

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 液相色谱柱通过 HPLC 和 ELSD 分析胆汁酸

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

Jeffrey Lei
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱（2.7 μm 和 4 μm 填料粒径）通过 HPLC 分析结合胆酸和游离胆酸。通过梯度法，InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 250 mm, 4 μm 色谱柱在 32 分钟内实现了所有胆汁酸的分离。将该方法转移至 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 100, 2.7 μm 色谱柱，实现了快速分离，分析时间在 13 分钟内。

前言

在本应用简报中，采用配备 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱的 HPLC 分离表 1 中列出的 14 种胆汁酸和胆固醇。为了实现快速分离，将该方法转移至较短的 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱。由于游离胆酸缺少特征发色团，因此采用 ELSD 以获得足够高的灵敏度。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。HPLC 级甲醇和乙腈购自 J. T. Baker (Center Valley, PA, USA)。水经由 ELGA PURELAB Chorus 系统 (High Wycombe, UK) 纯化。乙酸铵购自北京百灵威科技有限公司。标准品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。标准储备液均采用甲醇配制，浓度为 1 mg/mL。将所有单标溶液混合至各自浓度约为 70 μg/mL，制得混标溶液。

仪器与材料

- **色谱柱入口：**Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接液相色谱接头（部件号 5067-5965）
- **色谱柱出口：**Agilent InfinityLab Quick Turn 液相色谱接头（部件号 5067-5966）
- Agilent Captiva 经济型过滤器，PTFE 膜，直径 13 mm，孔径 0.2 μm（部件号 5190-5265）
- 安捷伦样品瓶，螺口盖，棕色，带书写签，经认证，2 mL（部件号 5182-0716）
- 安捷伦固定螺口盖，蓝色，带 PTFE/红色硅胶隔垫（部件号 5190-7024）

表 1. 本应用简报中分离的化合物

编号	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构
1	甘氨酸猪去氧胆酸	449.63	13042-33-6	
2	牛磺酸猪去氧胆酸钠	521.69	110026-03-4	
3	甘氨酸胆酸	465.62	475-31-0	
4	牛磺胆酸钠	537.68	145-42-6	
5	猪去氧胆酸	392.57	83-49-8	
6	胆酸	408.57	81-25-4	

- Agilent InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1000 mL (部件号 9301-6526)
- Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖, GL45, 3 口, 1 个放空阀 (部件号 5043-1219)
- Eppendorf 移液管和重复用移液器
- 超声仪 (VWR, Radnor, PA, USA)

仪器

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ELSD (G7102A)
- Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版

表 1. 本应用简报中分离的化合物 (续)

编号	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构
7	甘氨酸鹅去氧胆酸钠	471.61	16564-43-5	
8	牛磺鹅去氧胆酸钠	521.69	6009-98-9	
9	甘氨酸氧胆酸	449.63	360-65-6	
10	牛磺脱氧胆酸钠	521.69	1180-95-6	
11	鹅去氧胆酸	392.57	474-25-9	

表 1. 本应用简报中分离的化合物 (续)

编号	化合物	分子量 (g/mol)	CAS 号	结构
12	脱氧胆酸	392.57	83-44-3	
13	石胆酸	376.57	434-13-9	
14	石胆酸甲酯	390.6	1249-75-8	
15	胆固醇	386.65	57-88-5	

HPLC 条件		
色谱柱	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-902)	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 250 mm, 4 μm (部件号 690970-902)
流动相 A	20 mmol/L 乙酸铵水溶液	
流动相 B	乙腈:甲醇 (60:40)	
梯度	0-2 分钟, B 为 40% 2-8 分钟, B 由 40% 升至 60% 8-10 分钟, B 为 100% 停止时间: 15 分钟	0-5 分钟, B 为 40% 5-20 分钟, B 由 40% 升至 60% 20-25 分钟, B 为 100% 停止时间: 37 分钟
流速	1.50 mL/min	
柱温	60 °C	
进样量	4 μL	10 μL
ELSD 条件		
蒸发器温度	80 °C	
雾化器温度	30 °C	
气体流速	1.60 SLM	

结果与讨论

图 1 中上方色谱图显示了 InfinityLab Poroshell 120, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱对 15 种化合物的分离结果。在 32 分钟内完成了分析, 实现了完全基线分离。将该方法转移至较短的色谱柱, 该色谱柱具有 2.7 μm 的较小的填料粒径。分析时间缩短至仅 12.5 分钟, 但所有化合物

仍获得了出色的分离度。4 μm 表面多孔填料颗粒的柱效是传统 5 μm 全多孔填料颗粒的两倍。2.7 μm 表面多孔填料颗粒可提供与亚 2 μm 全多孔填料颗粒相媲美的 UHPLC 性能, 但反压相对更低。与亚 2 μm UHPLC 色谱柱常用的 0.5 μm 筛板相比, InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上的 2 μm 筛板更不容易堵塞。

因此, InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对于“脏”样品具有更好的耐受性。进行胆汁酸分析的实际样品一般为生物样品, 例如胆汁、血清和尿液样品。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱非常适合此类样品的分析。

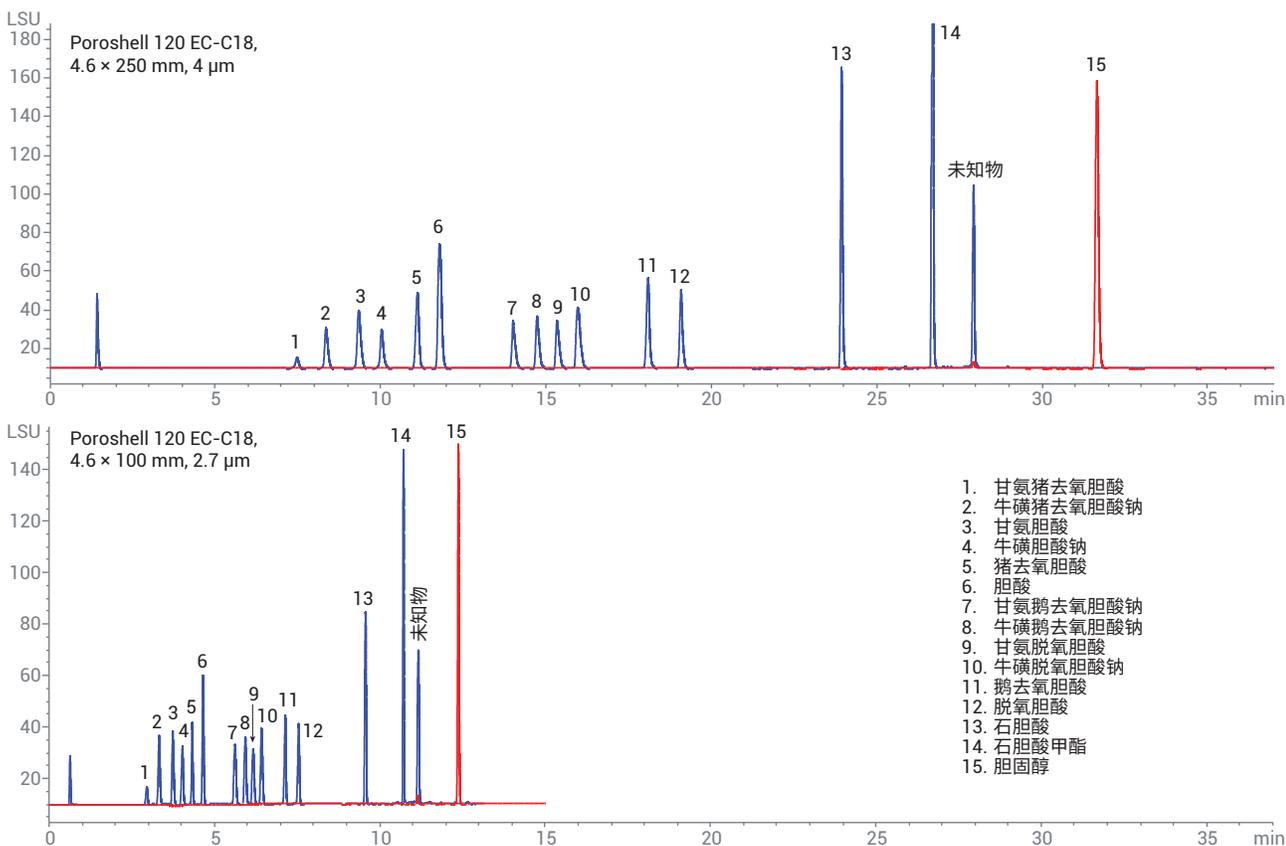


图 1. 使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱和 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的胆汁酸分离色谱图

为了实现更好的分离，调整了 HPLC 参数，包括流动相组成和柱温。在本次分离中，柱温对于分离十分重要。图 2 显示了不同柱温下的分离结果。当温度升高时，峰 3、4 和 5 的洗脱顺序发生改变，且分离度得到改善。

结论

4 μm 和 2.7 μm 填料粒径色谱柱均可实现所有胆汁酸的良好分离。填料粒径较小的短色谱柱实现了快速分离，显著缩短了分析时间并节省了溶剂。HPLC 联用 ELSD 的优化方法适用于胆汁酸分析。

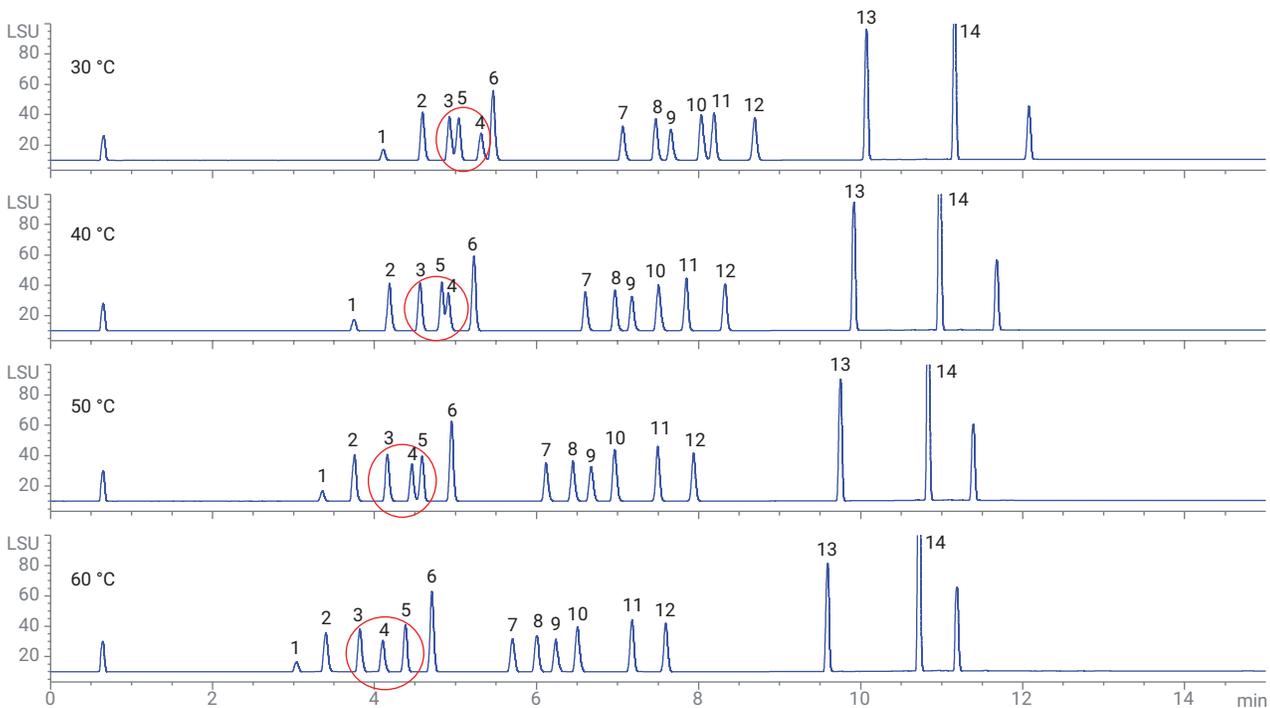


图 2. 使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱在不同柱温下得到的色谱图

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 3 月 14 日，中国出版
5994-0807ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

 **Agilent**
Trusted Answers