

# 高效液相色谱溶剂系统四面体优化法

吴 文 班允东 邸 欣 潘 萌 孙毓庆

(沈阳药学院 沈阳 110015)

**摘要** 改进了 Glajch 的三角形法,建立了适合于高效液相色谱(HPLC)的四面体优化法。将 7 个溶剂系统的实验结果输入计算机,由计算机模拟 231 个溶剂系统的色谱行为,优选出最佳溶剂系统。将此法用于 12 种磺胺药物的分离,得到了满意的结果。

**关键词** 高效液相色谱,流动相的优化,四面体优化法,磺胺类药物

## 1 前言

近年来,利用计算机模拟色谱行为进行色谱条件优化,已成为一个新动向。其中三角形法是 Glajch<sup>[1]</sup>在 1980 年报道的一个对多元流动相体系进行最优化的方法。但研究发现,该法结果不是唯一解,特别是当组分保留次序发生交错,最难分离对发生变化时,有可能导致错误的结论。对此,我们建立了四面体优化法及其软件。通过对 12 种磺胺药物的 HPLC 实验,结果表明本方法准确、方便、形象、直观。

## 2 原理

按 Glajch 的三角形优化法,设计 7 种溶剂系统进行色谱实验。溶质的色谱行为符合以下基本方程<sup>[2]</sup>:

$$\ln k' = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$$

式中,  $a$  为色谱特征常数,  $k'$  为容量因子,  $X$  为多元流动相中等洗脱溶剂的体积分数。

进行优化时,必须有一个能反映色谱分离质量的目标函数,我们采用以下优化函数:

$$COF = \sum R_i + n$$

$R > 1$  时,  $n \leftarrow n + 1$   
 $R > 1.5$  时,  $R = 1.5$

其中,  $R_i$  为  $i$  对峰的分度,  $n$  为基本分离开 ( $R > 1$ ) 的峰数。

为了防止单个峰对优化函数的偏重影响,当  $R > 1.5$  时,令  $R = 1.5$ 。为了使其适用于对未知样品的分析,增加了  $n$  项,使其产生尽可能多的分离峰。

在液相色谱中,溶质半峰宽  $W_{1/2}$  与其保留值  $t_R$  间存在下列线性关系<sup>[3]</sup>:

$$W_{1/2} = A + Bt_R$$

式中,  $A, B$  是与温度、溶质、流动相和固定相有关的常数。据此可用  $4\sigma$  作峰底,描绘模拟色谱图。

基于以上原理,我们采用 BASIC 语言,编成了 OSSP 软件 (Optimizing Solvent System Program),四面体法流程图见图 1。

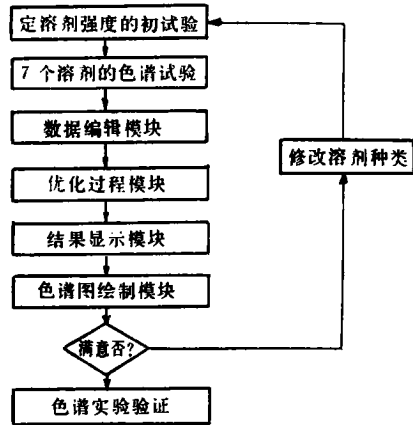


图 1 四面体法流程图

## 3 实验部分

仪器: Hitachi 655-15 型液相色谱仪, UV655 型可变波长紫外检测器, 655-60 型微处理机, SUN386 微机。

色谱条件: 色谱柱为 ODS, 250 × 4.6 mm i. d., 流速 1 mL/min; 检测波长为 265 nm。

样品: 醋酸磺胺米隆, 磺胺米隆, TMP, SG, 丙磺舒, SN, SD, SM<sub>2</sub>, 消炎磺, 周效磺胺, SMZ 及邻甲苯磺酰胺, 样品均溶于 95% 乙醇中。

## 4 结果与讨论

### 4.1 测定溶剂系统最佳洗脱强度

选择合适的溶剂系统洗脱强度,使样品中各组分的  $k'$  值尽可能多地落在最适宜范围(2~5)内,为溶剂系统组分选择作准备。以甲醇、水为初试溶剂,调配甲醇:水=20:80,溶剂强度  $S=0.6$  最合适。

#### 4.2 确定溶剂四面体上的等洗脱平面

在反相 HPLC 中,溶剂四面体以水为底剂,甲醇、乙腈、四氢呋喃三个溶剂强度属于不同组别的溶剂组成四面体底面三角形的三个顶点<sup>[4]</sup>,构成一个四面体(见图 2)。

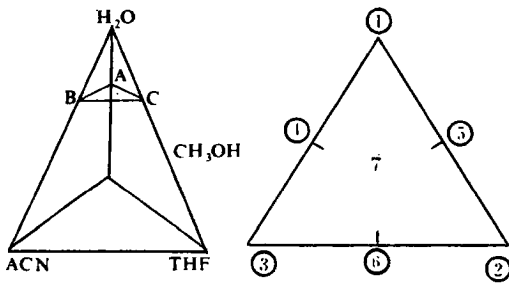


图 2(左) 溶剂四面体 图 3(右) 等洗脱平面  $\triangle ABC$  及等洗脱平面上 7 个溶剂系统选择

将甲醇:水=20:80代入公式  $S=S_1\phi_1+S_2\phi_2$ , 得  $S=0.6$ 。其中  $\phi$  为混合溶剂中各组分的体积分数;  $S_1, S_2$  为纯溶剂的溶剂强度,  $S_{H_2O}=0, S_{MeOH}=3.0, S_{ACN}=3.2, S_{THF}=4.5$ 。根据同一公式计算出  $S=0.6$  时,乙腈:水=18.8:81.2,四氢呋喃:水=13.3:86.7。从而在四面体上截得  $S=0.6$  的等洗脱平面  $\triangle ABC$ (见图 2)。

#### 4.3 设计 7 个溶剂系统

将  $\triangle ABC$  放大成正三角形(见图 3),计算机自动给出 ①~⑦号等洗脱溶剂的组成(见表 1),配制 ①~⑦号溶剂系统。

表 1 7 个溶剂系统的组成

溶剂	组 成	比 率(%)
(A)	CH <sub>3</sub> OH H <sub>2</sub> O	20.0 80.0
(B)	ACN H <sub>2</sub> O	18.8 81.2
(C)	THF H <sub>2</sub> O	13.3 86.7
	CH <sub>3</sub> OH ACN H <sub>2</sub> O	10.0 9.4 80.6
	CH <sub>3</sub> OH THF H <sub>2</sub> O	10.0 6.7 83.4
	ACN THF H <sub>2</sub> O	9.4 6.7 84.0
	CH <sub>3</sub> OH ACN THF H <sub>2</sub> O	6.7 6.3 4.4 82.6

#### 4.4 色谱实验与优化

用 7 种溶剂系统分别对样品进行色谱实验,记录各组分的保留时间、浓度、半峰宽等输入计算机,用 OSSP 软件进行优化,得到最佳溶剂系统甲醇-乙腈-四氢呋喃-水(4.0:2.8:8.6:84.5)、模拟峰保

留时间表以及模拟色谱图(见图 4)。

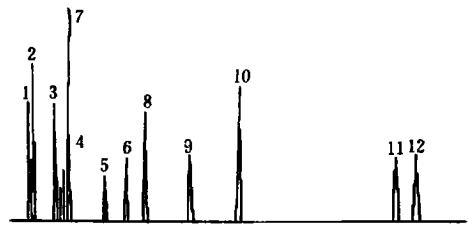


图 4 最佳溶剂系统模拟色谱图

#### 4.5 实验验证

用最佳溶剂系统甲醇-乙腈-四氢呋喃-水(4.0:2.8:8.6:84.5)做实验,结果见图 5,与模拟结果基本一致。

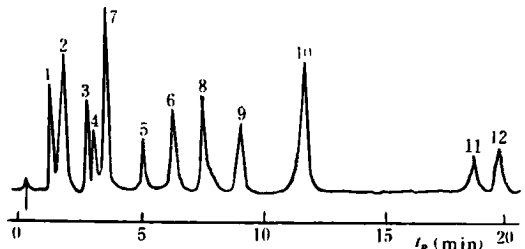


图 5 12 种磺胺类药物样品分离色谱图

#### 4.6 讨论

1. 在优化过程中,采用网格搜索法,屏幕上显示搜寻过程,每一个白点表示计算机正在模拟这个点溶剂系统的色谱行为,并进行判别。当本点优于前点时,就显示出一个红点,直至 231 个点的溶剂系统模拟完,给出一个小方块,即为最佳溶剂系统点(见图 6)。

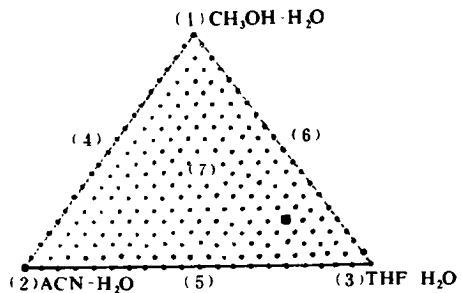


图 6 优化过程图

2. 本软件在使用过程中,能自动显示溶剂四面体、等洗脱平面、优化过程图、模拟色谱图以及各种表格,通过音乐、人机对话等与操作者进行友善交流,能方便地对数据进行增、删、改、存,整个优化过程可在 1 分钟内完成。

3. 本法同样适用于正相 HPLC。在正相中,常用

正己烷作为底剂,用乙醚、氯仿、二氯甲烷作为底面三角形三顶点,构造四面体<sup>[4]</sup>。溶剂强度用 P' 计算。

4. 本软件采用模块化设计,菜单选择,结构合理,操作简便易学。

5. 对优化结果不满意时,可以通过改变底面三顶点溶剂的种类重新实验。

### 参 考 文 献

- 1 Glajch J L *et al.* J Chromatogr, 1980;199:57
- 2 Berridge J C. Techniques for the automated optimization of HPLC separations. New York: John Wiley & Sons, 1986:77
- 3 陈 农.液相色谱谱图库的建立与作用指数定性(博士学位论文),中科院大连化学物理研究所,1991:26
- 4 孙毓庆.薄层扫描法及其在药物分析中的应用.北京:人民卫生出版社,1990:37

## The Tetrahedron Method of Optimizing Solvent System in High Performance Liquid Chromatography

Wu Wen, Ban Yundong, Di Xin, Pan Meng and Sun Yuqing

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang, 110015)

In this paper we modified the triangle method proposed by Glajch and developed the tetrahedron method. In this method, after the experimental results of 7 solvent systems were input into a micro-computer, the latter simulated the chromatographic behaviour of 231 solvent systems and gave the optimal system. The tetrahedron method has been successfully applied to the separation of 12 sulfadruugs.

**Key words** high performance liquid chromatography, mobile phase optimization, the tetrahedron method, sulfa drugs

\*\*\*\*\*  
(上接第 344 页)

## Analysis of Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether and Zearalenone in Cereals by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Particle Beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS)

Luo Yi, Liu Feng, Feng Jianlin, Zhang Lihan, Hu Xuying,  
Feng Cuiling and Yang Jinsheng

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

Kuang Kaiyuan and Shi Shiyang

(Institute of Plant Protection, Academy of Agriculture, Shanghai, 201106)

A qualitative and quantitative method for simultaneously analyzing alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) and zearalenone (ZMA) in cereals and cultures by HPLC and particle beam LC/MS was established. These three toxins were effectively separated on a C<sub>18</sub> reversed-phase column with an 80% aqueous methanol as the eluting agent. The recoveries of the three toxins in corn and wheat were all over 79%. The detection limits for them were 1 × 10<sup>-9</sup>g. With this method, about 100 cereal samples collected from the disease and non-disease areas of Kashin-Beck disease were detected. None of the three toxins was found. However, AOH and AME were detected in seven cultures of the genus *Alternaria* by HPLC and were successfully identified by particle beam LC/MS. The contents of AOH and AME in these cultures were in the range from 13.0mg/kg to 95.5mg/kg.

**Key words** high performance liquid chromatography, particle liquid chromatography/mass spectrometry, alternariol, alternariol monomethyl ether, zearalenone, corn, wheat