

色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱特征参量提取

李 朕, 尚丽平*, 邓 琥, 职统兴

西南科技大学信息工程学院, 四川 绵阳 621010

摘 要 氨基酸是维持生命活动的重要物质, 而色氨酸和酪氨酸又是天然氨基酸中重要的发光组分, 应用荧光光谱法对其进行测量和分辨具有重要的意义。文章用美国 Perkin-Elmer LS55 型荧光分光光度计, 对色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱进行了测量。将测量的数据用激发-发射-荧光强度的三维坐标表示, 得到三维荧光光谱图, 但色氨酸和酪氨酸存在共性峰, 通过波峰位置简单地来辨别两种混叠的物质很有难度。以数理统计概念为基础, 提取该三维荧光光谱的特征参数, 得到两种物质荧光光谱中最相关的信息, 可以解决两种物质光谱混叠的分辨问题。结果表明, 色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱平均值、标准差、原点矩、混合中心矩等参数差值百分比分别为 330.37%, 102.86%, 329.16%, 329.63%, 区别较大; 而边际分布、相关系数值差值百分比仅为 10.61% 和 2.40%。因而平均值、标准差、原点矩、混合中心矩可作为敏感特征参数, 用其分辨光谱混叠的色氨酸和酪氨酸是可行的。这种“数学预提取”的三维光谱分析法可以找出组分之间的敏感特征参量, 能够取代传统的三维荧光光谱分析法。

关键词 三维荧光光谱; 特征参量化; 色氨酸; 酪氨酸

中图分类号: O644.1 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)07-1925-04

引 言

氨基酸是构成蛋白质的基本单元, 是合成机体抗体、激素和酶的原料, 在人体内有特殊的生理功能, 是维持生命现象的重要物质^[1]。它们由于含有未饱和共轭环状结构能够发出天然荧光, 但其荧光激发和发射光谱严重重叠, 相互干扰, 无法用传统荧光法进行测定^[2-5]。三维荧光光谱的多组分分析可以解决这一问题^[6-12], 但由于它们大多是基于激发-发射-荧光强度信息处理方法, 尽管能得到较为理想的定量定性结果, 可需要大量的三维荧光光谱数据, 造成了信息冗余和时间的浪费, 不利于光谱混叠多组分物质的现场鉴别。

本文提出一种基于数学统计理论的三维荧光光谱特征参量化方法, 利用其对色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱进行参量化提取, 找出分辨两种组分的敏感特征参量, 将过去对荧光激发-发射-荧光强度信息进行分析的传统方法, 转化为利用特征参量化方法进行“数学预提取”的新的理念。

多维光谱信息的模型, 其基本原理是运用数学统计理论从三维荧光光谱信息中提取出最相关的信息, 从而实现降低光谱数据维数, 达到减小信息冗余的目的。这种方法实质上是对三维荧光光谱进行特征提取的一种方法, 它通过映射或变换的方法, 把高维特征变成特征空间的低维特征。

依据统计方法和表示意义的不同, 特征参数可以有多种不同的类型和形式, 主要有。

(1) 反映荧光强度(z 值) 分布的统计特征参数, 主要有平均值、标准差、 z 值的累积率分布等; (2) 反映荧光强度(z 值) 在 x 和 y 平面上分布的特征参数, 主要有原点矩、中心矩、重心、密集椭圆等; (3) 反映荧光强度(z 值) 与激发波长和荧光波长分布关系的特征参数, 主要有沿 x 和 y 方向的一维边际分布等。

这些特征参数基础统计参量, 从不同角度表示了三维荧光光谱的统计特征。对各参量进行多样本对比和综合分析, 选择出鉴别敏感的参数, 最终可达到分类和鉴别的目的^[13-16]。

1 三维光谱的特征参量理论

三维荧光光谱的特征参量化方法是近年提出的一种表示

2 实 验

2.1 仪器和试剂

收稿日期: 2008-05-02, 修订日期: 2008-08-06

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z214) 和四川省青年基金项目(06ZQ026-026) 资助

作者简介: 李 朕, 1983 年生, 西南科技大学信息工程学院硕士研究生 e-mail: lizhenali@yahoo.com.cn

*通讯联系人 e-mail: shangliping@swust.edu.cn

仪器: 美国 Pekin-Elmer LS55 型荧光分光光度计; 试剂: 色氨酸, 酪氨酸, NaOH 和 KH_2PO_4 溶液, 二次蒸馏水。

储备液和工作液的配制: 分别准确称取色氨酸 0.010 0 g、酪氨酸 0.010 0 g, 用二次蒸馏水配制成 100 mL 溶液作为储备液。工作液用二次蒸馏水逐级稀释得到。

缓冲溶液: NaOH 和 KH_2PO_4 配制成 pH 7.4 缓冲溶液 (其中 KH_2PO_4 为 $0.035 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2 实验方法

设置荧光激发波长为 230~320 nm, 间隔 5 nm; 发射波长为 230~500 nm, 间隔 2 nm; 仪器参数分别为: 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 5 nm, 扫描速度 $800 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。对以上两种物质的样品进行三维荧光扫描。用编写的三维荧光光谱指纹图和特征参量提取算法对其进行解析, 算法在 MATLAB 7.0 以上版本中运行。

3 结果和讨论

3.1 三维荧光光谱指纹图

用上述仪器和样品进行测量, 得到色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱的指纹图, 如图 1 和图 2。

从图中可以看出, 色氨酸在激发波长为 274 nm 时, 荧光强度最大, 荧光峰值位置在 358 nm; 在激发波长 230 nm, 发射波长 320 nm 左右有一个强度稍低但明显的光谱波峰。酪氨酸在激发波长为 226 nm 时, 荧光强度最大, 荧光峰值位置在 312 nm; 在在激发波长 275 nm, 发射波长 345 nm 左右同样有一个明显的光谱波峰。

观察实验获得的大量不同浓度的三维荧光光谱图发现, 色氨酸和酪氨酸存在共性峰, 因此简单的通过激发-发射-强度的波峰位置来辨别两种混叠的物质, 是很有难度的。

3.2 色氨酸和酪氨酸的特征参量提取结果

通过上面的特征参量化理论, 对得到的三维荧光光谱进行提取。表 1 和表 2 给出了对色氨酸和酪氨酸特征参量分别

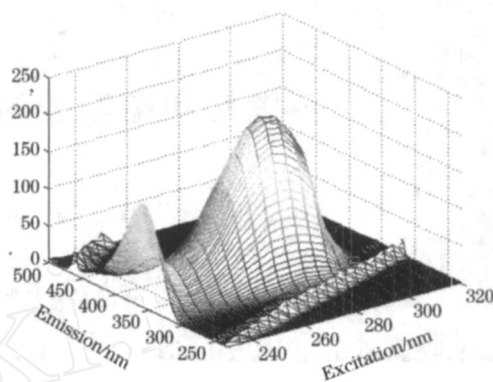


Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectra of tryptophan

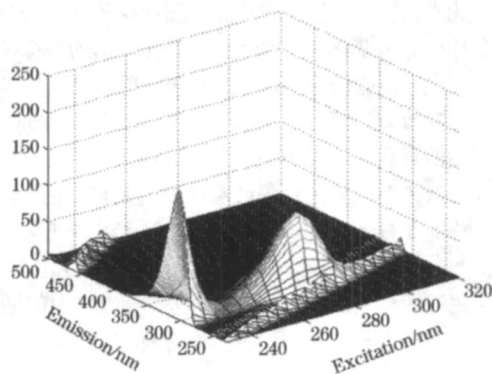


Fig. 2 Three-dimensional fluorescence spectra of tyrosine

提取的结果, 即特征参数。表 3 是两种物质三维荧光特征参数的平均值结果比较以及敏感参数的选择。

可以看出, 通过提取三维荧光光谱的特征参量, 对于不同的物质, 三维荧光光谱的特征参数具有不同的鉴别性。从表 3 中明显看到, 色氨酸和酪氨酸的三维荧光光谱平均值、标准差、原点矩、混合中心矩等参数差别很大, 差值百分比分别为 330.37%, 102.86%, 329.16%, 329.63%, 也就是

Table 1 Parameters based on the three-dimensional fluorescence spectra of tryptophan

	平均值	标准差	边际分布	相关系数	原点矩	混合中心矩
色氨酸 Trp.	25.768 5	24.863 4	(269, 372)	0.287 6	8.955 7	8.956 1
	26.563 2	24.594 1	(272, 380)	0.284 5	8.912 3	8.828 6
	26.025 8	24.365 0	(270, 381)	0.275 6	8.864 1	8.896 3
	26.133 3	24.764 2	(272, 375)	0.278 9	8.904 5	8.884 2
	25.687 7	24.218 6	(268, 368)	0.279 6	8.934 8	8.715 8
	25.998 2	24.550 1	(265, 365)	0.280 1	8.813 6	8.689 9
	25.963 8	24.631 8	(263, 362)	0.285 2	8.756 1	8.865 7
	26.056 3	24.660 5	(260, 358)	0.284 6	8.845 7	8.846 8
	26.112 8	24.568 2	(269, 369)	0.274 5	8.931 2	8.798 2
	25.762 2	24.356 8	(253, 362)	0.272 3	8.905 0	8.912 2
	25.716 4	24.895 7	(262, 365)	0.284 6	8.965 3	8.892 3
	25.984 6	24.893 2	(266, 367)	0.291 2	8.953 1	8.872 1
	26.348 3	25.128 7	(272, 370)	0.289 6	8.846 8	8.812 6
	25.428 9	24.125 6	(275, 373)	0.267 8	8.823 5	8.821 7
	26.345 1	25.213 5	(270, 371)	0.265 4	8.906 8	8.846 5
	26.010 7	25.100 8	(269, 370)	0.261 3	8.921 8	8.876 8

Table 2 Parameters based on the three-dimensional fluorescence spectra of tyrosine

	平均值	标准差	边际分布	相关系数	原点矩	混合中心矩
酪氨酸 Tyr	6.100 6	12.186 9	(260, 318)	0.305 0	2.016 2	2.006 3
	6.188 2	12.235 6	(263, 321)	0.321 4	2.225 6	2.146 7
	6.258 6	12.467 2	(268, 325)	0.336 1	2.134 7	2.234 8
	6.244 2	12.357 4	(260, 318)	0.313 5	2.213 1	2.165 2
	5.869 5	12.053 1	(255, 314)	0.286 7	1.986 4	1.986 3
	5.768 3	12.004 6	(254, 311)	0.289 7	1.899 6	1.897 9
	6.012 8	11.986 3	(255, 315)	0.296 2	2.005 6	1.905 2
	6.248 6	12.087 5	(251, 327)	0.290 5	2.018 7	2.010 0
	5.896 3	12.583 2	(268, 326)	0.312 1	2.248 3	2.111 2
	5.782 5	12.220 0	(261, 320)	0.303 5	2.158 7	2.245 8
	5.998 6	12.053 4	(251, 310)	0.288 9	1.984 8	1.921 2
	6.007 5	11.894 2	(250, 307)	0.286 4	2.000 2	2.005 9
	6.157 6	11.998 6	(252, 312)	0.298 8	2.103 4	2.200 1
	6.253 8	12.154 7	(261, 318)	0.313 2	2.115 8	2.008 8
	5.897 5	12.189 9	(258, 315)	0.301 0	2.012 0	2.011 2
	5.955 0	12.205 6	(258, 316)	0.313 2	2.020 6	2.082 2

Table 3 Parameters based on the three-dimensional fluorescence spectra of tryptophan and tyrosine and their comparison

	平均值	标准差	边际分布	相关系数	原点矩	混合中心矩
色氨酸 Trp.	25.994 1	24.683 1	(267, 369)	0.296 4	8.890 0	8.844 7
酪氨酸 Tyr.	6.040 0	12.167 4	(258, 317)	0.303 5	2.071 5	2.058 7
差值比 Rat. / %	330.37	102.86	10.61	2.40	329.16	329.63

说,从色氨酸和酪氨酸混叠的光谱中,可以提取出这些能明显分辨两种物质的特征参数,从而做出鉴别;表 3 中色氨酸和酪氨酸的边际分布、相关系数值差值百分比仅为 10.61 % 和 2.40 %,也就是说,不能用这两个指标作为分辨该两种混叠物质的依据。因此,对于能明显分辨色氨酸和酪氨酸的特征参量,即平均值、标准差、原点矩和混合中心矩,我们称之为色氨酸和酪氨酸的敏感特征参量,用它们作为分辨两种混叠物质的依据,比之用传统的全三维荧光光谱信息分析,有着更加准确和快速的优点。

4 结 论

用三维荧光光谱仪对色氨酸和酪氨酸的溶液进行测量,

得到各自的三维荧光光谱图,经研究发现,用激发-发射-荧光强度组成的三维谱图能够更加全面的展现物质的荧光性质,增加分析的信息量。但这两种物质的谱图比较相似,不能直接以此作为分辨它们的依据。本文提出的三维荧光特征参量化概念和理论,用表观数学统计的思想对三维荧光光谱进行参量化提取,可降低信息的维数,实现两种物质的“数学分离”。结果表明,色氨酸和酪氨酸的三维特征参数中,平均值、标准差、原点矩、混合中心矩的差别很大,具有良好的可分辨性,可作为分辨它们的敏感特征参数。将这些参数作为化学计量学或模式识别的输入参量,可进一步提高多组分鉴别的分析精度和速度,可作为今后多组分物质定性和鉴别研究的重要参考^[17,18]。

参 考 文 献

[1] ZHANG Hong-yuan, WAN Hai-qing(张洪渊,万海清). Biochemistry(生物化学). Beijing: Chemical Industry Press(北京:化学工业出版社), 2001. 45.

[2] DING Ya-ping, SU Qing-de, WU Qing-sheng(丁亚平,苏庆德,吴庆生). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(4): 212.

[3] LI Dong-hua, NI Yong-nian(李东华,倪永年). Journal of Nanchang University (Natural Science)(南昌大学学报·理科版), 2002, 26(1): 71.

[4] WU Gen-hua, HE Chi-yang, CHEN-Rong(吴根华,何池洋,陈荣). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 318.

[5] WANG Huai-you, HUI Qiu-sha, LIU Lian-dong, et al(王怀友,惠秋莎,刘连栋,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(3): 427.

[6] XIAO Jin, REN Feng-lian, SONG Ge, et al(肖劲,任凤莲,宋鸽,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(10): 2088.

- [7] ZHOU Xun-qi, RAN Shao-chun(周海琪, 冉绍春). China Offshore Platform(中国海洋平台), 2002, 6(3): 32.
- [8] TIAN Guang-jun, SHI Jin-shan(田广军, 史锦珊). Chinese Journal of Scientific Instrument(仪器仪表学报), 2005, 26(8): 727.
- [9] TIAN Guang-jun(田广军). Chinese Journal of Scientific Instrument(仪器仪表学报), 2006, 27(6): 2127.
- [10] SHANG Li-ping, LI Zhan-feng(尚丽平, 李占峰). Chinese Journal of Scientific Instrument(仪器仪表学报), 2006, 27(6): 2107.
- [11] LI Yan, WANG Jiu-de, GU Bing-he(李燕, 王俊德, 顾炳和). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(6): 844.
- [12] YAN Zheng-yu, JIANG Xin-min, ZHANG Sheng-hua(严拯宇, 姜新民, 张圣华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(3): 409.
- [13] NI Yong-nian, CAI Ying-jun(倪永年, 蔡英俊). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1641.
- [14] XUE Ze-chun, CHENG Xin-sheng, YANG Li-wen, et al(薛泽春, 程新胜, 杨丽文, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 99.
- [15] WU Gen-hua, WANG Jie, GUO Chang, et al(吴根华, 汪婕, 郭畅, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(4): 765.
- [16] JIANG Feng-hua, YANG Huang-hao, Frank Sen-chun LEE, et al(蒋凤华, 杨黄浩, 黎先春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(9): 1765.
- [17] YANG Ren-jie, XU Xiao-xuan, SHANG Li-ping, et al(杨仁杰, 徐晓轩, 尚丽平, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 94.
- [18] OU YANG Er-ming, ZHANG Xi-hui, WANG Wei(欧阳二明, 张锡辉, 王伟). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(7): 1373.

Extraction of Characteristic Parameters of Three-Dimensional Fluorescence Spectra of Tyrosine and Tryptophan

LI Zhen, SHANG Li-ping*, DENG Hu, ZHI Tong-xing

College of Information Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract In the present paper, three-dimensional fluorescence spectra of tyrosine and tryptophan were detected through Pekin Elmer LS55 fluorescence spectrometer made in U. S. A, with the excitation wavelength in the range of 230-320 nm, interval of 5 nm, emission wavelength in the range of 230-500 nm, and interval of 2 nm. Three-dimensional fluorogram was obtained using excitation wavelength, emission wavelength and fluorescence intensity detected by Pekin Elmer LS55 as three-dimensional system of coordinate. It can be seen that the main peak of the three-dimensional fluorescence spectra of tyrosine and tryptophan was aliasing evidently, so it was impossible to distinguish these two overlapping components using excitation wavelength, emission wavelength and fluorescence intensity easily. Therefore, to distinguish spectra of tyrosine and tryptophan obviously, characteristic parameter was extracted based on the principle of mathematical statistics and the most relevant information of the fluorescence spectra of tyrosine and tryptophan was obtained. The results showed that the difference value percentage of the "mean", "deviation", "origin pitch" and "mixed center pitch" of the three-dimensional spectra's characteristic parameter was 330.37%, 102.86%, 329.16% and 329.63%, respectively; meanwhile, the difference value percentage of "distribution" and "correlation" was 10.61% and 2.40% respectively. Thus, it was obvious that the "mean", "deviation", "origin pitch" and "mixed center pitch" of the three-dimensional spectra's characteristic parameter can be used to distinguish overlap spectra of tyrosine and tryptophan as sensitive characteristic parameters. The principle and results of this method are applicable and valid. This "math pre-extracted" three-dimensional spectrometry found sensitive parameter among the components by the parameter extracting and can replace traditional excitation-emission-intensity three-dimensional fluorescence analysis, then can be generalized to the identification of multi-components.

Keywords Three-dimensional fluorescence spectra; Characteristic parameter; Tryptophan; Tyrosine

* Corresponding author

(Received May 2, 2008; accepted Aug. 6, 2008)