

综 述

高效液相色谱优化的新进展

房杏春 相秉仁 安登魁

(中国药科大学药物分析研究室, 南京)

随着高效液相色谱分析在许多领域中广泛应用, 计算机技术在色谱中的迅速渗透以及新一代智能色谱仪的问世, 人们越来越重视利用计算机技术来解决目前色谱分析中的主要技术关键, 包括最优操作条件的选择、色谱定性等。随着色谱法的发展, 硬件的改进和操作条件优化软件的开发, 色谱专家系统的研究正迅速发展^(1~5)。本文拟在前文⁽⁴⁾介绍的单纯形法、窗口图解技术、混合液设计统计技术和叠加分辨率图等色谱优化方法的基础上, 简要地阐述近年来 (1983~1987) 的有关进展。

一. 色谱优化指标

高效液相色谱分析中, 由于各种实验因素的复杂性和相互影响, 致使至今还未能概括出哪些因素是优化分离的关键所在。实现流动相溶剂系统最优化, 首要解决的问题是获得能反映诸多复杂因素的色谱特性的优化指标表达式。理想的色谱优化指标应该具有下列条件: 在各种溶剂系统中当色谱峰的洗脱次序发生变化时, 优化指标的运用仍然是满意的; 在计算响应值时, 对优化指标表达式无需事先作一些规定和校正; 在色谱优化条件中无需事先知道色谱图中所要分离峰的数目。一个好的优化指标应该能给出确切的数值来指出色谱的优化点和区域⁽⁶⁾。

色谱图中两峰分离的好坏常用分辨率 R_s 、谷峰比 V 和分离参数 P 来表示。

近 20 年来, 所发表的色谱优化指标表达式大多是在上述三个基本参数的基础上, 增加一些规定或加上权重因子而获得的。如总分辨率 (total overlap ϕ)、色谱响应函数 (chromatographic response function, CRF)、色谱优化函数 (chromatographic optimization function, COF)、信息量 (information power)、分离数 (separation number)、乘积分辨率 (product resolution)、面积重叠法 (area overlap method)、色谱评价函数 (chromatographic evaluation function, CEF)。Debets⁽⁶⁾ 详细地讨论了上述指标与分辨率的关系, 并指出在应用上述指标时主要缺点都不能给出色谱峰总体分离的确切定量数值。

根据上述指标已提出一些新方法如重叠分辨率图形法、窗口图解技术等, 但这些方法都是响应面的优化, 是单一目标的优化, 未考虑分析时间等其它目标的优化。最近 Coenegracht⁽⁷⁾ 等提出了 pareto-optimality 法。该法是一种多指标决策判定法 (multi-criteria decision making, MCDM), 它研究分离和分析时间两个方面, 已用于反相液相色谱分析五种磺胺类衍生物。它应用溶剂三角法, 选择水、有机改性剂 1 和 2 构成三角形的顶点, 通过实验并预示不同流动相时所有洗脱物的容量因子和相邻峰之间的最小分辨率, 得到图 1~3 所示的结果。因此该法类似于叠加分辨率图法, 但该法同时优化分析时间和分辨率。

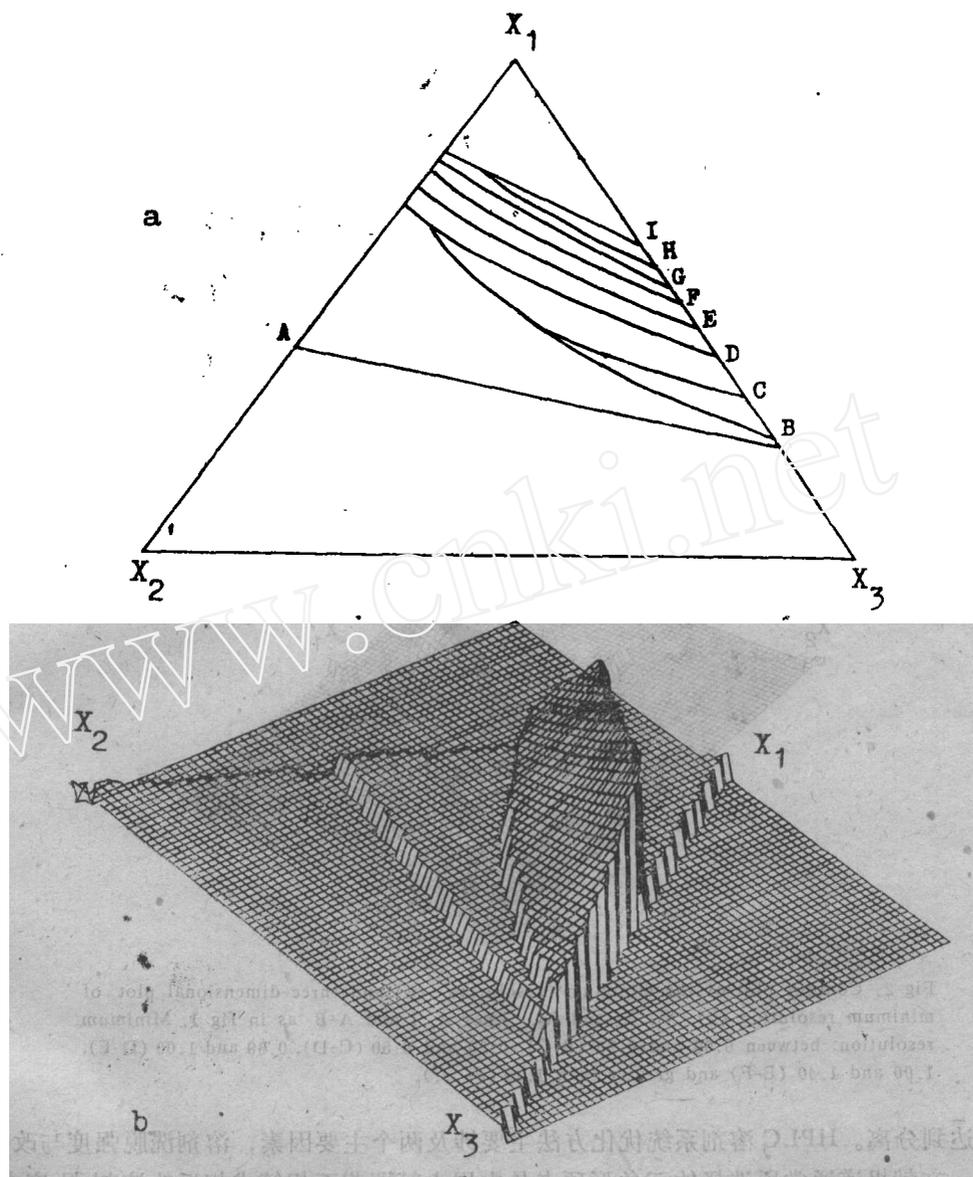


Fig 1. Contour plot of the maximum capacity factor (a) and three-dimensional plot of $\max k(b)$. X_1 =water; X_2 =tetrahydrofuran—water(50:50); X_3 =methanol—water(50:50). Lines A and I: the boundaries of the design space. A-B: at least one capacity factor smaller than one. Maximum capacity factor: between 1 and 2 (B-C), 2 and 3 (C-D), 3 and 4 (D-E), 4 and 5 (E-F), 5 and 6 (F-G), 6 and 7 (G-H) and 7 and 8 (H-I).

该法的优点是从 MCDM 中可以一目了然地了解分析时间和分辨率之间的关系，流动相的组成的选择从图中可以作出较严格的判定，无需对分析时间和最小分辨率进行规定和限制，色谱工作者可以任选认为合理的分析条件。可以认为该法是一种有希望的优化指标。

二. 混合液设计统计技术

混合液设计统计技术是 Glajch 等^(2,4)提出的溶剂系统优化方法，并正在不断开发和扩充混合液设计统计技术在 HPLC 选择性优化的软件⁽⁸⁾。该法基于三种不同的溶剂系统的选

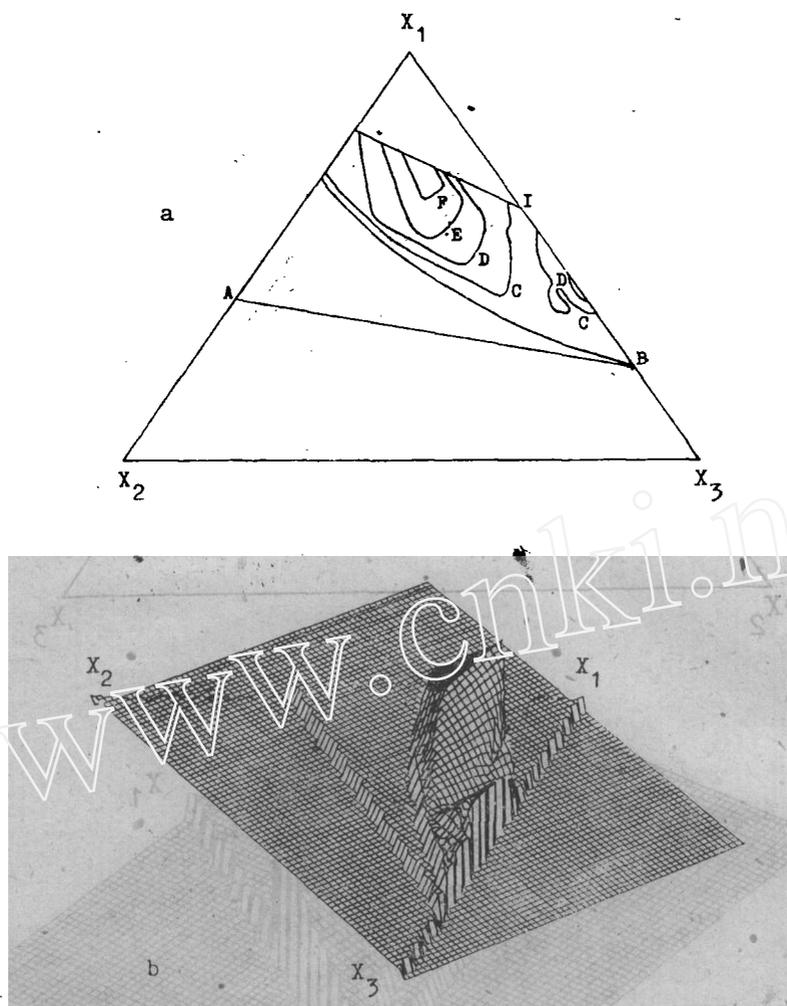


Fig 2. Contour plot of the minimum resolution (a) and three-dimensional plot of minimum resolution (b). X_1 , X_2 and X_3 , lines A, I and A-B as in fig 1. Minimum resolution: between 0.00 and 0.20 (B-C), 0.20 and 0.60 (C-D), 0.60 and 1.00 (D-E), 1.00 and 1.40 (E-F) and greater than 1.40 (F-...).

择性而达到分离。HPLC 溶剂系统优化方法主要涉及两个主要因素，溶剂洗脱强度与改性剂的选择。文献报道通常所选择的三角形顶点是由用水等调节至相等或相近的溶剂强度的乙腈、四氢呋喃和甲醇而构成的。这实际上是在事先选定溶剂强度后再考虑分离的选择性，因此可以认为溶剂系统的优化是区域性，并没有达到两个因素的同时优化。Cönegracht 等⁽⁹⁾在原来工作的基础上⁽⁷⁾采用三次多项式模型拟合容量因子，并应用于反相离子对色谱分析四种维生素和四种局麻药，获得了十分满意的结果。现以反相离子对色谱分离四种维生素的溶剂优化方法为例说明该法的基本思路。

反相离子对色谱中的洗脱强度，不仅由有机改性剂的含量决定，而且还受离子对的影响。理论上 pH 是决定选择性的主要因素，有机改性剂的类型和浓度也有明显作用，但离子对试剂的浓度对化合物的分离并不起主要作用。选择性三角形如图 4 a 所示。从图中可以看出甲醇浓度的增加，意味着分析时间缩短。

应用 Goldberg 等提出的三次多项式模型⁽¹⁰⁾

$$\ln k = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (1)$$

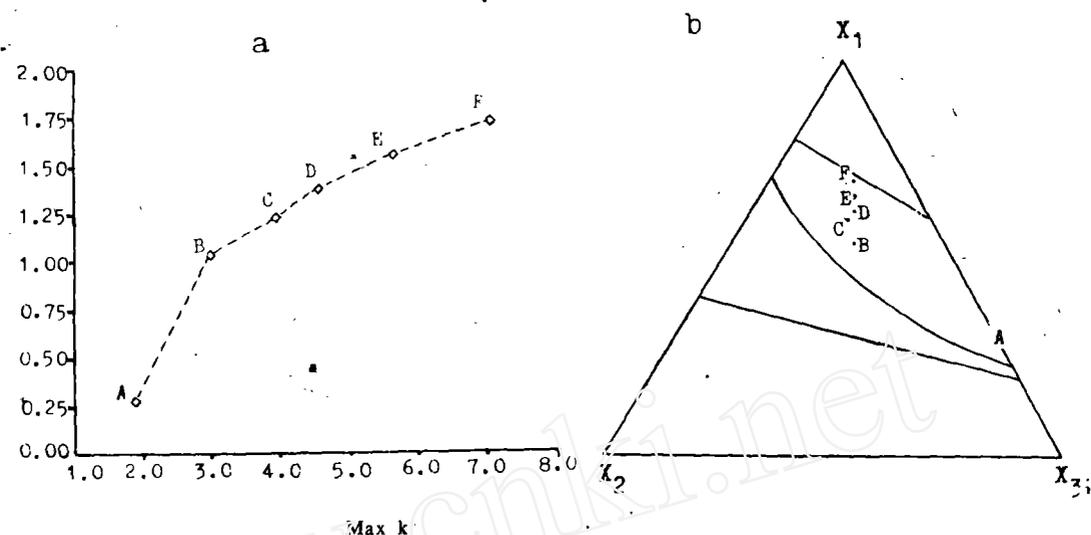


Fig 3. MCDM plot using seven max. k classes (a) and Pareto-Optimal (PO) plot (b). The points A, B, C, D, E and F are the Pareto-Optimal points. The corresponding mobile phase compositions (in volume percentages of X_1 , X_2 , X_3) are: A. 0.65:0.00:0.35; B. 0.77:0.10:0.13; C. 0.80:0.09:0.11; D. 0.81:0.08:0.11; E. 0.83:0.07:0.10; F. 0.85:0.06:0.09. X_1 , X_2 and X_3 as in fig 1.

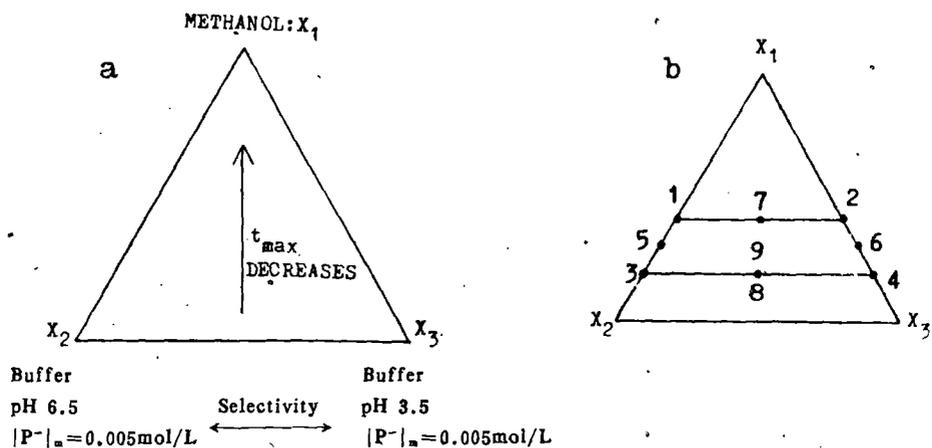


Fig 4. Mixture design showing the direction in which solvent strength and selectivity vary (a) and mixture design for the separation of vitamins (b). $[P^-]$ = mobile phase concentration of sodium octylsulphonate; t_{max} = retention time of the last peak.

通过 9 次实验设计 (见图 4 b), 根据已知的流动相组成和实验所得各洗脱物的容量因子, 按 (1) 式进行多元线性回归, 计算各洗脱物在溶剂系统试验范围的系数估计值, 再按 (1) 式预测各洗脱物在不同流动相配比时的容量因子, 并按下式

$$R_s = \sqrt{N} (k_2 - k_1) / 2(k_2 + k_1 + 2) \quad (2)$$

计算各洗脱物在不同流动相时的分辨率, 并求出最难分离物质对的分辨率 ($R_{s(min)}$), 绘制最小分辨率图。图 5 为四种维生素按上述方法求得最小分辨率图。

该法的优点在于可获得流动相组成的优化区域, 沿甲醇增加方向则保留时间缩短, 从最:

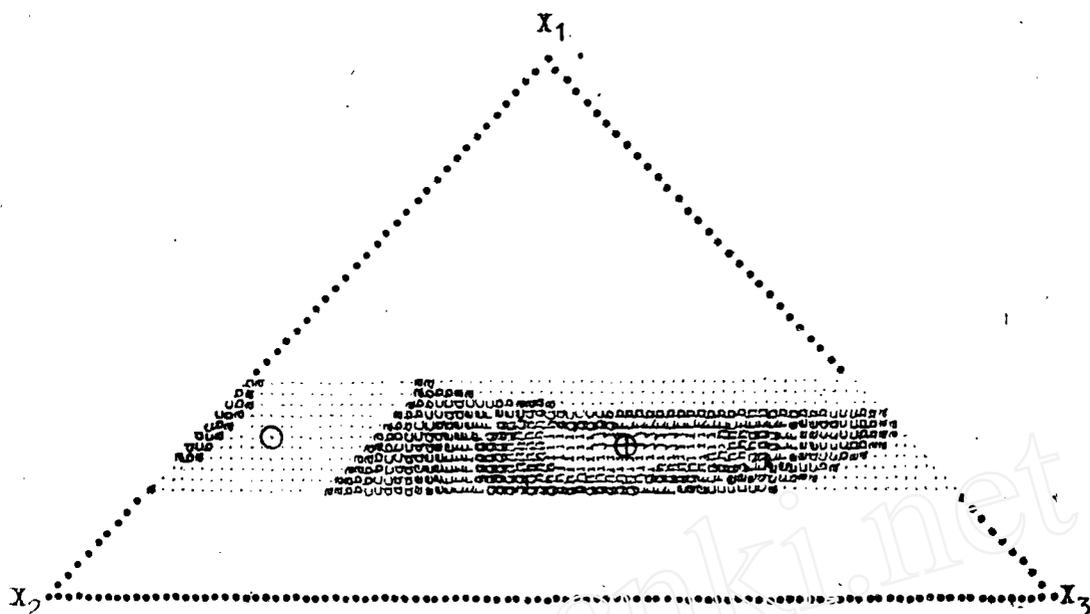


Fig 5. Minimal resolution plot for the separation of vitamins. A poor separation is indicated by \odot and the optimal mobile phase composition by \oplus . R_s (min) < 1.0 is indicated by a dot; R_s (min): a=1.00, b=1.16, c=1.32, ..., z \geq 5.00.

小分辨率图中选择合适的点即可获得理想的溶剂系统。 R_s 计算通过式(2)而获得。 R_s 的定量预示取决于理论塔板数的正确估计, 一般情况下用不准确的理论塔板数时, 预示优化系统仍然满意的, 但也常会引起 $R_{s(\min)}$ 值的过大或过小情形的出现, 使判定出现困难。

三. 梯度洗脱溶剂系统的优化

在高效液相色谱溶剂系统的优化中, 常见的报道是恒溶剂洗脱的溶剂系统优化, 但梯度洗脱法有其明显优点, 它能改善强滞留物的选择性和灵敏度, 尤其在 k 范围较宽的混合物分析中显示其优越性, 因而正逐渐受到色谱工作者的重视。

逐步梯度洗脱法要计算若干恒溶剂洗脱中的流动相组成、洗脱物容量因子和保留体积。该法已成功地应用甲醇水构成的逐步梯度洗脱优化分离六种巴比妥类的混合物⁽¹¹⁾, 所得结果较好, 但这种方法仅适用于特定的分离, 无普遍的优化意义, 并且计算和操作过程十分复杂和繁琐。实际上该法也只是连续改变有机改性剂浓度的一种方法。

线性溶剂强度梯度洗脱法, 它假定柱的塔板数与流动相的组成和洗脱物无关, 且选择性因子在恒溶剂洗脱时不受流动相组成的影响, 也就是在洗脱过程中对所有的洗脱物具有相同的峰宽和灵敏度。

Kirkland 和 Glajch⁽¹²⁾ 将线性溶剂强度和溶剂选择性三角形结合起来, 并将梯度洗脱划分为两类: 非选择性多溶剂梯度洗脱法 (isoselective multisolvent gradient elution, IMGE) 和选择性多溶剂梯度洗脱法 (selective multisolvent gradient elution, SMGE)。IMGE 将恒溶剂洗脱的溶剂选择性三角形加以扩大, 构成溶剂强度的三棱柱 (见图 6 a), 因而恒溶剂洗脱的溶剂三角形实际上是三棱柱中的一个薄片。通过 7 次实验设计 (见图 6 b) 获得计算的基本数据, 将数据拟合到二阶多项式曲面上, 然后通过叠加分辨率图形技术预示最优溶剂系统 (见图 7)。该法用于分离氨基酸等 14 种药物的混合物获得满意的结果。梯度洗脱的

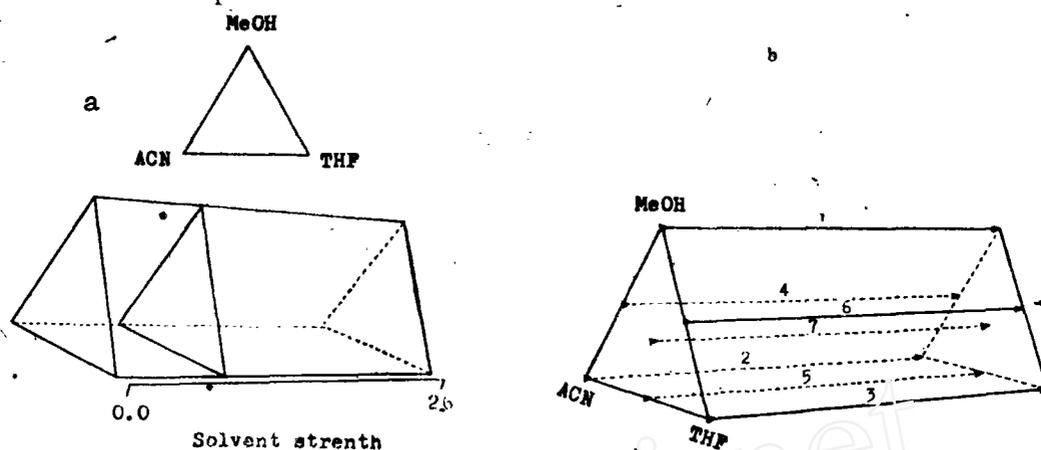


Fig 6. Solvent strength prism for gradient elution compared with an isocratic solvent selectivity triangle for one solvent strength (a) and experimental design for seven gradient elution runs to obtain basic data for optimization calculation (b). ACN= Acetonitrile; MeOH= methanol; THF= tetrahydrofuran.

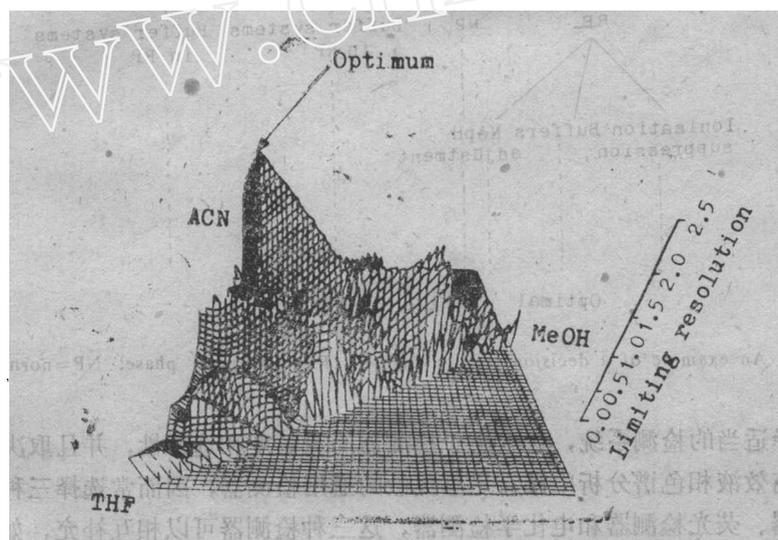


Fig 7. Overlapping resolution map (ORM) for IMGE optimum. Optimum occurs at methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran (12:80:8).

IMGE 法简单、实用，而 SMGE 法效果更好，但太复杂。

Glajch 等⁽¹³⁾最近报道了溶剂三棱柱梯度洗脱优化分离 20 种乙内酰苯硫脲氨基酸的衍生物，就不同柱、串联柱、离子强度对乙内酰苯硫脲氨基酸衍生物的分选选择性影响，详细地比较了恒溶剂洗脱法和梯度洗脱法的优劣，认为优化的梯度洗脱与优化的恒溶剂洗脱分离乙内酰苯硫脲氨基酸衍生物时其分离效果相似。优化的恒溶剂洗脱所使用的设备简单、操作容易，在不同的仪器上使用时具有较好的重现性，且分析时间稍短；优化的梯度洗脱法使先洗脱的化合物之间的分离更好些，而这一点在实际样品分析中可提供一定的空隙以检出样品中可能存在的杂质或分解产物，更重要的是梯度洗脱法可以提高迟洗脱化合物的灵敏度，提高仪器的检测能力。因此这两种方法可以互为补充，对于难分离的混合物的优化分离是十分有用的。

四. 液相色谱分析的专家系统

随着色谱基础研究的深入和计算机技术的应用,全自动的色谱仪的研究已经十分广泛。具有部分色谱专家智能的智能色谱仪已经问世,如 Du Pond 公司 Sentinel 系统、Spectra Physics 公司的 Optim I/II 及 Perkin Elmer 公司的 PESOS 等流动相系统选择软件。新的软件也正在不断改进和问世^(3,14)。随着软件的开发和硬件的技术问题的逐步解决,色谱专家系统的研究也正在飞速进行⁽⁵⁾。

Massart 等^(5,15,16)正在建立药物色谱分析的专家系统,他们研制的专家系统采用了判决树结构(见图 8),系通过一个节点到另一个节点的推理来生成参数的概率范围,选择初次

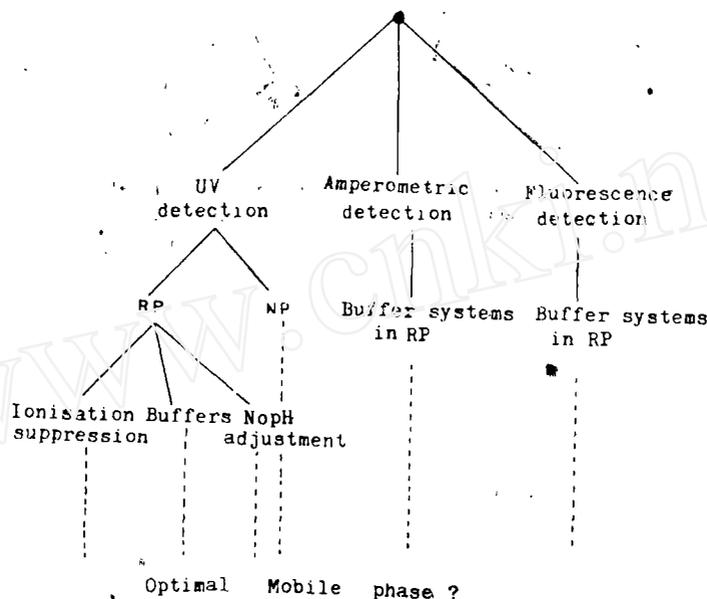


Fig 8. An example of a decision tree in HPLC. RP=Reversed phase; NP=normal phase.

参数。首先选择适当的检测系统,这取决于检测器的灵敏度和选择性,并且取决于分析物的特性。由于在高效液相色谱分析中没有足够灵敏的通用检测器,因而常选择三种类型的检测器即紫外检测器、荧光检测器和电化学检测器,这三种检测器可以相互补充,如适用性较广的紫外检测器和荧光检测器的选择性以及电化学检测器的灵敏度。在第一节点时采用 CN 柱以判断采用正相色谱还是反相色谱,以后建立最佳操作系统,如色谱溶剂系统的优化。

Massart 等⁽¹⁵⁾现已建立了检测器系统选择的专家系统,实验研究了 43 种药物能否采用电化学检测器,结果表明专家系统的预选正确率达 93%⁽¹⁶⁾(即在 43 种药物中选对了 40 种)。

可以预料随着色谱研究的深入,更多、更普遍的专家系统将会展现在我们面前。专家系统的建立会使色谱分析发生根本性的变革,促使各门学科的迅速发展。

参 考 文 献

1. Glajch JL and Kirkland JJ. *Anal Chem* 1983, 55:319A.
2. Glajch JL, et al. *J Chromatogr* 1980, 199:57.
3. Debets HJG. *J Liq Chromatogr* 1985, 8:2725.
4. 安登魁、相秉仁. 南京药学院学报 1986, 17:73.
5. Billiet H. *Trends Anal Chem* 1986, (2):IX.
6. Debets HJG, et al. *Anal Chim Acta* 1983, 151:131.
7. Smilde AK, et al. *J Chromatogr* 1983, 369:1.
8. Glajch JL, et al. *J Liq Chromatogr* 1987, 10:1727.
9. Coenegracht PMJ, et al. *Ibid* 1987, 389:351.
10. Goldberg AP, et al. *J Chromatogr Sci* 1984, 22:31.
11. Jandera P and Churacek J. *J Chromatogr* 1979, 170:1.
12. Kirkland JJ and Glajch JL. *Ibid* 1983, 255:27.
13. Glajch JL and Kirkland JJ. *J Chromatogr Sci* 1987, 25:4.
14. 卢佩章、卢小明. 色谱 1984, 1:58, 1:102.
15. Musch G, et al. *J Chromatogr* 1985, 348:97.
16. Musch G and Massart DL. *Ibid* 1983, 370:1.

www.cnki.net