

电位滴定结合偏最小二乘算法用于溶液中肉桂酸和 *L*-苯丙氨酸的同时测定

何阳春, 房升*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要: 结合自动电位滴定和化学计量学算法, 建立同时测定溶液中肉桂酸、*L*-苯丙氨酸和硫酸铵的方法。通过正交设计 25 组校正集溶液, 通过留一验证法对校正集最佳主成分进行选择, 得到偏最小二乘法较佳模型, 并对模拟样品进行分析。结果显示: 肉桂酸、*L*-苯丙氨酸、硫酸铵的回收率分别在 92.9%~104.4%、94.9%~101.5%、96.6%~105.1% 之间。基于 PLS 的方法可以方便解析重叠的滴定图谱, 不需要预先分离即可预测成分浓度。

关键词: *L*-苯丙氨酸; 偏最小二乘法; 电位滴定; 同时测定

A Chemometrics-Assisted Potentiometric Method for Simultaneous Determination of Cinnamic Acid and *L*-Phenylalanine

HE Yang-chun, FANG Sheng*

(College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: In this work, we proposed a new method for the simultaneous determination of cinnamic acid, *L*-phenylalanine and ammonium sulfate in solution using combined potentiometric titration and chemometrics. The partial least squares (PLS) algorithm was applied and 25 standard mixtures of the compounds were prepared according to orthogonal experimental design for calibration set. The commonly used leave-one-out cross-validation method was used to select the optimum number of factors in the PLS model. An independent set of synthetic raw mixtures was employed to evaluate the prediction performance of the resulting models. The results showed that the recovery values ranged from 92.9% to 104.4% for cinnamic acid, 94.9% to 101.5% for *L*-phenylalanine, and 96.6% to 105.1% for ammonium sulfate respectively. The study proves the feasibility of simultaneous spectrometric determination of cinnamic acid, *L*-phenylalanine and ammonium salts in raw mixtures without preliminary separation steps.

Key words: *L*-phenylalanine; partial least squares (PLS); chemometrics; simultaneous determination

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0140-04

L-苯丙氨酸主要用于医药保健品、食品添加剂等领域, 是合成甜味剂阿斯巴甜的主要原料。采用生物技术将肉桂酸转化为 *L*-苯丙氨酸, 已成为国内外 *L*-苯丙氨酸工业化生产的主要工艺之一^[1-4]。在该酶法合成过程中, 肉桂酸、*L*-苯丙氨酸和铵盐离子的浓度随反应进行而变化, 快速、准确分析反应液中各组分的含量, 对其生产过程的产品控制、分离提纯等十分重要。

Yamada 等^[5]在优化反应条件过程中, 采用薄层色谱

分离, 并利用紫外扫描定量肉桂酸和 *L*-苯丙氨酸浓度; 贾士儒等^[2]则采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行 *L*-苯丙氨酸定量分析; 项雷文等^[6]采用双波长紫外吸收法测定转化液中 *L*-苯丙氨酸含量, 测定波长为 258nm, 参比波长为 278nm。其他方法还包括氨基酸自动分析仪^[7]、层析法^[8]等。尽管上述方法都适用条件优化或生产过程控制, 但大都需要进行复杂的预分离或干扰组分的掩蔽, 成本较高且费

收稿日期: 2011-02-20

基金项目: 浙江省教育厅项目(Y201016733); 浙江工商大学引进人才科研启动基金项目

作者简介: 何阳春(1962—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为机械及计算机算法在食品中的应用。E-mail: hyczjgsu@yahoo.com.cn

*通信作者: 房升(1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为化学工程。E-mail: fangshengsky@yahoo.com.cn

时,利用化学计量学方法同时测定肉桂酸、L-苯丙氨酸和铵盐离子还未见报道。

随着计算机的普及和发展,利用化学计量学方法同时测定混合干扰多组分体系,是近年来很活跃的研究领域^[9-12]。化学计量学采用数学解析而非分离的方法,解决化合物谱图重叠的问题。本实验拟采用成本低廉的电位滴定结合化学计量学——偏最小二乘(partial least squares, PLS)方法^[13-16],对肉桂酸、L-苯丙氨酸和铵根离子(NH₄⁺)3组分混合体系进行同时分析测定,为酶法合成L-苯丙氨酸的定量分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氢氧化钠(NaOH)、氯化钾(KCl)、邻苯二甲酸氢钾、硫酸铵均为分析纯;肉桂酸(分析纯, > 99%) 浙江华东医药试剂公司;L-苯丙氨酸(> 98.5%) 浙江升华拜克生物股份有限公司;无二氧化碳水(制备方法:取超纯水加热煮沸,冷却后密封保存)。

NaOH 标准溶液、KCl(2mol/L)、缓冲溶液均按照国标法(GB/T 601—2002《化学试剂标准滴定溶液的制备》)配制。称取一定量的于烘箱烘至质量恒定的基准的邻苯二甲酸氢钾,溶于无二氧化碳水中,用配制好的氢氧化钠溶液进行自动电位滴定,最后标定 NaOH 溶液浓度为 0.0360mol/L。

各组分母液制备:利用电子天平准确称取一定量的 L-苯丙氨酸、肉桂酸和硫酸铵分别定容于容量瓶中,作为母液储存备用。校正集和预测集中各溶液都采用母液移液配制。

1.2 仪器与设备

Metrohm 809 型自动电位滴定仪、复合 pH 玻璃电极 瑞士万通公司;Auhaus 精密分析天平(0.01mg) 美国奥豪斯仪器公司;UV/UF 系列超纯水系统 美国 Thermo Scientific Barnstead 公司;常规干燥箱 上海赛欧试验设备有限公司。

1.3 方法

按照实验设计 25 组校正集溶液浓度,移取不同量的待测组份溶液于滴定烧杯,加入 25mL KCl 溶液作总离子强度调节剂,加入超纯水稀释到 100mL 左右;插入 pH 电极并搅拌,用自动电位滴定仪进行滴定测定,每个溶液采用 6mL NaOH 标准溶液滴定,采用固定滴加长度(每隔 0.01mL 等分滴加)的方法滴定,得到滴定剂加入体积与溶液 pH 值之间的关系,并记录好数据。相应的预测集溶液采用同样方法进行测定。在滴定实验中,加入离子强度调节剂使得溶液的总离子强度在一个相对

稳定且小的幅度内变化。这样在保持条件下,校正溶液和预测溶液中 L-苯丙氨酸、肉桂酸和 NH₄⁺ 的活度系数,可以基本保持在同样的范围内变化。

对于用于多元校正滴定分析的数据,必须是特定 pH 值下的滴定剂的体积数据。因此,必须对仪器记录的数据进行转换。本实验采用 Matlab 中的线性内插方法,对 pH 值在 4.80~9.60 区间,每隔 0.01 pH 值取一个点,共 481 个 pH 值点,最后得到的每个 pH 值处消耗的滴定剂的体积 v 。

1.4 滴定化学计量学基本原理

在电位滴定多元校正模型中,当 m 个滴定溶液试样,每一溶液中含有的被滴定组分为 a 种,当采用滴定剂(如 NaOH)滴定这些溶液时,在 b 个 pH 值点或电位处,记下所耗的滴定剂体积 v ,则得到一个 $m \times b$ 的滴定剂体积矩阵 V 。这样本实验的校正集 V 矩阵为一个 25×481 矩阵,其中每一列都代表溶液滴定到某个 pH 值时的滴定剂用量,每一行代表一个溶液的滴定曲线。

体积矩阵 V 与多种待测物的浓度矩阵 C 之间的线性关系由我国学者倪永年^[13]提出,见式(1):

$$V_{m \times b} = C_{m \times a} \times K_{a \times b} + K_{0, m \times b} \quad (1)$$

式中: $K_{0, m \times b}$ 代表非 0 截距项矩阵; $K_{a \times b}$ 代表系数矩阵。

对式(1)中矩阵 V 和 C 可先进行中心化处理,此时可以省略式(1)中的截距项,结果如下:

$$\bar{V}_{m \times b} = \bar{C}_{m \times a} \times \bar{K}_{a \times b} \quad (2)$$

式(2)类似于常规光谱学方法中的 Lambert-Beer 方程。因此,电位滴定法中的滴定曲线可称为滴定波谱^[17],此时, pH 值近似于光谱中的横坐标波长 λ , V 近似于光谱中的纵坐标吸光度或响应值 A 。此后就是化学计量学算法的应用,本实验采用常用的 PLS 回归^[18]进行解析。

上述电位滴定多元校正的思想可采用图 1 说明,首先可由校正集 V 和浓度矩阵 C 得到数值关系,建立校正数学模型(如 PLS 回归),预测集的溶液滴定数据 V 代入已建立的数学模型,得到未知溶液的浓度,具体过程见图 1。

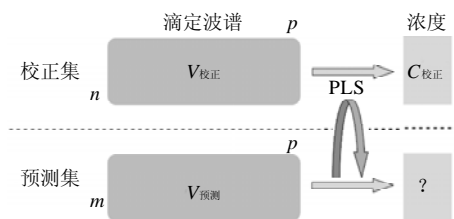


图 1 多元校正中校正集和预测集之间的关系示意图

Fig.1 Schematic description of the calibration set and test set used in titration multivariate calibration

2 结果与分析

2.1 校正集设计

L-苯丙氨酸的酶法生产过程是以反式肉桂酸为底物,在通入氨气条件下,通过红酵母生物转化成*L*-苯丙氨酸。因此,最后的反应液中和后存在 NH_4^+ ,将 NH_4^+ 同时作为测定对象,有利于过程的优化和控制。尽管可以通过电位滴定对单组分的肉桂酸、*L*-苯丙氨酸进行滴定分析,但由于其离解常数之间相差较小,很难对其混合溶液直接测定;并且由于 NH_4^+ 本身的酸性太弱,不适宜直接电位滴定分析。因此,本实验设定的校正集中同时包含肉桂酸、*L*-苯丙氨酸和硫酸铵3种物质。

在化学计量学方法中,对未知样品分析前必须首先建立一组校正溶液(校正集)。如果校正集中浓度比例设计不合理,如集中在某一区域,会使得模型的泛化能力下降。为了模拟不同的浓度比例情况,校正集中溶液的数量越多模型就越可靠,但这样又会大大增加实验测定的工作量。已经有文献[11,13]方法证明,采用正交设计的方法可以很好的解决化学计量学中的校正集选择问题。通过正交设计的校正集可以在较少的实验工作量下,尽可能地涵盖实验可能的条件情况变化。

表1 校正集中各种组分的浓度

Table 1 Concentrations of various compounds in the calibration set

样本数	肉桂酸	<i>L</i> -苯丙氨酸	硫酸铵
			mmol/L
M1	0.0000	0.0612	0.3786
M2	0.0000	0.1225	0.5679
M3	0.0000	0.1837	0.7572
M4	0.0000	0.2449	0.9465
M5	0.0000	0.3061	1.1358
M6	0.1817	0.0612	0.5679
M7	0.1817	0.1225	0.7572
M8	0.1817	0.1837	0.9465
M9	0.1817	0.2449	1.1358
M10	0.1817	0.3061	0.3786
M11	0.3635	0.0612	0.7572
M12	0.3635	0.1225	0.9465
M13	0.3635	0.1837	1.1358
M14	0.3635	0.2449	0.3786
M15	0.3635	0.3061	0.5679
M16	0.5452	0.0612	0.9465
M17	0.5452	0.1225	1.1358
M18	0.5452	0.1837	0.3786
M19	0.5452	0.2449	0.5679
M20	0.5452	0.3061	0.7572
M21	0.7270	0.0612	1.1358
M22	0.7270	0.1225	0.3786
M23	0.7270	0.1837	0.5679
M24	0.7270	0.2449	0.7572
M25	0.7270	0.3061	0.9465

在本实验中,采用正交设计方法配制不同含量的肉桂酸、*L*-苯丙氨酸和硫酸铵溶液,校正溶液的组成见表1。对于表中的各组成的浓度比也参照了普通酶法生

产过程中各物质的比例关系^[5-6]。表中采用一个5水平的正交设计,可以得到25个溶液集合。表1可以看作一个25行3列的浓度矩阵 $C_{25 \times 3}$,矩阵中每一行代表一个溶液中各物质的浓度组成。

图2a显示了表1中25个溶液的pH-V滴定数据,由图可见经过正交设计后的校正集滴定谱图,在整个浓度范围各个溶液能合理交叉,且整体分布均匀,以便模拟各种组分间的干扰条件。还可以看到,滴定图谱与一般光谱十分相似,如上所述,其中的pH值和V关系图可以视为符合Lambert-Beer定律的“谱图”,光谱中的吸收波长 λ 相当于pH值,吸光度或响应A则相当于V。

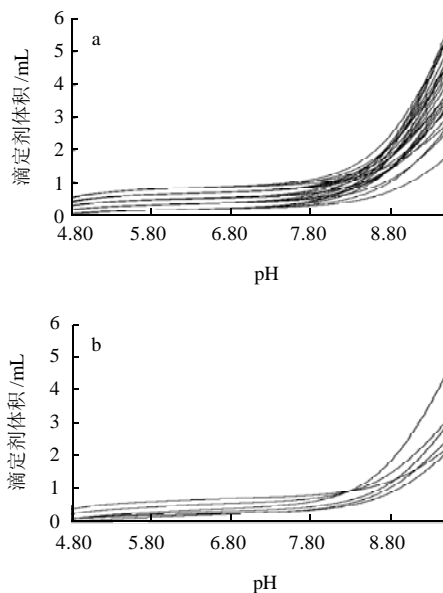


图2 校正集(a)和预测集(b)的滴定曲线

Fig.2 Titration curves for calibration set samples and prediction set samples

2.2 PLS的最佳主成分数选择

一般来讲,若主成分数 n 选择过小时,会因相关信息的丢失而导致结果失真;若 n 选择过多时,则又会将实验误差如仪器误差等带入模型,造成结果较大误差,且使得模型复杂。本实验采用化学计量学中常用的留一交叉验证法^[11]选择PLS的最佳主成分数。相对于其他选择算法,如蒙特卡罗交叉验证法和多维交叉验证法,留一交叉验证更加可靠且适用于样本集较少的条件。对于本实验PLS回归,25个校正集的混合物样品,经过留一交叉验证,最终确定主成分数为3个,这基本上与溶液中的化合物种数是一样的,即不需要用更多的成分数去提取有用信息,说明混合物之间的非线性干扰基本可以忽略。

2.3 预测样品

按照各化合物的实际浓度比例情况, 分别配制 6 个不同组成的混合物溶液(实际浓度如表 2 所示), 作为未知浓度的预测集以考察模型的预测能力。对于这些未知组成的溶液, 保持与校正集相同的条件下, 测出不同 pH 值条件下的滴定剂消耗体积矩阵, 其滴定谱图见图 2b。在基于上述得到的最佳主成分数基础上, 采用 PLS 回归, 得到的各个溶液预测结果也列于表 2, 包括每个浓度的预测回收率。

表 2 预测集各溶液实际浓度和模型得到的估计值及回收率

Table 2 Actual and predicted concentrations and recoveries of various compounds in the prediction set

实际值/(mmol/L)			预测值/(mmol/L)			回收率/%		
肉桂酸	L-苯丙氨酸	硫酸铵	肉桂酸	L-苯丙氨酸	硫酸铵	肉桂酸	L-苯丙氨酸	硫酸铵
0	0.0735	0.4164	0.0046	0.0727	0.4378	—	98.9	105.1
0.1981	0.1102	0.6057	0.1893	0.1046	0.5850	95.6	94.9	96.6
0.1654	0.2572	0.2272	0.1705	0.2564	0.2199	103.1	99.7	96.8
0.3998	0.0735	0.3407	0.4172	0.0746	0.3305	104.4	101.5	97.0
0.5816	0.2204	0.3407	0.5400	0.2111	0.3524	92.9	95.8	103.4
0.6906	0.1592	0.795	0.7127	0.1595	0.7982	103.2	100.2	100.4

注: “—”表示因实际值为 0 而无法计算回收率。

结果表明, 采用 PLS 算法用于解析溶液中各被滴定离子的谱图重叠数据, 可以解决因解离常数相近而不能同时滴定分析的问题, 避免繁琐的化学掩蔽和分离提纯等步骤。本实验方法简便, 且适用于样品的批量分析, 为酶法合成 L-苯丙氨酸过程中肉桂酸、L-苯丙氨酸和 NH_4^+ 同时测定提供了一种很好的途径。

3 结 论

本实验借助电位滴定和化学计量学相结合的方法, 建立了溶液中 L-苯丙氨酸、肉桂酸和 NH_4^+ 同时分析方法。通过正交设计了 25 组校正集溶液, 通过留一验证法对校正集最佳主成分进行了选择, 得到了 PLS 较佳模型。通过对模拟样品的分析, 结果显示, 基于 PLS 的方法可以方便解析重叠的滴定图谱, 不需要预先分离即可预测组成浓度。研究为酶法合成 L-苯丙氨酸的产品控制、分离提纯等过程提供了一种定量分析途径, 也为滴定计量学的在食品领域的应用提供借鉴。

参考文献:

- [1] D'CUNHA G B, SATYANARAYAN V, NAIR P M. Stabilization of phenylalanine ammonia lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of L-phenylalanine methyl ester[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(6): 421-427.
- [2] JIA Shiru, CUI Jiandong, LI Yan, et al. Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acids by high-level expression of phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(3): 193-197.
- [3] 李艳军, 刘飞, 于韦, 等. 反式肉桂酸转化条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 103-107.
- [4] 崔建东, 贾士儒, 谭之磊. 改善苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌细胞通透性提高反式肉桂酸转化率[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(6): 1015-1019.
- [5] YAMADA S, NABE K, IZUO N, et al. Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia lyase activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42(5): 773-778.
- [6] 项雷文, 郑建兵. 双波长紫外吸收法测定 L-苯丙氨酸含量[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(3): 69-71.
- [7] CHANG J Y, GOO Y M, LEE C H, et al. Conversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine by phenylalanine ammonia lyase[J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 1994, 15(5): 387-390.
- [8] 李德莹, 余永友. 生物转化肉桂酸制 L-苯丙氨酸[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2007, 129(6): 559-561.
- [9] NI Yongnian, XIAO Weiqiang, KOKOT S. A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics[J]. Food Chemistry, 2009, 113 (4): 1339-1345.
- [10] ZHANG Lei, LI Qingqing, TAO Wei, et al. Quantitative analysis of thymine with surface-enhanced Raman spectroscopy and partial least squares (PLS) regression[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry.
- [11] 倪永年, 蔡英俊. 偏最小二乘差动力学分光光度法同时测定酪氨酸和色氨酸[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 433-435.
- [12] LIU Fei, HE Yong, SUN Guangming. Determination of protein content of *Auricularia auricula* using near infrared spectroscopy combined with linear and nonlinear calibrations[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57(11): 4520-4527.
- [13] NI Yongnian. Simultaneous determination of mixtures of acids by potentiometric titration[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 367(1): 145-152.
- [14] FANG Sheng, ZHU Mingqiao, HE Chaohong. Moving window as a variable selection method in potentiometric titration multivariate calibration and its application to the simultaneous determination of ions in Raschig synthesis mixtures[J]. Journal of Chemometrics, 2009, 23(3): 117-123.
- [15] 房升. 液液离子交换萃取法从 Raschig 合成液中分离硫酸羟胺: 应用与相关基础研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [16] LINDBERG W, KOWALSKI B R. Evaluation of potentiometric acid-base titrations by partial-least-squares calibration[J]. Analytica Chimica Acta, 1988, 206(1): 125-135.
- [17] 张云. 计算滴定分析法的分类及其进展[J]. 分析科学学报, 2006, 22 (6): 731-736.
- [18] 杜一平, 潘铁英, 张玉兰. 化学计量学应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.