

## · 综 述 ·

## 化学计量学在色谱优化中的应用

黄河舟, 黄 晟, 谷 莉, 柴逸峰(第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要 目的:**近年来,化学计量学的许多方法被广泛应用于色谱优化,并在多方面取得了满意效果。本文对化学计量学在色谱优化中的应用作一综述,供研究者参考。**方法:**查阅国内外文献。**结果:**化学计量学的多种方法近年来在色谱的优化中得到了广泛的应用。**结论:**化学计量学的使用使色谱分离的优化更加系统科学、有效。

**关键词** 化学计量学; 色谱; 优化; 响应函数;

**中图分类号:**R917 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-0111(2003)06-0323-04

色谱过程中流动相比、pH、流速、温度等各因素的变化综合起来会对分离效率和结果产生复杂的影响,选择一个优化的实验条件进行分离分析是提高色谱分析精密度、重复性和改善定量准确性的重要前提。要在众多的影响因素(factor)中找出较优的参数组合,需要科学合理地安排实验,以达到减少实验次数、缩短实验周期、提高经济效益的目的,同时尽量能对最佳方案的实验结果进行预测。国外这方面的研究已实现工程化,得到了相当程度的重视;国内近年来这方面的研究亦日益增多。

化学计量学(Chemometric)是将统计学、数学和计算机技术结合,设计或选择最优分离测量条件,通过分析化学数据获取最大限度的信息的一种方法。在色谱优化中大量应用了化学计量学方法。

### 1 色谱响应函数

一般对色谱图的直接观察仍然是评价一次色谱分离好坏的主要方法。我们可以直接确定分离度和分离时间为个人评价色谱图质量的因素,但其主观分析的结果无法为系统优化的算法所直接使用,因为这些算法需要一个对分离结果评价的数字表示。响应值(response)就是根据一个实验的各项结果综合考虑得出的一个对该方法进行总体评价的指标,如色谱分析中的分离度、理论塔板数等,通常也叫做目标函数。响应函数对优化过程至关重要,指导着优化过程的前进方向和最终结果。好的响应函数能客观反映色谱图之间的相对优劣,使优化顺利进行。常用的色谱响应函数有:

1. Glajch 等人提出了 COF 函数:  $COF = \text{Log}$

$(\sum R_i)$ , 其中  $R_i$  为每对峰的分度<sup>[1]</sup>。

2. Morgan 和 Deming 提出了 CRF 函数:  $CRF = \sum(\text{Log } R_i)$ <sup>[1]</sup>

3. T. D. SchLabach 等人提出了 CRS 函数<sup>[1]</sup>

$$CRS = \left\{ \sum (R_i - R_{opt})^2 / [R_i (R_i - R_{min})^2] \right\} + \sum R_i^2 / [a(R_i)]^2 \{ (T_i / n) \}$$

其中  $R_{opt}$  是预定的实现完全分离的分度,  $R_{min}$  是可以接受的最低分度,  $R_a$  为分度均值,  $a$  为分度的个数,  $T_i$  为分离时间,  $n$  为峰数。

COF 函数与 CRF 函数均未考虑分离时间的缩短对分离结果的改善, CRS 函数充分考虑了分度和分离时间对色谱图的贡献。

4. 卢佩章等针对 CRF 和 COF 的局限性提出了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<sup>[2]</sup>:

$$HCRT = 100\,000 \times n + 10\,000 \times K_3 + (100 - T)$$

房程等在 HCRF 函数基础上提出了广义 HCRF 函数 gHCRF 并用于氯苯律定有关物质的优化分离<sup>[2]</sup>。

### 2 色谱优化方法

色谱优化中应用到的化学计量学方法大体来讲可以归结为科学实验设计和系统优化求最优解两种途径。

**2.1 实验分组设计** 实验分组设计研究如何科学地安排实验,以最少的实验次数取得最多的有关样品的分析信息。从这些信息出发,就可以找出最佳的实验条件。若实验安排得不好,则只能找到局部

**基金项目:**上海市科技发展基金项目(01DJ19012) **作者简介:**黄河舟(1976~),男,硕士研究生 \* **通讯作者:**柴逸峰, Tel: (021) 25070373. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

最优化条件或根本找不到最优条件。分组设计应遵循重复、随机化、区组化的原则。典型的方法有因子分析(主成分分析、部分因子分析、目标因子分析、偏最小二乘法)、正交设计、中心组成设计、均匀设计等。

**2.1.1 主成分分析(principal component analysis, PCA)** 由于影响实验的各因素之间存在交互干扰作用,使得多因素多水平实验条件和结果的分析变得很复杂。主成分分析可以将原来众多且相关的因素之间包含的信息集中到少数几个互相独立的综合因素之中,减少实验参数的数目。

**2.1.2 PLackett-Burman 实验设计** PLackett-Burman 实验设计方法是一种部分因子设计方法。它在扫描一系列潜在的参数影响时较为有效,可以检测出实验主要影响因素。该设计的主要缺点之一是假定所有影响因素之间交互干扰作用可以忽略<sup>[3]</sup>。

**2.1.3 正交设计(the orthogonal design)** 正交设计是根据正交表确定实验各影响因素各水平的组合方式,以此方案进行实验并对结果进行统计分析,得出最优化实验条件。正交设计也是一种非全面实验设计方案,但具有很好的均衡分散性(因素之间搭配均匀,实验点分布均衡),同时可以方便地比较因素各水平的效应。采用 1/2 实施方案,只需完全因子分析一半的实验次数,1/4 实施只需完全因子分析 1/4 的实验次数。因此,当实验次数较多时,采用正交设计可以成倍地减少实验次数。该设计假定所有的影响因素之间没有或只有一阶的交互干扰作用<sup>[4]</sup>。

嵇岩然等用本法优化了二维气相色谱柱效利用率操作条件<sup>[5]</sup>。

**2.1.4 中心组成设计(central composite design, CCD)** 中心组成设计常被用于系统条件优化,在有多种相互干扰的不同因素的情况下,提供了一条快速优化实验条件的有效途径。有时在研究的开始阶段可以使用 PLackett-Burman 设计来进行初步的条件优化,然后再根据得到的结果进行中心组成设计以进一步优化<sup>[3]</sup>。

P. Dehouck 等人使用本方法优化了氯洁霉素的 MEKC 分离<sup>[6]</sup>。

此外,林渭海等通过窗图最优化法优化分离了残留农药的气相色谱分离<sup>[7]</sup>。

**2.2 系统优化求解** 该类型优化算法一般是根据若干组预设初始条件和相应的响应值,经系统优化算法预测实验条件的优化方向,得出可能的优化条

件,测量其响应值;优化算法根据新的数据进行下一轮优化预测,反复进行后得到最优实验条件。相应的代表方法为单纯形法、遗传算法等。

**2.2.1 单纯形法(Simplex)** 单纯形法(见图 1)是一种系统优化算法,通过在初始单纯形 GHIL 的各个顶点上进行实验,对各顶点的实验响应值进行比较,判断其变化趋势,作为下一步的实验条件参考。通过反射变换使单纯形不断移动到响应较好的区域(R),直至按照预定的精确度充分接近最优顶点。单纯形法无需考虑各实验参数之间的交互关系<sup>[4]</sup>。其缺点在于需要很多次实验(一般 10~15 次,有时多达 30 次<sup>[8]</sup>)才能得到优化结果,而且得到的可能只是一个局部的优化条件<sup>[4]</sup>。很多研究者对单纯形法进行了大量研究工作,提出了许多改良算法,如改良型单纯形法、超改良型单纯形法等。

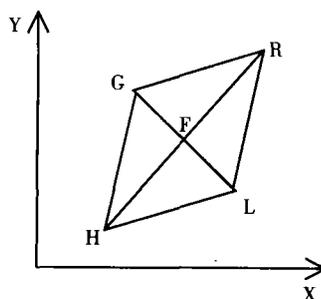


图 1 单纯形状优化示意图

单纯形法在山梨醇和甘露醇的大型工业液相色谱分离优化<sup>[9]</sup>、PTC 氨基酸的毛细管胶束电动色谱分离优化<sup>[10]</sup>、尿中美芬妥英的手性色谱分离<sup>[11]</sup>、双柱循环色谱分离过程的最优化<sup>[12]</sup>中均得到了满意的结果;周炜等用均匀设计,以改进加权单纯形法为手段,研究了藿香挥发油薄层色谱溶剂系统的最优化<sup>[13]</sup>。

**2.2.2 遗传算法(Genetic Algorithm, GA)** 遗传算法是进化算法(Evolutionary Computation, EC)的一个分支,是借鉴了生物界自然选择和进化机制发展起来的一种高度并行、随机、自适应的搜索算法。简单而言,它使用了群体搜索技术,通过编码操作(coding)使用种群(population)代表一组问题解,通过对当前种群施加选择(selection)、交叉(crossover)和变异(mutation)等一系列遗传操作,从而产生新一代的种群,并逐步使种群进化(evolution)到包含近似最优解的状态,最后通过解码操作(decoding)得出问题的近似最优解<sup>[14]</sup>。

应用遗传算法求解时,在编码方案、目标函数和遗传算子确定后,算法将利用进化过程中获得的信息自行组织搜索,因而具有能根据环境变化来自动

发现环境的特性和规律的能力。遗传操作中使用的自然选择消除了一般算法设计过程的一个最大障碍,即需要实现描述问题的全部特点,并要说明针对问题的不同特点算法应采取的措施。因此,遗传算法可以解决许多复杂的非结构化的最优化求解问题<sup>[14]</sup>。

蔡宇杰等用基于浮点编码的遗传算法优化了木糖酵母液的色谱分离<sup>[15]</sup>;陈学国等将基于线杂交和面变异的遗传算法用于等度反相色谱多元流动相分离条件的优化,并用于 9 种小肽的反相离子对的分 离,优化结果理想<sup>[16]</sup>。

**2.2.3 人工神经网络优化 (artificial neural networks, ANN)** 人工神经网络是一种由大量简单处理单元紧密联系起来组成的一种数据处理网络(见图 2),是模拟人类大脑神经网络的结构和行为的一种数据处理系统。它由具有一定层次结构的神经元组成,包括输入层、隐藏层和输出层。网络经过已知样本的“训练”之后就可以对最优化实验条件作出预测判断,经反复反馈-预测过程达到最优解。该方法无需预先了解对各项实验参数之间的关系即可实现优化。Havel 等人对神经网络在毛细管电泳色谱中的优化作了一系列工作。

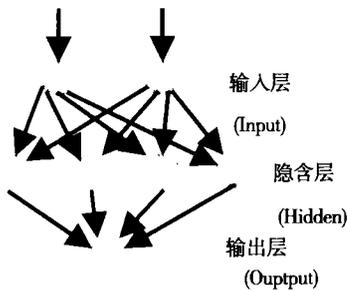


图 2 神经网络示意图

朱萍等使用非线性输入前向人工神经网络对热解吸-气相色谱实验条件优化进行了研究,得到了满意的结果<sup>[17]</sup>;陈祥光等通过引入模拟辅助样本分析 2-吡啶醇的液相行为,改善了 BP 网络的泛化能力和预测精度<sup>[18]</sup>。

**2.2.4 其他优化方法应用**柳文媛等用逐步登高法优化了黄芩中黄芩素、汉黄芩素的色谱测定方法<sup>[19]</sup>;靳颖华等用复合形法对薄层色谱溶剂系统进行了优化<sup>[20]</sup>;王静馨用模式识别法优化了反相液相色谱等度分离条件<sup>[21]</sup>。

**3 前景与展望**

化学计量学近年来在光谱、色谱优化中取得了很大的成功,成为色谱优化极其有效的工具。通过化学计量学优化可以最大限度提高色谱的分离能

力,改善其精密度和重复性。同时,化学计量学在色谱中的应用也会促进化学计量学本身的发展,促进新的化学计量学方法的产生。

**参考文献:**

[1] TD Schlabach, JL Excoffier. Multi-variate ranking function for optimizing separations[J]. J Chromatogr, 1988, 439:173.

[2] 房程,倪坤仪,郁建,等.优化指标 gHCRF 在 HPLC 分离氟苯律定有关物质中的应用[J]. 药学学报, 1999, 34(10): 772.

[3] AM Siouffi, RPhan-Tan-Luu. Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 892:75.

[4] 相秉仁. 计算药理学[M]. 中国医药科技出版社, 1990, 189.

[5] 嵇岩然,李国靖,于景阳. 二维气相色谱柱效利用率操作条件优化与分析[J]. 齐齐哈尔大学学报. 2002, 18(3):173.

[6] P. Dehouck. Analysis of clindamycin by micellar electrokinetic chromatography with a mixed micellar system[J]. J. Chromatogr A, 2001, 932:145.

[7] 林渭海,崔素萍,宋玉华. 气相色谱最优化分离多种有机氯、有机磷农药的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(4):19.

[8] Eric Peyrin, Yves Claude Guillaume. Chemometric approach to the treatment of benzodiazepine separation and peak broadening in capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 1999, 849:563.

[9] 刘唐书,舒文利,徐清才,等. 大型工业液相色谱分离山梨醇和甘露醇过程优化研究[J]. 离子交换与吸附, 1998, 14(6): 487.

[10] 王洪,胡汉芳,尚素芬,等. 单纯形算法动态优化毛细管胶束电色谱分离体系[J]. 色谱, 1998, 16(4):293.

[11] 姚彤炜,阮宏强,曾苏,等. 尿中美芬妥英手性色谱分离单纯形法最优化[J]. 中国现代药学应用杂志, 1998, 15(2):37.

[12] 李湘,李忠,奚红霞. 双柱循环色谱分离过程的最优化. 化学工程. 2003, 31(1):17.

[13] 周炜,刘文英,安登魁. 计算机辅助藿香挥发油薄层色谱最佳溶剂系统选择[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(3):201.

[14] 王小平,曹立明. 遗传算法—理论应用与软件实现[M]. 西安:西安交通大学出版社. 2002, 1.

[15] 蔡宇杰,丁彦蕊,张大兵,等. 基于浮点编码的遗传算法优化模拟移动床色谱分离木糖酵母液[J]. 色谱, 2003, 21(3): 206.

[16] 陈学国,倪坚毅,邹汉法,等. 遗传算法用于液相色谱分离条件的优化[J]. 色谱, 2002, 20(2):97.

[17] 朱萍,郭伟强,徐妙云,等. 基于非线性输入前向网络的色谱实验条件优化[J]. 浙江大学学报, 1999, 33(1):20.

[18] 陈祥光,薛锦诚,傅若农,等. 引入模拟辅助样本提高 BP 网络的泛化能力[J]. 分析科学学报, 2002, 18(2):137.

[19] 柳文媛,林力行,张正行,等. RP-HPLC 法测定黄芩中黄芩素、汉黄芩素的含量[J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(3): 162.

[20] 靳颖华,班允东,孙毓庆. 薄层色谱溶剂系统的优化设计

[J]. 色谱, 1997, 15(3):263.

[J]. 分析化学研究报告, 1998, 26(9):1056.

[21] 王静馨. 模式识别法用于反相液相色谱等度分离条件优化

收稿日期: 2003-10-28

## 中药色谱指纹图谱研究进展

黄 晟, 谷 莉, 黄河舟, 柴逸峰(第二军医大学药学院, 上海市 200433)

**摘要** 目的:介绍中药色谱指纹图谱的研究进展。方法:查阅国内外相关文献资料,综述了近年来一些常用的色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用现状及研究进展,并展望了中药色谱指纹图谱在中药质量控制领域的应用前景。结果:中药色谱指纹图谱具有系统性、整体性、特征性等特点,越来越多的应用于中药的鉴别和质量控制当中。结论:中药色谱指纹图谱在中药质量控制领域具有广阔的开发和应用前景。对于中药现代化具有重要的意义。

**关键词** 中药; 指纹图谱; 色谱; 研究进展

中图分类号: R917

文献标识码: B

文章编号: 1006-0111(2003)06-0326-04

中药作为我国的国粹,有着几千年的悠久历史,一直是医药工作者研究的重点。由于中药是一个混合的复杂体系,其成分众多,加上药材品种、产地、加工方法、贮藏条件等因素的影响,其质量控制也成为医药工作者研究的难点,这也成为中药现代化进程中急需解决的关键问题。虽然,目前对大多数中药的有效成分以及药理作用机制并不明确,尚有许多争议。但有一点基本上得到了公认,即中药的药效是多种成分共同作用的结果,具有整体性。那么,对中药的质量控制也应体现其整体性,如果只对其中少数已知成分作质量控制是不合理的,这样就会遗失其它大量的有用信息。中药指纹图谱技术就是在这样的情况下应运而生的,它是建立一类中药材或中成药中所共有的、具有特异性的某类或数类活性成分的色谱或光谱信息的图谱,具有系统性、整体性、特征性等特点。本文就中药色谱指纹图谱研究现状和进展作一综述。

### 1 中药指纹图谱的概念

中药指纹图谱的“指纹”概念来源于法医学,但又与法医学中的指纹分析不太一样,法医学中是指个体指纹的绝对唯一性,而中药指纹图谱则是指同种中药材内在成分的整体相似性<sup>[1]</sup>。中药绝大多数来源于各种生物,其同一物种由于基因的唯一性和遗传性因而具有相似性,其体内化学成分虽然因生长环境和生长年限等各种因素的影响产生个体间较为明显的差异,但其代谢也具有遗传性,因此在化

学成分上也具有相似性。这也是中药指纹图谱分析的依据。

中药色谱指纹图谱是指采用色谱方法以及其它联用技术建立的同种中药材或制剂所共有的具有特异性的组分群体(某类或数类成分)的特征图谱或图象<sup>[2]</sup>。它是一种综合的、可以量化的色谱测定手段,可以对中药材或制剂进行定性和定量的研究,用来评价和控制中药质量。

### 2 中药色谱指纹图谱研究现状

中药色谱指纹图谱的研究国外早已开展,德国对银杏进行了指纹图谱研究,测定了银杏提取物中33个银杏黄酮的含量,并且通过使用指纹图谱控制其成分和相对含量,成功的对有效成分含量与药理学相关性进行了研究,发现约24%的银杏黄酮和约6%的银杏内酯组成的银杏提取物具有最好的疗效,这一研究成果极大的推动了中药色谱指纹图谱的研究和发展,也引起国内医药研究工作者的极大重视,国家药品监督管理局于2000年颁布了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,规范了对中药指纹图谱的研究,促进了国内学者对中药指纹图谱的研究热潮。

目前,我国对中药色谱指纹图谱的研究基本上还处在初级阶段,即使用各种方法建立中药材及制剂的指纹图谱,以及对相应信息进行数字化处理,使其能评价和控制中药材及制剂的质量,也就是构建中药质量控制的一种模式。在这方面已经取得了不少成绩,但与国外的研究相比,尚有不小差距。国外许多研究机构对中药指纹图谱的研究已进入高级阶