

二极管阵列检测器在色谱峰纯度鉴定中的应用研究

胡育筑 康继宏 郁建 黄芳 杜迎翔 陈文佳

(分析化学教研室)

摘要 研究了二极管阵列检测器在色谱峰纯度鉴定中的应用,将比率色谱法和主成分分析法应用于几个混合药物实例。结果表明,这两种方法能够正确判断色谱保留几乎完全相同、紫外光谱不同的 2~3 组分混合物的色谱峰纯度,并对这两种技术在重迭色谱峰纯度鉴别中的应用及其实验条件等进行了讨论,比较了其特点和优缺点,总结了规律,为其在实际工作中的应用进行了探索性的研究。

关键词 色谱峰纯度;二极管阵列检测器;比率色谱法;主成分分析法

在色谱分析中,研究色谱峰的纯度鉴定方法对复杂物质的分离分析有着重要的意义^[1-3]。国内应用导数色谱法鉴定峰纯度的研究已有报道^[4,5],该法基于固定波长下检测不同组分色谱流出曲线的差异性,但对保留相同或几乎相同的体系显然是无能为力的。近年发展起来的高效液相色谱二极管阵列检测器的应用和普及为色谱峰纯度的检查提供了有效的检测手段,但国内实际应用的研究报道尚不多见。

二极管阵列检测器(Diode-array detector,简称 DAD)^[6,7]采用二极管阵列元件,能够获得“在流”的全部光谱信息,快速得到色谱峰组分的吸收光谱,其重现性好,灵敏度高。应用 DAD 检查色谱峰纯度常用的方法有比率色谱法、窗口法、光谱抑制法、导数光谱法、主成分分析法等。而这些方法的实验技术及特点未能被色谱工作者熟悉因而限制了它们的实际应用。本研究应用 HP-1050 仪器配置的二极管阵列检测器通过对实际样品的测定,对其中比率色谱法和主成分分析法的应用技术及实验条件等进行了探索性的研究,比较了两种方法的特点和局限性,总结了一些基本规律。

比率色谱法(Ratio-gram method)^[8,9]是一种利用 DAD 的多信号功能对色谱峰纯度进行定性的方法。该法根据纯物质在两特定波长下的吸收比是个常数,且与浓度无关的原理,以比率色谱图作为色谱峰纯度的检查指标。纯物质的比率色谱为方波形,而杂质的存在将使比率色谱变形。

主成分分析法(Principle component analysis,简称 PCA)是一种处理多组分信号的化学计量学方法,常应用于多元混合物的紫外光谱测定及多变量统计分析中主成分信息量的提取^[10]。Maeder^[11],Gemperline^[12]和 Keller^[13]曾研究将该法用于色谱峰纯度的鉴别。利用二极管阵列检测器收集不同时刻的光谱数据,建立色谱光谱数据矩阵,就可根据 PCA 法确定出主成分和经过标准化处理的数据矩阵之间的因子载荷矩阵,进而建立起主成分的数学模型,并根据一定的规则确定因子数目,即测定样品中的组分数。主成分分析的数学模型如下:

$$Z = A \times F$$

其中:Z 为标准化数据矩阵,A 是因子载荷矩阵; $F = [F_1, F_2, \dots, F_m]$, $F_1, F_2 \dots F_m$ 是 m 个新的标准化变量(称为主成分)。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

HP1050 高效液相色谱仪; 色谱柱 (Spherisorb C18, 5 μm , I. D. 4.6 mm $\times$ 150 mm, 中国科学院大连化学物理研究所); 微型计算机 (长城 0520DH); H66025T 超声清洗机; 6# 砂芯漏斗; Shimadzu 2100 紫外分光光度仪; 化学试剂均为分析纯; 实验用水为重蒸馏水。

1.2 计算机软件 系用 BASIC 语言自编。

1.3 样品液的配制

分析用样品均由本教研室提供。肉桂酸、氟胞嘧啶、苯甲酸、咖啡酸、3,4-二羟基苯甲酸用甲醇溶解稀释至适当浓度; 诺氟沙星、环丙沙星用少量稀盐酸溶解, 用蒸馏水稀释至适当浓度。

1.4 色谱条件

流动相为 I: 100% 甲醇; II: 甲醇-水-三乙胺 (50: 50: 0.4), 磷酸调至 pH=5.5。流速 1.00 ml/min; 进样量 5 μl ; 柱温为室温。

1.5 实验步骤

1.5.1 比率色谱法

扫描样品中各组分的紫外光谱图。根据

紫外图谱, 选择出 3~5 组波长对, 并估计样品中各组分在选出波长对下的吸收比值 (ratio)。

根据估计的吸收比值设置 THRSH 和 Range。THRSH 值的设置应从小到大, Range 的范围则从大到小。用标准品在各组波长对下分别作实验, 选出每组波长对的最佳 THRSH 和 Range, 根据结果确定优化的实验波长对。取样品在优化条件下进行实验。

1.5.2 主成分分析法

扫描样品中各组分的紫外光谱图。根据紫外图谱, 选择合适的测定波长, 使物质及可能杂质的信号都较大, 然后在所选波长下进样, 记录组分的保留时间。设置时间程序 (time table), 即在色谱峰的前沿、峰顶和峰尾处分别设置一定的时间点。用样品进行试验, 记录各时间点利用 DAD 记忆的光谱, 以得到样品的色谱光谱数据矩阵。应用自编程序计算得到样品中组分的数目。

2 结果和讨论

2.1 比率色谱法

2.1.1 样品的测定条件见表 1, 实验结果见图 1~3。

Tab 1. The determination conditions for testing examples

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Component		Cinnamic acid 0.01 mg/ml	Flucytosine 0.01 mg/ml	Norfloxacin Ciprofloxacin 0.01 mg/ml	Caffeic acid, Benzoic acid 3,4-dihydroxy benzoic acid 0.01 mg/ml
Mobile phase		I	I	I	I
General gram	Detection λ	273 nm	276 nm	277 nm	220 nm
	(Bandwidth)	(4 nm)	(4 nm)	(4 nm)	(4 nm)
	Reference λ			450 nm	
	(Bandwidth)			(80 nm)	
Peakwidth	Peakwidth			>0.05 min	
	(Resptime)			(1 s)	
Ratio gram	λ pair	273/290	276/255	277/255	220/240
	THRSH	5 mAU	5 mAU	1 mAU	2 mAU
	Range	1.0~5.0	0.5~5.0	3.5~7.0	1.0~5.0

2.1.2 从图 2 可见, 样品 1~4 的色谱峰表观上均为纯峰。图 3(a)和(b)中单组分肉桂酸和氟胞嘧啶的比率色谱图呈规则方波形, 反映了纯物质比色谱的特点。图 3(c)和(d)

显示了不纯峰的比色谱特点。图 1(c)中诺氟沙星和环丙沙星的光谱几乎完全一致, 它们在 277 nm 的吸收度有所差别, 而在 255 nm 的吸收度却一致, 因而以 277/255 作为波长

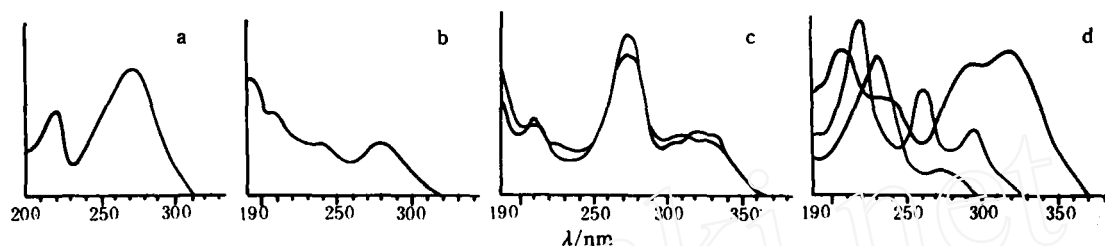


Fig 1. General UV spectra. (a)~(d) corresponds to the sample 1~4 in Tab 1.

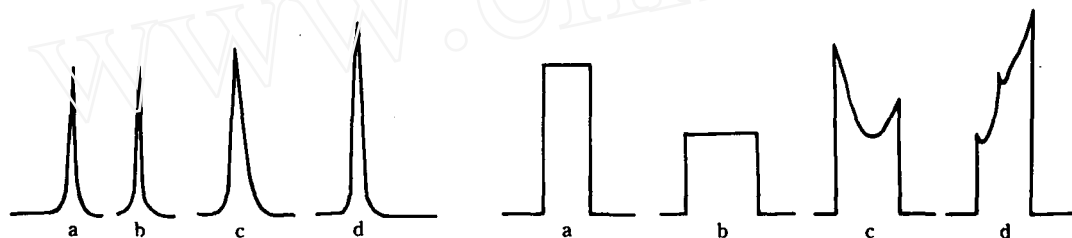


Fig 2. General chromatograms. (a)~(d) see Fig 1.

Fig 3. Ratio chromatograms. (a)~(d) see Fig 1.

对,由于诺氟沙星和环丙沙星的吸收比不同而使混合物的比色谱图 3(c)呈现非方波形。图 3(d)是能形成单一峰的三元体系的比色谱。

2.1.3 对于纯物质来说,两个特定波长处的

吸收比为一常数,且与浓度无关,其比色谱为方波形(有规则的弧形曲线是由于噪声、基线漂移等允许的检测误差造成的),如图 4。而各组分吸收特性有区别的二元或三元体系呈图 3(c)和(d)的形状。

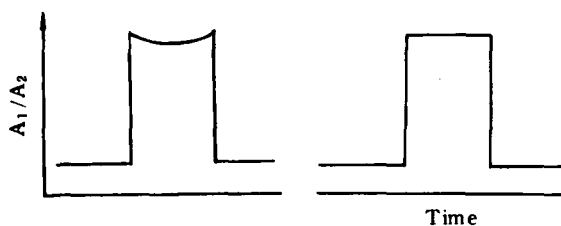


Fig 4. Ratio chromatograms for pure substance

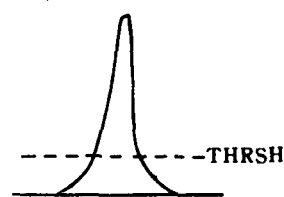


Fig 5. Illustration of THRSH

2.1.3 利用比率色谱法进行峰纯度的定性时,通常第一个波长选择在有较强吸收的位置,所选波长对应使杂质的吸收度比和测定主成分的吸收度比明显不同,同时兼顾杂质的吸收较大,以便获得足够的信息量,使对杂质的检测达到一定的灵敏度,并可减少噪声等随机因素的干扰。

2.1.4 应用比率色谱法鉴定峰纯度时,需设定两参数:THRSH(阈值)和 Range(比率范围)。阈值的物理意义见图 5。

实际测定时,只有当吸收度大于此阈值才开始计算两波长处的比值。

Range 是指设置的比率范围。只有当实际 ratio 值落在设置的 Range 内时,比色谱才随 Ratio 的改变而发生相应的变化,反映出色谱峰纯度的实际情况。

阈值 THRSH 和比率范围 Range 的设定值常影响杂质的检出。THRSH 太小,则比色谱受噪声的影响较大,纯物质的比色谱有可能呈现出类似于不纯峰的比色谱;反之,若过大,对于微量杂质来说,杂质的吸收度有可能小于阈值而使不纯峰呈现为纯峰的比色谱。同理 Range 若设置得偏大,则比色谱的峰高减小,测定灵敏度降低。

2.1.5 比率色谱图的峰高和峰宽亦随某些因素的影响而发生变化。峰高同浓度无关,同实际比率值有关,但不成正比,其大小主要由设置的 Range 决定,在下限一定的情况下,Range 越大则峰高越小。峰宽与样品浓度、进样量、设置的阈值 THRSH 有关,随进样量和浓度增大及设置的阈值变小而增大。

2.1.6 应用比率色谱法鉴定峰纯度时其结果受到样品特性和实验条件的影响。因此在实际测定时,有条件时应用主成分和杂质的标准品通过实验选择测定波长对、THRSH 和 Range 等,然后根据优化选择的实验条件测定实际样品。

2.2 主成分分析法

2.2.1 应用主成分分析法的实验条件见表 1,结果见表 2。

Tab 2. The results by PCA

Matrix size	Sample(same to Tab. 1)			
	3×5	3×5	5×5	7×9
M	1	1	2	3
Assigned K_R	0.99	0.99	0.99	0.95

这里, M 是计算得到的主因子数,即所求的组分数。 K_R 是计算得到的 M 个主成分占总信息量的百分数。

2.2.2 主成分分析法用于对色谱峰纯度的鉴定要求各组分光谱间有足够的差异,以保证色谱光谱数据矩阵的正定性,即各光谱必须线性独立,否则无法得到正确的结果。换句话说,若杂质和主成分的光谱、普通色谱图完全一致,则本法不能对其色谱峰的纯度进行定性。

选择的测定波长应使主成分和杂质的吸收波长都较大,从而保证对杂质检测的灵敏度,同时应尽量远离 200 nm,以减小末端吸收噪音的误差。本研究图 1(d)三组分的实例中测定波长选在了 220 nm,这是为了兼顾到使三组分的吸收度都较大且有足够的差异,以保证有足够的信息量。

2.2.3 表 2 中“matrix size”是指时间点的数目×波长点数目,即所取数据矩阵的行和列

的数目。

时间点应选取得比较均匀且数目足够多,以保证测定结果的准确性与灵敏性,限于仪器的光谱记忆能力,时间点数一般取 3~10 点。测定波长数目的选择也应考虑到分析体系的复杂程度。从表 2 可知,随组分数增加,测量数目也应增多以保证足够的信息量。在不同时间点的光谱图上取值时,可不必对应于同一波长,只要每个光谱图所取波长点总数相等即可。

2.2.4 设置的 K_R 值的大小代表了计算得到的组分数所占总信息量的比例。由于不同物质的检测灵敏度不同,故 K_R 取值也不同。在检测杂质时,若杂质的含量较少,或杂质同主成分光谱比较相似,则 K_R 值应取得较大些,一般为 0.95~0.99,即 M 个主成分可包含 95~99% 信息量。

2.2.5 本研究所用 HP-1050 高效液相色谱仪不能直接给予每个时间点光谱各波长的信号值,需从贮存数据绘制的光谱图上手工量测吸收度。

2.3 小 结

由以上实验结果可知,借助于二极管阵列紫外可见检测器的特性用比率色谱法和主成分分析法鉴别色谱峰的纯度,有效简便,可望得到广泛应用。

比率色谱法同主成分分析法相比,前者能以比率色谱图的形态反映峰的纯度,简便快速,但所受的影响因素较多,可靠性稍差;后者可直接计算出组分数,准确度较好,但略嫌繁琐,且受着光谱必须线性独立的限制。这两种方法都可在无须对峰形、位置及组分数进行假设的情况下确定重叠色谱峰中的组分数。但在实际应用中,对这两种方法的使用一般要根据实际情况选择某些实验参数,以保证结果的准确性。

本研究仅仅对组分配比基本固定的 1~3 组分混合物应用以上两种方法进行了定性测量,对杂质的检测限、定量限及定量方法的

研究正在进行。

参考文献

- 1 Grant A, Bhattacharyya PK. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J Chromatogr*, 1985;347:219
- 2 Marr JGO, Horvath P, Clark BJ, et al. Assessment of peak homogeneity in HPLC by computer-aided photodiode array detection. *Anal Proc*, 1986;23:254
- 3 Marr JGD, Seaton GGR, Clark BJ, et al. Multiple absorbance ratio correlation - a new approach for assessing peak purity in liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1990;505:289
- 4 吉宁, 高国强, 陈玉英. 导数色谱法鉴定高效液相色谱峰纯度. 中国药科大学学报, 1991;22(5):295
- 5 吉宁, 高国强, 陈玉英等. 导数色谱法在色谱峰纯度鉴定和定量分析方面的应用. 中国药科大学学报, 1993;24(2):112
- 6 Huber L. *Application of Diode-Array Detection in HPLC*. France: Hewlett-Packard Co., 1989
- 7 张志荣. 现代仪器联用分析. 成都科技大学出版社, 1989;62-71
- 8 White PC and Cattick T. Evaluation of absorbance ratioing for solute identification in HPLC using a diode array detector. *J Chromatogr*, 1987;402:135
- 9 Warren FV and Bidlingmeyer BA. Selection of wavelengths for absorbance ratio monitoring in liquid chromatography. *Anal Chem*, 1987;59:1897
- 10 相秉仁. 计算药理学. 北京: 中国医药科技出版社, 1990
- 11 Macder M. Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks. *Anal Chem*, 1987;59:527
- 12 Gemperline PJ and Hamilton JC. Conditions for detecting overlapped peaks with principal component analysis in hyphenated chromatographic methods. *Anal Chem*, 1989;61:2240
- 13 Keller HR and Massart DL. Peaks purity control in liquid chromatography with photodiode-array detection by a fixed size moving window evolving factor analysis. *Anal Chem Acta*, 1991;246:379

Application Studies on Chromatographic Peak Purity with Photodiode-array Detection

Hu Yuzhu, Kang Jihong, Yu Jian, Huang Fang, Du Yingxiang, Chen Wenjia

Department of Analytical Chemistry

The application studies of chromatographic peak purity with photodiode-array detection were described. Two methods, i.e., ratio gram method and principle component analysis, were applied for four kinds of samples containing from 1 to 4 components. The results show that both methods can identify the peak purity and be useful for the practical work. The experimental techniques were discussed in detail.

Key words Chromatographic peak purity; Photodiode-array detection; Ratio gram method; Principle component analysis

中国药科大学师资培训中心面向全国招生

中国药科大学是我国唯一的综合性药科大学, 设置药学、英语药学、药物制剂、药物分析、药理学、化学制药、药物化学、生物制药、微生物制药、中药学、中药制剂、中药鉴定、中药药理学、医药企业管理、医药国际贸易等专业及专业方向。为了适应医药教育事业发展的需要, 新设了师资培训中心, 面向全国各类医药院校培训药学类各专业本科、大专、中专及职工学校的师资人才及各课程主讲教师, 接受高级访问学者, 培训年限 1~2 年, 经考核合格, 由中国药科大学核发结业证书。培训形式采取国内访问学者、师资培训班, 单科进修等形式。具体事宜请与中国药科大学教务处师资培训中心联系。地址: 江苏省南京市童家巷 24 号。邮编 210009。电话 (025) 6635528。图文传真 (025) 3302827。