

## 现场光化学荧光法测定酪氨酸

蔡维平\* 王细生 朱庆枝 王志红 许金钩  
(厦门大学化学系, 教育部分析科学重点实验室, 厦门 361005)

**摘 要** 在碱性缓冲溶液中, 酪氨酸经 275 nm 紫外光照射后, 产生荧光二聚体。据此, 建立了现场光化学荧光法测定酪氨酸的新方法。线性范围为  $2.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L。检测限及精密度分别为  $3.2 \times 10^{-9}$  mol/L<sup>-1</sup> 和 1.7%。方法简便、快捷, 对其它氨基酸有较好的选择性, 可用于啤酒及氨基酸注射液的测定。文章对光化学反应机理作了初步探讨。

**关键词** 光化学, 荧光法, 酪氨酸

### 1 引 言

酪氨酸是氨基酸家族中的重要成员之一, 自然界中有广泛的分布, 是人体中合成某些腺素及辅酶的前体。酪氨酸的分析方法颇多, 其中酶法分析<sup>[1]</sup>的灵敏度高、选择性好, 但由于酶的某些缺点制约了其广泛应用。慈云祥等<sup>[2]</sup>用锰卟啉化合物作为过氧化物酶模拟酶, 研究了酪氨酸等为底物的酶促反应。直接荧光分析法测定酪氨酸也有不少应用<sup>[3,4]</sup>。本研究工作中发现, 在 275 nm 光照射下, 酪氨酸发生光化学反应, 产物的荧光特性发生变化。由此建立起现场光化学荧光法测定酪氨酸的新方法。该法简便、快捷, 对其它氨基酸具有好的选择性, 用于啤酒及氨基酸注射液的测定, 获得良好结果。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器和试剂

Hitachi 650-10S 荧光分光光度计, 配备 18  $\mu$ L 流通池; Hitachi F-4500 荧光分光光度计; Model pH-260 型酸度计(厦门分析仪器厂); LZ-1010 型蠕动泵(沈阳肇发自动分析研究所)。

酪氨酸标准溶液: 配制  $1.00 \times 10^{-2}$  mol/L 的贮备液, 存于冰箱中, 使用时稀释为所需浓度的工作溶液; pH 10.5 的  $\text{NH}_3 \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$  缓冲溶液; 10% 的丙酮水溶液。以上所用的水经亚沸蒸馏。

#### 2.2 实验方法

于 10 mL 具塞比色管中加入含适量酪氨酸的溶液, 3.0 mL 碱性缓冲溶液, 0.2 mL 丙酮溶液, 用水稀释至刻度, 摇匀。用蠕动泵将溶液泵入 18  $\mu$ L 的荧光计流通池中, 停泵并用荧光计的 275 nm 激发光照射 8 min, 然后调节激发波长为 315 nm, 发射波长为 410 nm, 测定荧光强度。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 测量条件的选择

**反应体系的荧光特性** 绘制光照前后酪氨酸体系的荧光激发和发射光谱, 结果图 1 所示。可见, 酪氨酸经光照后发生了光化学反应, 产物的荧光强度显著增大, 激发和发射波长也分别由 275 nm 和 305 nm 红移至 315 nm 和 410 nm, Stokes 位移显著加大。

2000-01-13 收稿; 2000-07-28 接受。  
本文系福建省自然科学基金资助项目。

光照波长的选择 用不同波长的光照射固定浓度的酪氨酸溶液,然后测定光化学反应产物的荧光强度。结果表明,用 275 nm 的光照射效果最好。

缓冲体系及 pH 的选择 试验表明,光化学反应应在弱碱性介质中进行,  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  是较好的缓冲体系, pH 在 10.5 ~ 11.0 之间荧光强度最大,缓冲溶液的加入量以 3.0 mL 为宜。

丙酮的影响及用量选择 绘制体系未加和加入丙酮的光化学反应动力学曲线,结果如图 2 所示。可见丙酮的加入极大地提高光化学反应的速度,光照 6 min 后荧光强度达到最大且基本恒定。而丙酮的浓度以 0.2% 为宜。

### 3.2 标准曲线的制作及方法的精密度、检测限

按照上述条件制作标准曲线,酪氨酸浓度在  $2.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内,光照前后荧光强度差值  $\Delta I_f$  与酪氨酸浓度  $C$  的线性方程为  $\Delta I_f = 3.62C - 17.2$ ,  $r = 0.9985$  ( $C$  的单位为  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L)

对 11 份试剂空白溶液平行测定,以  $3S_0/k$  计算,方法的检测限为  $3.2 \times 10^{-9}$  mol/L。对 8 份浓度均为  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的酪氨酸溶液平均测定,相对标准偏差为 1.7%。

### 3.3 干扰试验

对于浓度为  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L 的酪氨酸,以 5% 误差为限,共存物的允许摩尔倍数为:亮氨酸、甘氨酸(500),苯丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、丙氨酸、赖氨酸(200),组氨酸、色氨酸(100),蛋氨酸(25);  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$  (1000 以上),  $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  (200),  $\text{Ca}^{2+}$  (50),  $\text{Mg}^{2+}$  (5),  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  (1),  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  (0.1)。可见大多数氨基酸无干扰,而二价以上金属离子有不同程度的干扰。

### 3.4 啤酒及氨基酸注射液中酪氨酸含量的测定

分别移取 1.00 mL 除气啤酒和氨基酸注射液于 100 mL 容量瓶中,用水定容。分别移取适量的稀释液按照实验方法进行测定。两种试样各进行 4 次平行测定,结果酪氨酸平均含量分别为  $9.15 \times 10^{-4}$  和  $2.15 \times 10^{-3}$  mol/L,相对标准偏差为 5.4% 和 4.6%,4 次不同标准加入量的回收率分别为 92.8% 和 94.0%。

## 4 光化学反应机理初探

酚的对位取代物在过氧化物酶和  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下,偶联为荧光二聚体而用于酶法分析早有报道。Zheng<sup>[5]</sup> 及王冬媛<sup>[6]</sup> 分别发现,光照可替代过氧化物酶及  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 同样产生二聚体,并探讨了反应机理。本文研究的酪氨酸经光照后,产物的荧光特性与文献<sup>[6]</sup> 报道的对羟基苯丙酸光照

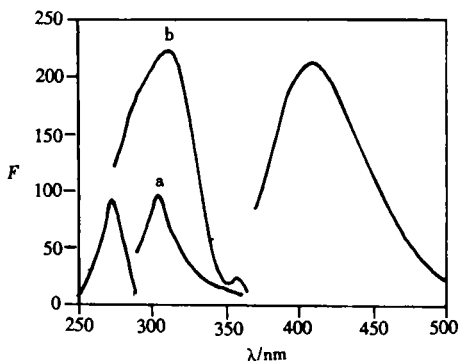


图 1 Tyr 的荧光激发和发射光谱  
Fig.1 Fluorescence excitation and emission spectra of tyrosine (Tyr)  
a. 光照前 (before irradiation), b. 光照后 (after irradiation)。

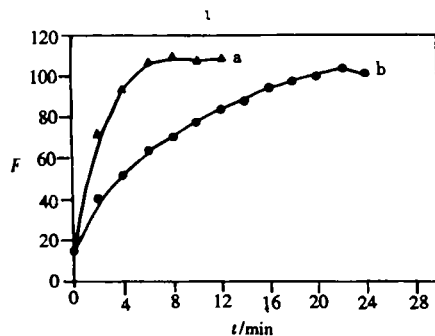


图 2 光化学反应的动力学曲线  
Fig.2 Kinetic curve of photochemical reaction  
a. 加入丙酮 (add acetone), b. 未加丙酮 (without acetone)。

后的二聚体几乎完全一样,表明酪氨酸也发生二聚反应;文献<sup>[7]</sup>报道,光照可以替代苯丙氨酸氧化酶,使之发生与酶促反应等效的光化学反应,产生  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。而本研究工作也发现,酪氨酸在非氨性介质中经光照后,产物中也存在  $\text{NH}_3$ 。因此可认为,酪氨酸兼有酚的对位取代物及苯丙氨酸两者的光化学反应特性,光照发生了系列等效酶促反应,并最终生成荧光二聚体。

## References

- 1 Guibault G G, HieSerman J. *Anal. Biochem.*, **1968**, 26:1
- 2 Ci Yunxiang(慈云祥), Chen Lie(陈 列). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **1989**, 17:404
- 3 Froehlich P M, Murphy L D. *Anal. Chem.*, **1977**, 49:1606
- 4 Huang Xianzhi(黄贤智), Xu Jingou(许金钩), Li Yaoqun(李耀群). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **1987**, 15(3):199
- 5 Zhang G, Purnendu K D, Williams S E, John N M. *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 243:207
- 6 Wang Dongyuan(王冬媛), Xu Jingou(许金钩), Guo Xiangqun(郭祥群), Zhao Yibing(赵一兵). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **1995**, 23(8):870
- 7 Wang Xisheng(王细生), Cai Weiping(蔡维平), Zhu Qingzhi(朱庆枝), Wang Zhihong(王志红), Xu Jingou(许金钩). *J. Fuzhou University (Natural Science Edition)*(福州大学学报,自然科学版), **1999**, 27(Supp.):75

## In-situ Photochemical Fluorimetry of Tyrosine and Its Determination

Cai Weiping\*, Wang Xisheng, Zhu Qingzhi, Wang Zhihong, Xu Jingou  
(Department of Chemistry, the Key Laboratory of Analytical Sciences of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** Tyrosine can produce fluorescent dimers under irradiation with 275nm UV-light in  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  buffer. Based on this fact, a new photochemical fluorimetry in-situ was developed for determination of tyrosine. The linear relationship is over the range of  $2.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L tyrosine. The detection limit is  $3.2 \times 10^{-9}$  mol/L and relative standard deviation is 1.7%. This method is simple and rapid, and has better selectivity for other amino-acids. It has been applied to the determination of tyrosine in beer and amino-acid injections. Mechanism of the photochemical reaction was discussed.

**Keywords** Photochemical reaction, fluorimetry, tyrosine

(Received 13 January 2000; accepted 28 July 2000)