[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

XBridge BEH Amide XPカラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）によるモノアミン神経伝達物質のLC-MS/MS分析

Jonathan P. Danaceau, Kenneth J. Fountain, and Erin E. Chambers
Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- イオンペア試薬の必要性なしにモノアミン神経伝達物質の保持とベースライン分離を達成
- 低システム背圧での短時間分析によりサンプルスループットを大幅に向上させる柔軟性
- HILICのための系統的分析法開発
- 粒子径2.5µmによる幅広いシステムで使用できる柔軟性

ウォーターズのソリューション

XBridge BEH Amide XPカラム

ACQUITY UPLC® システム

Xevo® TQ-S 質量分析計

キーワード

HILIC、モノアミン、LC-MS/MS、
神経伝達物質、XPカラム

はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は極性化合物分析法の選択肢として急速に普及してきています[1－5]。特に分析の困難な一連の極性分析種としてモノアミン神経伝達物質［Dopamin（DA）、Serotonin（5-HT）、Epinephrine（EP）、Norepinephrine（NE）］があります。これらの化合物は多くの心的状態、動作や、鬱病、不安神経症、統合失調症、パーキンソン病などの神経疾患において重要な役割を果たしています[6-8]。これらの神経伝達物質はまた、乱用薬物の毒性の影響においても重要な役割を果たしています[9-11]。

ここではXBridge™ BEH Amide XPカラムを用いたモノアミン神経伝達物質のHILIC分析アプリケーションについてご紹介します。良好なクロマトグラフィー分析条件の開発は、最適なピーク形状と感度を得るために有機溶媒移動相のイオン強度を系統的に最適化することで行いました。固定相およびカラム温度の選択も重要です。結果として得られた分析条件では、最も極性が高く困難な分析種についても逆相で分析時に必要なイオンペア試薬なしに短時間の分析でベースライン分離を達成しました。

分析条件

Dopamine、Norepinephrine、Epinephrine、Serotonin、N-methyl serotonin（NMS）の混合ストック用スタンダードは酸化を防ぐためにアスコルビン酸0.1%および1N HCl 2.5%を含有したメタノールに溶解して調製しました。100 ng/mL DA、NE、EP、5-HTと10 ng/mL NMSのワーキングスタンダードは初期組成移動相に溶解して用事調製しました。

LC条件：

LCシステム：	ACQUITY UPLC
カラム：	XBridge BEH Amide XP 2.5 µm 2.1×75 mm 製品番号 186006090
カラム温度：	30 ℃
サンプル温度：	5 ℃
移動相A：	95：5　水/アセトニトリル （100 mMギ酸アンモニウム含有） pH 3.0
移動相B：	85：15　アセトニトリル/水 （30 mMギ酸アンモニウム含有） pH 3.0
ニードル洗浄：	強洗浄溶媒および弱洗浄溶媒共に 移動相B

MS条件：

MSシステム：	Xevo TQ-S
イオン化モード：	ESIポジティブ
取込モード：	MRM
キャピラリー電圧：	2.0 kV
コーン電圧：	化合物特定 （表1参照）
脱溶媒ガス：	900 L/hr
コーンガス：	150 L/hr
脱溶媒温度：	350 ℃
ソース温度：	100 ℃

データの取込みおよび解析は MassLynx® ソフトウェア（V4.1; SCN 810）を用いて実施。

初期移動相条件は100%移動相B。2.5分間で移動相Aの比率を30%に上昇し、0.1分間で移動相Bの比率を100%に戻し、1.4分間ホールド。トータルサイクルタイムは4.0分。注入量は20 µL。

分析種	MRMトランジション	コーン電圧	コリジョンエネルギー
NMS	191.1>160	30	15
5-HT	177.0>160	14	8
DA	154>137	18	8
EP	184>166	12	8
NE	152>107	30	14

表1　HILIC条件下でモノアミン神経伝達物質分析に使用したマススペクトルパラメーター

結果および考察

移動相組成の最適化

図1AにXBridge BEH Amide XPカラムで分析したモノアミン神経伝達物質のクロマトグラムを示しました。許容可能なピーク形状と分離度を達成するために、移動相Bのイオン強度と溶解性について注意深くバランスを取る必要がありました。移動相Bへの30 mMギ酸アンモニウムの添加は図1に示すクロマトグラフィー性能を得るために必須で、よりイオン強度の低い（10 mMおよび20 mM）移動相の使用では、おそらく固定相との二次効果により、顕著なピークテーリングと、最も極性の高い分析種であるDA、EP、NE間の分離度悪化が見られました。移動相Bの水系比率を15%まで上昇させることで混和を確実にし、水系比率が低い場合に起こる水とアセトニトリルとの相分離を防ぎます。水系比率の上昇だけでは予測されるように全ての化合物の保持が低減しますが、ピーク形状や近接して溶出するピーク間の分離度の向上は見られません。ピーク形状や分離度の向上は、移動相イオン強度を上昇させることで固定相との二次効果を防ぎ、結果としてクロマトグラフィー性能が向上するという理論と全て一致しています。

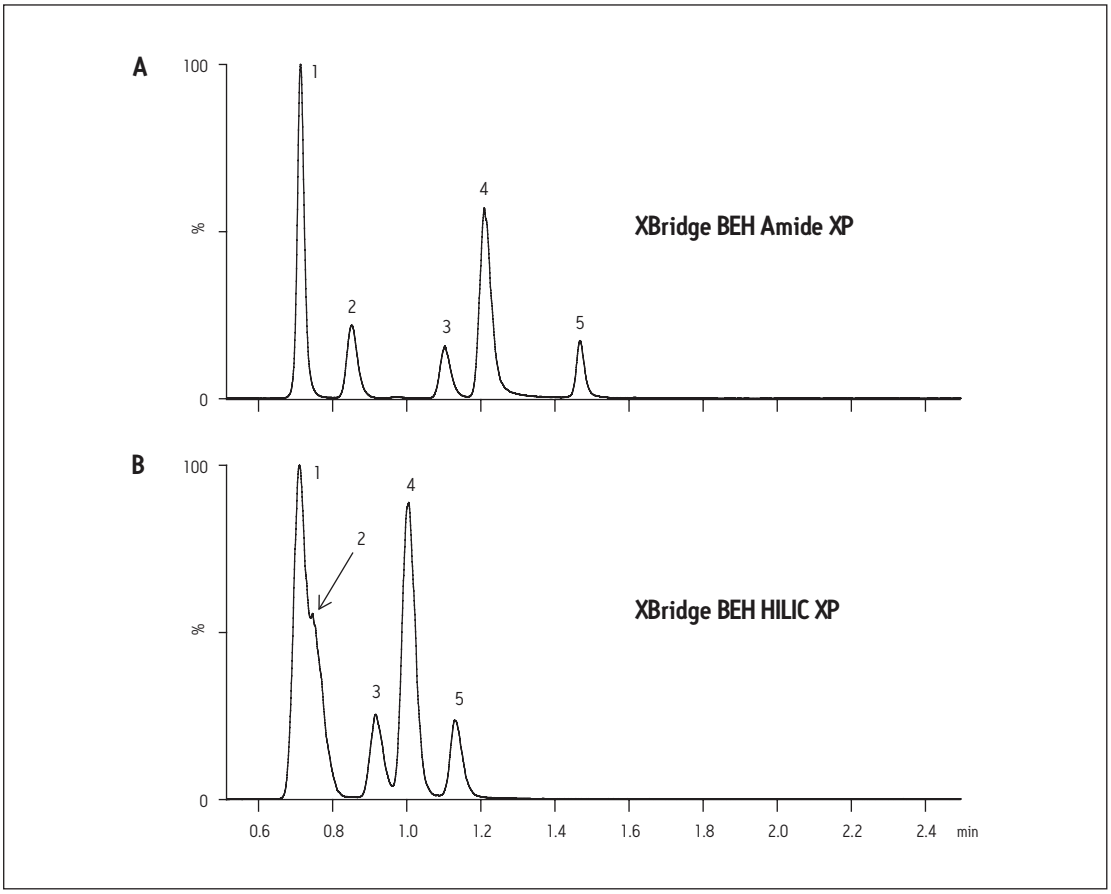

図1　Waters XBridge BEH Amide XP (A) およびXBridge BEH HILIC XP (B) カラムを用いたモノアミン神経伝達物質のクロマトグラム
分析種：1. NMS、2. 5-HT、3. DA、4. EP、5. NE

固定相の選択

先に詳細を記載したXBridge BEH Amide XPカラムの性能を非修飾ハイブリッドパーティクル（XBridge BEH HILIC XP）と比較しました。移動相AおよびBに10mMギ酸アンモニウムを添加した予備試験の結果では、本研究で用いた化合物はXBridge HILICカラムよりもXBrige Amideカラムで良好な分離を示していました。前述の最適化条件を用いた2種類のカラムの比較も予備試験の結果を裏付けしています。図1BにはXBridge BEH HILIC XPカラムでモノアミンスタンダードを分析したクロマトグラムを示しています。明らかに、Amideカラムでほとんど全てのピークの保持が優れ、近接するピークの分離度が向上しています。Amideカラムの卓越した性能はその極性官能基に起因します。酸性条件（pH 3.0）でアミド官能基の極性基は移動相の水系部分とより効果的に相互作用し、HILICクロマトグラフィーに必要な安定した水和層を形成します。

カラム温度のHILICクロマトグラフィーへの影響

HILICクロマトグラフィーはカラム温度に非常に敏感で、温度上昇に伴い保持が低減または増加どちらも起こります[12,13]。図2には図1Aで使用した移動相条件を用いて様々な温度でモノアミンを分析したクロマトグラムを示しました。概して、温度が上昇するとピーク間の分離度は低減しました。40 ℃でDopaminとEpinephrineの分離度が低減し、60℃でベースライン分離が失われました。興味深いことに、カラム温度を20 ℃まで下げるとNMSのピーク形状が著しく悪化します。この図から30℃でスピード、分離、全分析種のピーク形状の最適なバランスが得られることが分かります。

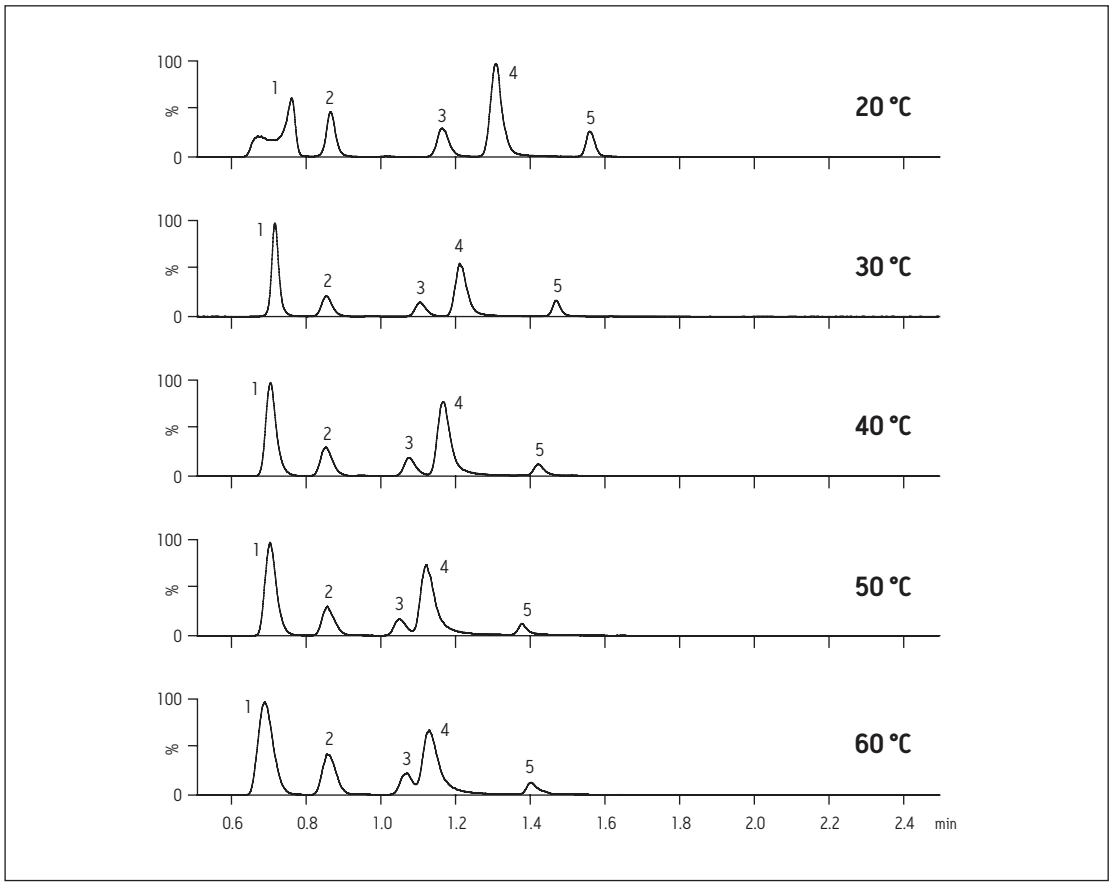

図2　モノアミン分析におけるカラム温度変更の影響　分析種：1. NMS、2. 5-HT、3. DA、4. EP、5. NE

結論

粒子径2.5 μmカラムを用いたモノアミン神経伝達物質のHILICクロマトグラフィーによる分析法の開発について解説しました。有機溶媒移動相のイオン強度最適化がクロマトグラフィー性能の最大化に重要であることを示しましたが、完全な混和を確実にするために移動相の水系比率上昇とのバランスをとる必要があります。XBridge BEH Amide XPカラムの卓越した性能によりHILIC分析法開発時における固定相選択を考慮する重要性を実証し、カラム温度についてもクロマトグラフィー最適化において重要な考慮点であることが示されました。これらの結果から、最も極性の高い化合物（EpinephrineとNorepinephrine）の保持と分離も容易に達成できることが分かります。比較的低背圧のHILIC分析の特性と中程度の長さ（75 mm）のカラムを組み合わせることで、必要に応じて分析法を適応させる十分な柔軟性が可能になります。

参考文献

1. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J: Metabolomic applications of HILIC–LC–MS. *Mass Spectrometry Reviews* 29(5), 671-684 (2010).
2. Jian W, Edom RW, Xu Y, Weng N: Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *Journal of Separation Science* 33(6-7), 681-697 (2010).
3. Xu RN, Rieser MJ, El-Shourbagy TA: Bioanalytical hydrophilic interaction chromatography: recent challenges, solutions and applications. *Bioanalysis* 1(1), 239-253 (2009).
4. Jian W, Xu Y, Edom RW, Weng N: Analysis of polar metabolites by hydrophilic interaction chromatography–MS/MS. *Bioanalysis* 3(8), 899-912 (2011).
5. Hemström P, Irgum K: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29(12), 1784-1821 (2006).
6. Mellon SH, Griffin LD: Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13(1), 35-43 (2002).
7. Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P et al.: Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in Neurobiology* 71(1), 3-29 (2003).
8. Shah AJ, Crespi F, Heidbreder C: Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value. *Journal of Chromatography B* 781(1-2), 151-163 (2002).
9. Hill SL, Thomas SHL: Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clinical Toxicology* 49(8), 705-719 (2011).
10. Schep LJ, Slaughter RJ, Beasley DMG: The clinical toxicology of metamfetamine. *Clinical Toxicology* 48(7), 675-694 (2010).
11. Seger D: Cocaine, metamfetamine, and MDMA abuse: the role and clinical importance of neuroadaptation. *Clinical Toxicology* 48(7), 695-708 (2010).
12. Fountain KJ, Xu J, Diehl DM, Morrison D: Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 33(6-7), 740-751 (2010).
13. Hao Z, Xiao B, Weng N: Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science* 31(9), 1449-1464 (2008).

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters および ACQUITY UPLC、MassLynx、Xevo は Waters Corporation の登録商標です。
XBridge および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年2月 720004389JA PDF