

# 同步荧光法同时测定色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸\*

黄贤智 许金钩 李耀群\*\*

(厦门大学化学系)

## 摘 要

本文叙述一种新的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的同步荧光分析法。介质为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH 缓冲液 (pH=7.4)。以激发单色器和发射单色器的波长差  $\Delta\lambda = 55\text{nm}$  进行同步扫描,其同步特征峰苯丙氨酸为 217nm,酪氨酸为 232nm,色氨酸为 284nm (均指激发波长)。苯丙氨酸和酪氨酸可直接由其特征峰的高度进行定量测定。色氨酸的 284nm 特征峰略受酪氨酸同步峰拖尾的影响,其峰值信号需加校正。苯丙氨酸测定范围为 0.07—5ppm,酪氨酸为 0.02—1ppm,色氨酸为 0.001—0.5ppm。

多组分荧光物质的同时测定,历来是分析者感兴趣的问题。同步荧光技术是解决这个问题的良好的手段之一。自 Lloyd<sup>[1]</sup> 提出这种技术以来,方法日渐完善<sup>[2-4]</sup>,已由固定波长差  $\Delta\lambda$  (激发和发射单色器的波长差) 进一步发展为可变角 (亦称可变波长)<sup>[5]</sup>、固定能量 (亦称恒频率差)<sup>[6]</sup> 和同步一导数光谱<sup>[7]</sup> 等方法。

色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸是天然氨基酸中仅有会发荧光的组分。由于三者的激发光谱和发射光谱互相重叠,不能分别测定,早期多采用预分离或化学处理后分析的方法<sup>[8,9]</sup>。1979年 Miller<sup>[10]</sup> 采用同步荧光光谱法获得酪氨酸 (用  $\Delta\lambda < 15\text{nm}$ ) 和色氨酸 (用  $\Delta\lambda > 60\text{nm}$ ) 的特征光谱。随后 Miller 和 Fell<sup>[11-12]</sup> 用同步荧光光谱法或同步一导数荧光光谱法对苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的分析做了不少工作。本文首次采用单一  $\Delta\lambda$  值的同步荧光光谱法来同时测定上述三种氨基酸。

## 实 验 部 分

### (一) 仪器与试剂

日立850型荧光分光光度计:使用时单色器带通为5nm,扫描速度为100nm/min。苯丙氨酸标准溶液:以DL-苯丙氨酸(层析纯,中国科学院生化所制)配制成1.25mg/ml的水溶液。

酪氨酸标准溶液:以L-酪氨酸(上海禽蛋二厂,生化试剂)配制成0.313mg/ml的水溶液。

色氨酸标准溶液:用DL-色氨酸(B.D.H.实验室试剂,批号700812/551129)配制成0.625mg/ml的水溶液。

以上三种标准溶液,使用时按需要浓度用水逐级稀释。

\* 本工作得到科学基金的资助, \*\*85届毕业生

缓冲溶液: pH = 7.4. 用0.5M NaOH和0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液以4:5体积比混合而成。所有以上溶液均用三次蒸馏水配制。

(二) 条件试验

1. pH的选择:

色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸三者的荧光产率与介质pH值有关, 适宜的pH分别为11, 7和中性至弱碱性<sup>[8,9]</sup>。我们根据表1的试验结果选用pH = 7.4为共同的介质酸度。

表1 pH值对同步(Δλ = 55nm) 荧光信号值的影响

缓冲溶液 pH	同步荧光峰信号		
	苯丙氨酸10ppm	酪氨酸5ppm	色氨酸 1ppm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -柠檬酸 6.0	9.5	67	78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH 7.4	67	87	76
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH 8.4	60	75	88
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaOH 9.7	92	47	137

2. 激发、发射及同步光谱的测绘:

移取上述苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的标准溶液, 加入适量pH = 7.4的缓冲溶液、分别配制成1.5、0.6和0.2ppm的相应溶液, 然后分别测绘激发、发射和同步(Δλ = 55nm)光谱, 结果如图1。

3. Δλ的选择:

同步荧光光谱法中, Δλ的选择是一个重要问题。为此进行了Δλ为3、10、30、50、55、60、70nm等一系列的同步扫描试验。根据试验结果认为选用Δλ为55—60nm较为适宜, 见图2。

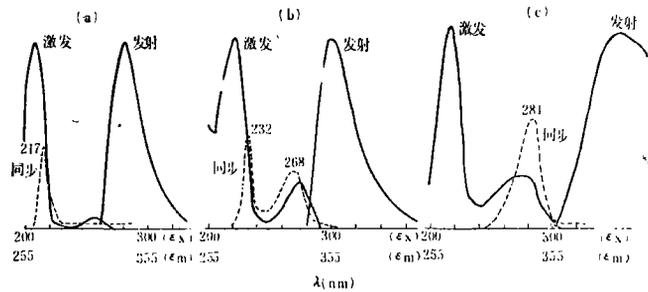


图1 苯丙氨酸(a)、酪氨酸(b)和色氨酸(c)的激发、发射和同步(Δλ = 55nm)光谱

在此范围内, 不同Δλ值的同步特征峰值虽有些差别, 但已清晰地分开, 其中色氨酸的同步荧光峰值略受酪氨酸存在的影响而有不同程度的蓝移, 但仍可根据它们的同步荧光光谱特性加以辨别。

4. 工作曲线的测绘:

移取不同量的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的标准溶液分别置于25ml容量瓶中, 各加入2ml pH = 7.4的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH缓冲溶液, 用水稀释至刻度, 用Δλ = 55nm进行同步扫描, 在217nm、232nm和284nm分别读取苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的同步荧光信号, 然后分别绘制其同步荧光信号~浓度的工作曲线。单组分的工作曲线线性范围为: 苯丙氨酸0.07—10ppm,

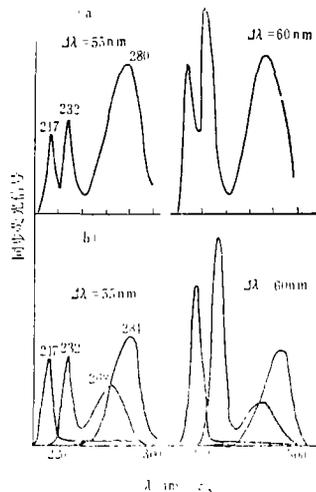


图2 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸共存时(a)和组分单独存在时(b)的同步荧光光谱  
Δλ = 55nm和Δλ = 60nm

酪氨酸0.01—5ppm,色氨酸0.001—5ppm。当三组分共存时,由于苯丙氨酸受另两种氨基酸和酪氨酸受色氨酸的熄灭作用,工作曲线线性范围缩小为:苯丙氨酸0.07—5ppm,酪氨酸0.02—1ppm,色氨酸0.001—0.5ppm。

### 5. 已知混合样品的测定:

移取已知量的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸标准溶液作为混合样品,在与工作曲线相同的条件下进行同步荧光测量。苯丙氨酸和酪氨酸的含量分别用在217nm和232nm测得的同步荧光信号值查对相应的工作曲线。酪氨酸不存在时,色氨酸含量可直接由284nm的同步信号查对其相应的工作曲线;酪氨酸存在时,由于色氨酸在284nm的同步荧光信号受到酪氨酸268nm的同步荧光峰影响,结果将略偏高,其偏高程度随酪氨酸量增加而增加,但可用下式来消除其影响:

$$F = F_{284} - KF_{232} - F_0$$

式中 $KF_{232}$ 为相当于酪氨酸在284nm所贡献的同步荧光信号,K为酪氨酸在284nm与232nm同步荧光信号的比值,由单组分酪氨酸实验求得, $F_{232}$ 为酪氨酸在232nm的同步荧光信号, $F_{284}$ 为在波长284nm实测的同步荧光信号; $F_0$ 为空白溶液在284nm的信号;F为色氨酸于284nm的真实同步荧光信号。由F值和相应的工作曲线,可求得色氨酸的含量。

几个混合样品测定结果见表2

表2 已知混合样品测定结果 ( $\Delta\lambda = 55\text{nm}$ )

编号	已知量 (ppm)			测得量 (ppm)		
	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸
1	0.20	0.10	0.050	0.19	0.10	0.053
2	0.80	0.40	0.20	0.83	0.42	0.21
3	1.10	0.55	0.28	1.09	0.54	0.28
4	1.40	0	0.35	1.42	0.02	0.35
5	0.70	0	0	0.75	0	0
6	0	1.00	0	0	0.96	0
7	1.70	0.85	0.425	1.70	0.85	0.42
8	2.00	0.10	0.275	1.99	0.11	0.26
9	0.20	1.00	0.275	0.21	0.94	0.27

采用 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 进行同步荧光扫描,采用以上步骤进行这三种氨基酸的测定,同样可获得满意的结果(数据从略)。

## 结果与讨论

由图1可见,在经典的荧光光谱上,激发和发射光谱相互重迭的这三种氨基酸,在采用 $\Delta\lambda = 55\text{nm}$ 的同步荧光光谱法时可以获得谱带宽度窄的苯丙氨酸和色氨酸的特征同步谱,峰值波长分别为217和284nm;酪氨酸的同步光谱呈现两个峰,强峰位于232nm,弱峰位于268nm。在酪氨酸的特征同步光谱峰232nm处,苯丙氨酸呈现微小的同步荧光信号,但当其浓度小于5倍酪氨酸时,其影响可忽略不计。本实验采用日立850型荧光计的“双扫描功能”。此时该仪器所测得的同步光谱系非校正光谱,即带有光源、单色器和光电倍增管的光谱特性。

## 参 考 文 献

- [1] J.B.F. Lloyd, *Nature(Phys.Sci)*, 231, 64(1971).  
[2] T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, 50, 396(1978).  
[3] Ph. Baudot, J.C. Andre, *Anal. Lett.*, 15, 471(1982).  
[4] 黄贤智等, 光学与光谱技术, 4, 31(1985).  
[5] J.N. Miller, *Analyst*, 109, 191(1984).  
[6] E.L. Inman, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 54, 2018(1982).  
[7] P. John, I. Soutar, *Anal. Chem.*, 48, 520(1976).  
[8] 陈国珍主编, 荧光分析法, 第256页, 科学出版社, 1975年。  
[9] 郭尧君, 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用, 第123页, 科学出版社, 1979年。  
[10] J.N. Miller, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, 16, 203(1979).  
[11] J.N. Miller, A.F. Fell, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32, 70(1980).  
[12] J.N. Miller, et al., *Anal. Proc.*, 19, 37(1982).

(收稿日期: 1985年10月21日)

## SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TRYPTOPHAN, TYROSINE AND PHENYLALANINE BY SYNCHRONOUS FLUORIMETRY

Huang Xianzhi, Xu Jingou and Li Yaoqun  
(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen)

### ABSTRACT

A new method of synchronous fluorimetry for the simultaneous determinations of tryptophan, tyrosine and phenylalanine is described. The measurement is carried out in a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH buffer solution (pH=7.4) with  $\Delta\lambda$  55nm for synchronous scanning, which gives peaks at 217nm, 232nm and 284nm for phenylalanine, tyrosine and tryptophan, respectively. The former two amino acids can be directly determined from the corresponding synchronous signals, while synchronous signal of tryptophan at 284nm is slightly interfered by that of tyrosine, and should be corrected. The linear ranges of the determination are 0.07 to 5ppm for phenylalanine, 0.02 to 1ppm for tyrosine and 0.001 to 0.5ppm for tryptophan.