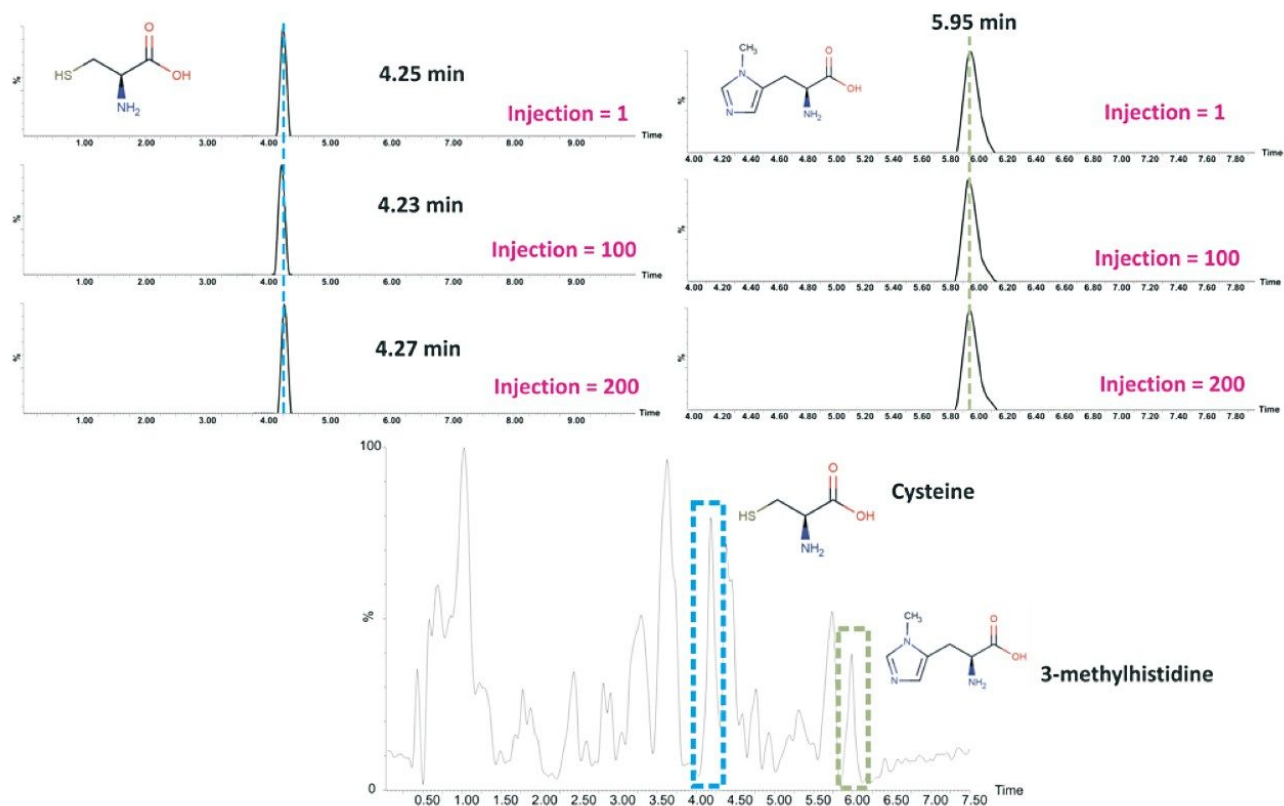


图5.基于BEH Amide色谱柱以及由10 mM甲酸铵组成的缓冲流动相得到的人尿样中已知内源性代谢物的保留时间重现性。在200次连续进样中，半胱氨酸和3-甲基组氨酸的变异系数(CV)分别为2.8%和0.6%。

结论

本研究说明键合固定相色谱柱与未键合的传统HILIC色谱柱相比，在通用代谢物分布研究中具有更大的优势。结果表明，键合色谱柱在分析复杂基质中的极性化合物方面具有更出色的化合物保留性能、峰形和重现性。根据LCMS QC参比标准品的分析结果可以看出，BEH Amide色谱柱具有更高的选择性和峰分离度。

此外，添加缓冲流动相可增强化合物-固定相相互作用，从而得到更清晰的峰形，改善色谱分离结果。评估参比标准品加标人尿样的结果表明，使用HILIC Amide色谱柱和经过优化的方法，在200次进样中表现出优异的重现性。

参考文献

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

特色产品

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

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/135020928>>

720006934ZH, 2020年6月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)