

免疫-遗传算法用于互变异构体重叠色谱峰的解析

邵学广 王 蕾 张孝松

(中国科学技术大学化学系 合肥 230026)

摘 要 基于免疫算法和遗传算法的特点, 将免疫-遗传算法用于互变异构体重叠色谱信号的快速解析与定量分析。结果表明该方法可将完全重叠的互变异构体信号相互分离, 且可同时得到各成分的定量信息。对多西环素、差相脱水四环素、脱水四环素的混合物重叠色谱信号的解析结果表明, 该方法的回收率在 95%~106% 之间。

关键词 免疫-遗传算法 互变异构体 重叠色谱信号解析

Resolution of Overlapping HPLC Signals of Enantiotropic Isomers using An Immune Algorithm-Genetic Algorithm

Shao Xueguang, Wang Lei, Zhang Xiaosong

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Based on the advantage of immune algorithm and genetic algorithm, an immune algorithm-genetic algorithm (IA-GA) was applied to the fast resolution and quantitative determination of the overlapping HPLC signals of enantiotropic isomers. It was proven that completely overlapping HPLC signals of the enantiotropic isomers can be resolved by using the proposed IA-GA method. Meanwhile, the quantitative information of each component can also be obtained after the resolution. Overlapping HPLC signals of seven mixtures of doxycycline, 4-epianhydrotetracycline and anhydrotetracycline with different concentration were resolved and quantified. Results showed that the chromatographic signal of each component was completely extracted from experimental chromatogram of their mixture samples, and the recoveries lay between 95% and 106%.

Key words Immune algorithm, Genetic algorithm, Enantiotropic isomer, Resolution of overlapping HPLC signals

复杂体系重叠分析化学信号的解析是分析化学的一个重要研究课题。化学因子分析^[1,2]、小波分析^[3,4]等方法在色谱重叠信号的解析中已得到广泛的应用。近年来, 基于对免疫系统功能的模拟而发展起来的免疫算法, 也逐步发展成为一种重叠分析化学信号解析的新型方法, 已成功地应用于一维重叠色谱信号^[5,6]、多组分氨基酸混合物重叠 NMR 信号^[7]以及多组分二维 HPLC 信号的解析^[8,9]。

四环素类药物属广谱抗生素, 在发挥药效的同时对人体有较大的毒副作用, 因此对四环素类药物的分析具有重要意义。但是, 在差相脱水四环素标准溶液的放置过程中, 有部分差相脱

邵学广 男, 39 岁, 教授, 博士生导师, 主要从事化学计量学方法及其应用研究。

国家自然科学基金资助项目(29975027)

2002-03-29 收稿, 2002-10-31 修回

水四环素转化为脱水四环素,这使得差相脱水四环素标准品的色谱图中存在两个色谱峰,即差相脱水四环素的色谱峰(主峰)及其异构体的色谱峰(副峰);同样对于脱水四环素的标准色谱图也有两个峰,即脱水四环素的色谱峰(主峰)及其异构体的色谱峰(副峰)。当这两种四环素类药物同时测定时,两组色谱峰完全重叠,互相干扰。这种现象的存在使差相脱水四环素与脱水四环素混合溶液中各组分的定量测定变得更加困难。

本文将免疫算法与遗传算法相结合,用于多西环素、差相脱水四环素和脱水四环素混合物重叠色谱信号的解析,并得到了满意的定量分析结果。

1 原理与算法

免疫算法是基于对免疫系统中抗体与抗原相互作用过程的模拟而建立起来的一类方法,是重叠信号解析的有力工具。将免疫算法与遗传算法相结合,利用遗传算法的优化机制可提高解析实际分析化学重叠信号的能力。免疫算法的原理与算法及免疫-遗传算法的原理与计算过程已有文献报道^[5~10],该算法的核心内容可描述如下。

对于多组分混合样品的色谱信号:

$$V = \sum_{i=1}^n V_i = \sum_{i=1}^n c_i V_{0i} \quad (1)$$

其中 V 为色谱信号, V_i 为各组分的色谱信号, V_{0i} 为各组分在单位浓度下的色谱信号, c_i 为各组分的浓度,如果各组分的色谱不重叠,则:

$$c_i = \frac{\langle V, V_{0i} \rangle}{\langle V_{0i}, V_{0i} \rangle} \quad (2)$$

但对于重叠色谱信号,式(1)不成立,必须采用迭代算法逐步提取重叠信号中各组分的信号。定义一个反馈向量 V_F 表示被提取的信息,并同时定义:

$$V = [V_{0,1}, V_{0,2}, \dots, V_{0,n}] \quad (3)$$

$$T = \frac{V_0}{\langle V_0, V_0 \rangle} \quad (4)$$

则通过下列迭代过程:

$$dc = \langle (V - V_F), T \rangle \quad (5)$$

$$c = c + dc \quad (6)$$

$$V_F = cV_0 \quad (7)$$

即可得到各组分的浓度 c 和色谱 V_F 信息。

在本文中,如果用 $V_{0,1}$ 表示部分异构化的差相脱水四环素标准溶液(设总浓度为 $c_{0,1}$)的色谱双峰, $V_{0,2}$ 表示部分异构化的脱水四环素标准溶液(设总浓度为 $c_{0,2}$)的色谱双峰, V 表示二者混合溶液的色谱信号,如果混合溶液中二者的异构化程度与标准溶液中相同,则下式成立:

$$V = c_1 V_{0,1} + c_2 V_{0,2} = \sum_{i=1}^2 c_i V_{0,i} \quad (8)$$

其中 c_1 和 c_2 分别表示相对于 $c_{0,1}$ 和 $c_{0,2}$ 的倍数, $c_1V_{0,1}$ 和 $c_2V_{0,2}$ 分别为两组分的色谱信息。

在上述计算中, 混合信号和标样信号的峰位置可能会由于实验的重现性而发生偏移, 遗传算法可用于该偏移量的校正。

2 实验部分

2.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(包括四元泵、二极管阵列检测器及 Agilent1100 化学工作站); 电子天平(上海天平仪器厂); pH-3B 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱(4.6×250mm, 5μm)。

2.2 试剂与样品

多西环素(doxycycline, DC)、差相脱水四环素(4-epianhydrotetracycline, EATC)、脱水四环素(anhydrotetracycline, ATC, 由中国生物制品检定所提供); 甲醇(高效液相色谱专用试剂); 草酸(分析纯); 盐酸(分析纯)和二次重蒸馏水。

DC、EATC、ATC 的标准溶液由三种药物分别溶于盐酸和甲醇后, 经二次重蒸馏水稀释配成一定浓度。样品为 DC、EATC、ATC 的混合溶液; 所有溶液使用前均经 0.22μm 滤膜过滤。

2.3 实验方法及数据的选取

流动相为体积比为 54:46 的甲醇/0.01mol·L⁻¹ 草酸(pH2.0), 流速为 0.8mL·min⁻¹, 进样量为 5μL, 柱温为 25°C, 检测波长为 272nm, 采样区间为 0~14.50min, 采样间隔为 0.00667min。本文选取 11.17~14.50min 之间的实验数据, 共 500 个数据点。出峰顺序为 DC、EATC、ATC。

3 结果与讨论

3.1 重叠色谱信号的解析

选用由 DC、EATC 和 ATC 组成的三组分样品进行分析, 其中 DC 与 EATC 的色谱峰重叠, EATC 与 ATC 互为差相异构体。在 EATC 溶液中, 有部分 EATC 转化为 ATC, 使 EATC 标准品的色谱图中存在两个峰, 即 EATC 的色谱峰(主峰)及其异构体 ATC 的色谱峰(副峰)。同样, ATC 标准品的色谱图也有两个峰, 但主副峰与 EATC 相反, 因此两峰的位置与 EATC 溶液中两峰的位置完全重合。

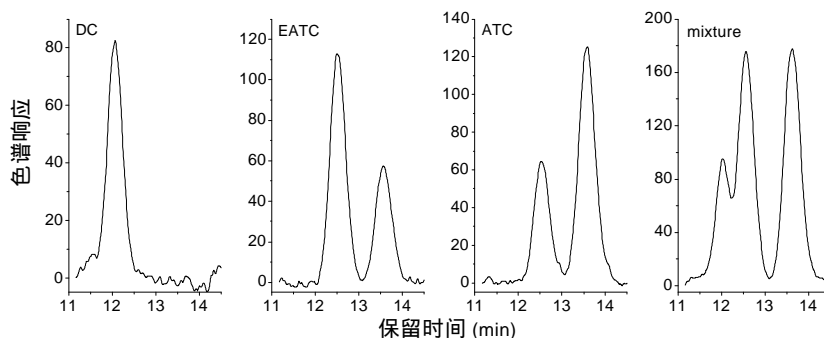


图 1 三个组分的标准色谱图及混合样品的色谱图

Fig.1 The chromatograms of the standard samples and their mixture

图 1 为 DC、EATC、ATC 三种药物标准溶液及其混合样品的色谱图，可以看出，EATC 和 ATC 的色谱图中均有两个色谱峰，对于 EATC，第一个峰为主峰，第二个峰为副峰；对于 ATC 则相反。在混合溶液的色谱图中，DC 的色谱峰与 EATC 重叠，EATC 与 ATC 的两个峰完全重叠。

图 2 为 7 个混合样品的色谱图以及用免疫-遗传算法解析得到的解析结果，1~7 分别对应于表 1 中的样品 1~7。由图 2 可以看出，三个组分的信息得到了较好的分离，并且解析结果的峰形和峰位置没有发生变化。

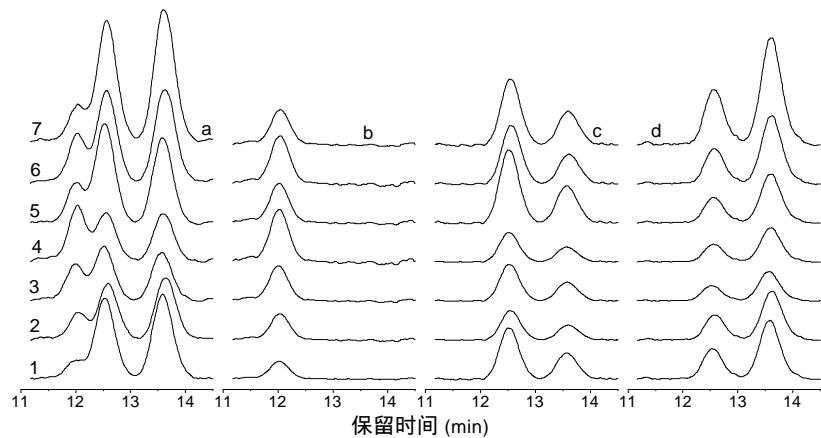


图 2 混合样品的色谱图及各组分的解析结果

Fig.2 Experimental chromatograms (a) and the resolved results of DC (b), EATC (c) and ATC (d)

3.2 重叠色谱信号的定量

表 1 为免疫-遗传算法对 7 个混合样品的定量计算结果，由表 1 可以看出，该方法可得到比较准确的计算结果，各组分的回收率均在 95%~106%之间。

表 1 实验色谱数据的定量结果

Tab.1 Quantitative results of experimental data

样品	组分	加入量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	计算值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%
1	DC	20.00	20.91	104.54
	EATC	35.00	33.70	96.28
	ATC	30.00	30.54	101.79
2	DC	30.00	29.75	99.17
	EATC	20.00	20.54	102.71
	ATC	25.00	24.63	98.52
3	DC	40.00	41.47	103.67
	EATC	25.00	25.12	100.50
	ATC	15.00	15.47	103.11
4	DC	60.00	60.73	101.22
	EATC	20.00	19.77	98.86
	ATC	17.50	18.13	103.60
5	DC	45.00	44.31	98.47
	EATC	50.00	50.17	100.34
	ATC	25.00	24.27	97.09
6	DC	55.00	55.20	100.36
	EATC	40.00	38.32	95.79
	ATC	35.00	35.27	100.78
7	DC	40.00	41.72	104.31
	EATC	45.00	47.49	105.54
	ATC	55.00	52.30	95.09

本文将免疫-遗传算法用于互变异构体重叠色谱信号的相互分离及各成分的定量计算。结果表明, 该方法可将完全重叠的互变异构体的色谱信号相互分离, 且可得到准确的定量计算结果, 为复杂体系的信号解析提供了一种有效手段。

参考文献

- [1] E R Malinowski. Anal. Chem., 2000, 72(18): 4363~4371.
- [2] F Gong, Y Z Liang, Q S Xu et al. J. Chromatography A, 2001, 905:193~205.
- [3] X G Shao, W S Cai, P Y Sun et al. Anal. Chem., 1997, 69(9): 1722~1725.
- [4] X G Shao, W S Cai. J. Chemom., 1998, 12(2): 85~93.
- [5] X G Shao, Z H Chen, X Q Lin. Chemom. Intell. Lab. Syst., 2000, 50(1): 91~99.
- [6] X G Shao, Z H Chen, X Q Lin. Fres. J. Anal. Chem., 2000, 366(1): 10~16.
- [7] 邵学广, 孙 莉. 高等学校化学学报, 2001, 22(4): 552~555 .
- [8] L Sun, W S Cai, X G Shao. Fres. J. Anal. Chem., 2001, 370(1): 16~21.
- [9] 邵学广, 孙 莉. 分析化学, 2001, 29(7): 768~770.