

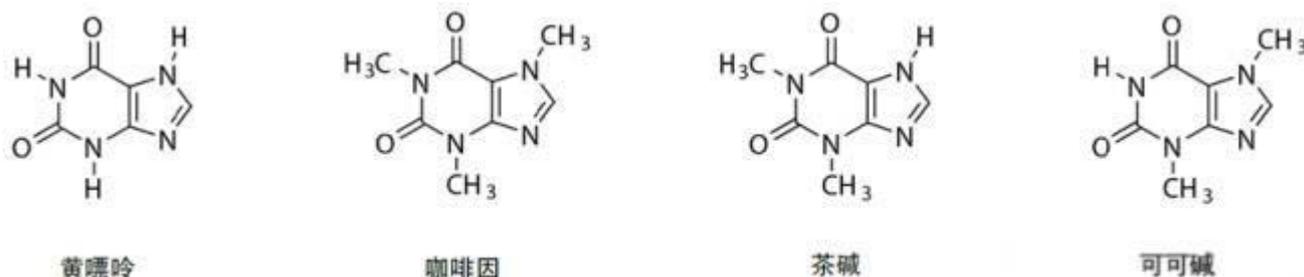
【应用合集】 No.17 | 使用SiliaSep C18反相Flash柱分离咖啡因和其他天然兴奋剂

背景介绍

甲基黄嘌呤中最出名的是具有生理刺激作用的咖啡因。在某种程度上，茶碱和可可碱也是甲基黄嘌呤的其中两种，同样具有刺激作用。其他的烷基化黄嘌呤(无论是天然的还是合成的)科学家们也正在探索其与保健相关的应用。

黄嘌呤是由咪唑和嘧啶环结合而成的弱碱。咖啡因的结构是在1, 3和7位上对其进行甲基化，茶碱是在1, 3位，可可碱则是在3, 7位。相近的化学结构使得这些化合物难以用色谱法分离。四种天然兴奋剂的结构如图1所示。

图1: 混合物中四种兴奋剂的化学结构



使用SiliCycle球形和不规则硅胶的Flash柱对分离的区别

使用反相C18 SiliaSep Flash柱分离这些化合物的混合物。SiliCycle比较了不规则硅胶和球形硅胶在这项分离上的区别。两种填料的规格如表1所示。先使用含有40g填料的柱进行测试，然后转换至120g的柱中进行放大。

表1: Flash柱内不规则和球形填料的规格

不同填料规格比较			
	填料形状	粒径(μm)	孔径(\AA)
SiliaSep PREMIUM	球形	25	90
SiliaSep	不规则	40 - 63	60

当使用球形而非不规则的吸附剂填料时，虽然减小了粒径，但并不影响背压，同时还可提高分辨率、分离效率和上样能力。

样品以液体的形式进行上样。由于分析物在DMSO中的溶解度较差，因此上样量不再更多增加。其他溶剂，如水、乙酸、乙腈、甲醇和DMF，也进行了测试，但也没有任何一种溶剂有足够的溶解度可提高上样量。

醋酸和三氟乙酸都作为酸性试剂被加入流动相进行了测试。最后发现醋酸在pH约为4.5时可以提供的分离效果最好。因此对不同程度酸化的水/甲醇进行了实验，得到40 g和120 g Flash柱的最佳操作条件，如表2所示。

在考虑放大时方案是需要优化的，于是增加了一步梯度洗脱确保了大的Flash柱也能提供和小Flash柱差不多的分离效率。

表2: 色谱条件

色谱条件	
参数	说明
柱类型	#1: SiliaSep PREMIUM Flash 柱(球形硅胶), C18, Monomeric, 25 μm, 90 Å #1: SiliaSep Flash 柱(不规则硅胶), C18, Monomeric, 40 - 63 μm, 60 Å
产品编号	#1: FLH-03295D-A-ISO40 (40 g) FLH-03295D-A-ISO120 (120 g) #2: FLH-R33230B-ISO40 (40 g) FLH-R33230B-ISO120 (120 g)
洗脱梯度	流动相 A: 水/甲醇(95/5) + 0.0125 % 乙酸 流动相 B: 水/甲醇(5/95) + 0.0125 % 乙酸 40 g 的柱子 1. 0 % B (22 CV) 2. 5 % B 至 20 % B (24 CV) 120 g 的柱子 1. 0 % B (17 CV) 2. 5 % B 至 20 % B (12 CV) 3. 20 % B (2 CV)
温度	25°C
流速	50 mL/min (对 40 g 的柱子) 80 mL/min (对120 g 的柱子)
检测	UV 270 nm
上样	溶解在DMSO中的混合物溶液以液体形式上样(0.1%样品上样量)

注: CV = Column Volume 柱体积

图2: 用SiliaSep C18 Flash柱分离黄嘌呤衍生物a) 40 g Flash柱, 不规则(蓝色)和PREMIUM (黑色); b) 120g Flash柱, 不规则(蓝色)和PREMIUM (黑色)的结果

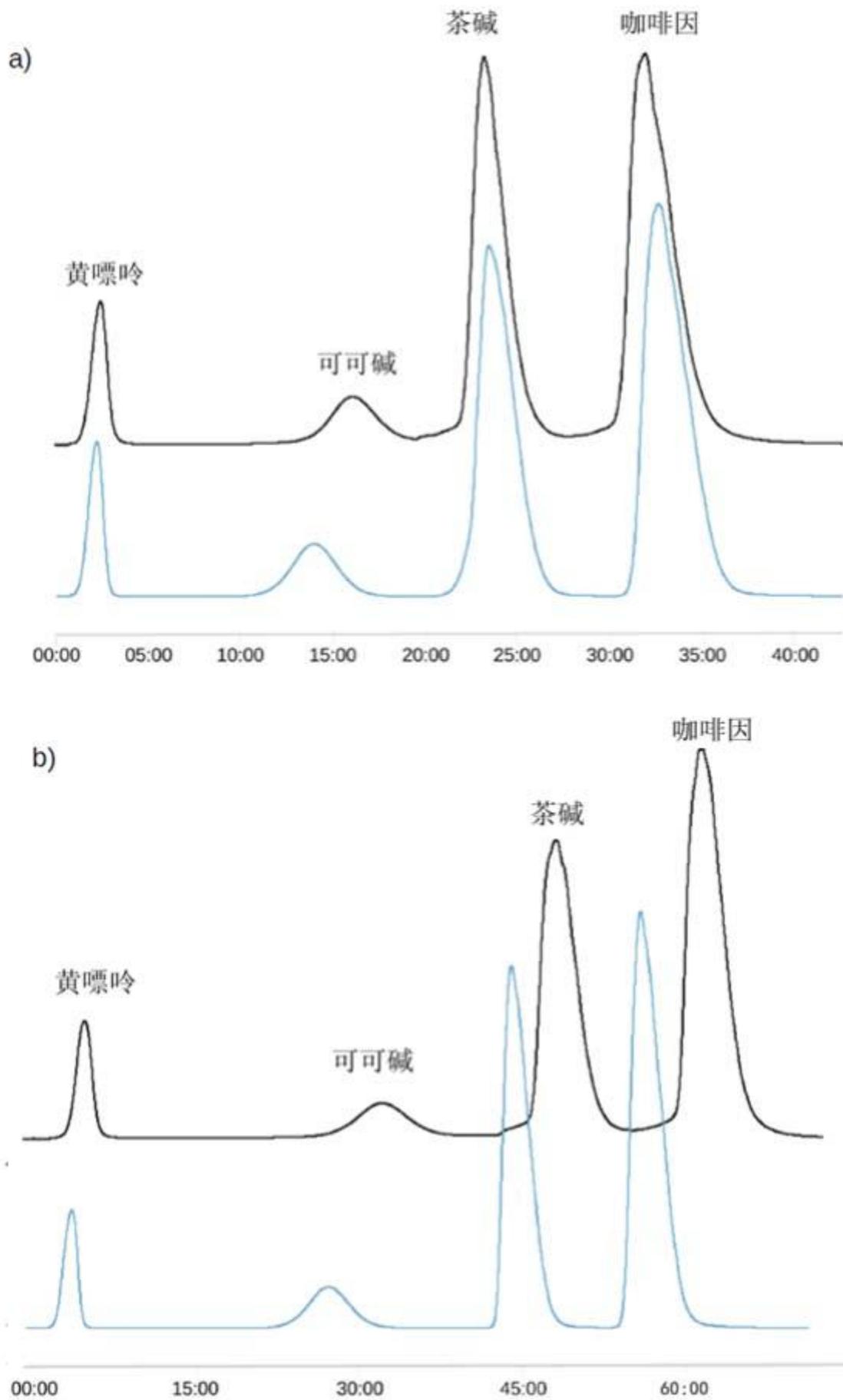


图2给出了40g和120g球形和不规则填料的色谱图。在120g柱子中，使用球形吸附剂停留时间更长，峰间距更长。总的来说，球形和不规则吸附剂都能有效地分离化合物。

比较不同品牌的球形填料Flash的分离效果

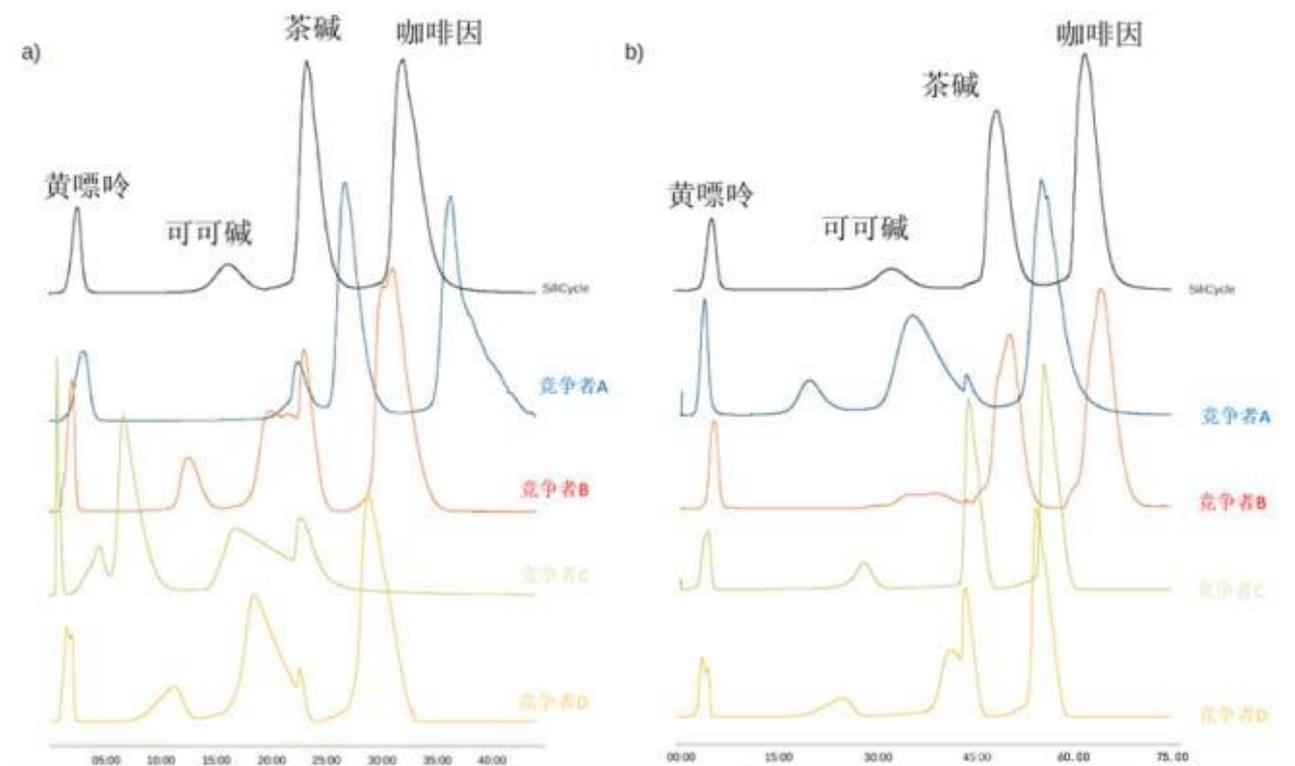
均选择了球形硅胶作为吸附剂，比较了不同厂商的性能。表3列出了所有待测试柱子的吸附剂特性。实验将SiliCycle Flash柱的色谱条件直接在其他厂家的Flash柱上应用，无需进一步优化。

表3: 不同厂家硅胶的比较

不同硅胶的比较		
	粒径 (μm)	孔径 (\AA)
SiliaSep PREMIUM	25	90
竞争者 A	20 - 35	100
竞争者 B	30	100
竞争者 C	30	100
竞争者 D	20 - 40	100

分别测试不同厂家的柱子对化合物的分离效果，所有的峰顺序都为:第一峰是黄嘌呤，第二峰和第三峰分别是可可碱和茶碱，最后的峰是咖啡因。咖啡因是甲基黄嘌呤中极性最小的，在主链上含最多的甲基链，因此它是最后离开色谱柱的。谱图如图3所示，是使用不同制造商的球形Flash柱分离混合物的结果。

图3: 用C18球形Flash柱分离黄嘌呤衍生物结果:a) 40 g柱子; B) 120g柱子



使用40g的柱子时，竞争者B、C和D所用的保留时间更短，峰间距更近，分辨率更低。竞争者B和D还表现出第三峰(即茶碱)的峰形变宽和峰裂，而竞争对手C谱图上第四峰(咖啡因)也出现了这种影响。竞争者A的峰比其他竞争者的峰更陡，但在最后一个峰有明显的拖尾，使得分析时间增加。SiliCycle的SiliaSep PREMIUM在这之中表现了最好的分离，所有峰都最清晰。

需要注意的是，该结果是在SiliCycle的SiliaSep PREMIUM Flash柱上进行优化的，并没有针对每个竞争对手的柱再进行单独优化。使用该色谱条件得到的结果可能与其他色谱条件下不同。因此如果需要更换供应商，不能直接复制色谱条件，不能不考虑重新优化所花的时间。

总结

总结一下，球形C18硅胶可以成功地从茶叶中分离出咖啡因和其他天然存在的黄嘌呤衍生物，他们具有相似化学结构，较难分离。SiliCycle的40g和120g Flash柱均与竞争对手的进行了比较。在SiliCycle柱子上优化的色谱条件被直接运用到其它厂家的柱子上。发现SiliaSep PREMIUM 40 g和120 g的Flash柱均提供了最佳分辨率。