

# Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 LC カラムを用いた HPLC と ELSD による 胆汁酸分析

## 著者

Rongjie Fu  
Agilent Technologies  
(Shanghai) Co. Ltd.

Jeffrey Lei  
Agilent Technologies (China)  
Co. Ltd.

## 概要

抱合胆汁酸と非抱合胆汁酸の両方を、粒子サイズ 2.7 および 4  $\mu\text{m}$  の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いて HPLC で分析しました。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6  $\times$  250 mm、4  $\mu\text{m}$  カラムをグラジエントメソッドで使用することにより、すべての胆汁酸を 32 分以内に分離できました。また、このメソッドを InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6  $\times$  100、2.7  $\mu\text{m}$  カラムに移管したところ、13 分以内での迅速な分離が実現しました。

## はじめに

このアプリケーションノートでは、表 1 に示す 14 種類の胆汁酸とコレステロールを、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 250 mm、4 μm カラムを用いて HPLC で分離しました。短時間での分離を実現するために、メソッドをより短い InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムに移管しました。非抱合胆汁酸には特徴的な発色団がないことから、十分な感度を得るために ELSD を使用しました。

## 実験方法

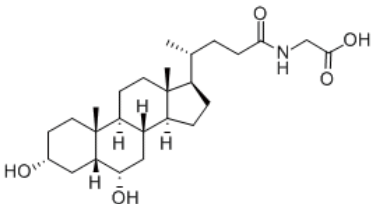
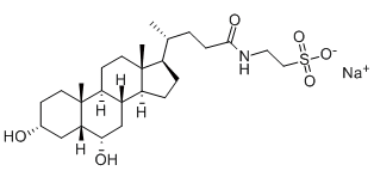
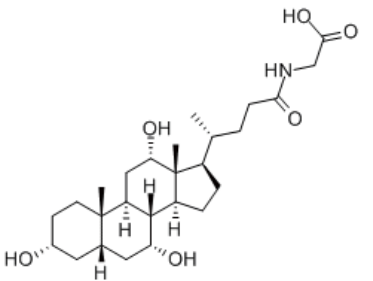
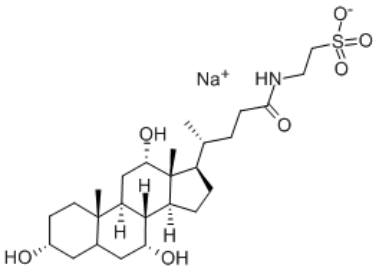
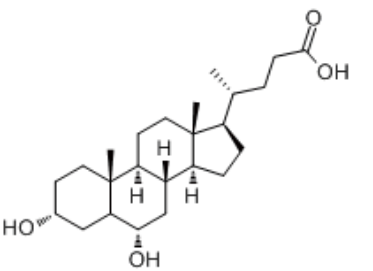
### 試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。HPLC グレードのメタノールとアセトニトリルは 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。酢酸アンモニウムは、J&K Scientific 社 (北京、中国) から入手しました。標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。標準原液はすべてメタノール中で濃度が 1 mg/mL になるように調製しました。標準混合物溶液は、すべての標準溶液の濃度が約 70 μg/mL になるように混合しました。

### 消耗品と器具

- **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 圧着スクリュキャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセブタム (p/n 5190-7024)

表 1. このアプリケーションノートで分離した化合物

No.	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 番号	構造
1	グリコヒデオキシコール酸	449.63	13042-33-6	
2	タウロヒヨデオキシコール酸ナトリウム	521.69	110026-03-4	
3	グリココール酸	465.62	475-31-0	
4	タウロコール酸ナトリウム	537.68	145-42-6	
5	ヒデオキシコール酸	392.57	83-49-8	

- 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 マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ELSD (G7102A)
- Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07

表 1. このアプリケーションノートで分離した化合物 (続き)

No.	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 番号	構造
6	コール酸	408.57	81-25-4	
7	グリコケノデオキシコール酸 ナトリウム	471.61	16564-43-5	
8	タウロケノデオキシコール酸 ナトリウム	521.69	6009-98-9	
9	グリコデオキシコール酸	449.63	360-65-6	
10	タウロデオキシコール酸 ナトリウム	521.69	1180-95-6	
11	ケノデオキシコール酸	392.57	474-25-9	

表 1. このアプリケーションノートで分離した化合物 (続き)

No.	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 番号	構造
12	デオキシコール酸	392.57	83-44-3	
13	リトコール酸	376.57	434-13-9	
14	リトコール酸メチルエステル	390.6	1249-75-8	
15	コレステロール	386.65	57-88-5	

HPLC 条件		
カラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-902)	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 4.6 × 250 mm、4 μm (p/n 690970-902)
移動相 A	20 mM 酢酸アンモニウム水溶液	
移動相 B	アセトニトリル: メタノール (60:40)	
グラジエント	0 から 2 分、40 %B、 2 から 8 分、40 ~ 60 %B、 8 から 10 分、100 %B、 ストップタイム: 15 分	0 から 5 分、40 %B、 5 から 20 分、40 ~ 60 %B、 20 から 25 分、100 %B、 ストップタイム: 37 分
流量	1.50 mL/分	
カラム温度	60 °C	
注入量	4 μL	10 μL
ELSD		
エバポレータ温度	80 °C	
ネプライザ温度	30 °C	
ガス流量	1.60 SLM	

## 結果と考察

図 1 の上段のクロマトグラムは、InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 250 mm、4 μm カラムを用いた場合の 15 種類の化合物の分離を示しています。分析は 32 分で完了し、すべての化合物でベースライン分離を達成しました。このメソッドを、より小さい 2.7 μm の粒子サイズで、長さがより短いカラムに移管しました。分析時間はわずか 12.5 分に短縮され、

この場合もすべての化合物について優れた分離能を示しました。4 μm 表面多孔質粒子は、従来の 5 μm 全多孔質粒子よりも効率が 2 倍向上しました。2.7 μm 表面多孔質粒子では、2 μm 未満の粒子に匹敵する UHPLC 性能を得られましたが、背圧はそれほど高くなりません。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムの 2 μm フリットは、2 μm 未満の UHPLC カラムで一般的に使用される 0.5 μm フリットと比べて、詰まりにくくなります。その

ため、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムは、汚れたサンプルに強いカラムです。胆汁酸分析の実際のサンプルは常に、胆汁、血清、尿のサンプルといった生体サンプルです。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムはこのようなサンプルに最適です。

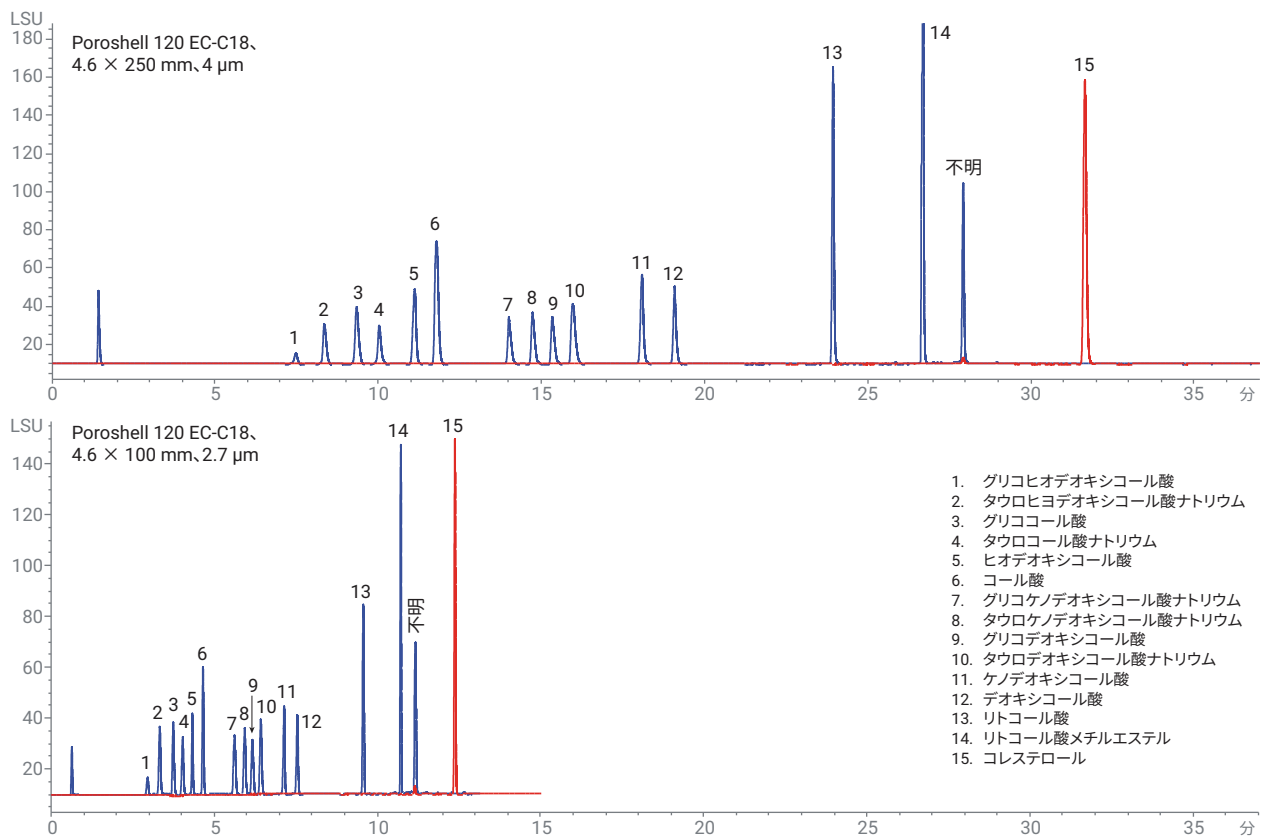


図 1. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 250 mm、4 μm カラムと InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm カラムによる胆汁酸の分離のクロマトグラム

分離能を高めるために、移動相組成やカラム温度などの HPLC パラメータを調整しました。この分離では、カラム温度が分離能にとって極めて重要でした。図 2 に、異なるカラム温度での分離を示します。温度が上昇すると、ピーク 3、4、5 の溶出順序が変化し、分離能が向上しました。

## 結論

粒子サイズ 4 および 2.7  $\mu\text{m}$  のカラムは、すべての胆汁酸について良好な分離能を提供しました。より小さい粒子サイズで長さがより短いカラムによって、迅速な分離が可能になり、分析時間と溶媒消費を大幅に節減できました。胆汁酸分析には、HPLC と ELSD を組み合わせて最適化したメソッドが適しています。

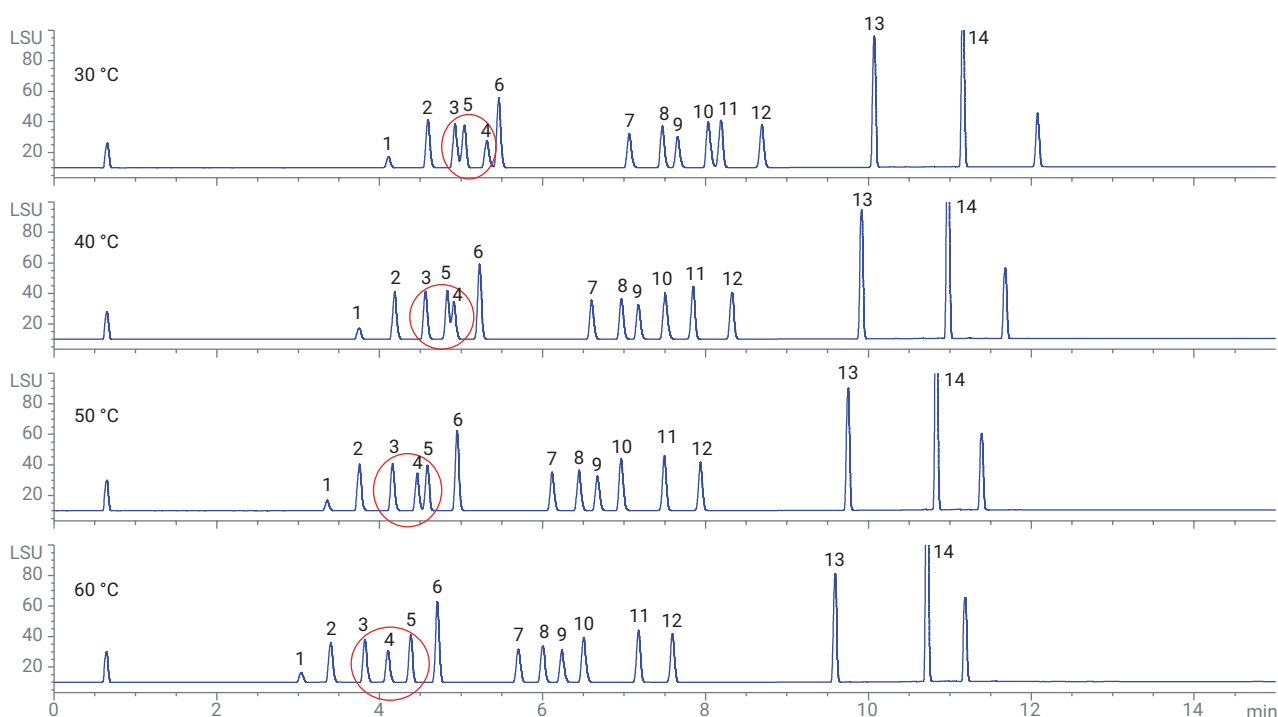


図 2. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 100 mm、2.7  $\mu\text{m}$  カラムを使用した異なるカラム温度でのクロマトグラム

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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, March 14, 2019  
5994-0807JAJP