液相色谱专家系统中谱图库的建立*

陈 农 梁鑫淼 张玉奎 卢佩章

(中国科学院大连化学物理研究所、中国大连色谱技术研究与开发中心，大连 116012)

关键词 液相色谱专家系统、谱图库、谱图选择原则、谱图验证

随着微型计算机在分析实验室以空前的速度普及和推广应用，采用人工智能技术发展色谱专家系统是当今色谱领域中的前沿课题之一[1,2]. 发展液相色谱专家系统，首先应在已经发表的文献中针对实际具体样品总结出适用的方法，而大多数色谱工作者在日常分析中寻找分析方法时，都倾向于看到相应的文献谱图以及关于这类样品最先进的、最实际的以及最方便的色谱分析方法，因此建立和发展液相色谱谱图库在液相色谱专家系统的研究中具有特殊重要的地位. 它不仅可以作为色谱分析方法的检索库，同时还可以在色谱专家系统推荐完色谱方法后显示相应的谱图以作佐证，为专家系统进行方法发展、谱图推荐及谱图验证提供可靠的知识库. 目前正在发展的液相色谱专家系统中，还未见到包含液相色谱谱图库的专家系统.

在液相色谱专家系统中，我们已经建立的从理论上总结出的柱系统推荐软件自然需要采用大量的实际结果来加以验证[3]. 所以必须从已发表的文献中根据实际样品实事求是的总结出适用的方法及谱图[1)-4)]. 本文在2000篇文献的基础上，总结并提出了根据样品分析方法最先进，不同的实际分析需要采用不同的分析方法，而且分析方法最方便的选择原则来选择液相色谱方法及谱图[4)]，首次建立了包括样品预处理方法、样品最佳分析方法在内的液相色谱谱图库，库中共有200张典型可靠的液相色谱谱图.

一、谱图选择原则

谱图选择原则主要有以下三点：首先对于实际样品的分析，我们要选择最先进的液相色谱分析方法，从我们查得的胆汁酸、维生素、核苷酸等20类样品的近2000篇文献可以得出，目前对于大部分样品组分的分析，最先进的液相色谱分析方法为反相或离子对反相. 又如，在查得的180篇氨基酸分析的文献中，有83篇是采用柱前衍生的反相技术来分离氨基酸，占52%. 采用这种方法分析氨基酸具有分析时间短、分析灵敏度极高而且衍生试剂多样化等特点；对于糖类(单糖)来说最先进的方法还包括采用 β- 环糊精的反相键合相色谱以及反相胺基键合相系统；对于特殊的样品如手性样品最先进的方法还包括采用手性固定相；异构体样品采用液固吸附色谱.

本文1991年4月10日收到. 1992年1月14日收到修改稿.

* 中国科学院大连化学物理研究所青年基金资助项目.

1) 林彬生，中国科学院大连化学物理研究所博士论文，1986.

2) 邹汉法，中国科学院大连化学物理研究所博士论文，1989.

3) 陈 农、张玉奎、卢佩章，色谱(待发表).

4) 陈 农，中国科学院大连化学物理研究所博士论文，1991.

其次，选择方法还应根据不同的分析需要以及不同的基质选择不同的分析方法这一原则，这样的例子在实际分析中很多，例如胆汁中的胆汁酸和血样中的胆汁酸的分析方法就不同，由于胆汁中的胆汁酸浓度较高可以采用反相紫外检测加以分析，而血样中的胆汁酸浓度很低，必须采用柱后酶反应衍生或柱前衍生加以分析．氨基酸的分析也是如此，目前对于灵敏度要求很高的氨基酸分析几乎都是采用柱前衍生的反相技术，这尤其是分析氨基酸含量较少的生物体液、蛋白质水解液中氨基酸成分的分析，而到了复杂基质中氨基酸浓度较高的全分析还得采用经典的离子交换法，此法具有分离度高、方法稳定可靠等特点，但此法分析时间较长，灵敏度受到缓冲液纯度的限制等等．

最后一个原则是尽量采用既先进又方便的反相色谱系统．由于反相色谱操作简单、方法可靠，用得最为广泛，所以能采用反相分析的尽量采用反相分析． 反相固定相主要以 C_{18} 为

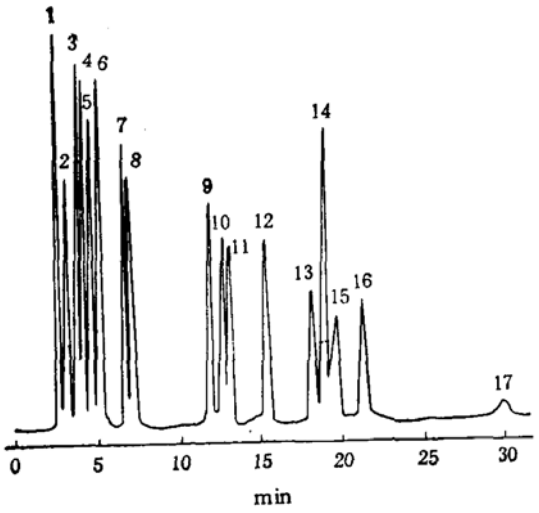

图 1　反相色谱分离 PTH 氨基酸[4]
柱子：Ultrasphere-ODS；流动相：乙腈-缓冲液(37.8:62.2)；1. Asp；2. Glu；3. Asn；4. Gln；5. Thr；6. Gly；7. Ala；8. Tyr；9. Met；10. Val；11. Pro；12. Try；13. Phe；14. Lys；15. Ile；16. Leu；17. Ser

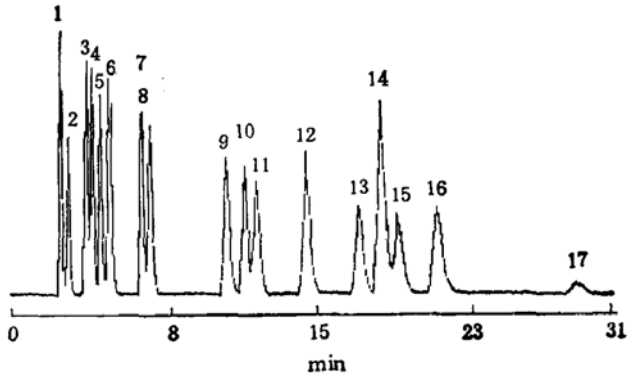

图 2　计算机模拟的 PTH 氨基酸的分离谱图
图中各数字的含义同图 1

主，但最近苯基键合相、腈基和胺基键合相、环糊精以及特种类型键合相也显示了很广的应用前景．另外离子对反相也较一般的离子交换更方便，例如含紫外吸收的无机阴离子也可以更方便的采用离子对反相色谱加以分离．

二、谱图存贮的实验技术

存贮液相色谱谱图时采用了指数衰减修正的高斯模型（EMG 模型），其原理是建立在峰形变化规律的基础上[3]，参见(1)—(3)式：

$$\omega_{1/2} = a + bt_r; \tag{1}$$

$$\sigma = a_1 + b_1 t_r; \tag{2}$$

$$\tau = a_2 + b_2 t_r. \tag{3}$$

式中 $\omega_{1/2}$ 为半峰宽，σ、τ 为高斯函数部分的标准偏差、指数衰减的时间常数，t_r 为保留时间．

存贮谱图采用了统计估算的方法，首先测得谱图中三个峰的半峰宽，并回归求得（1）式中 a、b 两系数，再由 1/10 峰高处的峰宽比估算谱图中各峰的 τ/σ 值，从而估算（2）及（3）式中系数 a_1、b_1、a_2、b_2 的值。

必须指出的是，我们存贮谱图的原理是存贮峰形规律而不是存贮切片。图 1、2 分别显示了一张分离 PTH 氨基酸的实际谱图以及采用计算机模拟的色谱谱图，模拟谱图与实际谱图很相近。由于我们是存贮峰形变化规律，因此计算机还可以对模拟的谱图进行峰放大、峰缩小以及插入一个未知峰到指定的位置；同时在建立的反相液相色谱定性系统的基础上，还可以对未知峰进行定性[1)]。

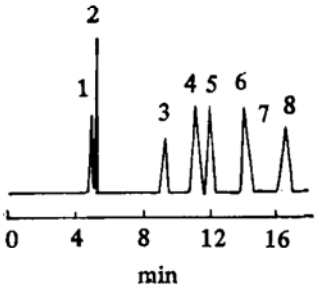

图 3　液相色谱专家系统中推荐的分析脂溶性维生素的谱图

柱子：Zorbax-ODS.
流动相：乙腈-二氯甲烷（700:300）.
检测器：UV/280nm.
1. 乙酸 VA 酯；2. VA 醇；
3. α-VE 醋酸酯；4. VD_2；
5. VD_3；6. β-胡萝卜素；
7. 未知；8. 硬脂酸 VA 酯

三、液相色谱专家系统中谱图验证示例

目前在发展中的液相色谱专家系统中，含有样品预处理方法推荐和样品最佳分析方法推荐的谱图库已经建成，库中有200张典型的液相色谱谱图，而且在液相色谱专家系统中还建立了样品名通道，通过此通道，用户选择样品名以及特定的基质后，相应的预处理方法以及最佳的分析方法就可以推荐出来，最后再显示一张谱图库中此类样品分析的典型谱图以证明推荐的正确性。表 1 显示了专家系统推荐的血浆中维生素 E 及 D_2 的最佳的液相色谱分析方法，从推荐的结果可以看出：分析 VE 和 VD_2 的最佳方法为非水反相，图 3 显示了一张谱图库中采用非水反相分析脂溶性维生素的谱图[5]，证明了专家系统推荐的正确性。

表 1　液相色谱专家系统中推荐的 VE、VD_2 的分析方法

HPLC Method Development in Expert System for Chromatography
Sample: (VE VD2)
Mode of Separation: (NON-AQUEOUS-REVERSED-PHASE) Chromatography
Column: ((SILICA-BASED-BONDED-PHASE-C18))
Mobile Phase: ((METHANOL) (CHCL3))
Additive Agent:(***)
Detector: UV-238nm
Possibility Factor: 0.855

参　考　文　献

[1] Lu Peichang, Huang Hongxin, *J. Chromvtogr.*, **452**(1988), 175.
[2] 卢佩章、戴朝政，色谱基础理论，科学出版社，1989.
[3] 张玉奎、董礼孚、包绵生、周桂敏、卢佩章，分析测试通报，5(1986)，112.
[4] Noyes, C.M., *J. Chromatogr.*, **266**(1983), 451.
[5] Landen, Jr. W. O., *J. Chromatogr.*, **211**(1981), 155.

1) 同 1000 页脚注 3).