

反相高效液相色谱中流动相选择与优化的研究进展

全红娜¹, 金松子², 雷勇胜², 蒋庆峰^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

摘要: 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 中的流动相对组分具有很强的亲和力, 并且与固定相共同竞争组分, 流动相的种类及配比直接影响到组分的分离。因此, 正确的选择流动相, 确定最佳的色谱分离条件, 可以实现更理想的分离。结合日常实验经验和相关文献, 综述了在 RP-HPLC 中, 如何快速地进行流动相的选择与优化。

关键词: 反相高效液相色谱法; 流动相; 保留因子; 分离度

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)10-1190-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.10.027

Research progress on selection and optimization of mobile phase in RP-HPLC

QUAN Hong-na¹, JIN Song-zi², LEI Yong-sheng², JIANG Qing-feng²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: The mobile phase of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) has a strong affinity for the components and competes for the components with the stationary phase. The species and proportion of the mobile phase directly affect the separation of components. Therefore, correctly choosing the mobile phase and determining the best chromatographic conditions could achieve better separation. Combining daily experiences with related literatures, the selection and optimization of mobile phase in RP-HPLC has been discussed.

Key words: RP-HPLC; mobile phase; retention factor; resolution

在色谱方法开发过程中, 高柱效、高分离度是一贯追求的目标, 而色谱柱和流动相的选择特别地备受关注^[1]。流动相是影响高效液相色谱 (HPLC) 性能的重要因素^[2], 其性质包括有机溶剂的种类、配比和 pH 值等, 对保留时间、峰形和分离度都有影响, 这些直接对实验结果产生不可忽视的作用, 因此正确的选择流动相是至关重要的。本文探讨了反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 中如何正确快速地进行流动相选择, 并且优化最佳分离条件。

1 分析样品的组成及性质

在色谱方法建立之初, 对样品的化学组成和理化性质要有一定的了解, 才能确定与选择出最佳的初始分离模式。

1.1 样品的相对分子质量

考虑到多肽的相对分子质量大和组成复杂, 并

且其保留行为对有机溶剂比例的微量变化非常敏感, 等度洗脱时分离结果的重现性差, 白泉等^[3]就分别对多肽 32、21 设计了 5、6 种线性梯度洗脱方式进行流动相优化, 最终各自优化出一种线性梯度方式, 分离、纯化和制备出高纯度的两种多肽。样品的相对分子质量对初始条件的选择是有影响的, 对于相对分子质量大的样品, 如多肽、蛋白质和低聚物等生物大分子, 梯度洗脱是最好的选择^[4]。对于低相对分子质量的样品, 需要通过分析样品性质, 如溶解性、分子极性、化合物结构、特殊官能团等, 选择适宜的流动相及分离模式。

1.2 样品的溶解度

了解样品在有机溶剂中的溶解度, 根据“相似相容”原理, 初步判断样品是极性还是非极性化合物。若样品溶解于己烷、庚烷等非极性溶剂时, 即

收稿日期: 2014-06-25

作者简介: 全红娜 (1987—), 女, 硕士在读, 研究方向是药物分析。Tel: (022)23006881 E-mail: qhn2007452083@163.com

*通信作者 蒋庆峰 Tel: (022)23006881 E-mail: jiangqf@tjipr.com

为非极性样品, 可以考虑使用正相色谱; 若样品溶解于二氯甲烷、甲醇、乙腈等极性溶剂时, 即为极性样品, 考虑的分离模式就是反相色谱。如果样品溶于水, 就首先检查水溶液的 pH 值。

1.3 样品的酸碱性

当样品中有酸或碱性物质时, 在实际的 RP-HPLC 工作中, 常加入酸^[5]、碱或缓冲液作为离子抑制剂来抑制被测物解离。较常用的是缓冲盐, 其不仅可以控制流动相的 pH 值, 还起到提高保留时间的重现性和改善峰形的作用^[6]。陈丹^[7]在用 ODS-C₁₈ 色谱柱分析间苯三酚时, 发现当流动相为水-有机相系统时, 间苯三酚的峰有严重拖尾现象, 峰形较差。分析原因可能是间苯三酚呈弱酸性, 在该系统下呈解离状态, 最终优化的流动相为乙腈-磷酸盐缓冲溶液(6:94)。此时主峰与杂质峰完全分离, 并且其峰形良好。

1.4 样品的稳定性

Ghari 等^[8]用一种简单的 RP-HPLC-UV 法代替了《美国药典》中阿奇霉素的检测方法, 研究中考察了流动相不同 pH 值时样品的分离情况。当流动相 pH 值为 6 时, 阿奇霉素峰拖尾严重, 这是由于阿奇霉素在酸性溶液中不稳定; 当流动相用 10% NaOH 溶液将 pH 值调至 8 时, 则获得了良好的峰形, 与其他杂质分离情况良好。因此, 选择流动相时, 应首先考虑样品在该流动相体系中是否稳定存在。

1.5 对映异构体

当样品中有对映异构体时, 就要考虑在流动相中加入手性衍生化试剂^[9]或使用手性色谱柱^[10]。

2 改变选择性和分离度

执行初始分离条件时, 会出现各种各样的问题, 如保留时间过短或过长、分离度达不到要求、拖尾严重等, 通过调节有机溶剂和添加剂的性质, 可控制选择性和分离度, 达到最佳分离效果。

2.1 有机溶剂对分离的影响

有机溶剂的种类和配比决定流动相的极性, 即洗脱能力。这对出峰时间、峰形、分离度等有着不可忽视的作用。

2.1.1 有机溶剂比例对分离的影响 初始分离条件中, 一般有机溶剂的比例定为 80%, 然后逐步减少有机相比例, 直到保留因子(k)落在所期望值的范围内, 即 $1 \leq k \leq 10$, 再考虑分离度、拖尾因子和出峰时间等, 优化出合适的流动相比例。Snyder 等^[11]在分离 4 种硝基取代苯混合物时, 流动相是乙腈和

水, 以 80% 的乙腈作为初始分离条件, 其保留时间很短 ($k=0.3$), 并且几种物质的分离度几乎为零; 接着改用 50% 乙腈, 样品的保留范围比较合理 ($0.9 \leq k \leq 4.2$), 但是分离度仍不符合要求, 进一步减少至 40% 乙腈, 保留因子范围是 $4.0 \leq k \leq 10$, 分离度为 1.4, 仍不符合要求。如果再继续减少乙腈比例, 保留因子就有可能大于 10, 因此就需要采用其他方法来改变选择性和分离度。

2.1.2 有机溶剂种类对分离的影响 如上述 Snyder 等^[11]的分离试验, 调整有机溶剂比例仍无法达到要求时, 就要考虑换有机溶剂的种类。较常用的是乙腈和甲醇。贾涛^[12]以甲醇-水(65:35)为流动相检测左炔诺孕酮时, 不管何种比例, 检测出的杂质都比较多, 且分离度不符合要求, 就考虑用乙腈代替甲醇, 结果左炔诺孕酮出峰时间合适, 并与其他杂质分离情况良好。

当单独使用乙腈和甲醇都不能满足要求时, 就可以考虑将两者混合使用。Kurade 等^[13]用 C₁₈ 色谱柱, 分离雷米普利和替米沙坦时, 当单独用缓冲盐-乙腈和缓冲盐-甲醇为流动相时, 分离度、拖尾因子和保留时间均不符合要求, 考虑用甲醇和乙腈的混合物, 最终优化的流动相系统为磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 pH 值至 3.4)-甲醇-乙腈(15:15:70), 结果显示雷米普利、替米沙坦的保留时间分别为 3.68、4.98 min, 二者分离情况良好。

若不能用等度洗脱分离样品时, 梯度洗脱是一种非常好的方法。丁素玲等^[14]在检测盐酸帕洛诺司琼的有关物质时发现, 有一中间体的保留时间是主峰出峰时间的 9~10 倍, 为了缩短分析时间, 采用了梯度洗脱, 缩短了二者的出峰时间差距, 并且分离度也符合要求, 减少了时间和试剂的浪费。利用 RP-HPLC 同时测定阿托伐他汀和 7 种相关杂质的量, 由于 8 种物质的保留范围宽, 考虑梯度洗脱, Petkovska 等^[15]采用全因子变量设计, 通过对有机溶剂比例、有机混合溶剂中四氢呋喃的比例和梯度时间的考察, 最终确定了有机溶剂的变化比例是 35%~75%, 有机混合溶剂中四氢呋喃的比例是 10%, 梯度洗脱时间是 10~20 min。在上述条件下, 阿托伐他汀和 7 种相关杂质分离情况良好。

2.2 缓冲盐对分离的影响

缓冲盐的种类、pH 值和浓度直接影响缓冲盐的离子强度, 而流动相的离子强度对可解离化合物的色谱峰形具有显著影响, 原因在于色谱柱的过载

效应随着流动相离子强度的增加而减弱^[16]。

2.2.1 缓冲盐种类对分离的影响 《中国药典》2010 年版^[17]中测定头孢呋辛钠中头孢呋辛时, 流动相为乙酸盐缓冲溶液(用 5 mmol/L 乙酸钠和 0.1 mol/L 乙酸调 pH 值至 3.4) - 乙腈(10:1), 与《英国药典》^[18]和《美国药典》^[19]不同的是用了 C₁₈ 色谱柱, 结果峰形呈三角形, 拖尾因子、峰宽和分离度均不符合要求。当改用甲酸盐时, 同时流动相进一步优化成甲酸盐缓冲液(用 80 mmol/L 甲酸钠和 0.14 mol/L 甲酸调 pH 值至 3.4) - 乙腈(9:1), 即使用 C₁₈ 色谱柱也能得到较好的峰形, 原因在于甲酸的 pKa 值为 3.7, 乙酸 pKa 值是 4.7, 甲酸的 pKa 值与流动相的 pH 值接近。选用 pKa 值与流动相 pH 值越接近的缓冲盐, 其离子强度越强, 即缓冲容量越大, 易得到较好的峰形。

2.2.2 缓冲盐的 pH 值对分离的影响 如上所述, 流动相的 pH 值除了与缓冲盐本身的 pKa 值有关外, 也应该考虑分离样品的 pKa 值, 使样品在该 pH 值条件下, 能以分子状态存在^[20]。马志新等^[21]依据离子抑制色谱, 用反相键合硅胶柱, 含 18% 的甲醇 - pH 3.5 的 50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液为流动相, 成功分离了含有丁二酸、戊二酸、己二酸的混合二元羧酸。丁二酸、戊二酸、己二酸的各步 pKa 值均在 4~6, 用磷酸盐缓冲溶液, 调节 pH 值至 3.5, 3 种酸都以游离状态存在, 减弱了与固定相的保留, 获得了良好的分离效果。阿托品有叔胺结构, 呈碱性, 在 ODS 色谱柱上保留时间很短, 张国柱等^[22]用磷酸将三乙胺溶液的 pH 值调至 7.5, 使阿托品由解离状态转为游离态, 从而增加了其在色谱柱上的保留。流动相的 pH 值高于或低于被分析物的 pKa 值两个 pH 值单位时, 有助于获得尖锐的峰形, 化合物 99% 以一种形式存在^[23]。

2.2.3 缓冲盐的浓度对分离的影响 缓冲盐浓度越大, 其离子强度越强, 对峰形的改善越明显。《美国药典》^[24]测定青霉素 G 钾中青霉素 G 时, 流动相为甲醇 - pH 4.3 的 10 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲盐, 当进样量大时, 其峰形拖尾严重。综上所述, pH 值为 4.3 时, 缓冲盐的缓冲容量几乎为零, 导致缓冲液过载, 当用磷酸调 pH 值至 3.5 时, 峰形有所改善, 但仍有拖尾。于是考虑增加缓冲盐浓度, 增加至 50 mmol/L 时, 峰形进一步改善。

2.3 特殊的添加剂对分离的影响

当被测化合物带有强离子官能团时, 如磺酸基、

羧基、胺基和铵基等, 在反相色谱柱上几乎无保留, 给药物的分离分析带来巨大困难。参考中性化合物, 一般在流动相中加入离子对试剂, 与被分析组分的离子生成不带电荷的中性离子对, 从而增加与固定相的作用, 改善了分离效果^[25]。

2.3.1 碱性离子对试剂 碱性离子对试剂较常用的是高氯酸盐和烷基磺酸盐。陈红等^[26]用 C₁₈ 色谱柱, 测定噻托溴铵的两种中间体, 即二(2-噻吩基)乙醇酸东莨菪酯和 2,2-二噻吩基乙醇酸甲酯, 实验过程中发现: 由于两种化合物结构含有极性基团和 N、S 原子, 会部分质子化而带正电荷, 与硅胶柱上残留的硅醇基相互作用, 当不加离子对试剂时, 峰形拖尾严重。因此, 在流动相中加入离子对试剂戊烷磺酸钠, 形成中性离子, 改善峰形和分离效果。王鹏嵩等^[27]以 C₁₈ 色谱柱, 实验初期选用乙腈 - 磷酸盐缓冲液和甲醇 - 磷酸盐缓冲液作为流动相, 定量分析血液中二甲双胍的浓度, 无论怎么改变有机相比例和缓冲盐性质, 二甲双胍的保留时间很短, 与血浆中杂质分不开。在酸性条件下, 加入十二烷基磺酸钠, 得到了满意的分离效果。

另一种分析碱性化合物时, 抑制固定相残留硅醇基作用的添加剂是胺^[28], 最常用的是三乙胺。El-Enany 等^[29]用反相液相色谱法测定了格列苯脲片剂的量时, 最初始无论是选用的甲醇 - 水、甲醇 - 缓冲盐或乙腈 - 水为流动相, 拖尾因子高达 2.0。实验证实, 流动相中加入三乙胺后, 改善了峰拖尾, 获得了满意的分离效果。

2.3.2 酸性离子对试剂 《中国药典》2010 年版中, 采用高效液相色谱测定氟喹诺酮类药物时, 一般采用反相柱和磷酸盐缓冲液 - 甲醇或乙腈作流动相, 几乎可适用于所有的氟喹诺酮类药物^[17]。考虑到喹诺酮类药物具有两性基团^[30], 在水溶液中通常以离子形式存在, 与柱填料表面残存的硅醇基有强烈吸附作用, 导致色谱峰易出现拖尾现象。根据离子对色谱理论, 在流动相中加入反离子对试剂进行分析。孙汉文等^[31]将四丁基溴化铵作为离子对试剂加到乙腈 - 水流动相中, 分别以磷酸和三氟乙酸调节流动相 pH 值至 2.87, 成功分离了依诺沙星、氟罗沙星、培氟沙星、洛美沙星、环丙沙星和恩氟沙星等 7 种氟喹诺酮类药物。

3 其他方法

很久以来, 国内外色谱工作者们结合数学知识、统计学方法和计算机软件等技术, 建立了许多优化

流动相的方法,如单纯形法、四面体法、图形法和人工神经网络等,为流动相的选择和优化提供了科学依据。

3.1 数学和统计知识的应用

早在 18 世纪,色谱工作者就利用数学知识和统计学方法,就提出了许多流动相优化的方法。如单纯形法、四面体法和实验设计技术。Imam 等^[32]根据混合设计技术设计实验,同时优化了流动相组分的配比和浓度,并绘制了保留时间和峰面积与流动相组分浓度和配比的三维反应面图,用此图选择出分离利培酮的最佳条件。Nakov 等^[33]用一种快速高效的亲水作用液相色谱法(HILIC),同时分离了亚胺培南及降解杂质硫霉素和西司他汀,研究中采用中心组合实验设计法优化流动相,结果显示三者分离情况良好。

3.2 图形技术的应用

对已知样品的分析,色谱工作者多采用窗口图形法(WD)和重叠分辨率法(ORM)。Weyland 等^[34]在 WD 基础上,采用了非线性模型,成功分离了 11 种磺胺类药物。

3.3 神经网络的应用

人工神经网络(ANN)是一种应用类似于大脑神经突触联接的结构进行信息处理的数学模型。如今,大多数色谱工作者,在建立 ANN 模型之前,会构建一个特殊的色谱响应函数。Du 等^[35]证实了 ANN 和新的色谱响应函数的有序结合,是一种灵活和高效的流动相优化方法。Jansen 等^[36]构建人工神经网络-遗传算子(ANNGA)模型,并用实验验证了该模型的可行性,成功分离了 4 种胆固醇酯、胆固醇和 3-棕榈酸。

3.4 计算机技术的应用

随着计算机技术的发展与色谱理论的深入研究,色谱工作者也建立了计算机优化流动相方法,为流动相的选择优化提供了更快,更准确的方法。人机界面(HCI)是用于确定色谱最佳分离条件的软件之一,由韩国仁荷大学高纯度分离研究室设计并编程。金银哲等^[37]利用 HCI 程序确定了 5 个儿茶酚化合物在色谱分析中的最佳流动相条件,并完全分离了这 5 种物质。

4 结语

对于大多数的研究者来说,流动相的选择和优化是整个色谱方法开发过程中的难点,也是最耗时耗力的一部分。本文仅简单介绍了流动相溶液中的

有机溶剂、缓冲盐和一些特殊的添加剂对分离的影响,即在反相高效液相色谱方法建立前,应先分析药物的基本结构,掌握其物理化学性质,特别是药物的极性、解离性和酸碱性,确定初始分离条件,再根据出现的具体问题,结合日常实践经验的积累、相关文献和影响分离的因素,改变选择性和分离度,正确快速地优化出最佳的流动相组成,为实验者选择和优化流动相提供简单参考。

然而对于相对分子质量较大、成分和组成复杂的样品,以及那些中药成分和生物大分子样品,这些是远远不够的,这就需要研究者们在实践中不断总结,不断积累,分享出更多有价值的经验,并且充分利用计算机软件系统,构建一套完整系统的流动相选择优化的理论。

参考文献

- [1] 王 丽,申兰慧,陈国清. 浅谈样品溶剂对高效液相色谱行为的影响 [J]. 中国药事, 2013, 27(2): 163-166.
- [2] 徐 红,侯 健. 高效液相色谱的色谱柱的类型和流动相的选择方法 [J]. 计量与测试技术, 2010, 37(2): 10.
- [3] 白 泉,葛小娟,耿信笃. 反相液相色谱对多肽的分离、纯化与制备 [J]. 分析化学研究简报, 2002, 30 (9): 1126-1129.
- [4] 施耐德,约瑟夫,约 翰. 现代液相色谱技术导论 [M]. 第 3 版. 陈小明,唐雅妍,译. 北京:人民卫生出版社, 2010: 198-199.
- [5] Ming X, Han S Y, Qi Z C, et al. Chromatographic retention prediction and octanol-water partition coefficient determination of monobasic weak acidic compounds in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography using acids as ion-suppressors [J]. *Talanta*, 2009, 79(3): 752-761.
- [6] Gardner M S, Voyksner R D, Haney C A. Analysis of pesticides by LC-electrospray-MS with postcolumn removal of nonvolatile buffers [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(19): 4659-4666.
- [7] 陈 丹. 间苯三酚口服制剂的研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2013.
- [8] Ghari T, Kobarfard F, Mortazavi S A. Development of a simple RP-HPLC-UV method for determination of azithromycin in bulk and pharmaceutical dosage forms as an alternative to the USP method [J]. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12(Suppl): 57-63.
- [9] 徐春秀,石 玉,张师愚,等. 3-环己烯-1-甲酸的手性拆分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 126-128.
- [10] Osipov A S, Orlov E N. Separation of positional isomers using chiral chromatography columns [J]. *Pharm Chem J*,

- 2012, 46(5): 288-291.
- [11] Snyder L R, Quarry M A. Computer simulation in HPLC method development. Reducing the error of predicted retention times [J]. *J Liq Chromatogr*, 1987, 10(8/9): 1789-1820.
- [12] 贾涛. 高效液相色谱法检测饲料中左炔诺孕酮的探讨 [J]. 检测分析, 2013(5): 35-39.
- [13] Kurade V P, Pai M G, Gude R. RP-HPLC estimation of ramipril and telmisartan in tablets [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2009, 71(2): 148-151.
- [14] 丁素玲, 袁玉. 反相高效液相色谱法检测盐酸帕洛诺司琼的有关物质 [J]. 中国药业, 2010, 19(16): 25-26.
- [15] Petkovska R, Cornett C, Dimitrovska A. Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and related compounds by use of chemometrics [J]. *Anal Lett*, 2008, 41(6): 992-1009.
- [16] 刘浩, 王红武, 丁建英, 等. 流动相的离子强度对 RP-HPLC 中抗生素色谱峰形的影响 [J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(1): 25-33.
- [17] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [18] British Pharmacopeia [S]. 2009: 1179.
- [19] USP32-NF27 [S]. 2008: 1865.
- [20] 马小利. 四氟苯甲酸反相高效液相色谱法分离条件的探索 [J]. 广州化工, 2010, 38(7): 149-150.
- [21] 马志新, 孙晓波, 徐丽, 等. 混合二元羧酸的一种高效液相色谱分析方法 [J]. 河南化工, 2013, 30(3/4): 51-52.
- [22] 张国柱, 任海燕, 王仕宝, 等. 离子抑制色谱法测定维 U 颠茄铝胶囊(III)中阿托品的含量 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(4): 246-247.
- [23] 龚时琼. 高效液相色谱分析中异常峰的分析与处理 [J]. 实验技术与管理, 2010, 27(6): 37-39.
- [24] USP32-NF27 [S]. 2008: 3228.
- [25] 金艳红. 印染织品和废水中直接染料的色谱与荧光分析研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2010: 15.
- [26] 陈红, 李来生, 方奕珊, 等. HPLC 法测定二(2-噻吩基)乙醇酸东莨菪酯和 2, 2-二噻吩基乙醇酸甲酯的含量 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2011, 35(5): 447-449.
- [27] 王鹏嵩, 吴海涛, 黄春新. 反相高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍的血药浓度 [J]. 中国热带医学, 2009, 9(8): 1607-1608.
- [28] Claessens H A. TrAC-Trends [J]. *Anal Chem*, 2001, 20: 563-583.
- [29] El-Enany N M, Abdelal A A, Belal F F, et al. Development and validation of RP-HPLC method for determination of glibenclamide in pharmaceutical dosage forms [J]. *Chem Cent J*, 2012, 4(2): 593-601.
- [30] 杜黎明, 卫洪清, 张俊燕, 等. 反相高效液相色谱法同时测定 6 种氟喹诺酮类药物 [J]. 色谱, 2013, 21(5): 503-506.
- [31] 孙汉文, 刘广宇, 乔凤霞. 反相高效液相色谱法有效分离和同时测定人体尿液中 7 种喹诺酮 [J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(2): 97-100.
- [32] Imam S S, Aqil M, Akhtar M, et al. Optimization of mobile phase by 32-mixture design for the validation and quantification of risperidone in bulk and pharmaceutical formulations using RP-HPLC [J]. *Roy Soc Chem*, 2014, 6: 282-288.
- [33] Nakov N, Petkovska R, Acevska J, et al. Chemometric approach for optimization of HILIC method for simultaneous determination of imipenem and cilastatin sodium in powder for injection [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2014, 37: 447-460.
- [34] Weyland J W, Bruins C H P, Doornbos D A. Use of three-dimensional minimum a-plots for optimization of mobile phase composition for RP-HPLC separation of sulfonamides [J]. *J Chromatogr Sci*, 1984, 22(1): 31-39.
- [35] Du X L, Li Y, Yuan Q P. A sequence optimization strategy for chromatographic separation in reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *AIChE J*, 2010, 56(2): 370-380.
- [36] Jansen M A, Kiwata J, Arceo J, et al. Evolving neural network optimization of cholesteryl ester separation by reversed-phase HPLC [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(6): 2367-2374.
- [37] 金银哲, 卢敬昊. 利用 HCl 程序确定儿茶酚化合物的反相高效液相色谱最佳分离条件 [J]. 色谱, 2006, 24(5): 466-470.