

PLS 分光光度法同时测定混合氨基酸

王雁鹏^① 董旭辉 陈岩 董树屏

(国家环境分析测试中心 北京市 100029)

摘 要 本文将偏最小二乘法(PLS)用于分光光度法同时测定混合氨基酸体系中的苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。对校准样品集的实验设计及测量波长点的选择等进行了实验和讨论,并与最小二乘法、卡尔曼滤波法和因子分析法的计算结果进行了对比,PLS 法的计算结果最精确,偏差最小。由此可见,PLS 法对于这类组分间存在相互作用的样品的测定是一种简捷、准确的多组分同时测定方法,通过校准集来校正相互作用带来的影响,是 PLS 法偏差最小的原因。

关键词 偏最小二乘,氨基酸,分光光度法。

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2006)05-1123-04

1 前言

偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)是由 Wold 在 1966 年提出的一种多组分测定的新的多元统计方法^[1,2]。最小二乘法,线性规划、Kalman 滤波,目标因子分析等方法对于组分间具有相互作用使组分吸光度加和性受到扰动的体系往往得不到满意的结果,PLS 方法克服了上述缺点,先构造了一系列已知浓度的混合物校准集,由校准集的吸光度和浓度阵重新建立起仪器响应与组分浓度之间的数学模型,再通过此法的模型对样品进行分析^[3]。这种方法称为间接校正。因此 PLS 方法广泛地应用在光谱分析中^[4,5],本文讨论了 PLS 法在吸收峰重叠严重的苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的紫外分光光度分析中的应用。

2 基本原理

对于 m 个含有 n 个组分的标准校准混合式样,其浓度矩阵表示为 $C_{n \times l}$ 。 n 个标准校正样在 m 个波长处的吸光度矩阵 $R_{n \times m}$ 。首先对吸光度矩阵进行主成分分析

$$R_{n \times m} = T_{n \times a} \times P_{a \times m} + E_{n \times m}$$

其中, $T_{n \times a}$ 为列正交矩阵,称为吸光度矩阵 R 的特征向量矩阵。 $P_{a \times m}$ 为正交矩阵,称为 R 的载荷矩阵, a 为维数因子, $E_{n \times m}$ 为凝随机误差矩阵。

为了克服 MLR 方法中,经过矩阵求逆带来的误差,对浓度矩阵 $C_{n \times l}$ 也进行主成分分析

$$C_{n \times l} = U_{n \times a} \times Q_{a \times l} + F_{n \times l}$$

其中, $U_{n \times a}$ ——列正交矩阵,称 C 的特征向量矩阵; $Q_{a \times l}$ ——行正交矩阵,为 C 的载荷矩阵; $F_{n \times l}$ ——为浓度随机误差矩阵。

^① 联系人,电话:(010) 84637722-2214; 手机:(0) 13601004671; E-mail: xinpost@sina.com

作者简介:王雁鹏(1970—),男,天津市人,工程师,硕士学位,从事化学计量学的研究和应用。

收稿日期:2006-09-06; 接受日期:2006-09-11

PLS 法中,用矩阵 $T_{n \times a}$ 对 $U_{n \times a}$ 回归获得矩阵

$$U_{n \times a} = T_{n \times a} \times B_{a \times u} + E'_{n \times a}$$

被测试样吸光度矩阵为 R_0 , 则浓度矩阵 C 可通过下式求得

$$C_{n \times l} = R_{n \times m} (U'_{n \times a} P_{a \times m})^t B_{a \times a} Q_{a \times l}$$

其中 P, B 均可从校准集中求得。

3 实验部分

3.1 主要仪器与试剂

本试验所使用的仪器是 U-3410 型紫外可见分光光度计(日本日立公司),所用生化试剂氨基酸(上海康达氨基酸厂)为层析纯。采用 0.5mol/L 的 KOH-KH₂PO₄ 为缓冲溶液, pH ≈ 7, KOH 和 KH₂PO₄ 为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

3.2 氨基酸储备液的制备

分别称取 0.2500g 三种氨基酸,加入少量乙醇溶解,后用二次蒸馏水定容于 500mL 容量瓶中,浓度为 500.0mg/L。

3.3 实验步骤

移取一定量的氨基酸标准储备液于 25mL 容量瓶中,加入 KOH-KH₂PO₄ 缓冲溶液 2mL,用二次蒸馏水加至刻度线,摇匀,在设定的波段和波长间隔下测量吸光度。将所得数据用 PLS 法进行数据处理。

4 结果和讨论

4.1 测量条件的选择

在 220—320nm 范围内扫描,苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的吸收峰严重重叠,通过对吸光曲线求导得知,最大吸收峰分别在 258nm, 279nm 和 275nm。

通过实验得知,三种氨基酸均在 pH=7 时具有较大的吸光度,同时氨基酸容易在酸碱环境下造成结构破坏。实验中采用 0.5mol/mL 的 KOH-KH₂PO₄ (pH ≈ 7) 缓冲溶液控制 pH 值。缓冲溶液用量在 1.0—3.0mL 内对吸光度没有影响,实验中选择 2mL 作为缓冲溶液的用量。

4.2 线性范围、加合性和稳定性

苯丙氨酸在实验的浓度范围 0—650mg/L 内符合线性,由于本实验所需浓度低于 650mg/L,因而没有继续探讨线性范围的上限。色氨酸的线性范围为 0—50mg/L。酪氨酸的线性范围为 0—70mg/L,实验中所有待测试样浓度均在线性范围之内。在 240—300nm 内这三种氨基酸的吸光度均具有较好的加合性。

4.3 校准集的确定

根据三种氨基酸的线性范围,以及混合体系的吸光度值的均匀分布和跨度,选取苯丙氨酸的浓度分别为 50, 200 和 350mg/L,色氨酸的浓度分别为 10, 30 和 50mg/L,酪氨酸浓度分别为 10, 40, 和 70mg/L,遵循正交设计表 $L_9(3^4)$ 设计了 3 水平 9 个标准混合样品作为校准集的浓度阵,将其与对应的吸光度阵构成数学模型,对被测混合样品进行校准计算。由于苯丙氨酸的灵敏度较低,因而在校准集中对该组分选取了较大的浓度。

4.4 维数 a 的确定

表 1 维数对应的方差 (mg/L)

维数	1	2	3	4	5	6
$V_{(R)}$	0.0769	0.0373	0.0021	0.0015	0.0010	0.0006
$V_{(C)}$	2.2439	1.6745	0.0449	0.0101	0.0068	0.0049

采用交叉验证 (Cross Validation) 的方法,同时观察残差矩阵的方差 $V_{(R)}$, $V_{(C)}$ 都不下降到误差允许范围时,此时对应的主成分数即为维数。本实验以 $V_{(R)}$, $V_{(C)}$ 都小于 1% 为准则,由表 1 中的结果可以看出,选择 5 维才能提取 R , C 中的绝大多数信息。

4.5 人工合成样品集的设计

采用了两种浓度配比方案进行对比,三种氨基酸分别采用高、中、低三种浓度,按照正交设计表 $L_9(3^4)$ 配制成 3 水平 9 个混合样品,样品集 1 为高浓度配比:苯丙氨酸的浓度为 250, 300 和 350mg/L,色氨酸的浓度为 25, 30 和 35mg/L,酪氨酸浓度为 50, 60 和 70mg/L;样品集 2 为低浓度配比:苯丙氨酸的浓度为 80, 120 和 160mg/L,色氨酸的浓度为 15, 20 和 25 mg/L,酪氨酸浓度为 40, 50 和 60mg/L。

4.6 波段及波长间隔对计算结果的影响

针对样品集 2,本文对三种波长选取方法作了对比,见表 2,第 1 种:波段 240—300nm,间隔 2nm;第 2 种:波段 250—290nm,间隔 2nm;第 3 种:波段 240—300nm,间隔 4nm。计算结果见表 3。

表 2 不同波长点选取的计算结果 (mg/L)

	波长点 1			波长点 2			波长点 3		
	MD	SD	RSD(%)	MD	SD	RSD(%)	MD	SD	RSD(%)
苯丙氨酸(Phe)	0.26	0.42	0.35	- 4.17	4.26	3.55	0.28	0.55	0.46
色氨酸(Try)	- 0.08	0.25	1.23	1.50	1.23	6.13	1.36	1.17	5.83
酪氨酸(Tyr)	1.56	1.61	3.22	0.12	0.55	1.10	2.89	2.99	5.97

从表 2 可见,第 1 种取法苯丙氨酸和色氨酸的计算偏差最小,第 2 种取法酪氨酸的计算偏差最小。可以根据测定的精度要求来选择波长点的取法,为了获得最准确的结果,用第 1 种取法来计算苯丙氨酸和色氨酸,而用第 2 种取法来计算酪氨酸。

通过比较可以看出,波长间隔对计算结果影响很大。

4.7 对校准集的检验

在波段 240—300nm、间隔 2nm 的条件下对两个样品集进行吸光度测定,用 PLS 法进行计算,计算结果偏差见表 3。

表 3 两个样品集的计算结果 (mg/L)

	样品集 1			样品集 2		
	MD	SD	RSD(%)	MD	SD	RSD(%)
苯丙氨酸(Phe)	0.37	0.96	0.32	0.26	0.42	0.35
色氨酸(Try)	- 0.13	0.35	1.16	- 0.08	0.25	1.23
酪氨酸(Tyr)	0.13P	0.61	1.01	0.12	0.55	1.10

从表 3 可以看出,两个样品集的计算结果误差基本相仿,而且达到了很低的水平,校准集的选取是合理的,对高浓度和低浓度体系都达到了很好的校准效果,PLS 法可以通过校准集来降低氨基酸之间的相互作用产生的误差。

4.8 各种不同化学计量学方法的比较

对样品集 2 的 9 个混合样品分别用偏最小二乘法、卡尔曼滤波法、最小二乘法和因子分析法进行数据处理, 以苯丙氨酸为例进行比较, 见表 4。

表 4 不同方法的苯丙氨酸计算结果(mg/L)

方法	AE									MD	SD	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
PLS	0.20	- 0.09	0.40	0.17	1.00	0.30	0.00	- 0.14	0.46	0.26	0.42	0.35
KF	- 0.45	- 0.89	- 0.62	- 0.47	- 0.50	- 0.83	- 1.38	- 0.83	- 1.58	- 0.84	0.92	0.77
LS	- 0.19	- 1.03	- 0.73	0.01	- 0.59	- 0.76	- 1.03	- 0.60	- 1.72	- 0.74	0.88	0.73
FA	- 1.34	- 1.11	- 0.79	0.34	- 1.97	1.52	- 0.94	- 1.22	- 2.79	- 0.92	1.49	1.25

注: LS——最小二乘; KF——卡尔曼滤波; FA——因子分析。
从偏差数据可以看出, 在 4 种方法中 PLS 法的计算结果最精确, 偏差最小。

5 结论

PLS 法对于这类组分间存在相互作用的样品的测定是一种简捷、准确的多组分同时测定方法, 通过校准集来校正相互作用带来的影响, 是 PLS 法偏差最小的原因。

参考文献

[1] 王镇浦, 罗国安, 周国华等. 偏最小二乘法用于药物分析[J]. 分析化学, 1984, 17(4): 317.
[2] 谢玉龙, 梁逸曾, 俞汝勤. 偏最小二乘法用于药物分析[J]. 分析化学, 1989, 17(7): 588.
[3] 陆小华. 用数遗算法改进非线性 PLS 法进行构效关系研究[J]. 分析化学, 1991, 19(2): 235.
[4] 李通化, 从培盛. 快速偏最小二乘法及其应用[J]. 分析化学, 1991, 19(5): 509.
[5] 刘黎. 氨基酸混合体系的 PLS 分光光度法测定[J]. 化学研究与应用, 1999, 11(6): 646.

Simultaneous Determination of Mixed Amino Acids
by PLS Spectrophotometry

WANG Yan-Peng DONG Xu-Hui CHEN Yan DONG Shu-Ping
(National Research Center for Environmental Analysis and Measurements, Beijing 100029, P. R. China)

Abstract The partial least square (PLS) method for spectrophotometric simultaneous determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in the mixed amino acids was studied. The orthogonal design in the calibration sample sets and the election of wavelength were discussed. The results of PLS are more accurate and reliable compared with those of least square (LS), Kalman filtering (KF) and factor Analysis (FA). All in all, the PLS analysis method can be used to determine accurately mixed amino acids which exhibits intrinsic interaction among components by appropriate calibration sample sets.

Key words PLS, Spectrophotometry, Amino Acid.