

文章编号:1009-3087(2016)03-0190-06

DOI:10.15961/j.jsuese.2016.03.026

## 紫外-可见-短波近红外漫反射光谱法对 丙氨酸手性的定性定量分析

梁冰<sup>1</sup>,李相玲<sup>1</sup>,敬小丽<sup>2</sup>,李涛<sup>1</sup>,姚舜<sup>1</sup>

(1. 四川大学 化学工程学院, 四川 成都 610065; 2. 成都中医药大学 医学技术学院, 四川 成都 611137)

**摘要:**以D-、L-和DL-丙氨酸为对象,首次研究了紫外-可见-短波近红外漫反射光谱结合化学计量学快速、无损地定性、定量分析固体手性化合物的可行性。在粒度过100目、样品与光纤探头距离5.6 mm的最优条件下测量漫反射光谱,经预处理后,采用主成分分析法(PCA)和判别偏最小二乘法(PLS-DA)建模进行定性分析,结果预测判别准确率为100%。定量分析上,16个不同比率的L-/D-丙氨酸二元混合粉末样的光谱经波长选择、光谱数据预处理后,以偏最小二乘回归法(PLR)和支持向量回归法(SVR)建模,校正集和预测集的最优决定系数( $R^2$ )均在0.99和0.98以上,绩效偏差率(RPD)值远高于2。研究表明,采用紫外-可见-短波近红外漫反射光谱法结合化学计量学可应用于手性固态丙氨酸的快速、无损分析,并有望于运用到手性药物的质量检测上。

**关键词:**紫外-可见-短波近红外漫反射光谱;化学计量学;丙氨酸

中图分类号:O657.3

文献标志码:A

### Qualitative and Quantitative Analysis of Chiral Alanine by UV-visible-shortwave Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy Combined with Chemometrics

LIANG Bing<sup>1</sup>, LI Xiangling<sup>1</sup>, JING Xiaoli<sup>2</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, YAO Shun<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Eng., Sichuan Univ., Chengdu 610065, China;

2. Inst. of Pharmaceutical Technol., Chengdu Univ. of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**Abstract:** UV-visible-shortwave near infrared diffuse reflectance spectroscopy (UV-vis-SW NIR DRS) combined with chemometrics was firstly used as a new method to analyze enantiomer and its racemic compound, using D-, L- and DL-alanine as model compounds. Under the optimal measuring conditions (powder particle sizes of 100-mesh and distance between fiber probe and sample of 5.6 mm), after spectral pretreatment and/or wavelength selection, principal component analysis (PCA) and discriminant partial least squares (PLS-DA) resulted in a correct discrimination of chirality with 100 percent accuracy; partial least squares regression (PLR) and support vector regression (SVR) models allowed a satisfied quantitation of L/D binary mixture with determination coefficients ( $R^2$ ) above 0.99 and 0.98 for calibration set and prediction set respectively by both PLR and SVR, and ratios of performance deviation (RPD) far above 2. The results showed that it is feasible to apply UV-vis-SWNIR DRS on chiral analysis of compounds.

**Key words:** UV-visible-shortwave near infrared diffuse reflectance spectroscopy; chemometrics; alanine

化合物的不同手性物具有不同药理作用、药代动力学和毒理学特性。因此,手性研究在药物领域上一直是热点。在药物的质量控制上,建立一种高效快速的手性分析法就显得尤其重要。目前的方法主要分2大类,一类是基于分离的方法,如色谱

法<sup>[1-2]</sup>和毛细管电泳<sup>[3]</sup>。该类方法虽然最常用,但前处理复杂、费时且费用高。另一类是光谱分析法,如圆二色谱法<sup>[4]</sup>、核磁共振<sup>[5]</sup>、质谱<sup>[6-7]</sup>、紫外<sup>[8]</sup>、荧光光谱<sup>[9]</sup>、共振瑞利散射光谱法<sup>[10]</sup>以及近红外光谱<sup>[11]</sup>。除共振瑞利散射光谱法外,这类方法均为湿

收稿日期:2015-11-06

作者简介:梁冰(1957—),男,教授,博士。研究方向:药物分析与过程检测。E-mail:liangbing@sina.com

网络出版时间:2016-4-29 18:48:44

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1596.T.20160429.1848.008.html>

<http://jsuese.scu.edu.cn>

法分析,且需添加手性选择剂以形成非对映体络合物,使得测量时间加长,样品用量加大。

紫外-可见-短波近红外漫反射光谱(UV-vis-SW NIR DRS),波长范围为200~1100 nm,其入射光与样品分子发生相互作用后离开样品,负载了样品组成和结构信息,可直接快速检测粉末或固态样品<sup>[12]</sup>。该法虽已用于各种载体上的氧化钒分子的表面结构研究<sup>[13]</sup>、有机与无机混合物的组成分析<sup>[14]</sup>、对氨基苯酚的检测<sup>[15]</sup>、西咪替丁片剂含量的测定<sup>[12]</sup>及西咪替丁多晶的定性和定量<sup>[16]</sup>。但其在固体化合物的手性分析上的研究与应用还没有报道。

发现D-、L-及DL-丙氨酸的UV-vis-SW NIR DRS间有一定差异,可能是由于它们不同的晶体结构而导致的。这提供了采用UV-vis-SW NIR DRS结合化学计量学对手性丙氨酸进行分析的可能性。为了证实这种可行性,作者采用主成分分析法(PCA)和判别偏最小二乘法(PLS-DA)、偏最小二乘回归法(PLR)和支持向量回归法(SVR)分别研究了手性丙氨酸的定性、定量分析,并以决定系数( $R^2$ )、误差均方根(RMSE)、校正误差均方根(RMSEC)、交叉验证误差均方根(RMSECV)、预测误差均方根(RMSEP)、绩效偏差率(RPD)及准确率(A%)对模型进行评价。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

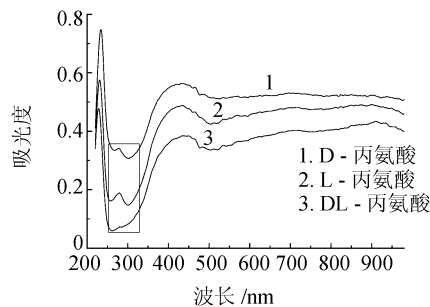
S3000 光纤光谱仪(杭州赛智科技)配备线型硅 CCD 阵列检测器(TCD 东芝 1304)、Y 型光纤、光源(美国海洋光学公司)、自制 PVC 样品池,工作原理见文献[12]。Unscrambler ver9.7(挪威 CAMO 公司),MATLAB 7.0(美国 Math Works 公司)。

### 1.2 样品的制备

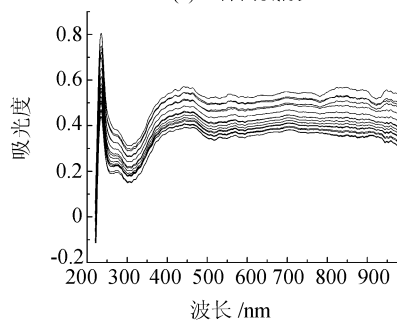
D-、L-及DL-丙氨酸购自成都贝斯特有限公司,纯度 $\geq 98\%$ ,采用中国药典(2010版)的旋光度法确认其手性合格。3种丙氨酸经手工研磨过筛(对样品研磨前后进行了XRD测定,衍射图谱无显著差异,即研磨过程中不存在晶型的转变),得到过60、80、100、120目的样品,干燥器中保存。用过100目筛的L-、D-型丙氨酸配制16种比例二元混合(L/D),其中校正集为0:1、0.1:0.9、0.2:0.8、0.3:0.7、0.4:0.6、0.5:0.5、0.6:0.4、0.7:0.3、0.8:0.2、0.9:0.1、1:0,预测集为0.15:0.85、0.35:0.65、0.55:0.45、0.75:0.25、0.95:0.05。

### 1.3 光谱的测量

每个样品称取0.22 g,填充于样品池内,用恒重的圆笔杆从同一高度冲压3次,然后把光纤探头垂直置于样品池上,以白板为空白,分辨率3.33 nm,曝光时间299 ms,测量样品在200~1100 nm波长范围内的漫反射光谱3次,其平均值作为样品的光谱数据。为降低仪器噪声的影响,取220~980 nm作为样品的原始光谱。定性分析中,每个目数下的每种丙氨酸各称量15个样本,共得45个样本;定量分析中,16个比例的二元混合物各测量了8个样本,总计128个样本。3种丙氨酸和16个L/D二元混合物的漫反射光谱如图1。3种丙氨酸的光谱强弱各不相同,且在250~350 nm波段差异显著;不同比例的L/D二元混合物的漫反射图谱虽外形相似,但光谱强弱有显著差别。表明紫外-可见-短波近红外漫反射光谱在丙氨酸的手性定性、定量分析上具有可能性。



(a) 3种丙氨酸



(b) L~D二元混合物

图1 丙氨酸的紫外-可见-短波近红外漫反射光谱  
Fig. 1 UV-vis-SW NIR spectra of 3 kinds of alanine, binary mixtures

## 2 结果与讨论

### 2.1 测量条件的优化

#### 2.1.1 颗粒粒度优化

对过60、80、100及120目筛的D-、L-及DL-丙氨酸粉末样品的原始光谱,建PLS-DA模型处理,结果如表1所示。经比较,确定过100目筛为最佳粒度。

#### 2.1.2 光纤距离优化

样品到光纤探头的距离会影响漫反射光谱的强

弱,故在过 100 目筛的粒度条件下,对一定范围的距离(3.8、4.5、5.3、6.1 mm)进行考察。经 PLS-DA

建模,结果如表 1 所示。表明当距离大于 5.3 mm 时已影响不大,故选取 5.3 mm 作为最佳光纤距离。

表 1 颗粒粒度及光纤距离的考察结果

Tab. 1 Effects of powder particle sizes and distance between fiber probe and sample on PLS-DA

测量条件	潜变量	校正集		交叉验证		预测集			
		$R^2$	$RMSEC$	$R^2$	$RMSECV$	$R^2$	$RMSEP$	$RPD$	
粒度/目	60	6	0.990 0	0.081 6	0.977 9	0.121 6	0.974 5	0.009 0	6.726 7
	80	4	0.980 1	0.115 1	0.967 1	0.147 8	0.951 1	0.414 4	4.522 2
	120	8	0.995 7	0.053 3	0.976 2	0.149 7	0.987 9	0.012 4	9.090 9
	100	6	0.994 1	0.011 7	0.986 1	0.090 2	0.991 9	0.040 0	11.111 1
距离/mm	3.8	4	0.928 4	0.218 5	0.904 9	0.278 3	0.865 8	0.590 5	2.729 8
	4.5	6	0.994 7	0.059 6	0.989 2	0.089 6	0.978 9	0.241 2	6.884 3
	5.3	6	0.995 3	0.055 7	0.990 5	0.087 2	0.976 7	0.241 7	6.551 2
	6.1	6	0.995 5	0.055 0	0.990 5	0.079 8	0.983 8	0.275 0	7.856 7

## 2.2 定性分析

### 2.2.1 数据预处理

采用 Unscrambler ver 9.7 软件自带的预处理法对原始数据进行处理。其中数据预处理法主要

包括多元散射校正(MSC)、标准正态变换(SNV)、归一化(normalization, Nor)、Savitzky-Golay 平滑(SG)。

表 2 表明最佳的处理为原始数据。

表 2 3 种丙氨酸的光谱数据的处理结果

Tab. 2 Results of spectral data pretreatment of the three kinds of alanine on PLS-DA

预处理法	潜变量	校正集		交叉验证		预测集		
		$R^2$	$RMSEC$	$R^2$	$RMSECV$	$R^2$	$RMSEP$	$RPD$
原始	4	0.970 5	0.140 3	0.948 7	0.203 6	0.991 6	0.075 0	7.731 4
SG	4	0.970 5	0.140 2	0.948 8	0.205 6	0.991 7	0.074 2	7.777 7
MSC	5	0.979 5	0.117 0	0.959 1	0.168 2	0.985 5	0.098 2	5.893 6
SNV	2	0.942 2	0.196 2	0.944 3	0.226 2	0.990 6	0.379 2	7.310 4
Nor	4	0.975 8	0.126 9	0.947 6	0.191 1	0.975 3	0.128 4	4.527 3

### 2.2.2 PCA 分析

光谱数据经过主成分分析后,在贡献率高于 95% 的条件下,作第一、二主成份值投影图。结果如图 2 所示,3 种手性的丙氨酸有清晰界限,归类效果好,判别准确率为 100%。

### 2.2.3 PLS-DA 分析

从 45 个样本中随机选择 30 个作校正集,其余的作验证集。将校正集样品按 D-、L-、DL- 丙氨酸分别定义为 1、2、3 类,建模。以所建模型预测验证集样品的类别,结果如图 3 所示,预测准确率为 100%,表明模型精密度高,预测效果好。

## 2.3 定量分析

L/D 二元混合物的比例见“1.2 样品的制备”,校正集共 88 个样本,预测集共 40 个样本。

### 2.3.1 波长选择

将原始波段、采用相关系数( $R$ )法和无用信息

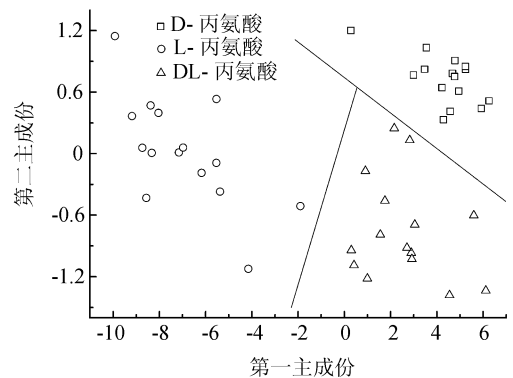


图 2 丙氨酸的主成份投影图

Fig. 2 Two-dimensional projections of the three kinds of alanine 消除法(UVE)选择得到的波段,经 PLR 建模及预测的结果进行对比,如表 3 所示。

比较  $R^2$ 、 $RMSEP$ 、 $RPD$  值,发现原始波段即 220 ~ 980 nm 的效果好,故最终选择 220 ~ 980 nm 作为后续建模波长。

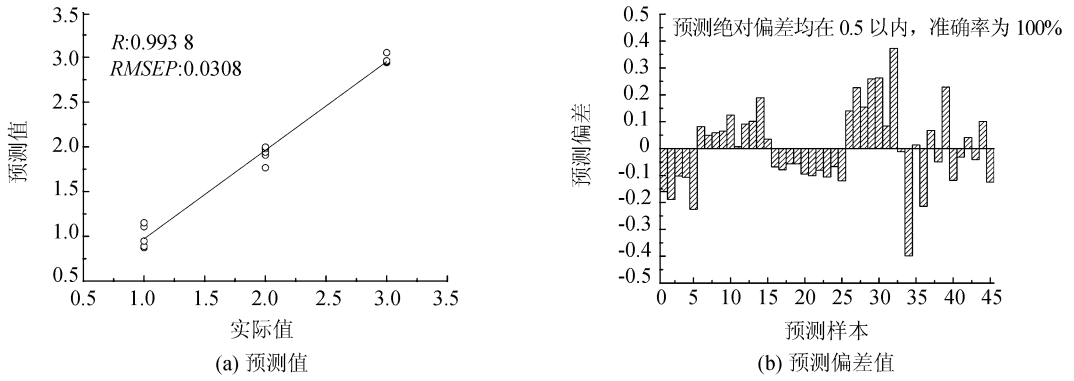


图3 3种丙氨酸的 PLS-DA 的判别分析结果

Fig.3 Results of modeling PLS-DA of the three kinds of alanine, the plot of predicted values, the plot of predicted error values

表3 波长选择结果

Tab.3 Result of wavelength selection on PLR

波长选择法	潜变量	变量类型	校正集		交叉验证		预测集		
			$R^2$	RMSEC	$R^2$	RMSECV	$R^2$	RMSEP	RPD
R	10	L	0.979 5	0.045 3	0.944 2	0.074 9	0.933 4	0.074 1	3.874 9
		D	0.981 7	0.042 8	0.074 9	0.070 9	0.94 28	0.068 6	4.181 2
UVE	9	L	0.951 1	0.069 9	0.900 3	0.100 2	0.915 5	0.093 2	3.440 1
		D	0.953 5	0.068 2	0.905 4	0.097 5	0.919 4	0.088 3	3.522 3
220~980 nm	10	L	0.992 3	0.027 8	0.987 4	0.035 5	0.984 7	0.043 0	8.084 5
		D	0.993 4	0.025 8	0.989 3	0.032 7	0.984 3	0.042 1	7.980 9

2.3.2 数据预处理

表4所示。

经上述波长选择后,分别作原始、SNV、MSC、NOR、SG、1阶导(1D)、1阶导(2D)预处理,结果如

最终选择预测 $R^2$ 为0.9848, RMSEP为0.0407的MSC作为定量分析的数据预处理法。

表4 数据预处理结果

Tab.4 Result of spectral data pretreatment on PLR

波长选择法	潜变量	变量类型	校正集		交叉验证		预测集		
			$R^2$	RMSEC	$R^2$	RMSECV	$R^2$	RMSEP	RPD
SNV	9	L	0.992 9	0.026 6	0.989 1	0.033 1	0.983 8	0.041 3	7.856 7
		D	0.992 9	0.026 6	0.988 5	0.034 0	0.985 2	0.048 7	8.219 9
1D	9	L	0.998 3	0.013 1	0.987 1	0.035 9	0.975 1	0.049 7	6.337 2
		D	0.998 0	0.014 0	0.990 8	0.030 4	0.977 8	0.057 3	6.771 6
2D	8	L	0.998 0	0.014 1	0.963 1	0.060 9	0.951 4	0.066 2	4.536 1
		D	0.998 3	0.013 0	0.975 3	0.052 2	0.963 9	0.055 6	5.263 2
MSC	9	L	0.992 7	0.027 0	0.998 2	0.034 4	0.984 8	0.040 7	8.111 1
		D	0.992 7	0.027 0	0.998 2	0.034 4	0.984 8	0.040 7	8.111 1
NOR	10	L	0.992 9	0.026 6	0.987 3	0.035 7	0.978 4	0.050 5	6.804 1
		D	0.992 9	0.026 6	0.987 3	0.035 7	0.978 4	0.050 5	6.804 1
SG	12	L	0.994 6	0.023 2	0.987 7	0.035 5	0.981 4	0.049 9	7.332 4
		D	0.995 6	0.020 9	0.990 1	0.031 5	0.979 5	0.051 2	6.984 3
原始	10	L	0.992 3	0.027 8	0.987 4	0.035 5	0.984 7	0.043 0	8.084 5
		D	0.993 4	0.025 8	0.989 3	0.032 7	0.984 3	0.042 1	7.980 9

### 2.3.3 PLR 分析

在上述波长选择和数据预处理基础上,得到的最佳 PLR 模型结果如表 4 所示。预测集的  $R^2$  为 0.9848,  $RMSEP$  为 0.0407,  $RPD$  为 8.111(远大于 2)<sup>[17]</sup>,表明模型精密度高,预测效果好。

### 2.3.4 SVR 分析

支持向量回归法(SVR)对丙氨酸二元混合物进

行定量分析。

首先,分别采用了网格搜索法(Grid-search)、遗传算法(Ga-search)和粒子群算法(Pso-search)对模型的参数,本文中为核函数的径向基函数参数  $g$ 、正规化系数  $c$  及不敏感损失函数  $p$  进行优化。结果如表 5 所示,网格搜索法结果最优。

表 5 SVR 模型的定量分析结果

Tab.5 Result of quantitative analysis of binary mixtures of alanine on SVR

参数 优化	变量 类型	参数			校正		交叉验证		预测集		
		$c$	$g$	$p$	$R^2$	$RMSEC$	$R^2$	$RMSEC_V$	$R^2$	$RMSEP$	$RPD$
Grid	L	512	0.0028	0.0100	0.9912	0.0300	0.9834	0.0410	0.9804	0.0520	7.1431
	D	724.0773	0.0020	0.0100	0.9912	0.0300	0.9849	0.0392	0.9807	0.0510	7.1982
Ga-cg	L	88.3010	0.1660	0.0100	0.9983	0.0141	0.9899	0.0319	0.9794	0.0539	6.9673
	D	87.7543	0.1693	0.0100	0.9983	0.0141	0.9899	0.0319	0.9793	0.0539	6.9505
Ga-cgp	L	47.6489	0.0570	0.0312	0.9915	0.0300	0.9850	0.0392	0.9774	0.0557	6.6519
	D	91.8772	0.1835	0.0146	0.9978	0.0141	0.9900	0.0318	0.9781	0.0566	6.7574
Pso	L	10.3673	0.1000	0.0100	0.9905	0.0316	0.9835	0.0408	0.9790	0.0583	6.9007
	D	20.6957	0.1000	0.0100	0.9929	0.0265	0.9804	0.0446	0.9820	0.0520	7.4536

### 2.3.5 PLR 与 SVR 模型比较

两模型对丙氨酸的定量分析效果均较好,但 PLR 模型的变量 L(D)的预测集的  $R^2$ 、 $RMSEP$ 、 $RPD$  值可达到 0.9848(0.9848)、0.0407(0.0407)和 8.1111(8.1111),优于 SVR 模型的 0.9804(0.9807)、0.0520(0.0510)、7.1431(7.1982),表明 PLR 模型在丙氨酸的手性含量分析上更有优势。

## 3 结论

紫外-可见-短波近红外漫反射光谱法结合化学计量学对丙氨酸的手性定性、定量分析表明,PCA 和 PLS-DA 模型均可准确判别 3 种丙氨酸的手性,正确率达 100%;定量分析中,PLR 模型比 SVR 模型表现出更高的精密密度,效果更好,结果令人满意。

紫外-可见-短波近红外漫反射光谱在丙氨酸定性定量分析上的成功,为其在手性化合物上的分析应用奠定了基础,有望运用于手性药物的质量控制。

### 参考文献:

[1] Shen Y, Yi D N, Liu J N. Discussion of the application of three-point interaction principle to the phenyl glycine racemic compound in IR spectrometry and its enantiomers separation in HPLC [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(8):636-638. [沈漪,易大年,刘基宁. 苯甘氨酸外消旋体的红外光谱及其对映异构体色谱拆分三点作用原理关系间的探讨[J]. 药学学报, 2002, 37(8):636-638.]

[2] Martinez-Gómez M A, Martínez-Pla J J, Sagrado S, et al. Chiral separation of oxprenolol by affinity electrokinetic chromatography-partial filling technique using human serum albumin as chiral selector[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 39(39):76-81.

[3] Guo X, Wang Z Q, Zuo L H, et al. Quantitative prediction of enantioseparation using  $\beta$ -cyclodextrin derivatives as chiral selectors in capillary electrophoresis [J]. Analyst, 2014, 139(24):6511-6519.

[4] Wang C Z, Zhu Z A, Li Y, et al. The cyclic dichromism studies of chiral zincporphyrins [J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2001, 17(2):244-248. [王传忠,朱志昂,李瑛,等. 手性锌卟啉的圆二色谱研究[J]. 无机化学学报, 2001, 17(2):244-248.]

[5] Ma F N, Shen X M, Ming X, et al. The novel macrocyclic compounds as chiral solvating agents for determination of en-

antiomers of chiral solvating agents for determination of en-

antiomers of chiral solvating agents for determination of en-

- antiomeric excess of carboxylic acids [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, 19(13): 1576 – 1586.
- [6] Tao W A, Cooks R G. Chiral analysis by MS [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(1): 25A – 31A.
- [7] Wu L M, Meurer E C, Cooks R G. Chiral morphing and enantiomeric quantification in mixtures by mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(3): 663 – 671.
- [8] Fakayode S O, Brady P N, Pollard D A, et al. Multicomponent analyses of chiral samples by use of regression analysis of UV-visible spectra of cyclodextrin guest-host complexes [J]. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394(6): 1645 – 1653.
- [9] Fakayode S O, Busch M A, Bellert D J, et al. Determination of the enantiomeric composition of phenylalanine samples by chemometric analysis of the fluorescence spectra of cyclodextrin guest-host complexes [J]. *Analyst*, 2005, 130(2): 233 – 241.
- [10] Yang J D. Simultaneous determination of D- & L-Tryptophan chiral enantiomer complexed with  $\beta$ -cyclodextrin by using Resonance Rayleigh Scattering spectrum and “Measurement analysis of two lines with one same point” [J]. *Fenxi Kexue Xuebao*, 2006, 22(4): 454 – 457. [杨季冬. 用 RRS 光谱和“同原射线计量分析法”同时测定 D- 和 L- 色氨酸对映异构体 [J]. 2006, 22(4): 454 – 457.]
- [11] Tran C D, Grishko V I, Oliveira D. Determination of enantiomeric compositions of amino acids by near-infrared spectrometry through complexation with carbohydrate [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(23): 6455 – 6462.
- [12] Liang Bing, Feng Yuyan, Song Hang, et al. Determination of cimetidine tablets by ultraviolet-visible diffuse reflection spectrum and support vector regression [J]. *Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition*, 2014, 46(3): 182 – 186. [梁冰, 冯宇艳, 宋航, 等. 紫外-可见漫反射光谱-支持向量回归法快速测定西咪替丁片剂含量 [J]. *四川大学学报: 工程科学版*, 2014, 46(3): 182 – 186.]
- [13] Gao X T, Wachs I E. Investigation of surface structures of supported vanadium oxide catalysts by UV-vis-NIR diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(6): 1261 – 1268.
- [14] Viscarra Rossel R A, McGlynn R N, McBratney A B. Determining the composition of mineral-organic mixes using UV-vis-NIR diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Geoderma*, 2006, 137(1/2): 70 – 82.
- [15] Filik H, Hayvali M, Kilic E, et al. Development of an optical fibre reflectance sensor for p-aminophenol detection based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline [J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 103 – 109.
- [16] Feng Y Y, Li X L, Xu K L, et al. Qualitative and simultaneous quantitative analysis of cimetidine polymorphs by ultraviolet-visible and shortwave near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and multivariate calibration models [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 104: 112 – 121.
- [17] Sarathjith M C, Das B S, Vasava H B, et al. Diffuse reflectance spectroscopic approach for the characterization of soil aggregate size distribution [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2014, 78(2): 369 – 376.

(编辑 黄小川)