

水溶性ビタミンおよびその代謝物の分析

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) と
LC/MS/MS による性能の向上

著者

Rongjie Fu and Yue Song
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.

概要

LC/MS/MS と Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いて、水溶性ビタミンおよびその代謝物を分析しました。まず、移動相の添加剤と pH の影響を検討しました。良好なピーク形状と検出感度が得られたのは、pH 中性で移動相のアセトニトリルに 10 mM 酢酸アンモニウムを添加した条件でした。さらに、リン酸化合物における性能向上は、PEEK ライナ付きカラムハードウェアと InfinityLab 不活性化添加剤を用いることによって達成できました。

はじめに

水溶性ビタミンおよびその代謝物の包括的な分析に対する要求が高まっています。これらの成分は、逆相カラムでは十分に保持されない高極性な低分子化合物です。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た InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムが最適です。このアプリケーションノートでは、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いて 24 種類のビタミンとその代謝物を分析しました。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。さらに、PEEK ライナ付きハードウェアと InfinityLab 不活性化添加剤、すなわち活性金属面との相互作用を低減する移動相添加剤を組み合わせた場合の影響についても調べました。これらの影響を、標準的なリン酸洗浄プロトコルと不活性化手法を使用していない従来のクロマトグラフィーと比較しました。

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) から購入しました。ビタミンおよび代謝物標準 (表 1) はすべて Anpel (上海、中国) から購入しました。表 1 に示した溶媒を用いて、各化合物の標準原液を調製しました。

各化合物の標準原液を混合し、アセトニトリルで希釈した混合物を測定に使用しました。表 1 にすべての成分の濃度を示します。

試薬およびサンプル

- 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/赤シリコンセブタム (p/n 5190-7024)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)
- Agilent InfinityLab 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、ペンシルバニア州、米国)

表 1. すべての成分の原液

| 化合物名 | 濃度 (mg/mL) | 溶媒 | 混合物中の濃度 (μg/mL) |
|-----------------------|------------|---------------------------------------|-----------------|
| チアミン | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 0.16 |
| チアミンリニン酸 | 1.0 | ACN:水 (1:1) | 3.4 |
| チアミンモノリン酸 | 1.0 | 水 | 3.4 |
| リボフラビン | 0.125 | エタノール:1% NH ₄ OH 水溶液 (9:1) | 0.43 |
| リボフラビンリン酸 | 1.0 | 水 | 3.4 |
| フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) | 1.0 | 水 | 3.4 |
| ニコチン酸アミド | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 0.04 |
| ナイアシン | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 3.4 |
| NAD | 1.0 | ACN:水 (7:3) | 1.7 |
| NADH | 1.0 | ACN:水 (7:3) | 6.9 |
| NADP | 1.4 | ACN:水 (7:3) | 10.8 |
| NADPH | 1.0 | ACN:水 (7:3) | 6.9 |
| D-パントテン酸 | 1.0 | ACN:水 (7:3) | 3.4 |
| ピリドキシン | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 0.04 |
| ピリドキサル | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 0.02 |
| ピリドキサミン | 1.0 | ACN:水 (9:1) | 0.12 |
| ピリドキサル 5'-リン酸 | 1.0 | 水 | 3.4 |
| ビオチン | 0.5 | ACN:水 (1:1) | 1.7 |
| 葉酸 (FA) | 0.5 | ACN:1% NH ₄ OH 水溶液 (1:1) | 1.7 |
| フォリン酸/ホリナート | 0.5 | ACN:水 (1:1) | 1.7 |
| 5-メチルテトラヒドロ葉酸 | 0.5 | ACN:水 (1:1) | 1.7 |
| テトラヒドロ葉酸 (THFA) | 0.5 | ACN:水 (1:1) | 8.6 |
| ジヒドロ葉酸 (DHFA) | 0.5 | ACN:0.1% NH ₄ OH 水溶液 (1:1) | 1.7 |
| シアノコバラミン (VB12) | 0.5 | ACN:水 (1:1) | 5.1 |

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (G6460A)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter LC/MS データ取り込みソフトウェア、バージョン B.08.02
- Agilent MassHunter ワークステーション Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン 10.0

表 2. LC/MS メソッドパラメータ

| HPLC 条件 | |
|----------|--|
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-924) InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, PEEK ライナ付き (p/n 675775-924) |
| 原液 | a) 100 mM ギ酸アンモニウム水溶液、ギ酸により pH を 3.0 に調整済み (酸性) b) 100 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (中性) c) 100 mM 酢酸アンモニウム水溶液、水酸化アンモニウムにより pH を 9.0 (塩基性) に調整済み |
| 移動相 1 | A) 100 mL 原液 a、900 mL の水を追加 B) 100 mL 原液 a、900 mL のアセトニトリルを追加 |
| 移動相 2 | A) 100 mL 原液 b、900 mL の水を追加 B) 100 mL 原液 b、900 mL のアセトニトリルを追加 |
| 移動相 3 | A) 100 mL 原液 c、900 mL の水を追加 B) 100 mL 原液 c、900 mL のアセトニトリルを追加 |
| 移動相 4 | A) 100 mL 原液 c、900 mL の水を追加、1.0 mL の不活性化添加剤を追加 B) 100 mL 原液 c、900 mL のアセトニトリルを追加、1.0 mL の不活性化添加剤を追加 |
| グラジエント | 0 ~ 1 分、100 % B 1 ~ 8 分、100 ~ 50 % B ストップタイム：10 分 |
| 流量 | 0.30 mL/min |
| カラム温度 | 40 °C |
| 注入量 | 0.5 μL |
| MS 条件 | |
| イオンモード | ESI/Jet Stream ESI、ポジティブ/ネガティブ |
| ドライガス温度 | 250 °C |
| ドライガス流量 | 6 L/min |
| ネブライザ圧力 | 35 psi |
| シースガス温度 | 325 °C |
| シースガス流量 | 12 L/min |
| キャピラリー電圧 | ポジティブ ネガティブ 3,500 V 2,500 V |
| ノズル電圧 | ポジティブ ネガティブ 500 V 1,000 V |
| ΔEMV | 0 V |

結果と考察

pH 値が異なる 3 種類の移動相添加剤を調べました。移動相の pH を 3.0 から 7.0 に増大させて、大部分の化合物を InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムに保持し、pH 値が中程度の移動相によって良好な分解能を達成しました。pH 7.0 と pH 9.0 の移動相を比較した場合、大部分の化合物の保持状態の変化は微小でした。一方、pH 値が中程度の移動相は、塩基性の移動相より高い強度を示しました。このため図 1 に示すように、pH 値が中程度の移動相を加えると、すべての化合物で全体的に最高の分離が達成されました。

実験では、ピリドキサル 5'-リン酸、リボフラビンリン酸、チアミンニリン酸、チアミンモノリン酸を含むリン酸化分子はピーク形状が悪化していました。これらの化合物は、ポンプや配管などの金属部品と相互作用するため、高濃度ではピークがテーリングし、低濃度では検出できません (図 2A)。

簡単な解決策は、金属部品の不活性化でした。この不活性化は、低濃度リン酸溶液による洗浄 (0.5 % リン酸、アセトニトリル:水が 90:10 の溶液) を用いて実施しました¹。リン酸はシステムの活性点に強く結合するため、粘着性のある化合物を良好に分析できます。図 2A と 2B に示すように、4 種類のリン酸化分子のピーク形状は、0.5 % リン酸による洗浄後にすべて改善されました。

表 3. マルチブルリアクションモニタリングによってモニターした質量

| 化合物 | プリカーサイオン | プロダクトイオン | フラグメンタ (V) | コリジョンエネルギー (V) | 極性 |
|---------------|----------|----------|------------|----------------|-------|
| ニコチン酸アミド | 123.1 | 80.1 | 100 | 21 | ポジティブ |
| ピリドキサル | 168.1 | 150 | 75 | 9 | ポジティブ |
| ピリドキシン | 170.1 | 152 | 80 | 13 | ポジティブ |
| リボフラビン | 377.2 | 243 | 135 | 25 | ポジティブ |
| ピリドキサミン | 169.1 | 152 | 170 | 25 | ポジティブ |
| ナイアシン | 124 | 80.1 | 110 | 21 | ポジティブ |
| チアミン | 265.1 | 122 | 70 | 13 | ポジティブ |
| ピオチン | 245.1 | 227 | 105 | 13 | ポジティブ |
| D-パントテン酸 | 220.1 | 90.1 | 80 | 13 | ポジティブ |
| D-パントテン酸 | 218.1 | 87.9 | 145 | 9 | ネガティブ |
| VB12 | 678.3 | 147.1 | 165 | 40 | ポジティブ |
| FAD | 786.2 | 348 | 180 | 21 | ポジティブ |
| リボフラビンリン酸 | 457.1 | 439 | 140 | 13 | ポジティブ |
| ピリドキサル 5'-リン酸 | 248 | 150 | 135 | 13 | ポジティブ |
| NADH | 666.1 | 136.4 | 180 | 60 | ポジティブ |
| NAD | 664.1 | 136.3 | 175 | 60 | ポジティブ |
| ホリナート | 474.2 | 327 | 110 | 17 | ポジティブ |
| 5M-TFH | 460.2 | 313 | 120 | 17 | ポジティブ |
| チアミンモノリン酸 | 345.1 | 122 | 85 | 17 | ポジティブ |
| FA | 442.2 | 295 | 95 | 9 | ポジティブ |
| DHFA | 444.2 | 178 | 110 | 9 | ポジティブ |
| チアミンニリン酸 | 425.1 | 122 | 95 | 21 | ポジティブ |
| THFA | 446.2 | 299 | 115 | 17 | ポジティブ |
| NADP | 744 | 136.4 | 180 | 60 | ポジティブ |
| NADPH | 746 | 136.4 | 180 | 60 | ポジティブ |

もう 1 つの解決策は、移動相に InfinityLab 不活性化添加剤 (p/n 5191-3940 または 5191-4506)²⁾を加えることです (1 L 移動相中に 1 mL の不活性化添加剤)。これにより遊離金属をキレートし、サンプル流路内で露出した活性化金属サイトを覆います。この添加剤により、金属成分の相互作用を低減できます。移動相に不活性化添加剤を加える前に、システムを同じリン酸で洗浄します。図 2C の 3 番目のクロマトグラムに示すように、ピーク形状

が引き続き改善されています。これらの化合物のピーク形状を改善するための代替の解決策として、PEEK ライナ付きカラムに不活性化添加剤を加えて使用します。図 2D のクロマトグラムに示すように、いくつかの化合物のピーク形状も改善されました。

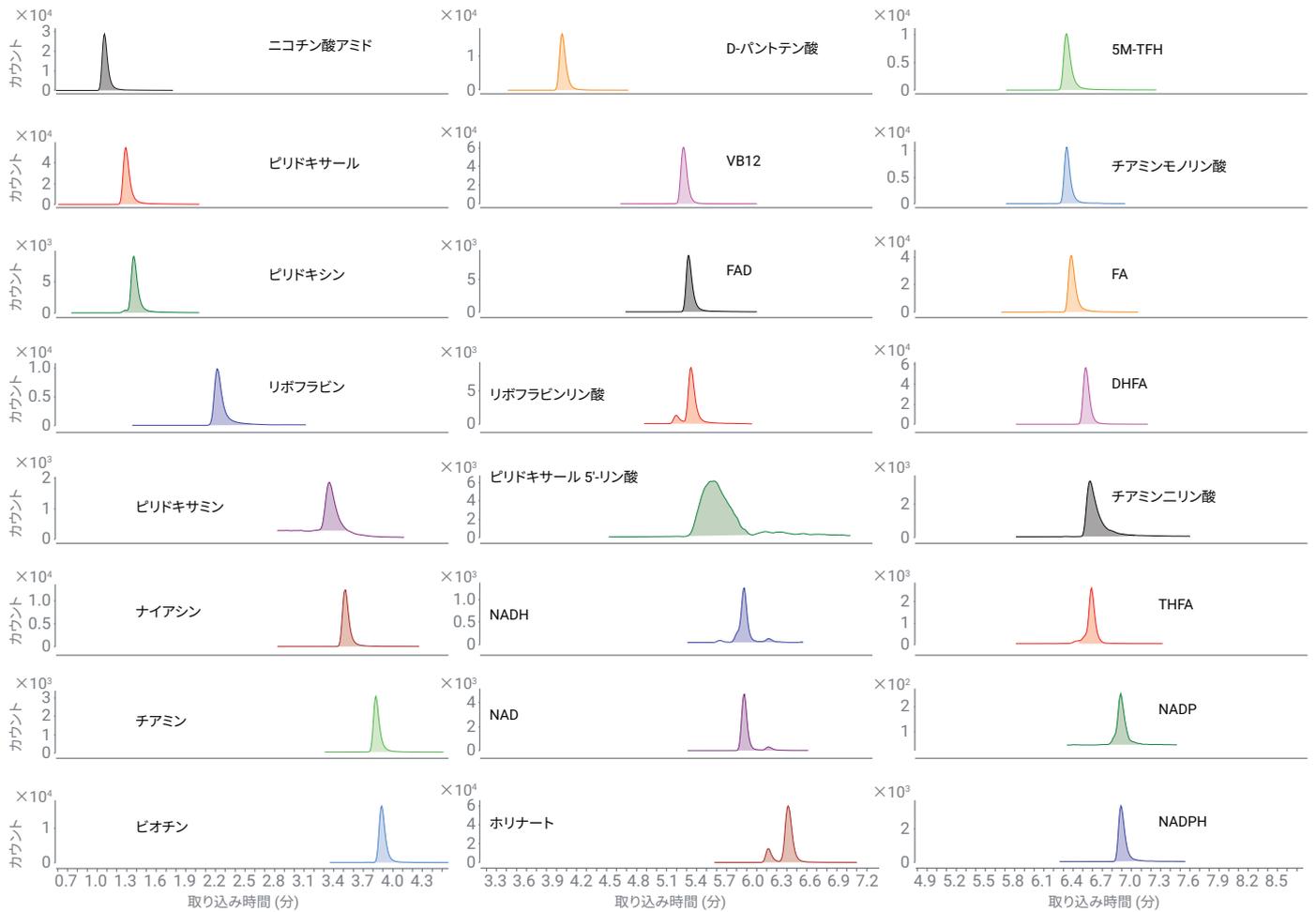


図 1. 各成分の MRM の抽出イオンクロマトグラム

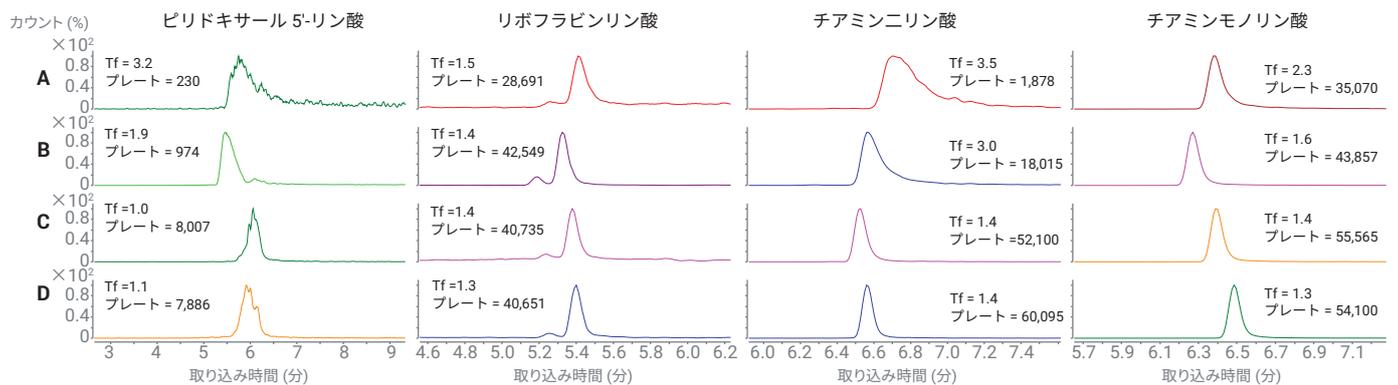


図 2. リン酸化代謝物と金属配管の相互作用の検討。A) システム洗浄前、B) システム洗浄後、HILIC-Z カラム、C) システム洗浄後、HILIC-Z カラム、不活性化剤を追加、D) システム洗浄後、HILIC-Z PEEK ライナ付きカラム、不活性化剤を追加

結論

酢酸アンモニウムを追加した pH 値が中程度の移動相と Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いることにより、これらの水溶性ビタミンおよびその代謝物の分析において全体的に最高の性能を達成しました。さらに、機器を 0.5 % リン酸（アセトニトリル:水が 90:10 の溶液）で洗浄して InfinityLab 不活性化添加剤を加えることにより、いくつかのリン酸化代謝物のピーク形状を大幅に改善することができました。PEEK ライナ付き InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを使用することにより、リン酸化代謝物のピーク形状をさらに改善しました。このアプリケーションノートで説明したメソッドは、水溶性ビタミンおよびその代謝物の分析に最適です。

参考文献

1. Hydrophilic Interaction Chromatography Method Development and Troubleshooting, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-9271EN, **2018**.
2. InfinityLab Deactivator Additive User Guide, *Agilent Technologies*, publication number 5991-9516EN, **2018**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタ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. 2019

Printed in Japan, November 12, 2019

5994-1553JAJP