

親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と LC/MS/MS によるコリン代謝物の分析

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.

Yue Song
Agilent Technologies (China)
Co. Ltd.

概要

コリンとその代謝物を Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムと Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムを用いて分析しました。Poroshell 120 HILIC-Z は、Poroshell 120 HILIC-OH5 と比べてピーク形状が良好で、感度もやや高いものの、保持力は弱くなります。異なる移動相添加物の影響を Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いて調べました。移動相に 10 mM の酢酸アンモニウムを加えると最適なピーク形状が得られることがわかりました。

はじめに

コリンとその代謝物、ベタイン、アセチルコリン、グリセロホスホコリンは、低分子量で高極性の4級アミン化合物であり、逆相カラムには保持されません(図1)。このクラスの化合物を保持するには、表面多孔性粒子技術を用いて新たに開発された HILIC ケミストリが最適です。このアプリケーションノートでは、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 ケミストリと Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z ケミストリを用いてコリンとその代謝物を分離します。異なる移動相添加物の影響を Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いて調べました。低濃度成分の検出には、Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いました。

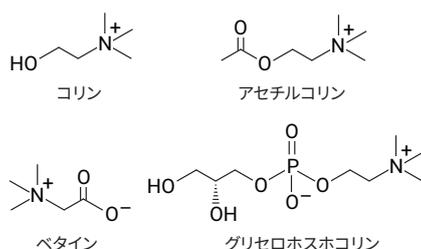


図 1. コリンとその代謝物

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。HPLC グレードのアセトニトリルは J. T. Baker (センターバレー、ペンシルバニア州、米国) から購入しました。水は、ELGA PURELAB Chorus システム (ハイ・ウィカム、英国) を使用して精製しました。ギ酸、酢酸、酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウムは、J&K Scientific (北京、中国) から入手しました。コリン、ベタイン、アセチルコリン、グリセロホスホコリンは、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。標準溶液は、アセトニトリル:水 (90:10) 中で 0.5 nM の濃度になるようにしました。

実験器具と材料

- **カラム入口:** Agilent InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング (p/n 5067-5965)
- **カラム出口:** Agilent InfinityLab クイックターン LC フィッティング (p/n 5067-5966)
- Agilent Captiva エコノフィルタ、PTFE メンブレン、直径 13 mm、ポアサイズ 0.2 μm (p/n 5190-5265)
- バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリュューキャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセパタム (p/n 5190-7024)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)

- Agilent A-Line セーフティキャップ、GL45、3 ポート、1 ベントバルブ (p/n 5043-1219)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- 超音波洗浄器 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II MCT (G7116B)
- Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (G6460A)
- Agilent MassHunter LC/MS データ取り込みソフトウェア、バージョン B.08.00

ソフトウェア

Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン B.07.00

HPLC	
カラム	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-924) InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-601)
移動相 A	水 + 酸または緩衝液 (図 2 参照)
移動相 B	アセトニトリル
グラジエント	0 から 5 分、10 ~ 50 %A、 5 から 6 分、50 ~ 60 %A、 6 から 8 分、60 %A、 停止: 8 分
流量	0.30 mL/min
カラム温度	30 °C
注入量	1 μL
MS	
イオンモード	ESI/Jet Stream ESI、ポジティブ
ドライガス温度	250 °C
ドライガス流量	5 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧 (+)	3,500 V
ノズル電圧 (+)	0 V
MRM	ΔEMV, 500 V

結果と考察

図 2 に示すように、異なる移動相添加物を分析しました。移動相の pH が上がるにつれ、アセチルコリンとコリンは Poroshell 120 HILIC-Z カラムにより強く保持されますが、シグナルはわずかに減少しました。中性または塩基性移動相を使用すると、保持力は変化しませんでした。しかし、中性領域の移動相では、

塩基性条件よりアセチルコリンとベタインのシグナルが高くなります。したがって、10 mM 酢酸アンモニウムを移動相に添加すると、4 つすべての化合物について最適な分離が得られます。

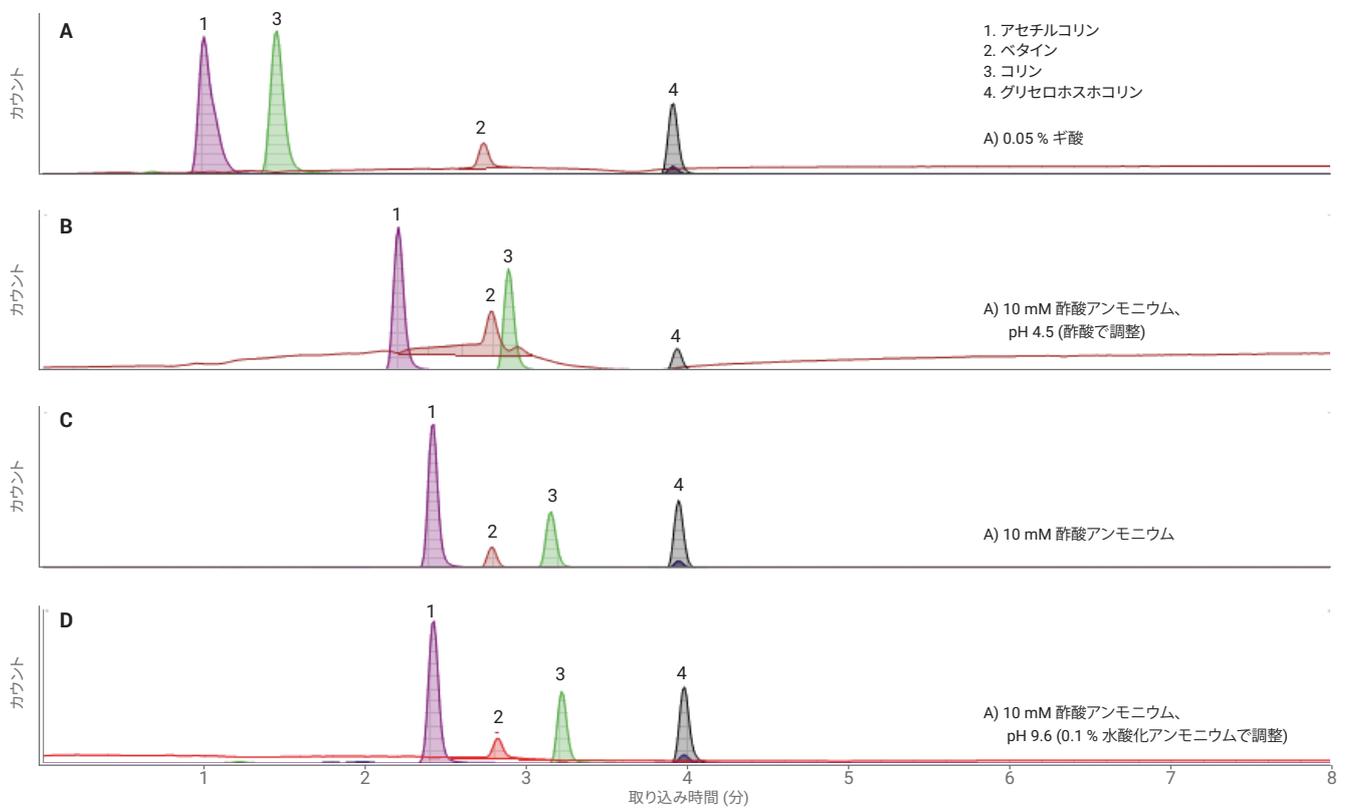


図 2. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムと LC/MS/MS による移動相添加物の影響

中性条件で同じ移動相を用いて2本のHILICカラムでの分離を比較しました(図3)。Poroshell 120 HILIC-OH5カラムを用いると、すべての化合物の保持力が強くなり、ピーク順序が変わり、さらにベタインの感度が高くなるが示されました。一方、Poroshell 120 HILIC-Zカラムを用いた場合、分析対象物として重要なアセチルコリンとコリンのピーク形状が良好でした。

結論

コリンとその代謝物は、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Zカラムを用いて酢酸アンモニウムを添加した中性領域の移動相において良好な分離が得られました。別のHILICケミストリとして、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5カラムでも分離を評価しました。ベタインの感度はHILIC-OH5カラムで向上しますが、アセチルコリンとコリンのピーク形状と感度はHILIC-Zカラムの方が優れています。

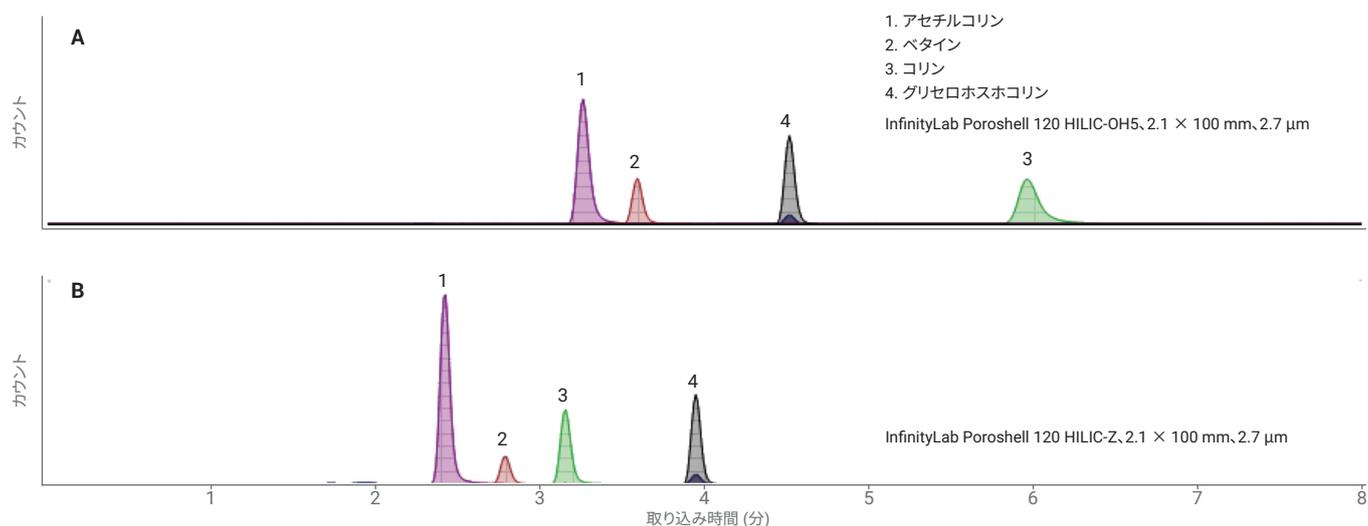


図3. 移動相 A に 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液を添加したときの InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムと InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムの比較

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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, June 1, 2018

5991-9491JAJP