

液相色谱分析仪器的进展

卢佩章* 黄红心

(中国科学院大连化学物理研究所, 中国大连色谱技术研究开发中心)

色谱分析是分析化学中最活跃的领域之一,从今年的匹兹堡会议文集发表的1389篇文章来看,色谱分析、光谱分析、电化学分析、波谱分析、质谱、环境分析、联用技术和化学计量学各占498、104、82、142、35、66和35篇,另外其它的文章有371篇,因此色谱分析的文章数有35%,占各种分析方法的首位。在色谱分析中,气相色谱有98篇,液相色谱有216篇,毛细管电泳色谱35篇,平板色谱34篇,超临界色谱30篇,另外还有逆流色谱、离子对色谱和流动注射分析等报告85篇,液相色谱文章占色谱文章的43%。而从发表的文章的内容来看,高效液相色谱仪已向微型化和智能化方向发展。所谓的微型化是指由于具有很高分离效率的毛细管气相色谱不适合于热不稳定和挥发性小的生物样品的分析。而液相色谱中的微分离技术,主要是指毛细管液相色谱、毛细管电泳及毛细管超临界色谱获得了巨大发展。另一个对微分离技术的推动力就是由生物化学和生物技术的研究也促进了微型色谱柱及微型仪器的发展。而微型仪器的发展同样带动了非常适合微型分离柱和高灵敏度的以激光为光源的荧光和电化学检测器的发展。另外,毛细管柱和其它分析技术(比如质谱)的联用在复杂生物分子结构的解释方面显示了广泛的应用前景。

液相色谱仪器的智能化体现在研究具有自动色谱分析方法设计的色谱仪方面。这种研究把先进的硬件系统和软件系统相结合形

成可在专家水平上完成色谱分析方法设计这一复杂的任务,而色谱数据处理及解释和实验室信息管理系统为所有色谱分析仪器的智能化提供了物质上的可能性。现分别对这两方面的发展作一简介。

微分离技术色谱仪的发展

微分离液相色谱通常是指采用0.5~1.0毫米的微型柱和0.2~0.32毫米的填充毛细管柱,由于它有高的检测器响应、可减少流动相和固定相消耗,可提供新的检测途径和与其它手段联用比较容易及进样量小优点而引起大多数色谱研究者的注意。但使用细管径柱的色谱仪完全不同于传统的仪器装置,它的流速只有1.0~10.0微升/分钟,而样品只需很少的进样量及小的检测池体积,因此输送系统的小型化及最佳化是仪器最重要的两个指标。Carlo Erba公司的A.D.Bas-hall报道了通过严格的控制和测量单个微量泵的流速可以获得对几个微升/分钟的梯度洗脱装置获得很好的重现性。另外,为在梯度洗脱中使溶剂完全混合,应该采用合适的混合器。

毛细管电泳因有极高的分离能力和高灵敏度而成为分离技术中发展最快的领域。今年的匹兹堡会议上有关毛细管电泳的文章有35篇,仅次于液相色谱和气相色谱而据第三位。而毛细管电泳的商品仪器的生产竞争也颇为激烈,在今年匹兹堡展览会上,已有8

家分析仪器生产厂推出了商品化毛细管电泳仪,其中包括Beckman Instrument、Bio-Rad、Genzomed BioTech、Microphoretic、Spectra-Physics、Applied Biosystems、Dionex及Linear Instruments等公司,象Spectra-physics一台全盘自动化的电泳仪包括可容纳82个样品的自动进样器,毛细管冷却系统,多波长扫描UV-VIS检测器及30KV的电源,整个系统都是由微处理机控制。而Dionex的电泳仪可进行区域电泳、毛细管胶体电动电泳和毛细管电动电泳等多种电泳分析,具有很高的灵活性及实用性。

另外,为解决毛细管对生物分子吸附在毛细管壁上而导致低的回收率问题,Guzman发展了一套微机控制的毛细管清洗装置,该装置能对多次进样后的毛细管再生和新的毛细管进行清洗,当然,根据不同结构的毛细管应采用不同的化学试剂。

检测器是液相色谱分析中不可缺少的一部分。细管径液相色谱和毛细管电泳对检测器提出了更高的要求。为解决微型柱和毛细管分离的检测问题,发展新型检测器是该领域的研究任务之一。UV-VIS检测器是常用的商品化仪器,但由于其灵敏度较低而很难适用于需要高灵敏度的场合。荧光检测器由于其特效性和高灵敏度而成为微分离色谱中最重要的检测器。激光光源因有好的单色性和聚焦能力可用于小体积流动池而不引起峰的变宽。用激光或激光诱导的荧光检测器可以获得femto级检测限,比如Kuhr和Yeung发展的间接荧光检测方法,把荧光活性物质加入缓冲剂或本身就是活性组分,然后可以在荧光背景中检测单个溶质,采用这种方法可以对atto摩尔级的核苷酸进行检测,这是一种可在毛细管柱电泳色谱中的广泛采用的方法。另外,在生物分析中,采用柱前和柱后衍生技术是提高灵敏度和选择性非常重要的手段。

除光检测方法外,另外的电检测方法也用于毛细管电泳色谱的检测,比如Zare利用电导检测器检测锂离子,这种检测器对可导电的小离子具有很高的实用性。电化学检测器也广泛地应用在微型色谱上,比如Wallingford和Ewiny提出把一根毛细管连接到一多孔玻璃柱上而使用电化学检测器和毛细管柱的电场相隔离,电极固定在一多孔玻璃外,而电化学检测器处于毛细管连接器的下流,当电泳毛细管的离子沿着毛细管柱朝着电化学检测器移动而连续被检测,这样就不会产生峰的变宽。

毛细管电泳和质谱的直接联用是非常自然的。这是因为毛细管电泳的流动相常常是静止或以很低的速度移动。电火花和常压离子化质谱是两种常用的电离方法,这种电离方法对肽可以达到pg级的检测限。使用标准的低分子质量质谱仪可以检测超过1000,000MW的离子,毫无疑问,在不远的将来,质谱和毛细管电泳的联用将象HPLC-MS和GC-MS一样占有一席之地。

智能化液相色谱仪的发展

在人类专家水平上进行色谱分析方法的发展一直是色谱工作者追求的目标,而液相色谱仪在微机控制下的整体化是该目标实用的标志之一。在今年的匹兹堡会议上已有多家大公司提出了在各自的硬件系统上进行色谱分析的方法设计。

比如Hewlett-Packard公司的A. Drouen报道的计算机辅助HPLC分离的优化系统已把Scheomakers提出的叠代优化方法安装在HP 1090系列液相色谱仪上。这样用户可以通过用最少的色谱实验获得最好的分离,该软件可以通过自动进样。基于样品的成份及需要的分离度选择溶剂的边界条件,然后用叠代的方法对不同的组分选择分离条件。

报导了HPLC方法设计系统的安装和应用,

Beckman Instrument的J. Schaefer该系统在现代溶剂输送和进样系统上发展了相应的软件工具。比如色谱图和光谱图之间的比较,因为整个系统由个人计算机控制,因此色谱仪的参数、数据处理及结果可以自动存档,而且系统软件还包括色谱图的曲线拟合及用于方法设计的计算机仿真。

Perkin-Elmer公司的W. Dong报导了用LC Analyst在进行计算机控制的系统上进行用于LC方法的设计,该文把Snyder发展的DryLab软件与LC Analyst硬件相结合进行等度和梯度洗脱的分析方法的发展,该系统已用于药物、代谢产物及肽的分析。

英国M. Upton报导的仪器控制、数据采集及处理整体化方法能保证信息的统一分析,而数据处理能保存在硬盘中,能在仪器、微机及网络之间进行信息传递,而仪器通过调用建立起完整的分析方法。

值得指出的是,最近作者所在的研究小组在仪器的智能化方面进行了大量的研究工作。在去年的北京国际分析仪器测试报告会和展览会(BCEIA)上,我们首次推出了带有色谱专家系统的智能高效液相色谱仪,这个系统是用先进的硬件系统构成。我们在IBM PC/XT微型计算机上发展了光二级管阵列快速扫描检测器及其数据采集和处理系统、高压泵控制及梯度洗脱系统以及自动进样系统,这三大部件都是用同一微机控制和协调,因而实现了色谱分析的全盘自动化。

为在全盘自动化的色谱仪进行色谱分析

方法的发展,我们进行了色谱专家系统的研究,先后完成了柱系统和分离模式的推荐、样品预处理方法和检测器的选择、分离条件的优化及色谱柱系统的诊断。柱系统的推荐是应用统计热力学推导出的色谱保留值变化规律和分子结构与保留值方程中系数的定量关系,从分子间作用和静电作用力的水平建立了液相色谱分离模式和流动相成份的选择规则,并应用谱图库中的谱图验证了其可靠性。而样品的预处理方法和检测器的选择是根据有关的规律和经验来得到的。这种在推理机的协调下可以进行色谱分析方法推荐。系统中采用的优化策略有在线和离线二种。在线优化包括Simplex方法用于未知样品的优化,Simplex方法用于已知样品的优化和任意多阶梯梯度洗脱对已知样品的优化的三种。离线优化包括人工干预优化和计算机仿真优化等二种。这些方法在实际应用中都获得了很好的效果,并用实际样品证明了其应用的有效性。

结 论

总之,由于色谱技术在生物科学和生命科学的广泛应用,色谱分析仪器的微型化和智能化研究已成为必然的发展趋势。在今后的几年,毛细管液相色谱、毛细管柱电泳等技术将有一个大的发展。而应用人工智能技术发展带有色谱专家系统的高效液相色谱仪是一个十分现实和具有理论意义的课题。这样一个系统可以模拟人类专家进行色谱分析方法的设计及操作条件的优化的整个分析过程。

• 卢佩章同志系中国科学院学部委员、大连化学物理研究所研究员、中国大连色谱技术研究开发中心主任。