

二极管阵列 检测技术在高效 液相色谱中的应用



分享惠普首创的
二极管阵列技术及其成果

目 录

1		
概 要		5
2		
导 言		5
3		
应用提要		6
4		
技术比较		9
	普通可变波长检测器	9
	二极管阵列检测器	10
5		
二极管阵列的特点		11
	全波长测定色谱峰	11
	一次运行即可打出全部最佳波长	11
	多信号检测	13
	未分离峰的定量分析	13
	峰纯度检验	14
	色谱峰的准确定性	15
6		
应 用		16
药 物 学	对药物代谢物的全分析	16
	新的微生物产品的全分析	17
	天然药物活性成分的鉴定	19
临床医学	尿中乙酰氨基苯及其代谢物的分析	19
毒 物 学	临床毒理学	20
	马的毒理学	22
生物科学	肽及蛋白的峰纯度控制	23
	导数光谱法鉴定肽与蛋白中芳香氨基酸	25
	多信号检测技术控制蛋白纯化效率	26
食品和饮料	动物食品中的抗生素分析	27
	饮料中色素的分析	29
环 境	饮用水中农药的分析	30
	空气中多环芳烃的分析	32
	废水中多氯苯酚的分析鉴定	33
石油化工	原油分析	35
高分子化工	聚合物中单体及添加剂的测定	37

附录 A HPLC 中光电二极管阵列检测器的最高灵敏度、
最佳选择性及最大线性的最优化 38
 色谱信号灵敏度的最优化 38
 光谱灵敏度的最优化 38

附录 B HPLC 中紫外/可见光谱谱库技术 47
 比较算法程序及其重复性 47
 影响匹配因子的参数 49
 一次运行实现峰纯度、峰定性及定量的全自动处理 53

附录 C 峰纯度检验技术 55
 色谱峰不同部位的光谱归一化及其比较 55
 两个波长下的吸光值 56
 多重吸收比率 57
 两个不同波长下的峰面积 58
 信号归一化 58
 其他方法 59

附录 D 影响波长分辨率的参数 60

附录 E 参考文献及专著 63

致 谢

本书部分资料由我的同事及几位色谱学者提供,谨致谢忱!

1 概 要

本书的目的在于证明二极管阵列检测器对高效液相色谱所带来的好处。为了帮助诸位了解这一检测技术的特性及优点,我们首先比较了二极管阵列检测器及普通紫外/可变波长检测器的设计,接着描述了这一技术本身以及在解决几个主要分析问题上的方法:最佳波长的确定,峰纯度检验及色谱峰的鉴定。

为使本书简洁易读,我们列举了一些典型的实例,这些方法在过去的十年内已经获得了应用。而在附录E中,我们按照应用领域列出了二极管阵列技术在HPLC中应用的大量文献。

如果您已经拥有了一台二极管阵列检测器或者正准备使用,那么附录A在如何实现二极管检测器对灵敏度、选择性及线性的最优化方面会给您提供有益的启示,将有助于您一开始就能够从这一检测器获得最理想的结果。

在附录B中,我们说明了如何利用紫外/可见光谱库技术结合其保留时间对色谱峰进行定性。

关于确证峰纯度的各种方法在附录C中进行了讨论。

2 导 言

二极管阵列检测器的开发是过去十年内HPLC技术的最重要的进步。1982年,惠普公司推出世界上第一台商品化二极管阵列检测器——HP1040A,这是HP公司根据三年前开发第一台二极管阵列分光光度计得到的技术经验设计而成的。从那时起软件技术获得许多重大改进——一次分析可得到更多的信息,处理速度更快等。最近,这种检测器又有一些新的改进以获得更好的波长分辨率及更高的灵敏度。

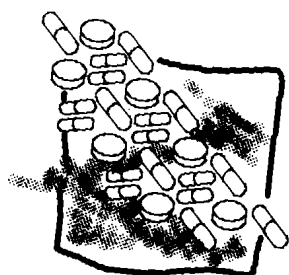
普通的HPLC分光光度检测器为某个样品在最大波长下监测色谱洗脱组分提供了可能。而如果需要光谱扫描,多数情况下需要停泵进行,并往往需要数秒甚至数分钟才能完成,这同波长范围有关。利用光电二极管检测器,样品扫描仅需数毫秒,因而可连续地获取光谱信息。波长加上保留时间和吸光值,形成时间—波长—吸光值三维信息而不需要停流。对于使用者来说,最明显的好处是无论是研究还是日常分析,都可以获得有关峰纯度及峰鉴定的连续信息。同时,三维谱图也可以使方法开发人员简单迅速地确定出一个或更多的波长。

按今天的标准来看,最初的二极管阵列检测器使用8位计算机速度较慢,限制了数据的贮存能力。时至今日,已经在具有很高运行速度的16位或32位计算机上发展出新的软件,能够在极短的时间内处理大量数据,导致了许多新的软件包的诞生,诸如光谱谱库检索程序等。随着性能不断改进的微处理器的出现,计算机能够在采集数据的同时进行数据处理,此外,价格适中的高分辨彩色监视器又可进行信息量丰富的数据显示。

最早的二极管阵列检测器仅用于研究分析及方法开发,而今的这种检测器常常也用于全自动的日常分析。它的功能键可方便的进行全自动的峰纯度检验及峰定性。

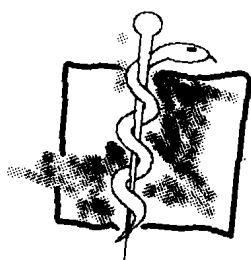
二极管阵列检测器的价格也在降低,现在可用内装的微处理器而省去了额外的计算机硬件和软件。这种检测器相对于可变波长检测器是一种经济的选择,它能够日常分析提供多信号检测及一些峰纯度检验功能。

3 应用提要



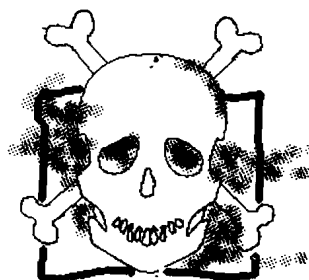
* 药物

药物及其代谢物的全分析
药物质量控制



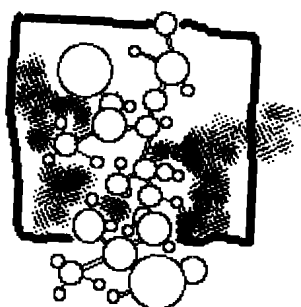
* 临床

药物及其代谢
物的全分析



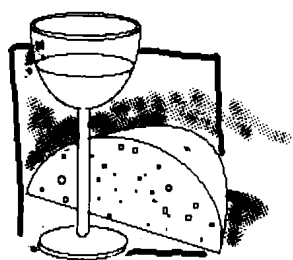
* 毒物

毒物及其代谢
物的全分析

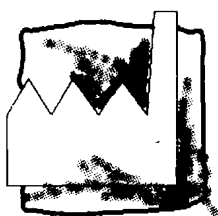


* 生化

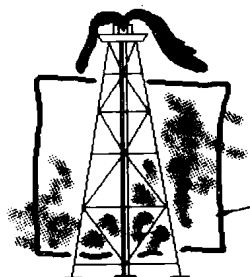
蛋白的结构解析



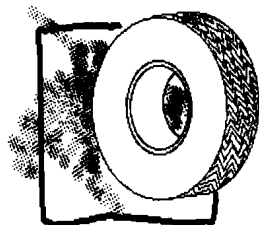
*** 食品**
添加剂的全分析



*** 环境**
氯代苯酚
农药
多环芳烃



*** 石油化工**
油中化合物的族分析



*** 高分子化工**
单体及添加剂的分析

4 技术比较

普通可变波长检测器

图4.1是一个普通可变波长检测器的结构图。从氘灯发出的多色光经过球面镜及平面镜组聚焦在单色仪的入口狭缝上,单色仪选择性地将一窄谱带的光透过出口狭缝。从狭缝出来的光束经过流动池,被其中的溶液部分吸收。通过测定吸收后到达光电二极管的光强度与空白参比时的光强度,来确定样品的吸收值。

大部分可变波长检测器通过一分光器将光束的一部分送到在参比一侧的第二个光电二极管。参比光束以及参比二极管用于补偿因光源波动产生的光强变化。为了对色谱过程中各个峰都获得最灵敏的检测,要求单色仪能够编程控制便于在运行过程中自动变换波长。可变波长检测器的这种设计,使它在—

次只能测量光谱中某一点的吸光值,然而在实际应用中,当两个具有不同最大吸收波长的化合物在色谱过程中难以分离的情况下,通常需要同时测量不同波长下的吸光值。而如果需要化合物的光谱,则必须停泵,通常,一个普通的可变波长检测器进行光谱扫描的时间要长于组分色谱峰的洗脱时间(即色谱峰宽——译者注)。

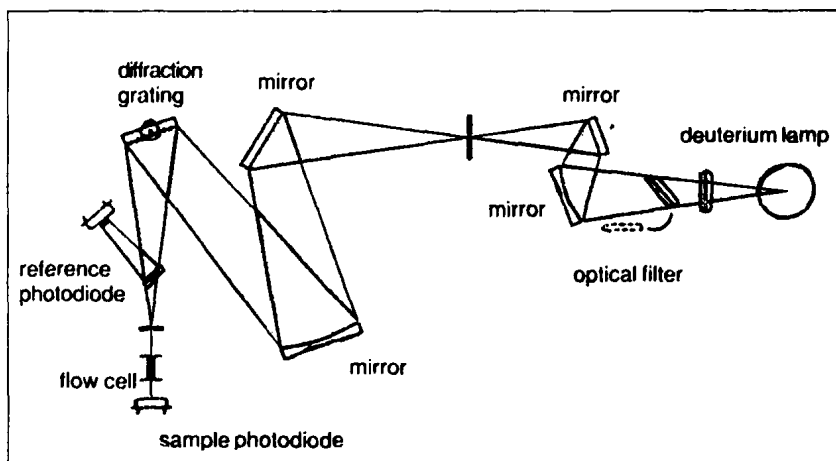


图4.1 可变波长检测器光路图

二极管阵列检测器

惠普二极管阵列检测器的结构如图4.2所示。一个消色差透镜系统将多色光聚焦在流动池内。然后，光束在全息光栅的表面色散，并投射在二极管阵列上。HP二极管阵列检测器通过其光电二极管阵列的电子线路，在10毫秒左右测出190nm到600nm的光强。

检测器的阵列由211个二极管组成，每一个二极管宽50mm，各自测量一窄段的光谱。通过测量固态线路开关连接到公共输出线上的储存电容器的电荷量来测出光电二极管所接收的光强度(参见图4.3)。这些开关由一个

寄存器控制，首先，给电容器充电到一个特定的量，在每一次测量周期开始时，由于光照射二极管，产生入射光二极管电流，导致充电电容器的部分放电，因而给电容器重新充电的电流正比于放电所需的光强度。通过测量整个波长范围内的光强度的变化，我们即可得到一张吸收光谱。

一个二极管所检测的光谱带宽与入射光狭缝的大小有关。而与普通的光谱检测器相比，它的样品与全息光栅的相对位置正好相反，因此，这种结构经常被称为“倒光学”系统。(reversed optics)

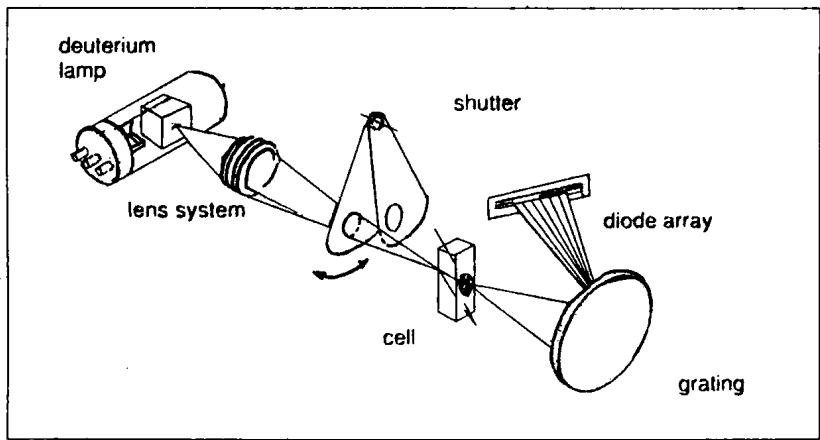


图4.2 二极管阵列检测器的光路图

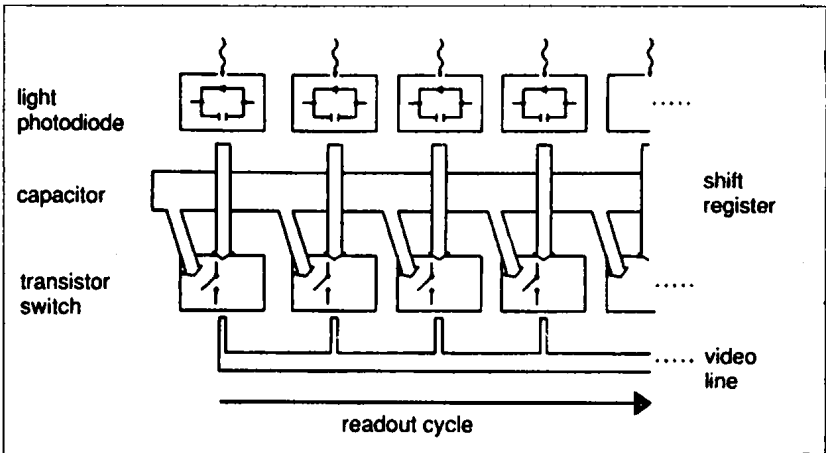


图4.3 光电二极管阵列

5 二极管阵列的特点

用于方法开发及日常分析的特点及好处

全波长测定色谱峰

——直至400nm的宽谱带检测

当开发一个新的色谱方法时,几乎很少甚至完全得不到所需的检测器条件,诸如为了记录吸光值差异所需的确切波长。在这种情况下,如果使用普通的可变波长检测器,必须重复进样,并每次改变不同检测波长来确认检测所有的色谱峰。而利用二极管阵列检测器,你可以选择整个波长范围,例如从190 nm到600nm,谱带宽度为400nm,仅需一次进样,在这一段波长范围内有吸收的所有组分,都被检测出来。图5.1是一个毒物样品,无论选择25nm还是选择280nm,都检测不出所有的色谱峰。只有选择从220到300nm的宽谱带检测,才能保证三个峰同时被检测到。

一次运行即可找出全部最佳波长

一旦色谱峰能够检测,下一个任务便是对每一个峰找出其相应的最大波长。二极管阵列检测器在给定的波长范围内实时采集每一色谱峰的光谱并计算其最大吸收波长。图5.2是一个具体例子,每一个峰的最大吸收波长都可自动计算并打印在峰尖附近。

同时,这些数据都可以用三维图的形式表示,即分析时间——波长——吸光值。这一点对于复杂样品尤为重要。让我们以多环芳烃的混合物为例来说明这一点,这里,我们面临的问题是,如何获得使每一个化合物都具有最大吸收的检测波长。图5.2说明了如何容易地找出最佳波长。

其结果显示在屏幕的不同部分。在屏幕中间是三维图:分析时间,波长及吸光强度(在彩色显示器上用不同颜色表示,在单色显示器上,则用不同深度的灰带表示)。在这种等吸收图上表达的数据可由波长一时间平面上进行垂直比较。最大吸收值是红色。

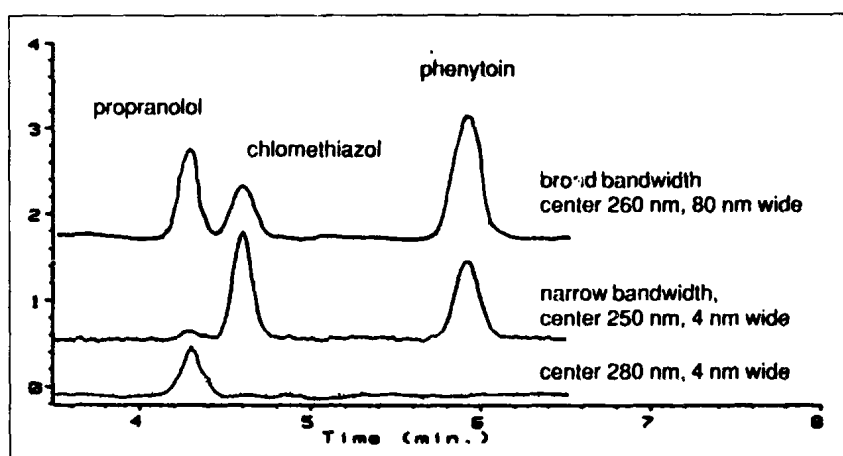


图5.1宽谱带检测

色谱图在下面的窗口显示。这是从光谱数据重建的色谱图,其波长准确对应于等吸收图上的光标指示位置。当光标沿波长轴移动时,下面窗口内的色谱图亦作相应的改变。

用这种方法,我们发现需要在三个不同波长下检测各个多环芳烃以达到足够的灵敏度。这些波长是270,310,320nm。

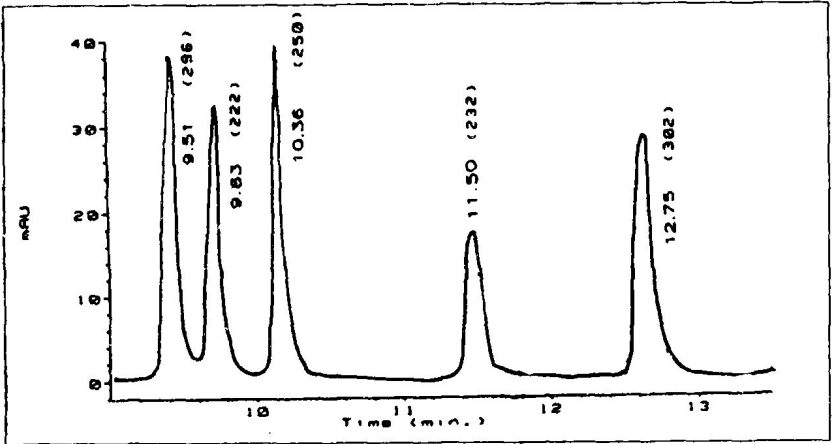


图5.2 自动波长最优化的结果

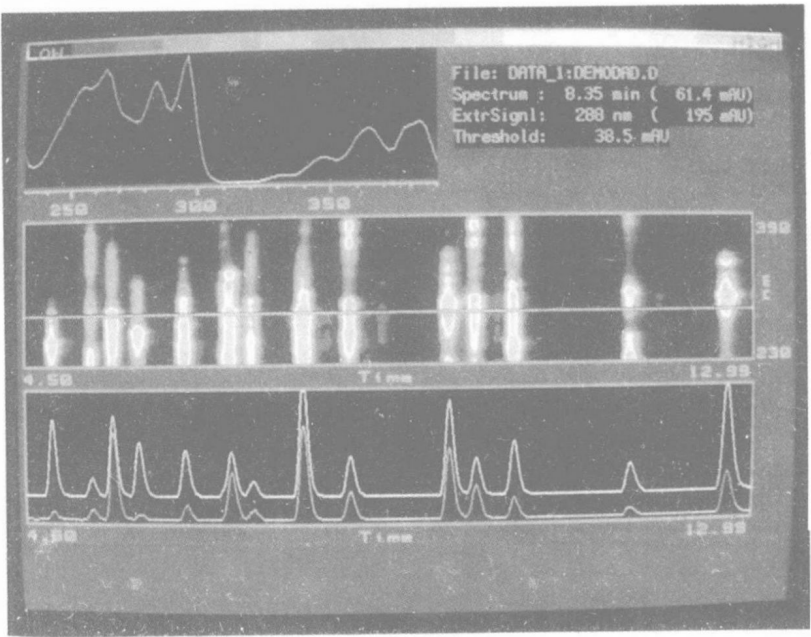


图5.3 等吸收图

多信号检测

二极管阵列检测器可以在多个波长下监测样品。当被分析组分的最大波长不同时,这一点尤为重要,图5.4是抗生素药品的色谱图及三张典型光谱图。这些药物在食品中的含量受到不同程度的法律限制,因而需要分析方法来监测其含量标准。图中所示选择的不同波长,是为了在最高灵敏度条件下分析各组分。

未分离峰的定量分析

如果两个化合物在色谱上未分离开,那么用单波长检测器就难以进行定量,即使用一个双波长检测器,不进行峰抑制处理也不能定量,因为紫外光谱会重叠在一起。用二极管阵列检测器,即使他们未分离开并且整个波长范围内光谱重叠在一起也可以定量。使这种方法成为可能的技术被称之为峰抑制(Peak suppression)功能,它运用一个另

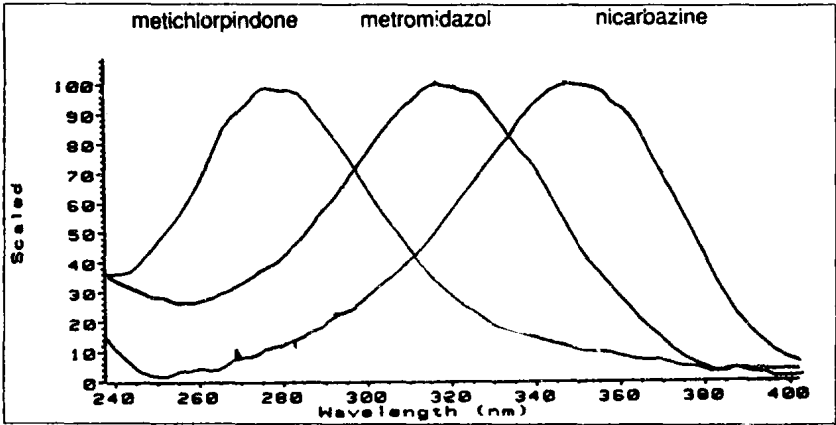


图5.4(a) 抗生素药物的典型光谱图

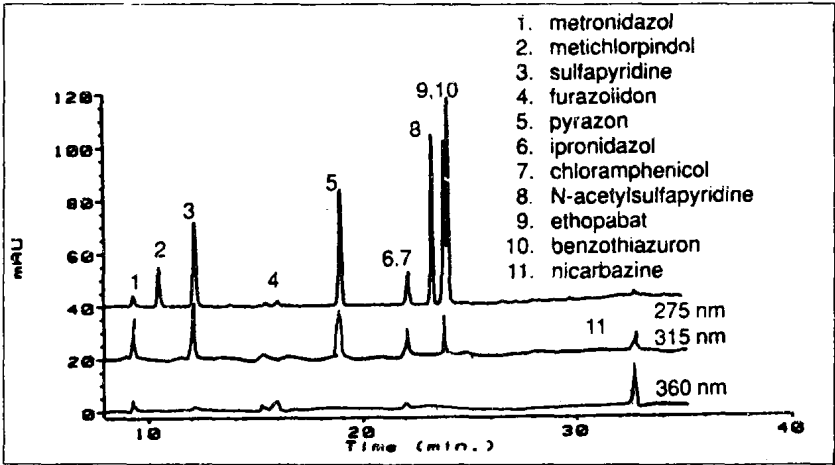


图5.4(b) 抗生素药物的多信号检测

外的波长——参比波长来实现这一点。图5.5是盐酸噻嗪及咖啡因的一对色谱峰，分别为用参比波长和不用参比波长的结果。只有当选择一个合适的参比波长时，才能分析盐酸噻嗪而不受咖啡因的干扰。在第45页的附录A上，你可以找到如何去选择一个正确的参比波长。

峰纯度检验

在开发一个用于研究目的，甚至是质量控制等方面的色谱方法时，重要的是，你需要确认所分离出来的色谱峰是纯组分，还是包含更多的化合物。如果仅从一个色谱图，往往难以作出判断。

利用二极管阵列检测器，通过杂质与组分之间光谱存在的差异，可进行峰纯度检验。

有多种方法可用于峰纯度检验。其中最常用的方法是在峰的洗脱过程中采集多点光谱。通过归一化及光谱叠加，既可以自行作图谱比较亦可由计算机自动进行。当整个波长范围内的光谱是匹配时，表明该色谱峰是纯的。图5.6给出一个实例。分别在峰上波，峰顶及峰下波采集光谱并进行归一化处理。无论是直观比较还是由计算机算出纯度因子，都可以清楚地显示出纯峰及不纯峰之间的差别。

峰纯度检验的一些方法在附录C中将详细讨论。

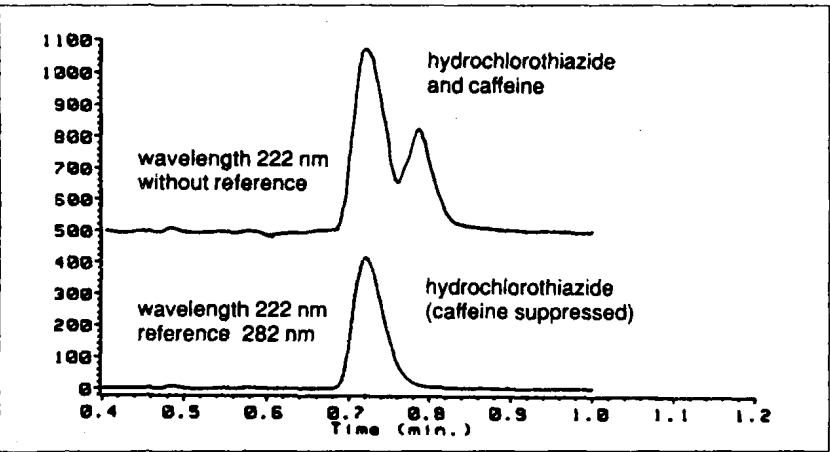


图5.5 设立参比波长的选择性

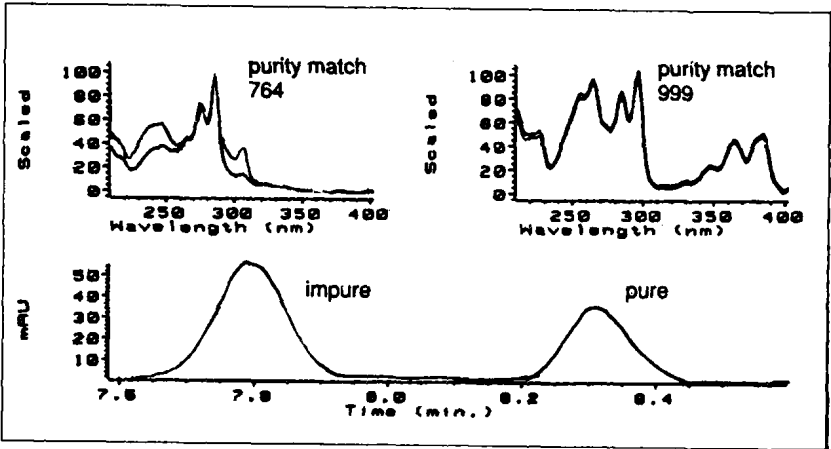


图5.6 光谱叠加法进行峰纯度检验

色谱峰的准确定性

在液相色谱中，我们通常使用绝对或相对保留时间对色谱峰进行定性。在完全确定的色谱条件下，紫外/可见光谱是进行谱峰准确鉴定的有用工具。利用二极管阵列检测器，随着每一峰的流出，可以自动采集峰顶的光谱图。它同谱库峰存数据的比较，可以通过在屏幕上交替显示或者藉助微处理机作数学处理(如图5.7(a))。一个最佳匹配的表按匹配因数的次序列于图5.7(b)。

在自动日常分析中，每一个峰的匹配数可以与它的最高匹配的化合物名称一起打印在报告表上，在色谱图上的每一个峰均在一个选定的谱库内检索并将最佳匹配的化合物

名称标注在谱图上。色谱峰的光谱图可以与谱库调出的最佳匹配化合物的光谱叠加显示，并最终在表格上打印出所有组分的保留时间，峰纯度因子、匹配数及峰鉴定的峰的名称。第56页附录B中列举了应用实例。

二极管阵列检测器的光谱功能对于其它领域也十分有用，例如HPLC中的溶剂的自动最优化。当色谱峰数目少于所进样品中组分数时，峰纯度检验会提供有用的线索，从而指出哪个峰含有两种组分，而色谱峰的洗脱顺序可通过色谱峰的光谱与已知的标准光谱比较来确定。

“比较”的方法及一些参数对匹配因数的影响在附录B中讨论。

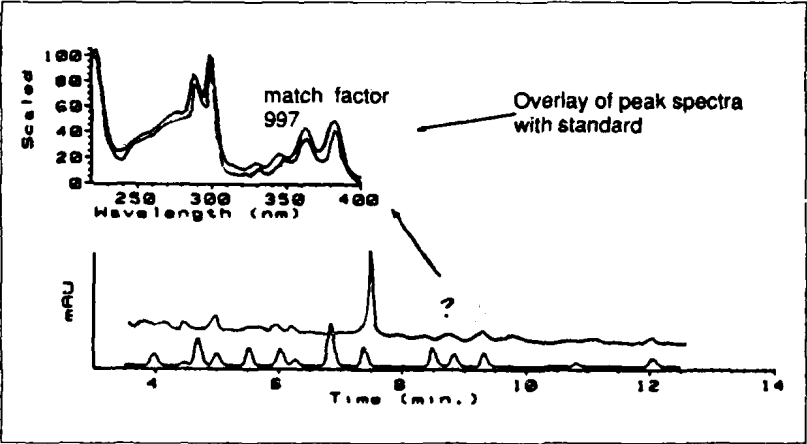


图5.7(a) 光谱谱库检索

Name		ID#	Library Entry#	Match Quality
1:	Benzo[g,h,i]perylene	415	15	999
2:	Dibenzo[a,j]anthracene	427	27	476
3:	Benzo[a]pyrene	403	3	451
4:	Naphthalene	412	12	445
5:	Dibenzo[a,h]anthracene	425	25	442
6:	Fluorene	410	10	379
7:	Benzo[e]pyrene	417	17	362
8:	Cyclopenta[c,d]pyrene	407	7	317
9:	Benzo[b]fluoranthene	416	16	296
10:	Perylene	423	23	296

图5.7(b) 匹配因数表

6 应 用

本节提供了二极管阵列检测技术在主要的HPLC应用领域中的重要特点一览。至于这一技术在HPLC中的所有应用,则不赘述,在每一应用领域中,我们仅列举若干典型例子。这些应用实例只是给读者一个解决应用问题的引导而并非最终答案。在附录E中,列出了二极管阵列检测技术在HPLC中应用的较详尽的文献篇目。

附录E中也列出了本章论及的每一个应用实例的参考文献。诸位可以从原文中获得更为详尽的色谱条件。



药 物 学

紫外/可见光谱谱库检索技术

对药物代谢物的全分析

HPLC技术对生物体液中(如血清,血浆及胆汁等)未知药物代谢产物的研究与鉴定是个难题,因为生物基体的复杂成份而往往给出大量的气谱峰,必须从中鉴别出可能的代谢物。尤其当代谢物的浓度较低以及基体组成变化的情况下,对它们的识别更加困难。

药物代谢物的UV光谱往往与其原药的光谱相似。用二极管阵列检测器,可以将色谱图中每一个峰的光谱与原药的光谱自动进行比较。如果光谱匹配因数超过预先的设定值,则相应的色谱峰自动作为原药的代谢物,并与其匹配因数一并列出,而光谱图则可以自动或交替地与原药光谱图叠加显示。

我们利用这一技术研究哌胺甲尿啉,一种抗高血压药,它在动物体内可进行多种代谢反应。其两种代谢物的结构如图6.1所示。图6.1(b)所示的色谱图是对一次口服60mg哌胺甲尿啉后收集的尿样的LC分析结果。在色谱分析过程中,用二极管阵列检测器采集每一色谱峰的紫外/可见光谱图并存储于磁盘内。分析结束后,对每一个峰的光谱与原药的光谱进行比较。当光谱比较的匹配值超过设定值时,该峰即被认为代谢物,匹配因数打印在该峰顶上方。

图6.1(c)是将代谢物色谱峰的光谱与哌胺甲尿啉的光谱叠加显示的结果。在这方面的应用课题上校正基体的光谱影响是十分重要的。为此,在与原药光谱比较以前,先对色谱峰的光谱图进行基线校正。

关于这一分析方法的详细信息请参阅附录E上标有②的参考文献。

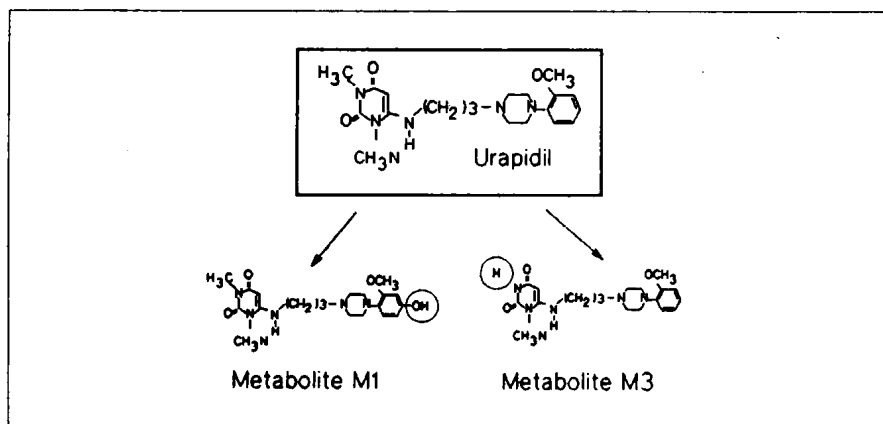


图6.1(a)哌胺甲尿啉的代谢方式

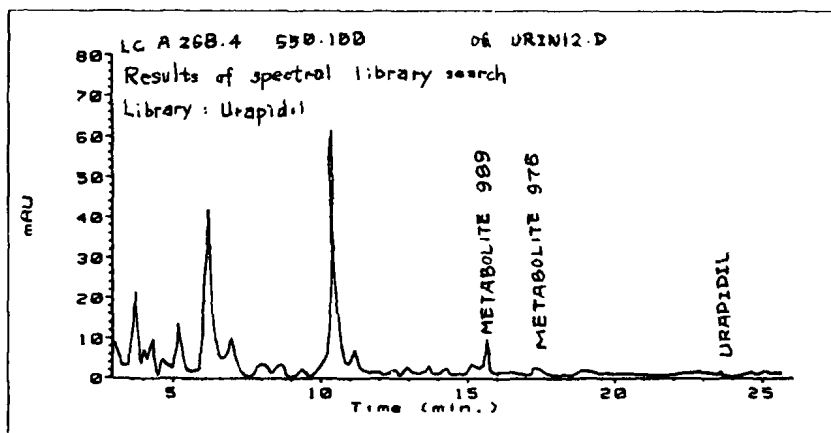


图6.1(b) 药物代谢物的自动光谱检索

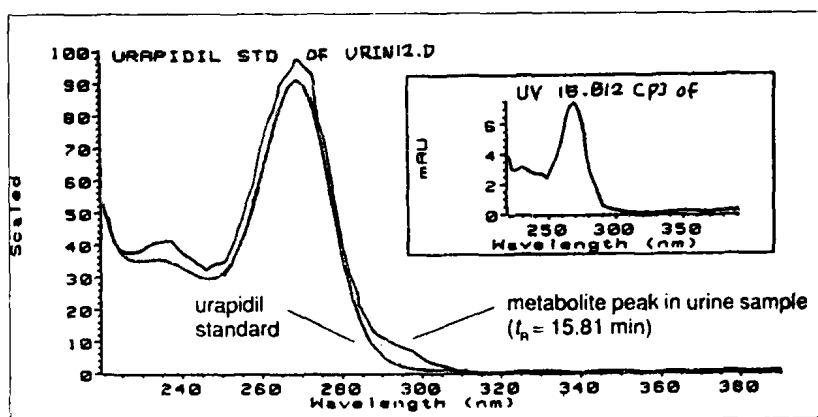


图6.1(c) 原药及其代谢物的光谱比较

新的微生物产品的全分析

微生物过程可用于多种抗生素的生产, 例如青霉素, 四环素, 氯霉素及链霉素等。在这些产品的生产过程中, 必须对其中的“活性”组分进行分析、提取及纯化。HPLC技术非常适合于这一领域里的半制备及分析分离, 然而, 普通检测器对于样品中的活性成份不可能给出任何信息。

利用二极管阵列检测器可进行快速地全

分析。图6.2是一个应用实例。这是Urdamycine的细胞提取物, 一种由链霉素氟氏菌素产生的新型抗生素的三维光谱色谱图。三维图将吸光值作为波长及时间的函数显示出来, 在350nm至550nm的吸收是Urdamycine的Chinoide辅基的典型吸收区间。

图6.2(a)清楚地显示出, 色谱图前半部流出的组分并没有象Urdamycine那样, 在350nm以上有吸收。因而对这些化合物不必再进一步去研究。Urdamycine在色谱的后半部分洗脱出来, 一旦这些活性成份被认定后, 可将馏份收集器与二极管阵列器串联并

收集它们,用于进一步地研究,诸如结构解析等。

三维光谱一色谱图亦可以用来进行峰纯度检验,为此需要放大图形,也需要利用软件将图沿轴作任意角度的转动。图6.2(b)是将

保留时间窗定在9.1到9.6分的三维图。你可以发现,在9.2分钟的色谱峰并不纯。

关于这类分析更详细的信息可参阅附录E标有①的文献。

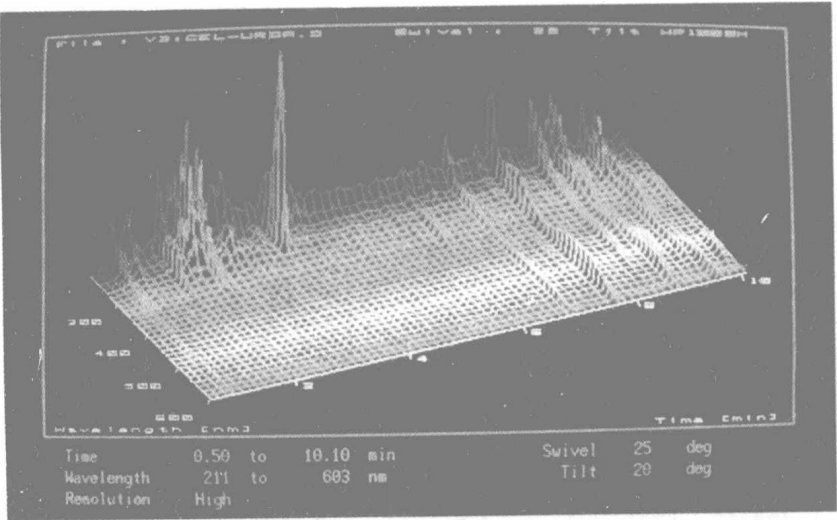


图6.2(a) 样品的三维谱图

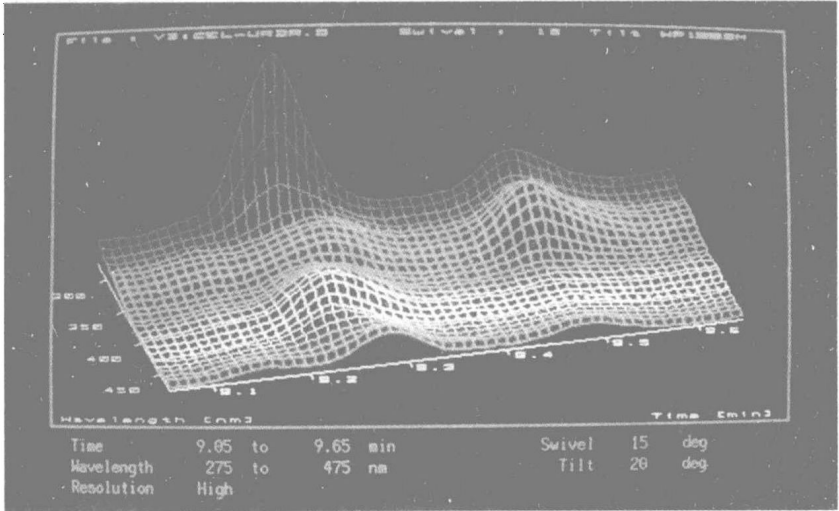


图6.2(b) 三维图用于峰纯度检验