

液相色谱专家系统以及 液相色谱用于生化分离的进展

张玉奎 陈农 卢佩章

中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心

高效液相色谱 (HPLC) 作为一个极为重要的分离、分析手段是分析化学学科中最为活跃的领域之一, 这可以从近几年召开的匹兹堡会议的统计资料可以看出: 1990 年共有 1389 篇文章, 色谱占 35%, 其中 43% 为液相色谱, 1991 年共有 1133 篇文章, 色谱占 40%, 其中 58% 为液相色谱, 色谱分析占有各种分析方法之首, 而液相色谱又为色谱方法之首, 在国际上, 单是以“HPLC”命名的国际学术讨论会就有十几个, 从历届匹兹堡会议看, 液相色谱专家系统的开发与应用以及液相色谱用于生化分离的研究进展迅速, 已经形成了液相色谱研究的前沿领域之一。

计算机技术的迅速发展和广泛使用大大促进了人工智能技术在分析实验室的应用, 仪器的自动化和智能化程度也大大提高, 研制具有人工智能的新型分析仪器已是分析化学发展的大势所趋, 随着高效液相色谱理论不断成熟与完善, 研制和开发各种液相色谱专家系统已成为近年来液相色谱发展的特点, 另一方面, 由于生命科学已成为高技术工业的组成部分, 所以随着生命科学的发展, HPLC 用于分离、分析和纯化生物及医药活性物质已成为 HPLC 领域中研究最为活跃的前沿课题, 现在乃至将来, HPLC 将继续显示它在生命科学中的显著位置。

下面将近几年来的一些统计数据来说明近几年 HPLC 发展的二个显著特点。

液相色谱专家系统的研究或者叫计算机辅助液相色谱方法的发展的研究在

1989 年至 1990 年期间相继共出版了 4 本专著, 国内近期也将出二本专著, 国际色谱杂志在 1989 年出版了一本专集, 题目就叫计算机辅助液相色谱方法的发展, 这本专集共收集了 42 篇文章, 其中 13 篇文章是关于计算机辅助液相色谱的研究, 占 31%, 在此之前国际液相色谱杂志也已出版了一个专集, 另外在 1990 年第二期的国际分析化学趋势杂志中, 有 4 篇文章论述了液相色谱专家系统的设计及开发应用, 并明确指出这是色谱乃至分析化学的发展趋势, 每年的匹兹堡会议都有至少二个专题讨论计算机辅助液相色谱方法的发展。

另一方面, 高效液相色谱用于生化的分离分析, 近年来成为 HPLC 研究中最前沿的课题之一, 在最近几年的匹兹堡会议上, 生物大分子的高效液相色谱以及最近几年倍受重视的高效毛细电泳技术也是广大色谱工作者普遍讨论的话题, 每年的匹兹堡会议至少有二个专题报告是关于生物医药活性大分子的 HPLC 分离、分析和纯化, 每年都有一次蛋白质、肽等的 HPLC 国际讨论会, 至今已有 10 届, 在液相色谱中高效毛细管电泳技术将在今后的生化分离、分析中显示出强大的生命力, 为了适应这方面日益增长的需要, 我国“生物医药在色谱中的应用讨论会”, 每二年召开一次, 至今已有二届, 参加会议的色谱工作者讨论非常活跃, 这反映了国内对这一国际发展新趋势的积极响应, 我们将结合国际上以及作者所在的国家色谱研究分析中心, 对这一方面研究上的进展情况做一简要的介绍。

液相色谱专家系统

在人类色谱专家的水平上进行色谱分析方法的发展一直是广大色谱工作者所追求的目标, 液相色谱仪器智能化的程度也取决于该仪器是否具有自动的液相色谱分析方法的设计和发展, 即是否装配有专家系统, 这种专家系统的研究是把最先进的硬件系统和软件系统相结合, 从而在人类色谱专家水平的基础上完成色谱分析方法的自动设计和发展, 对于液相色谱分析任务, 最复杂的一步就是分析方法的设计和选择, 每年的国际色谱讨论会, 大部分文章集中在液相色谱方法的设计与选择, 如在 1990 年 306 个墙报中关于液相色谱分析方法发展的文章占 61%。

目前国外的各大公司都竞相在各自先进的硬件的基础上进行计算机辅助液相色谱的研究, 如 Varin, Waters, LC Resources, Perkin-Elmer, H-P, Spectra-Physics 等均开发了一系列软件, 欧洲共同体也有一个相应的 ESPRIT 计划, 该计划是英国、荷兰和德国的科学家联合进行的一项关于建立分析化学专家系统的研究计划, 其中液相色谱专家系统的研究 (又称 ESCA 系统) 在其计划中占有很显著的位置, 到 1991 年, 液相色谱中的二个系列软件已经商品化, 而且还开发了以下系统:

1) “Diamond”优化系统, 此系统可以用来寻找具有最佳选择性的流动相。

2) "Enhancer" 系统, 此系统用来进行等度液相色谱操作条件下各种物理参数的优化。

3) "Shaiker" 系统, 此系统用于辅助色谱方法的评估。

Waters 公司也发展了 WISE 软件, 此软件是一个优化软件, 它优化的依据是根据最初几次实验所获得的数据先初步得到一优化条件, 由计算机对下一次实验的条件提出建议, 以此循环直到满意。

Perkin-Elmer 公司也有 EAM 系统, LC Resources 公司的 Drylab 系统, 1991 年 Drylab 已经应用到气相色谱中。

总之目前液相色谱专家系统仍处在实验室阶段, 需要做的工作很多, 主要集中在将形成的液相色谱专家系统软件实用化、商品化, 并且装备在液相色谱仪上, 真正做到实现液相色谱分析方法的自动设计, 国外在这方面已经起步, 在 1990 年, HP 公司已经将微机辅助的液相色谱优化系统安装在 HP1090 系列液相色谱仪上, 用户可以通过尽可能少的实验获得最佳的分离条件。

作者所在的研究小组在液相色谱专家系统以及液相色谱的智能优化方面进行了大量的研究工作, 在 1989 年 BCEIA 会议上首次推出的装备有液相色谱专家系统的智能液相色谱仪获得了金奖, 该系统采用最先进的硬件, 在 IBM-PC/XT 微型计算机上发展了光电二极管阵列快速扫描检测器及其数据采集和处理系统, 高压输液泵的控制梯度洗脱装置以及自动进样器采用了同一台微机控制和协调, 因而实现了 HPLC 分析的全盘自动化。

为了能在智能高效液相色谱仪上进行自动化的液相色谱分析方法的设计与发展, 我们进行了液相色谱专家系统的研究, 而且主要力量都放在了进行智能色谱的基础理论研究, 我们已经发展的液相色谱专家系统共包括: 液相色谱分离模式的选择, 样品预处理方法和流动相、检测器的选择, 在线定性、定量, 操作条件优化以及硬件诊断五大部分, 该系统允许用户可以从分子结构通道和样品名通道进入以推荐合理的分离模式、样品预处理方法等。

栓系统推荐是建立在液相色谱保留值基本方程 ($\ln k' = a + cC_0$) 中 a 、 c 二参数与分子结构参数之间的半定量关系的基础上的, 这种半定量的关系允许我们能在分子作用力的水平上进行液相

谱柱系统的推荐, 因此可以由分子结构参数算得 k' 值, 再按照“出得来”, “分得开”的标准, 在 HPLC 中确定 k' 范围在 0.4~0.3 之间, 由此可推荐不同的模式, 其中以反相模式为第一推荐。确保组分能在合理的 k' 范围内流出 ($0.4 < k' \leq 30$); 而且推荐的结果还可以通过液相色谱谱图库来加以验证, 该库是在大量文献的基础上选择了最先进、最实际、最可靠的液相色谱谱图, 存取谱图是根据峰形变化规律。根据用户的实际需要, 我们还建立了样品名通道, 并已开始用于用户的实际分析。

在色谱操作条件优化方面, 我们认为只有建立在正确的柱系统上的操作条件最佳化才有意义, 而且柱系统之间的比较一定要在各自的最佳条件下进行, 我们的优化系统, 以峰高分离度为基础, 采用计算机仿真全谱图拟合法发展了包括已知样品、未知样品在内的等度以及梯度条件下操作条件的优化, 同时结合最先进的智能搜索技术使条件优化选择更具特色, 而且发展了通过几次梯度来求算保留值方程中的各参数的方法, 使操作条件的优化更简便。该优化系统分在线和离线二种; 在线包括未知样品的 Simplex 方法, 已知样品的 Simplex 方法和任意多阶梯洗脱下的已知样品的优化; 离线优化包括: 人工干预优化以及计算机仿真等, 而且最近我们提出智能优化的方法, 从而使操作条件的优化在最佳的柱选择性、最佳柱型和最佳方法的基础上, 这些优化方法在实际样品的分析中都证明了其应用的可靠性。

在定性方面, 我们采用一种叫做“作用指数”的参数来进行液相色谱峰定性, 建立了包括 460 个组分在内的作用指数库, 正在发展色谱—紫外联合定性技术, 这些定性方法将在实际中的特定领域内收到比较实际的效果。

在定量方面, 我们建立了曲线拟合定量方法, 该方法采用模拟色谱流出曲线的技术进行峰面积的定量, 既准确同时还解决了重叠的色谱峰的定量问题。

根据 HPLC 用于生化分离发展的需要, 我们进一步发展了肽及蛋白质的液相色谱专家系统, 在大量文献的基础上, 提出了建立肽及蛋白质的 HPLC 专家系统知识库的基本规律。

液相色谱用于生化分离

二十一世纪是生命科学发展的年代, 生命科学的发展极大的扩大了液相

色谱的应用范围。

液相色谱成为一个可靠的、实用的分离技术还是由于化学键合的微粒固定相的合成成功, 由于采用了化学键合相, 使其应用领域进一步拓宽, 而大部分生物大分子是非挥发性、热不稳定物质, 所以不可能采用 GC 来分析, 而且随着生命科学的发展, 使液相色谱技术在 70 年代用于生化分离成为可能而且被广泛接受, 从 1990-1991 年匹兹堡会议文集中可以统计出, 液相色谱的近 60% 都是用于生化的分离、分析和纯化, 每年的匹兹堡会议至少有二个液相色谱用于生命科学的专题讨论, 而且从各大公司展出的液相色谱柱子也可以看出, 70% 的柱子是为分离分析和纯化生物活性物质而设计、生产的。

液相色谱以其多种分离模式广泛应用于生命科学中, 以其高的分辨率和快速的分析时间在生化应用中取得了很大的发展并得到承认。目前国外这方面的工作由于投资强度大所以研究也非常热门, 美国耗资巨大的人体基因组工程 (Human Genome Project) 已经吸引了无数的分析化学家去从事艰苦的分析、分离和提纯工作, 在这方面, 包括高效毛细管电泳在内的高效液相色谱是大有可为的。

液相色谱应用于生化分离的一大趋势是微型化, 色谱柱的微型化包括两个方面: 一是使用小颗粒 (颗粒直径小于 $5\mu\text{m}$) 固定相填充柱, 柱长只有几个厘米就可达到高速分离, 另一方面是使用细内径柱, 直径在 1 个毫米或更小, 微型化可以大大满足生命科学发展的需要, 进入八十年代, 由于色谱仪器的自动化以及智能化程度越来越高, 柱子以及仪器变得越来越小, 所以形成了“快速高效液相色谱法”, 对于生化中的痕量分析, 细管径柱不仅减少进样体积、降低溶剂消耗, 而且能更加方便地与电化学检测器、激光诱导荧光或者质谱联用, 所以目前开发的适用于生化分析的柱子, 都是细粒度的短柱子或者细内径柱, 有人采用装有 $3\mu\text{m}$ 填料的 $30 \times 3\text{mmi.d.}$ 的柱子在 7 分钟之内分了 11 个核苷及碱基, 参见图 1。当然, 细内径柱要求有相应的仪器配套, 以减少柱外效应, 充分发挥其柱效能。

作为微型液相色谱发展的另一个方面是近几年急剧发展的高效毛细管电泳技术, 它已被誉为近两三年来分析化学中发展最为迅速的一个领域, 它采用了

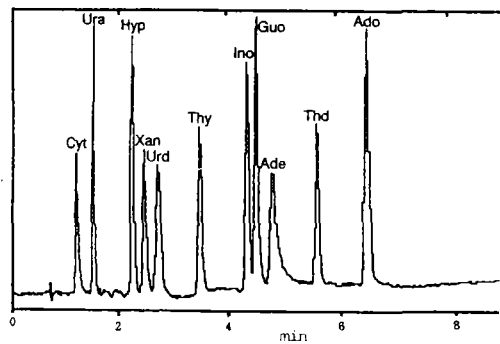


图1 采用 3.3mm 长的 C_{18} 柱梯度分离的 11 个核苷及碱基, 4 分钟的线性梯度 0.3~35% 甲醇与 0.02M KH_2PO_4 , pH5.6, 流速 2ml/min.

直径为 25~50 μ m 的毛细管柱, 获得了高于百万的柱效, 而且灵敏度高 (检测限为 10^{-15} ~ 10^{-20} mol/l), 因此受到了生命科学领域的极大重视, 可用于 DNA 序列、蛋白质和肽等的分析, 甚至可进行到单个细胞的分析。

液相色谱用于生化分离的另一个方面的是进行“大型制备”, 即液相色谱的“大型化”, 众所周知, 材料工业、生命科学和生化技术是高技术工业的组成部分, 目前全世界大约有 8000 家生物工程公司, 它们的发展也是为了适应新的高利润、高技术工业的需要, 某些重要的生物制品价格竟高达数万美元/毫克, 而液相色谱是实现这一目标的重要手段。

制备色谱是以分离、纯化为主要目的, 它所关心的是纯度以及单位时间的产率, 由于生命科学发展的需要, 液相色谱已经成为一发展迅速的有效的分离、纯化生物大分子的重要工具, 高效液相色谱从分析为主而发展到分析、分离并重, 这仍是今后高效液相色谱发展的一大趋势。

液相色谱用于生物大分子的制备可采用多种模式, 如高效疏水相互作用色谱、亲和色谱、反相液相色谱、膜色谱等等。疏水相互作用色谱是基于生物大分子在盐的水溶液中的疏水性大小不一而达到分离, 采用疏水色谱分离和纯化的产品具有高的生物活性, 反相色谱是通用型, 但因为它使用了有机溶剂, 容易使蛋白质失活, 有一定的限制, 所以合成低廉的可供制备用的液相色谱填料, 这是降低生化产品成本、提高产品纯度的关键。膜色谱是采用径向色谱柱, 它结合膜与色谱的特点, 具有迅速、容量大、操作简便, 易于达到制备

级规模的特点。因而近年来发展迅速, 所以液相色谱用于工业制备是液相色谱用于生化的另一极端, 即“大型化”, 总之 HPLC 用于生化分离的趋势可以概括为“小型的越来越小, 大型的越来越大”。

液相色谱用于生化分离, 柱子是关键, 研制各种专用及通用的供生化分离用的固定相仍将继续占据液相色谱用于生化分析中的显著位置, 目前已发展了各种各样的适用于生化分析、分离和纯化的分析柱, 专用柱和制备柱。刚性的多孔疏水填料在生化分离以及应用中起了很大作用, 这种类型的填料, 是在表面键合了一层亲水的有机分子层而得到广泛使用, 这类担体分离诸如蛋白质生物大分子时, 柱效高, 回收率高而且蛋白质不易失活。另外改变流动相的冲洗条件, 这类柱子还可以当作排阻色谱、疏水相互作用色谱、金属螯合作用或亲合色谱的柱子, 目前分离多肽和蛋白质的填料趋向于发展孔内疏水而表面是亲水的填料, 而且要细粒度、大孔径。

羟基磷灰石这样的无机填料, 由于能形成稳定的球形粒子, 在近年来得到了很大的发展, 冲洗条件也变得比较温和, 适用于分离蛋白质、核酸等生物大分子, 发展分析糖类组分的专用柱在生物化学中也具有十分重要的意义, 而且研制各种可供分离生物大分子的毛细管电泳的改性毛细管柱也成了近年来柱的研制的热点之一, 此类改性的毛细管柱要能有效的抑制电渗流的作用, 减少生物大分子与毛细管壁之间的相互作用。

近几年, 液相色谱用于生化分离的检测技术也取得了很大的发展, 电化学检测和激光诱导荧光检测也取得了广泛的应用, 这种检测技术再加上细管径柱可以将检测灵敏度提高到 10^{-18} 的数量级 (attomole 级), 如再采用毛细管 HPLC 或毛细管电泳, 就可得到检测单个分子的数量级 (10^{-21}), 另外光电二极管阵列及光栅聚焦的广泛使用, 使液相色谱所提供的信息量大幅度增加。

作者所在的国家色谱研究分析中心在生物、医药活性分子的分析、分离和纯化方面也做了一些工作。

首先从氨基酸和小肽的 HPLC 分

析开始, 系统研制了氨基酸疏水性的大小对小肽保留的贡献, 此研究对于小肽的分离模式的选择是非常重要的, 我们发现了 gly 对小肽保留的贡献几乎为零, 所以由极性与 gly 相近的氨基酸所组成的二肽在反相液相色谱中 k' 值很小, 反相液相色谱很难得到满意的分离, 必须采用离子对反相或离子交换加以分离。

考察了冲洗剂浓度对二肽异构体的影响, 发现冲洗剂浓度对二肽异构体的 k' 值有很大影响, 但对选择性影响很小。

考察了盐浓度 pH 值对二肽及三肽保留值的影响, 并系统研究了氨基酸结构对小肽保留值的影响, 同时还发展了氨基酸及二肽的双柱定性系统。

对结合型胆汁酸的保留行为也作了系统的研究, 发现了甘氨酸型以及牛磺型结合型胆汁酸在选择性上的变化规律, 并从保留值方程中 a-c 之间的线性关系解释了这种变化规律。

开发了适应于生物工程下游大规模纯化的径向色谱柱, 径向色谱柱是当前为了适应生物工程下游大规模纯化与分离而出现的新型色谱柱, 它克服了传统色谱柱不便于放大等缺点, 由于流动相及样品在柱内是径向流动, 即从周边流向中心, 这样的结构可采用很小的有效床层高度, 获得大的床层体积, 由于柱状层析法中的上样量与有效床层容积有关, 而且反压取决于床层高度和线速度, 因此径向柱所用的径向洗脱技术, 能在使用很大的上样量的同时达到很高的流速, 同时当保持半径不变而增加轴向高度时, 可按比例增加上样量和流速及线性放大。目前已合成了 CM、QAE、DEAE 等离子交换膜, 并对血浆、登革病毒单克隆抗体、干扰素等进行了纯化, 这为进行大规模的分离、纯化提供了强有力的手段。

在毛细管电泳方面我们也已开展工作, 系统考察了影响高效毛细管电泳迁移时间的各因素, 并从迁移方程解释了这些影响因素, 还采用一些指标来解决高效毛细管电泳重复性的问题, 系统考察了小肽的高效毛细管电泳的迁移行为。

总之液相色谱以及现在正在发展的高效毛细管电泳将在 21 世纪生命科学的发展中起着非常重要的作用。