ノート

DNA 付加体の網羅的分析を目指した HILIC 分離条件の検討

岩政 衣美¹, 三木 雄太¹, 井上 嘉則¹, 江坂 幸宏², 村上 博哉^{*1}, 手嶋 紀雄¹

1 緒言

生体内に存在する DNA は、様々な化学物質により 2'-deoxynucleoside (dN) 部位に損傷を受け、その結果 DNA 付加体が生成し、これがガン化の一因になると考えられている^{1)~3)}。生体内の DNA 中に残存する DNA 付加体の定量は、種々の化学物質に対する暴露量のモニタリングや個人の感受性を含めたりリスク評価などにつながることから、種々の DNA 付加体の定量手法の開発が進められている^{4)~7)}。一般的に DNA 中の DNA 付加体の存在量は、修復システムが存在するため、極微量である。それに加えて、検査のために用いられる生体由来の試料量が限定されることから、DNA 量自体が非常に少ない⁵⁾⁸⁾。そのため実分析における DNA 付加体の定量分析法には非常に高い感度が要求される。

DNA 付加体の定量法としては、以前より ³²P を利用するポストラベル法が利用されている⁹⁾¹⁰⁾。この ³²P-ポストラベル法は、非常に高感度な定量法であるが、放射性物質の ³²P を利用するため、測定者が限定され、汎用的な手法であるとは言い難い。さらに構造情報などの入手ができないため、代替となる手法の開発が求められていた。³²P-ポストラベル法の代替法として、液体クロマトグラフ-エレクトロスプレーイオン化-タンデム型質量分析装置 (LC-ESI-MS/MS) が利用されるようになってきている^{3)~5)7)11)}。さらには、これまでの「ある化学物質に由来する数種類の DNA 付加体のみに注目する戦略」から発展し、「様々な DNA 付加体を一斉に定量・評価する DNA adductomics の概念」に基づくアプローチが、近年注目されている¹⁾¹²⁾¹³⁾。DNA 付加体の定量では、上述の通り、DNA 中に残存する DNA 付加体量が非常に少ないため、LC-ESI-MS/MS の高感度化が必要不可欠である。このような DNA 付加体定量手法の感度改善を目的とし、nanoESI を利用した定量手法などの高度な技術を利用した例も報告されている⁵⁾⁸⁾。しかし、高度な技術を用いたルーチン分析は現実的ではない。

よって、汎用的な LC-ESI-MS/MS システムによる DNA 付加体の定量を可能にするために、イオン化効率を含めた測定システムの高感度化が必要である。

一般的に、LC-ESI-MS/MS による DNA 付加体定量法では逆相分離が用いられる。最近著者らは、DNA 付加体定量法の感度改善を目的とし、hydrophilic interaction chromatography (HILIC) の分析条件を最適化することにより、逆相分離を利用した場合と比較して、一桁以上の感度改善を報告している¹⁴⁾。この報告は、acetaldehyde 由来の二種の DNA 付加体に限定したものであるが、HILIC 分離が ESI-MS/MS を用いた DNA 付加体の定量分析での感度改善に広く活用できる手法であることを意味している。そのため、DNA adductomics への HILIC-ESI-MS/MS 手法の適用によって、より高感度に既知・未知の DNA 付加体を定量できることが期待される。

Kanally らの DNA adductomics の報告¹²⁾によると、DNA 付加体は、dN に化学物質が付加したものであることから、逆相分離における DNA 付加体の保持時間は、未損傷体に比べて長く、低極性な DNA 付加体が多く確認されている。そのため一般的に、DNA adductomics には逆相分離が有利であると言える。Acetaldehyde 由来の DNA 付加体の検討においても、逆相分離では未損傷体と acetaldehyde 由来の DNA 付加体を別々の保持時間にて分離が可能である。一方、上述の感度改善が確認できた HILIC 分離では、膨大な干渉成分である各未損傷体の保持時間帯に DNA 付加体が溶出することを確認している¹⁴⁾。そのため、さらなる高感度化を志向し、HILIC-ESI-MS/MS を DNA adductomics に適用するには、HILIC 分離での未損傷体及び DNA 付加体の分離向上が重要な検討課題となる。

近年、様々な修飾官能基を有する HILIC 分離用カラムが使用されている¹⁵⁾¹⁶⁾。HILIC 分離では、固定相に形成される水和層への分配と共に、修飾された官能基に由来する水素結合などの二次効果相互作用などが分離に影響していると考えられている。また、溶離液としては、アセトニトリル水溶液が一般的に用いられるが、アルコール類を用いたり、アセトニトリルと共にアルコール類を少量添加するなどして、分離を変化させる試みが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。特に水素結合性のあるアルコール（メタノール）の添加によ

* E-mail: hmurakami@aitech.ac.jp

¹ 愛知工業大学工学部応用化学科: 470-0392 愛知県豊田市八草町八千草 1247

² 岐阜薬科大学: 501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4

Fig. 1 Structure of four 2'-deoxynucleosides and the acetaldehyde-derived DNA adducts used in this study

り、水和層の形成が妨害されることで分離が変化することが示唆されている。さらに溶離液中の水濃度が少量になってきた場合、微妙な分離の調節が困難となるが、溶出力が低いアルコールを使用することで、その微調整が可能になることも期待できる。

そこで本論文では、DNA adductomics への HILIC-ESI-MS/MS の適用を目指し、四種類の異なる官能基を有する固定相間の分離選択性の違いや、溶離液組成操作による未損傷体及び DNA 付加体の分離挙動の変化について検討した。溶離液組成については、アセトニトリル水溶液を基準として、アルコール類の種類及び濃度の影響を観察した。その結果、溶離液の溶出強度の制御が可能となり、一回の測定に要する時間の短縮と分離の改善を達成した。加えて、メタノール濃度の違いによる溶出挙動の変化についても検討した。

2 実験

2.1 試薬

2'-deoxyguanosine (dG) hydrate, 2'-deoxycytidine (dC), 2'-deoxyadenosine (dA) monohydrate 及び thymidine (dT) は、関東化学から購入した。DNA 付加体のモデル化合物として用いた *N*²-ethyl-dG (EtG) は、シグマアルドリッチから入手し、cyclic-1, *N*²-propano-dG (CPrdG) は、以前に報告されている手法を用いて合成した¹⁹⁾²⁰⁾。トルエンは、和光純薬工業から入手した。溶離液として用いた acetonitrile (CH₃CN) は、シグマアルドリッチ製のものを、methanol (MeOH), ethanol (EtOH) 及び 2-propanol (IPA) は、いずれも関東化学製のものを、溶離液への添加剤として用いた酢酸アンモニウムは、和光純薬工業から購入した。

2.2 HPLC カラム

HPLC カラムとして、aminopropyl 基を有する InertSustain NH2 (3 µm, 150×2.1 mm I. D., ジーエルサイエンス), carbamoyl 基を有する TSKgel® Amide-80 (3 µm, 150×2.0

Fig. 2 Effect of the water concentration on separations of dNs (shown in Fig. 1) using the commercially available four HILIC columns at different mobile phase conditions

Mobile phase: (A) CH₃CN : H₂O = 90 : 10, (B) CH₃CN : H₂O = 95 : 5.

mm I. D., 東ソー), phosphorylcholine 基を有する PC HILIC (3 µm, 150×2.0 mm I. D., 資生堂) 及び sulfobetaine 基を有する SeQuant® ZIC-HILIC (3.5 µm, 150×1.0 mm I. D., メルク) をそれぞれ用いて分析した。

2.3 HPLC 装置

HPLC による分離挙動変化の検討については、PU-2085 pump, UV-2075 plus, DG-2080 degasser, CO-965 column oven (いずれも日本分光製) を用いた。カラム温度は、40 °C, 測定波長は 254 nm とした。流量は、ZIC-HILIC の検討では、0.05 mL min⁻¹ とし、そのほかのカラムでは、0.2 mL min⁻¹ とした。注入量は、ZIC-HILIC の検討では 2.5 µL で、そのほかのカラムでは 10 µL とした。測定試料は、*t*₀ マーカとして用いたトルエン及び DNA 付加体などの各種 dN を 90 % CH₃CN 水溶液に溶解したものとした。溶離液には、添加剤として 1 mmol L⁻¹ となるように酢酸アンモニウムを添加した。

3 結果と考察

3.1 四種類の市販 HILIC カラムによる未損傷体及び DNA 付加体の分離

本研究では、以前の検討¹⁴⁾で良好な分離が確認されている aminopropyl 基 (以下 NH2 column) と carbamoyl 基 (以下 Amide column) 修飾型カラムに加え、両性イオンタイプとして市販されている phosphorylcholine 基を有する PC-HILIC と sulfobetaine 基を有する ZIC-HILIC を用いた。すなわち官能基が異なる四種類のカラムを採用し、Fig. 1 に示す未損傷体と二種類の acetaldehyde 由来の DNA 付加体に関する分離挙動について検討した。溶離液として、ま

Fig. 3 Effects of alcohols on the separations of dNs (shown in Fig. 1) using the commercially available four HILIC columns at different mobile phase conditions

Mobile phase: (A) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$, (B) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 90 : 5 : 5$, (C) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{IPA} = 90 : 5 : 5$.

Fig. 4 Plots of each dN's $\log k$ against the alcohol spices on each column On NH2 column, CPrdG was excluded because peak broadening was observed under each condition. On ZIC-HILIC column, dT was also excluded because a peak split occurred in separation using $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$ as the mobile phase.

ず $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 10$ の組成で検討した。四種類のカラムを用いて分離した時のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。官能基の違いに由来する二次効果相互作用により、溶出順序の変化を期待したが、保持時間の差及びピークの重なり等は確認されたものの、四種類のカラムでの基本的な溶出順序は同一であることが明らかとなった（溶出順序：トルエン (t_0) $\rightarrow$ dT $\rightarrow$ dA $\rightarrow$ CPrdG $\rightarrow$ EtG $\rightarrow$ dC $\rightarrow$ dG。なお ZIC-HILIC のみ dA と CPrdG が同一の保持時間）。また NH2 column では、以前の報告¹⁴⁾と同様に、ほかの三種類のカラムとは異なり、CPrdG のピーク形状がブロードであることが確認された。この理由は、以下のような理由が考

Fig. 5 Effect of the MeOH concentration on the separations of dNs (shown in Fig. 1) using the commercially available four HILIC columns at different mobile phase conditions

Mobile phases: (A) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 7 : 3$, (B) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$, (C) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 3 : 7$.

Fig. 6 Plots of each dN's $\log k$ against the alcohol concentration on each column

On NH2 column, dA was excluded because the peak split occurred in separation using $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 3 : 7$ as the mobile phase. CPrdG was also excluded because peak broadening was observed under each condition. On ZIC-HILIC column, dT was also excluded because a peak split occurred in separation using $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$ as the mobile phase.

えられる。CPrdG は、Fig. 1 に示すように、acetaldehyde の付加に由来する環外の六員環の部分が開環型と閉環したアルデヒド型との平衡状態にあることが知られている²¹⁾。一方で、aminopropyl 基修飾カラムはカルボニル基を有する化合物と吸着を起こしてしまうことも知られている²²⁾²³⁾。そのため、平衡状態にある CPrdG のアルデヒド型が aminopropyl 基との間で吸着を起こし、ブロードなピーク形状になったものと考えられる。以上のことから、aminopropyl 基修飾カラムの利用時には、類似の吸着が起こる

Table 1 Each slope value obtained from plots of each dN's log k against the alcohol concentration on each column

analytes	Amide	NH2	PC-HILIC	ZIC-HILIC
dT	0.041	0.0045	0.0071	— **
dA	0.040	— *	0.017	0.039
CPrdG	0.060	— *	0.034	0.071
EtdG	0.084	0.061	0.068	0.12
dC	0.054	0.045	0.040	0.071
dG	0.080	0.059	0.061	0.14

* On NH2 column, dA was excluded because the peak split occurred in separation using $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 3 : 7$ as the mobile phase. CPrdG was also excluded because peak broadening was observed under each condition.

** On ZIC-HILIC column, dT was excluded because a peak split occurred in separation using $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$ as the mobile phase.

可能性がある。したがって、構造未知のDNA付加体の解析が必要であるDNA adductomics解析を行う上で、aminopropyl基修飾カラムの適用は不適であることが明らかとなった。

次に、溶離液の溶出力の低下による分離改善を期待し、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 95 : 5$ の溶離液組成を用いた時の各カラムにおける溶出挙動について検討した (Fig. 2)。溶離液として $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 10$ の組成を用いた時と比較して、分離の改善が各カラムで確認された。本検討における分離の改善は、溶離力の低下による保持時間の延長によるものであり、多検体試料の測定には長時間を要してしまう点で不適である。さらに、NH2 columnではEtdGとdCの保持時間が重なり、分離が達成されなかった。そこで、分離改善を達成しながら保持時間を短縮することができる分離系の確立を目指して検討を行うことにした。

3.2 異なるアルコール種の添加による溶出挙動変化

3.1では、水組成の変更による溶出挙動変化について検討した。ここでは、溶離液の CH_3CN 濃度は90%に固定しながら、10%の水組成の一部を、MeOH、EtOH及びIPAの各アルコールに変更した溶離液を調製し、それぞれのカラムにおける分離挙動変化について検討した。Fig. 3に、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$ 、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 90 : 5 : 5$ 及び $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{IPA} = 90 : 5 : 5$ のそれぞれの組成の溶離液を用い、各カラムで分離した時のクロマトグラムを示す。溶離液中の水組成の一部を三種類のアルコールに置換することによる分離挙動の大幅な変化は確認されなかった。しかし、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 10$ の条件よりも保持時間の延長が各カラムにおいて確認できた。Fig. 4にアルコールの種類と保持係数 (log k) の関係を示す。MeOH < EtOH < IPAの順で、保持時間の延長が確認された。これ

は各アルコール種の極性低下とも一致しており、主として移動相の極性低下によって水和層への分配が増強したものと考えられる。なおNH2 columnでは、CPrdGのピーク形状がブロードであること、またZIC-HILICでは、dTのピーク形状がスプリットしたものがあったことから、それぞれ評価から外した。また各dNにおけるアルコールの種類の違いに関してFig. 4より比較すると、アルコール種の違いによる各dN分離に対する明確な特異性は確認されなかった。さらに $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 95 : 5$ と比較して、四種類すべてのカラムで保持時間が短縮された。以上の結果より、アルコールの併用により、分離の改善と一回の測定に要する時間の短縮を同時に達成する分離系の確立が期待された。そこでMeOHに注目し、MeOH組成変化による溶出挙動の変化についてさらに検討を行うことにした。

3.3 MeOH添加濃度変化による溶出挙動変化

MeOHの濃度を変更した時の分離挙動の変化をFig. 5に示す。先ほどの $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 5 : 5$ に加え、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 7 : 3$ 及び $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 3 : 7$ の条件下にて分離を行った。各カラムにおいて、MeOH濃度の増加に伴って溶出力が低下し、各dNの分離の向上が確認された。中でもEtdG及びdGの保持時間の増加が、dT、dA、CPrdG及びdCより、相対的により大きく延長した。その結果、Amide columnでは、EtdGの溶出時間の延長により、EtdGとdCのピークが重なった。さらにNH2 columnとPC-HILICでは、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 10$ の組成比における溶出順序がEtdG → dC → dGであったが、 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 90 : 3 : 7$ では、dC → EtdG → dGと、順序が入れ替わることが明らかとなった。

そこで詳細な検討を行うために、MeOH濃度変化に対する各dNの保持係数 (log k) との関係について解析した (Fig. 6)。なおNH2 columnでは、CPrdGのピーク形状がブロードであること、及びdAでは、ピーク形状がスプリットしたものがあったため、評価から外した。またZIC-HILICでは、dTのピーク形状がスプリットしたものがあったことから、こちらも評価から外した。Fig. 6に示すようにMeOH濃度の上昇に伴い、すべてのdNの保持係数が増加した。上述の通り、MeOHの増加に伴うEtdG及びdGの保持係数の変化 (傾き) は、他のdNと比較してより大きくなるが、各カラムにおいて確認された (Table 1)。本研究ではグアニン骨格を有するdG、EtdG及びCPrdGの三つを試料としており、そのうちのdGとEtdGの二種類において挙動の変化が起きている。これら三種類のdG類縁体の構造について考察すると、CPrdGでは、dGとEtdGとは異なり、DNA中などでも水素結合を形成する部分が、マスクされていることが分かる。この構造の違いが保持挙動に影響を与えているものと考えられる。その理由は溶離

液の有機溶媒組成の増加に伴い, 充填剤の官能基などに起因する水素結合等の二次効果相互作用が増強されたことに由来するものであると思われる. その相互作用発現等の詳細な検討は, 今後, 核酸化合物等を含めた類縁構造を有する化合物を用いて行う予定である. 以上の結果より, MeOH 濃度を変更することにより, 分離の最適化が可能であることが明らかとなった.

4 結 言

本研究では, DNA adductomics への HILIC-ESI-MS/MS の適用を目指し, HILIC 分離の改善について検討した. その結果, 充填剤の種々の官能基により, 溶出順序を変更できるほどの特異性は, 確認することはできなかった. また溶離液の組成に関しては, CH₃CN と水の混合系で, 溶出力の高い溶媒である水組成の減少により, 分離は改善できるものの, 保持時間の大幅な延長が各カラムで確認された. そこで, CH₃CN 組成を固定し, アルコール添加による分離挙動の変化を期待し, 検討を行ったところ, 各カラムで, アルコール類の添加による分離能の改善が確認された. 特に MeOH に関して詳細に検討した結果, MeOH 濃度依存的に保持時間の延長が確認されたことに加え, dG 構造に由来する特異的な保持係数変化が観察された. このような水の代替としてアルコールを添加した溶離液の利用は, より高有機溶媒組成下での HILIC 分離に適しているため, ESI-MS の高感度化へ寄与できる可能性もある. これらの結果は, 今後の DNA adductomics を推進するうえで, 有用な知見である.

謝 辞

本研究の一部は, 科学研究費 (若手研究 B: 16K17924, 基盤研究 B: 26288072, 基盤研究 C: 15K05546) の助成を受け, 遂行されたものであり, ここに謝意を表します.

文 献

- 1) S. Balbo, R. J. Turesky, P. W. Villalta : *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 356 (2014).
- 2) E. M. Leung, K. Deng, T. Y. Wong, W. Chan : *Anal.*

- Bioanal. Chem.*, **408**, 953 (2016).
- 3) M. Wang, N. Yu, L. Chen, P. W. Villalta, J. B. Hochalter, S. S. Hecht : *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 319 (2006).
- 4) S. Zhang, P. W. Villalta, M. Wang, S. S. Hecht : *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1386 (2006).
- 5) H. J. C. Chen, W. P. Lin : *Anal. Chem.*, **81**, 9812 (2009).
- 6) D. Sangaraju, M. Goggin, V. Walker, J. Swenberg, N. Tretyakova : *Anal. Chem.*, **84**, 1732 (2012).
- 7) S. Balbo, S. S. Hecht, P. Upadhyaya, P. W. Villalta : *Anal. Chem.*, **86**, 1744 (2014).
- 8) H. J. Chen, W. P. Lin : *Anal. Chem.*, **83**, 8543 (2011).
- 9) G. Talaska, A. Z. S. S. Al-Juburi, F. F. Kadlubar : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5350 (1991).
- 10) C. A. Bieler, M. Stiborova, M. Wiessler, J. P. Cosyns, C. van Ypersele de Strihou, H. H. Schmeiser : *Carcinogenesis*, **18**, 1063 (1997).
- 11) N. Tretyakova, M. Goggin, D. Sangaraju, G. Janis : *Chem. Res. Toxicol.*, **25**, 2007 (2012).
- 12) R. A. Kanaly, T. Hanaoka, H. Sugimura, H. Toda, S. Matsui, T. Matsuda : *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 993 (2006).
- 13) R. A. Kanaly, S. Matsui, T. Hanaoka, T. Matsuda : *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **625**, 83 (2007).
- 14) H. Murakami, R. Horiba, T. Iwata, Y. Miki, B. Uno, T. Sakai, K. Kaneko, Y. Ishihama, N. Teshima, Y. Esaka : *Talanta*, **177**, 12 (2018).
- 15) D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez : *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **47**, 111 (2013).
- 16) B. Buszewski, S. Noga : *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 231 (2012).
- 17) E. S. Grumbach, D. M. Diehl, U. D. Neue : *J. Sep. Sci.*, **31**, 1511 (2008).
- 18) M. Liu, J. Ostovic, E. X. Chen, N. Cauchon : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2362 (2009).
- 19) F. L. Chung, S. S. Hecht : *Cancer Res.*, **43**, 1230 (1983).
- 20) M. Sako, I. Yaekura : *Tetrahedron*, **58**, 8413 (2002).
- 21) C. C. Garcia, F. P. Freitas, A. B. Sanchez, P. Di Mascio, M. H. Medeiros : *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 1602 (2013).
- 22) T. Ikegami, N. Tanaka : *Chromatography*, **29**, 1 (2008).
- 23) 上茶谷若, 井上嘉則, 斎藤 満, 山本 敦 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61**, 613 (2012).

Study on HILIC Separation Conditions for DNA Adductomics

Emi IWAMASA¹, Yuta MIKI¹, Yoshinori INOUE¹, Yukihiro ESAKA², Hiroya MURAKAMI^{*1} and Norio TESHIMA¹

^{*} E-mail : hmurakami@aitech.ac.jp

¹ Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247 Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0392

² Gifu Pharmaceutical University, Daigaku-nishi, Gifu-shi, Gifu 501-1196

(Received April 5, 2018; Accepted May 15, 2018)

The concept of comprehensive DNA adducts analysis (called DNA adductomics) has recently been attracting attention, and the development of a highly sensitive and accurate quantitative method for DNA adductomics has been desired. In our previous research on LC-ESI-MS/MS, hydrophilic interaction chromatography (HILIC) was found to be effective for improving the sensitivity concerning the quantitation of DNA adducts. Although HILIC-ESI-MS/MS is useful for the quantitation of DNA adducts, the improvement of HILIC separation for DNA adductomics must be still needed. In this paper, we describe the improvement of HILIC separations for DNA adductomics by investigating the composition of mobile phases and the commercially available HILIC columns with four difference polar groups. While the elution order for four 2'-deoxynucleosides and the two DNA adducts was not drastically changed by varying the HILIC columns, the separation of each dN and DNA adducts was improved by adding alcohols and by varying the alcoholic concentration.

Keywords: hydrophilic interaction chromatography; DNA adduct; DNA adductomics; alcohol.