

优化指标 g_{HCRF} 在 HPLC 分离氯苄律定有关物质中的应用

厉程*, 倪坤仪¹, 郁建¹, 黄芳¹, 朱世谦¹

(江苏省药品检验所, 南京 210008; ¹ 中国药科大学分析化学研究室, 南京 210038)

摘要 目的: 在多因素串联色谱响应函数(HCRF)基础上提出了新的优化指标 g_{HCRF} , 对新化合物氯苄律定有关物质的 HPLC 分离进行优化。方法: 采用球面对称设计, 对影响色谱分离的两个主要因素(x_1 : 甲醇比例; x_2 : 离子对试剂浓度)进行优化, 并对试验结果进行关系式模拟。结果: 以 g_{HCRF} 建立的关系式预测的理论最优解为 $x_1 = 76\%$, $x_2 = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与实验最优解 $x_1 = 75\%$, $x_2 = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十分接近, 预测能力可信。结论: 氯苄律定有关物质的分离证实 g_{HCRF} 适用于复杂混合样品的分离优化。

关键词 氯苄律定; 色谱优化; 广义的多因素串联色谱响应函数(g_{HCRF}); 球面对称设计

氯苄律定(chrolobenzylidide)为中国药科大学药化研究室研制的一种具有抗心律失常药理作用的新化合物, 其有关物质检查可以采用反相离子对高效液相色谱法。由于反相离子对色谱中影响分离选择性的因素很多, 因此在建立分析方法时, 有必要运用色谱优化技术, 以较少的实验次数获得最佳的分离条件。

色谱优化方法很多, 所有优化方法中都有一个评价色谱分离效果的指标, 即优化指标。合理的优化指标应能对色谱图进行正确评价, 同时应使搜索方法能迅速达到最优点。优化指标种类繁多, 每一种都有其优点和局限性, 应根据被分析样品的实际情况和分离要求进行选择。不同的优化指标可能导致不同的优化结果, 因此优化指标的正确选择在色谱优化中具有举足轻重的作用。如果选择不当, 不仅可能增加实验次数, 更严重的可能使优化结果偏离真实的最优解从而导致整个优化过程的失败^[1]。本文用优化指标 g_{HCRF} 对氯苄律定有关物质的 HPLC 分离进行优化。

实验部分

1 仪器与试剂

仪器: 岛津 LG-10A 液相色谱仪, SPD-10A 紫外

检测器, 色谱工作站(中科院大连化物所), YWG C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm ID, 10 μm)。

试剂: 氯苄律定, 盐酸小檗碱, 对氯氯苄, 四氢小檗碱(中国药科大学药化研究室提供); 甲醇, 高氯酸(分析纯); 重蒸馏水(自制)。

2 优化指标的选择

2.1 传统优化指标 氯苄律定在合成过程中可能带入的有关物质包括原料盐酸小檗碱(代号 B)、对氯氯苄(代号 pCl), 反应中间体四氢小檗碱(代号 THB)以及可能产生的未知副产物和降解产物。分析这样一个复杂的多组分样品, 首先考虑采用传统的综合优化指标: 色谱响应函数(CRF)或色谱优化函数(COF)。CRF 和 COF 是应用较早、比较普遍的优化指标, 但它们的局限性是不能反映由于流动相组成的变化引起的色谱峰相对次序的变化(即峰交叉), 因此容易导致响应函数表面的局部优化^[1,2]。我们在实验中观察到, 流动相中甲醇比例的改变会使氯苄律定和 B 两组分出现峰交叉现象, 因此采用 CRF 或 COF 作为优化指标显然不合适。

2.2 HCRF 卢佩章等针对 CRF 和 COF 的局限性而提出的多因素串联色谱响应函数(HCRF), 同时考虑峰个数(n)、最难分离物质对的峰高分离度(K_3)和分析时间(T) 3 个因素对优化过程的综合贡献, 并且根据各因素的贡献大小分别冠以不同的权重系数, 其数学表达式为:

$$\text{HCRF} = 100\,000 \times n + 10\,000 \times K_3 + (100 - T) \quad (1)$$

用 HCRF 作为优化指标进行色谱条件的优化时, 被分析样品中的各组分通常已知, 可根据要求确定最

收稿日期: 1998-02-01

基金项目: 国家新药研究基金(87041)及国家医药科技创新

1035 项目 95-ED-01(K95-12-18)

* Tel: (025) 3307598, Fax: (025) 6631604

难分离物质对并跟踪优化,当其峰高分离度(K_3)达到一定要求时即可终止优化过程;但若实际分析中最难分离物质对随分离条件的不同而改变,则应使所有组分均达到适宜的分离^[1]。

2.3 广义 HCRF 我们在分析氯苄律定有关物质时发现,由于原料的质量差异导致某些产品中出现一个未知副产物(I)。由于副产物也属于有关物质,其分离状况应在优化考察范围内;但由于 I 的结构和性质未知,不应在判定最难分离物质对时考虑而应分别考虑。为此我们在 HCRF 基础上进行了推广,兼顾已知组分中的最难分离物质对和未知组分的分离,提出了广义 HCRF (generalized HCRF, $gHCRF$), 其表达式为:

$$gHCRF = 100\,000 \times n + 10\,000 \times [f(x_1) + f(x_2) + \dots + f(x_n)] + (100 - T) \quad (2)$$

$f(x)$ 是反映某一物质对分离状况的函数,只要在色谱图中出现肩峰,可以计算出峰高分离度(K_3)时, $f(x)$ 可用 K_3 代替,即为表达式(1)的情况;存在未知杂质时,由于杂质太少且无纯品对照,在色谱图上可能难以计算分离度,此时 $f(x)$ 可用保留时间的函数反映未知杂质与相邻色谱峰之间的分离状况。氯苄律定有关物质的分离应采用 $gHCRF$ 优化指标,

$$gHCRF = 100\,000 \times n + 10\,000 \times [K_3 + f(I)] + (100 - T) \quad (3)$$

3 球面对称设计

球面对称设计(spherical symmetric design)为一种精度较高的并行优化法,试验点均匀分散且具有代表性,因此只需较少的实验即可获得较佳的实验条件^[3,4]。由于未知副产物 I 的纯品尚无法获得,实验中的样品为氯苄律定产品(含有 I)与 B, THB 和 pCl 3 种有关物质按一定比例配成的混合溶液。

按照球面对称设计,影响氯苄律定有关物质色谱分离的两个主要因素(x_1 : 甲醇比例; x_2 : 离子对试剂 $HClO_4$ 浓度)的取值见表 1, 各次实验的色谱图反映的信息分别用 HCRF 和 $gHCRF$ 表示(表 1), 分别按(1)和(3)式计算。 n 为色谱图中出现的峰数(不考虑溶剂峰), HCRF 只考虑氯苄律定, B, THB 和 pCl 4 种已知组分, 而 $gHCRF$ 考虑包括未知物 I 在内的 5 种组分。 K_3 为已知组分中最难分离物质

对的峰高分离度($0 \leq K_3 \leq 1$)。

$$f(I) = 1 - \left| \frac{t_R(I+1) - t_R(I)}{t_R(I+1) - t_R(I-1)} - 0.5 \right| \quad (0.5 \leq f(I) \leq 1)$$

其中, $t_R(I)$ 、 $t_R(I-1)$ 和 $t_R(I+1)$ 分别代表 I 以及与 I 前后相邻的色谱峰的保留时间(min), $f(I)$ 取值大小可反映 I 与相邻峰之间的分离状况。如果色谱图中不出现 I, 说明 I 与相邻峰发生了重叠, 即 $t_R(I) = t_R(I-1)$ 或 $t_R(I) = t_R(I+1)$, 此时分离状况最差, $f(I)$ 取值最小($= 0.5$); 若 I 位于 I-1 和 I+1 中间, 分离最佳, $f(I)$ 取值最大($= 1$)。T 为分析时间, 以最后一个出峰组分的保留时间代替, 虽然 ($T - 100$) 的变化对 HCRF 和 $gHCRF$ 值影响很小, 不影响计算, 但在实际分析中该项的变化对判断条件的可行性十分重要, 不能忽略。

实验最优解为第 5 号试验所对应的分离条件: 甲醇 75%, $HClO_4$ $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, 此条件下样品的色谱图见图 1, 各组分均达到了有效分离。

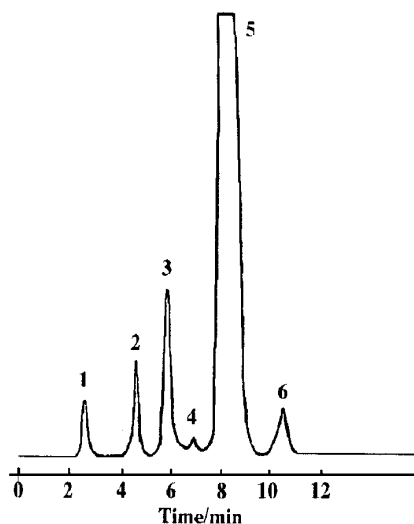


Fig 1 Separation of chlorobenzylidene and its related compounds. Column: YWG C_{18} (250 mm \times 4.6 mm ID, $10 \mu\text{m}$); mobile phase: methanol - water (75: 25), containing $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1} HClO_4$, with pH 3.5 adjusted by sodium hydroxide. 1. Solvent: methanol; 2. Tetrahydro berberine; 3. *p*-Chlorobenzyl chloride; 4. By-product I; 5. Chlorobenzylidene; 6. Berberine hydrochloride.

Tab 1 Experimental design and experimental results in spherical symmetric design

No.	Factors in coded form		Experimental values	
	x_1 / %	x_2 / mol·L ⁻¹	HCRF	gHCRF
1	68	0.044	210091	318591
2	68	0.016	310085	419985
3	82	0.044	306195	306195
4	82	0.016	310093	417393
5	75	0.01	410088	519388
6	75	0.05	302393	410793
7	65	0.03	308187	308187
8	85	0.03	305295	305295
9	75	0.03	210094	307594

结 果

为了进一步阐明色谱响应值与影响因素之间的内在关系,我们对以上试验数据进行了关系式模拟,对模拟的回归方程求最优解,并用试验加以验证。如果试验结果表明方程最优解确为真实的最佳条件或与之相近,则说明方程可信,可用于实验条件的预测,优化过程是成功的。反之,如果方程最优解并非实际的最佳条件或与之相去甚远,则优化过程是失败的,并无实际的指导意义。

关系式模拟 在一般的反相离子对色谱中,响应值(Y)与影响因素(x)之间的关系可表示为:

$$Y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{12} x_1 x_2 \quad (4)$$

分别以 HCRF 值和 gHCRF 值作为响应值进行多项式回归,得以下两个回归方程:

$$\begin{aligned} \text{HCRF} = & 5.2653 \times 10^6 - 1.1977 \times 10^5 x_1 - \\ & 3.9493 \times 10^7 x_2 + 7.6029 \times 10^2 x_1^2 + \\ & 3.1382 \times 10^8 x_2^2 + 2.4514 \times 10^5 x_1 x_2 \quad (5) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{gHCRF} = & 1.7507 \times 10^5 + 1.4633 \times 10^4 x_1 - \\ & 2.3705 \times 10^7 x_2 - 9.4807 \times 10 x_1^2 + \\ & 3.7217 \times 10^8 x_2^2 - 2.5010 \times 10^4 x_1 x_2 \quad (6) \end{aligned}$$

在两参数的取值范围内(x_1 : 65 ~ 85; x_2 : 0.01 ~ 0.05)求解以上两回归方程的极大值并用试验加以验证。方程(5)的极大值(HCRF = 488159)所对应的实验条件下($x_1 = 65$, $x_2 = 0.01$),各组分不能有效分离,方程预测不可信;方程(6)的极大值(gHCRF = 520763)对应的理论最优解($x_1 = 76$,

$x_2 = 0.01$)与实验最优解($x_1 = 75$, $x_2 = 0.01$)的分离状况十分接近,方程预测合理。实验中为方便流动相的配制,我们采用(75, 0.01)为最终的流动相组成。

讨 论

串联多因素色谱响应函数(HCRF)的基本思想是:在保证最难分离物质对具有适宜分离度前提下,分析时间越短越好。在混合物中各组分均已知而且只有一组最难分离物质对的情况下,HCRF作为优化指标所得结果是令人满意的。如果混合物中不只是一组最难分离物质对,或最难分离物质对随实验条件而发生改变时,固定一组物质对进行优化所得的最优条件可能并非对所有组分而言的最佳条件。这种情形在含有未知组分的样品中更容易发生,因为未知物的结构和性质未知,条件的改变对其分离的影响很难预测。对这些组成比较复杂的混合样品的分析,本文在 HCRF 基础上进行推广和延伸,首次提出了新的优化指标 gHCRF,对所有难分离物质对以及未知组分同时加以考虑,所得的优化结果应比单独考虑某一组物质对更全面。应用于氯苯律定样品有关物质的分离分析,gHCRF在研究和探索色谱分离的内在规律时显示出优越性,表明 gHCRF较 HCRF更能反映这类复杂样品的实际分离情况。

优化指标 gHCRF 为首次提出,其理论严谨性和实验设计的周密性有待于进一步探讨和研究。

References

- 1 Zou Hanfa, Zhang Yukui, Lu Peizhang. *Ion-pair High Performance Liquid Chromatography*. Zhengzhou: Henan Science and Technology Publication. 1994. 152 ~ 162
- 2 Xiang Bingren. *Computer Assisted Pharmaceutics*. Beijing: China Medical Science and Technology Publication. 1990. 189 ~ 204
- 3 Sheng HL(盛海林), Tu JS(涂家生). Application of spherical symmetric design in pharmaceutics. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1996, 27: 211
- 4 Guillaume Y, Guincharde C. Method to study the separation of eight *p*-hydroxybenzoic esters by gas chromatography. *J Chromatogr A*, 1996, 727: 93

APPLICATION OF OPTIMIZATION PARAMETER gHCRF IN THE HPLC SEPARATION OF CHROLOBENZYLIDINE AND ITS RELATED COMPOUNDS

Li Cheng(Li C) , Ni Kunyi(Ni KY)¹ , Yu Jian(Yu J)¹ , Huang Fang(Huang F)¹ and Zhu Shiqian(Zhu SQ)¹

(Jiangsu Province Institute for Drug Control , Nanjing 210008 ;

¹Department of Analytical Chemistry , China Pharmaceutical University , Nanjing 210038)

ABSTRACT AIM: The generalized HCRF (gHCRF) was proposed as a new optimization parameter based on heterogeneous chromatographic response function(HCRF) , and was first used in the HPLC separation of chrolobenzylidene and its related compounds . **METHODS:** By use of Spherical Symmetric Design , optimization was made on the two factors (x_1 : methanol concentration; x_2 : perchloric acid concentration) which affected the chromatographic separation . The equations simulating the relationship between response values and factors were setup . **RESULTS:** The theoretical optimal condition from gHCRF equation is $x_1 = 76\%$ and $x_2 = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which is very much close to the experimental optimal condition ($x_1 = 75\%$ and $x_2 = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) . Therefore , the prediction from the equation is reasonable . **CONCLUSION:** The separation of chrolobenzylidene and its related compounds showed that the gHCRF parameter can be satisfactorily applied to the chromatographic optimization of complex samples .

KEY WORDS chrolobenzylidene ; chromatographic optimization ; generalized heterogeneous chromatographic response function(gHCRF) ; spherical symmetric design