

用高分离快速液相色谱系统进行黄嘌呤类化合物的高通量分离

应用

生化、食品饮料、医药

作者

John W. Henderson and Ronald E. Majors

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808-1610

USA

摘要

黄嘌呤类化合物最好采用 C18 柱进行反相 HPLC 分离。研究发现，缩短柱长、减小粒径将使黄嘌呤类混合物的分离时间从 8 分钟缩短到 1.5 分钟，而分辨率没有明显损失。采用简单的

等梯度 HPLC 方法分析了液体饮料（茶、巧克力饮料和可可饮料）中的可可碱、茶碱和咖啡因。

前言

黄嘌呤类化合物是一类生物碱，常被用作轻度兴奋剂和支气管扩张剂，对哮喘症状有明显疗效。最常见的黄嘌呤类化合物是咖啡因，主要存在于如咖啡豆、茶、柯拉果等食品中，可可豆中也含有少量咖啡因。不可思议的是，由于巧克力中含有可可碱、茶碱和咖啡因（都属于甲基茶碱类），因此，巧克力也是一种弱兴奋剂。这些黄嘌呤类化合物及其代谢物的化学结构见图 1。

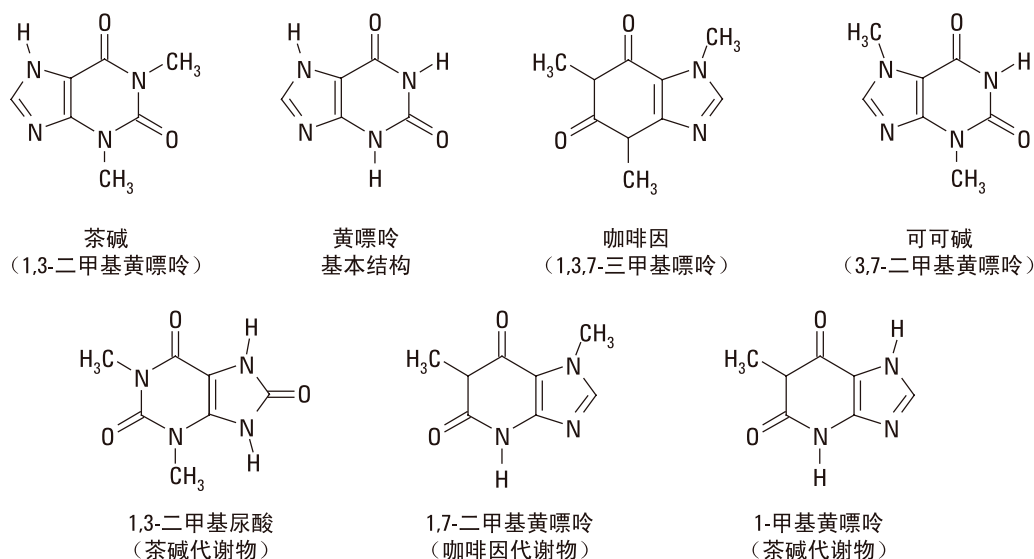


图 1. 选用的黄嘌呤类化合物及其代谢物的结构



Agilent Technologies

黄嘌呤类化合物在体内几乎 100% 被吸收，摄入后几分钟内出现在血液中。黄嘌呤类化合物刺激中枢神经系统，可作用于循环系统，松弛支气管平滑肌。众所周知，咖啡因具有减轻睡意、缓解疲劳和醒脑的作用。这些常见的黄嘌呤类化合物在体内代谢成可能对人体有生理作用的各种化合物。

黄嘌呤类化合物常用反相 HPLC (RP-HPLC) 在 C18 柱上分离 [1-3]。虽然离子对色谱已被用于黄嘌呤的分离 [2]，但使用水和乙腈作为缓冲液的 RP-HPLC 需要的流动相系统更简单。本篇应用报导了不同固定相对黄嘌呤类化合物分离选择性的影响，并探讨了粒径和柱长对分离速度的影响。最后，报告了巧克力型饮料中咖啡因和可可碱的分析方法。

黄嘌呤类化合物分离固定相的选择

HPLC 可以让感兴趣的峰在尽可能短的时间内得到分离。选择合适的固定相是方法开发的重要步骤。最初，我们对几种不同的固定相进行了选择，以找到本研究最适合的固定相。图 2 显示了用 ZORBAX StableBond 固定相 [氰基 (CN)、苯基、C18] 和一种极性嵌入固定相 (ZORBAX Bonus RP) 对试验混合物中黄嘌呤类化合物的分离。

虽然 Bonus 柱的粒径不同，但这里我们的目的是选择具有最佳选择性和最短保留时间的固定相。在所用的条件下，CN 柱的保留最短（因为其烷基链较短），但在这个柱子上，有两种黄嘌呤化合物没有分开。SB-C18 柱在最短的时间内得到了最佳分离，因此成为选定的固定相。

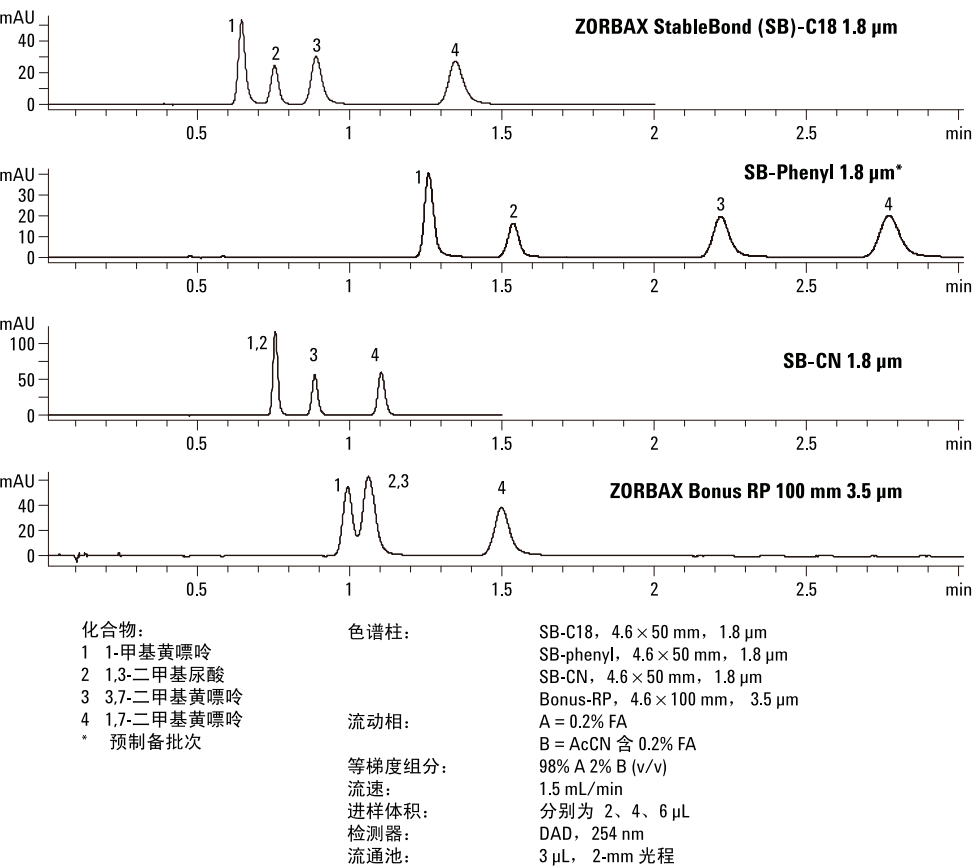


图 2. ZORBAX 固定相对黄嘌呤类化合物分离选择性的比较

为后续实验所选定的色谱条件如下：

粒径和柱长对黄嘌呤类化合物分离的影响

最近 HPLC 分离趋向于使用更小粒径的较短色谱柱。分离度相同或类似，而分离速度更快。图 3 显示了黄嘌呤类测试混合物在三根不同柱子上（250 mm、100 mm 和 50 mm）的等梯度分离结果，这三根柱子分别填充了三种不同粒径的 ZORBAX StableBond C18 填料（分别为 5 μm 、3.5 μm 、1.8 μm ）。我们预计随着柱长变短，保留时间将更短，保留时间的缩短与柱长减少成正比。从图 3 中的确可以清楚地看到整个分离时间的缩短，从 8 分钟到 1.5 分钟。

LC 条件

色谱柱：ZORBAX SB-C18
(各种长度和粒径见各色谱图)

流动相：A= 0.2% 甲酸 (FA)
B=乙腈含 0.2% FA

等梯度组分：98% A 2% B (v/v)

流速：1.5 mL/min；进样体积见各色谱图

检测：DAD, 254 nm

流通池：3 μL , 2-mm 光程

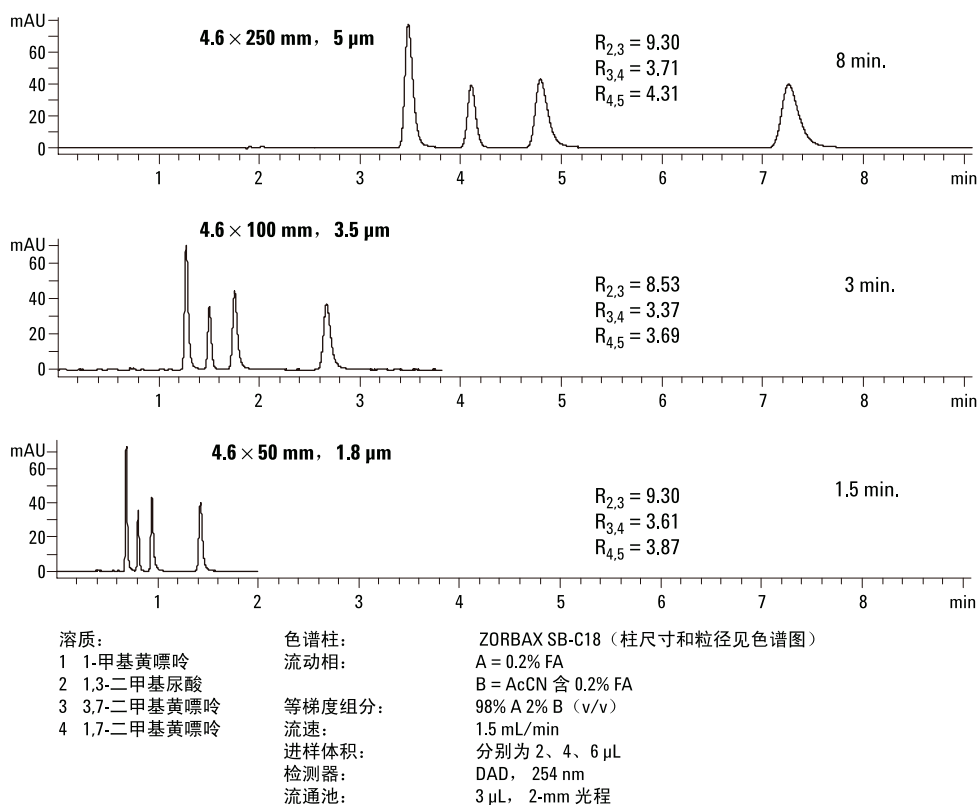


图 3. 色谱柱的可扩展性：保持分辨率的情况下，改变色谱柱配置以提高速度

另一方面，我们还估计柱效也将下降。但是，随着粒径的减小，整个柱效和分离度却几乎不变。对所有黄嘌呤类化合物的分离度计算结果见图 3。这就是快速分离的概念，更短色谱柱与更小填料颗粒的组合，在保持分离效率的同时大大缩短了分离时间。由于流速相同（在这里是 1.5 mL/min），溶剂的使用与柱长成比例地减少，从而降低了分析成本。改用更短色谱柱的另一个好处是，色谱峰变窄了。因此，如果用同样质量的样品进样，峰高将明显增加，从而提高了灵敏度。在图 3 中，进样体积随柱长变短而减少，还能保持峰高基本不变。

当然，如果色谱柱的填料粒径减小，色谱柱的反压将以粒径平方的倒数增加。因此，如果使用同样的柱长，在同样流速（更准确的说是线速度）下的压力将会随粒径减小而增加，3.5 μm 粒径的柱子压力将比 5.0 μm 柱增加 2 倍，而 1.8 μm 粒径的柱子将比 5.0 μm 柱增加 8 倍。所以，随着粒径的减小，理论塔板数的

增加，色谱柱可以缩短，实际压力增加的数值可参见表 1。安捷伦设计的粒径分布有助于使压力保持比 1.8 μm 柱的预计压力要低。

表 1. 压力与粒径和柱长的关系*

粒径 um	柱长 mm	压力 bar	压力增加 (相对于 5.0 um 柱)
5	250	181	1.0
3.5	100	155	0.86
1.8	50	264	1.46

* 条件见图 3

为了说明色谱柱填料粒径的改变对选择性的影响很小，我们用同样柱长的不同粒径色谱柱对黄嘌呤类测试混合物进行了等梯度分离。图 4 显示，从 5 μm 到 1.8 μm 柱，保留时间基本不变，但峰宽明显变窄。换言之，1.8 μm 柱的柱效更高，分离度更高，但选择性几乎没有改变。HPLC 条件见图 4 的色谱图。

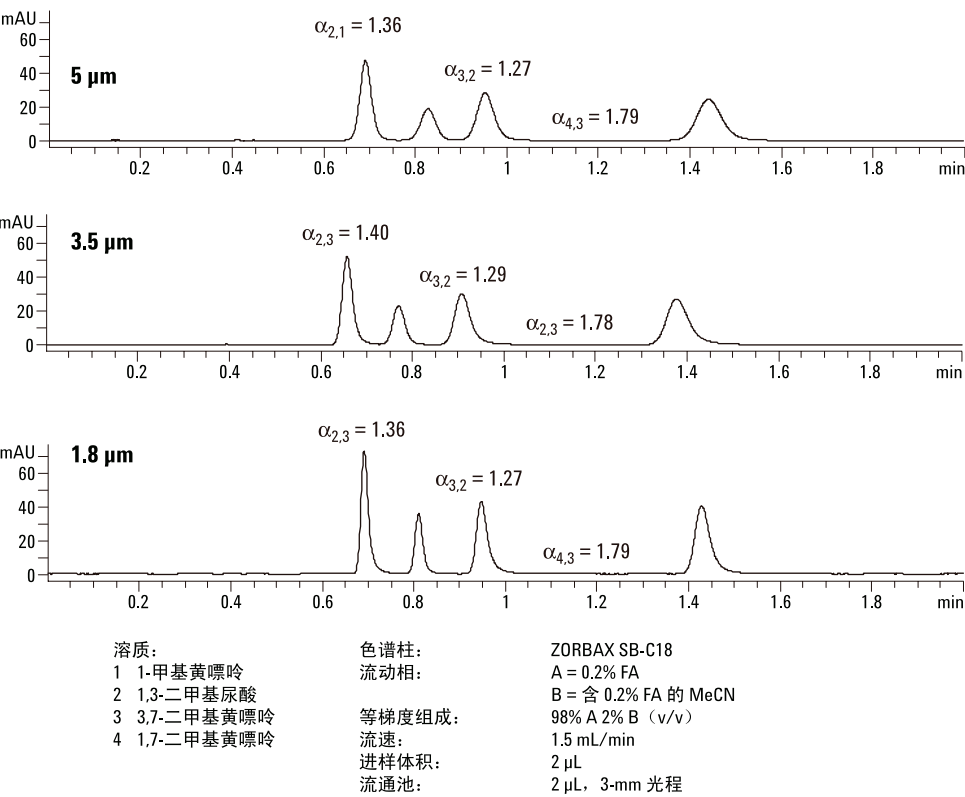


图 4. 柱选择性与粒径的关系

液体饮料中黄嘌呤类化合物的分析

三种最常见的黄嘌呤类化合物是咖啡因、茶碱和可可碱。这些黄嘌呤类化合物可能存在于各种饮料中，作为调味剂，或用于增加口味或提神。我们建立了一种分析巧克力饮料和茶中黄嘌呤类化合物的等梯度方法。用前面提到的色谱条件，使标准黄嘌呤类混合物得到很好的分离。见图 5。

接下来，按照说明在容器中配制三种不同的液体饮料——热可可、巧克力饮料和红茶（袋装），然后超声混匀。制备后，对所有溶液进行离心分离，水相部分经 0.45 微米滤膜过滤，去除可能堵塞 HPLC 柱的颗粒。尤其是，热可可有一层特殊的脂类，要进行分析的只是水层。每个样品取 3 μL 水提取物进样。结果见图 6。

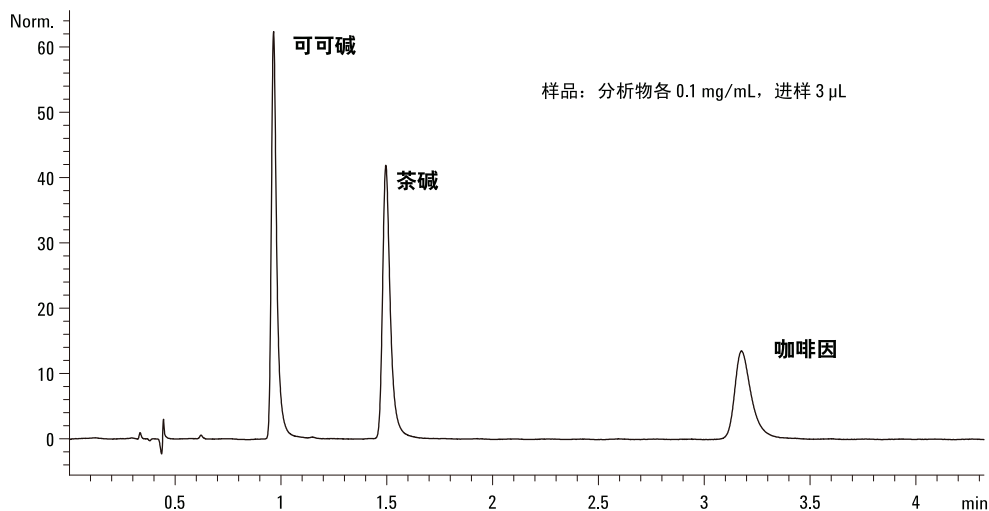


图 5. 黄嘌呤类标样的分离

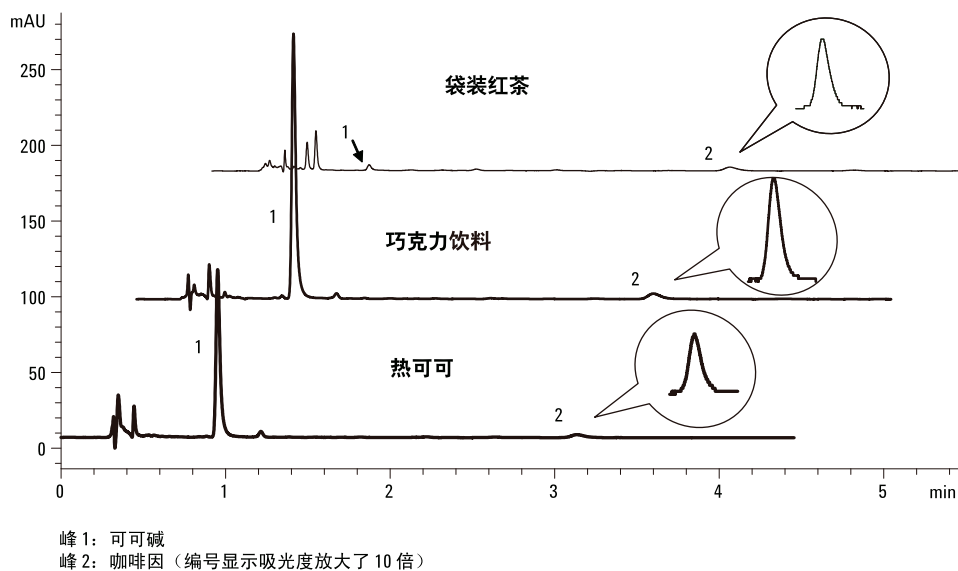


图 6. 液体饮料中黄嘌呤类化合物的分析

我们可以进行饮料中这三种黄嘌呤的半定量分析（单点校正）。从表 2 中可以看出，巧克力饮料中有大量可可碱，咖啡因含量比较少，而茶样品中，咖啡因含量非常高。表 2 的结果是按重量之比计算的，并非其在饮料溶液中的总毫克数。这些结果都在厂商标识的浓度范围内。这些饮料中都没有检测出茶碱。

表 2. 液体饮料中黄嘌呤类化合物的测定

饮料	可可碱 (%, wt/wt)	咖啡因 (%, wt/wt)
热巧克力	0.15	0.011
巧克力	0.13	0.011
茶	0.056	0.17

结论

黄嘌呤类化合物最好采用反相 HPLC 在 C18 柱上分离。随着柱长和粒径减少，所测黄嘌呤类混合物的分离时间从 8 分钟缩短到 1.5 分钟，而分离度没有损失。用一种简单的等梯度 HPLC 方法，对液体饮料（茶、巧克力、可可）中的可可碱、茶碱和咖啡因进行了分析。

参考文献

1. U. Huber, "Analysis of Antiasthmatic Drugs by HPLC", Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.
2. R. Ricker, "High Speed Separation of Analgesics", Agilent Technologies, publication 5988-6414EN, www.agilent.com/chem.
3. Q. Wang, "Analysis of Xanthines in Serum", Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问安捷伦的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明，如有更改，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2006

中国印刷
2006 年 3 月 6 日
5989-4857CHCN



Agilent Technologies