

紫外分光光度法同时测定色氨酸和酪氨酸^①

徐 澜 安 伟^{②a}

(山西忻州师范学院生化系 山西省忻州市和平西街 10 号 034000)

a(山西农业科学院玉米研究所 山西省忻州市新建北路 14 号 034000)

摘 要 以 0.1 mol/L NaOH 为溶媒, 18 种组成蛋白氨基酸在 280—310 nm 波长仅色氨酸和酪氨酸有吸收峰。利用这一特性, 提出了色氨酸和酪氨酸混合体系的紫外光谱的测定方法, 同时用偏最小二乘法(PLS)和多元线性回归法(MLR)等化学计量学方法对光谱数据直接进行解析, 结果都较为满意。本法已用于复方氨基酸注射液的测定, 结果也很满意。

关键词 偏最小二乘法; 多元线性回归法; 色氨酸; 酪氨酸

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)05-2320-04

1 引言

色氨酸(Try)作为人体的必须氨基酸之一, 具有极其重要的生理功能和实用价值, 它促进胃液分泌和脑代谢, 治疗癫痫。在医药上用于抗痉挛, 食品行业中用作鱼类保鲜剂(BL-F)的重要成分, 防止鱼蛋白的分解, 还可用于预防发霉、消毒。色氨酸同时也是植物生长激素前体物和非营养性甜味剂。此外, 色氨酸还显示出强的抗氧化性能, 在食品中用作抗氧化剂。酪氨酸(Tyr)及其衍生物如肾上腺激素、甲状腺素、多巴、巴胺等在机体内起激素和激素受体作用, 与神经活动、行为以及大脑皮层的睡眠节律有关。色氨酸和酪氨酸也是肝、脑、肾疾患、外科手术、严重烧伤、儿童等药品的重要成分。所以对于它们的研究有着重要的意义, 故对于它们的同时测定也越来越受到分析工作者的重视^[1-3]。由于色氨酸、酪氨酸的紫外光谱、荧光光谱严重重叠, 故同时测定时, 需要用化学计量学方法进行处理。曾有报道用导数光谱法^[4], 二阶导数荧光光度法^[5]同时测定不同样品中的色氨酸和酪氨酸, 有人用等吸光度法测定复方氨基酸注射液中性氨酸含量^[6]等。本文在一定的波长范围内测定它们在不同波长处的吸光度值, 采用偏最小二乘法和多元线性回归法同时测定合成样品和氨基酸注射液中色氨酸和酪氨酸的含量。测定结果相对误差都较小, 表明本方法有一定的应用价值。

2 实验部分

2.1 方法原理

利用 $A = KC$ 这一关系式, 吸光度值 A 的大小取决于溶液所含色氨酸和酪氨酸的浓度值 C , 吸光度值与浓度成正比, 若被测组分浓度为 C_i , 在某一特定的波长下则有:

同时存在 n 个组分时, 可建立如下方程:

① 忻州师范学院院级科研基金项目(200905)

② 联系人, 手机: (0) 13037008407; 电话: (0350) 3048252; E-mail: ymsanwei@sohu.com; tinchonliang@yahoo.com.cn

作者简介: 徐澜(1975—), 女, 山西省偏关县人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学及分子生物学的教学科研工作。

收稿日期: 2010-11-15; 接受日期: 2010-12-20

$$A_i = K_i C_i + a \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (a \text{——测量误差})$$

$$A_1 = K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1n}C_n + a_1$$

...

...

$$A_p = K_{p1}C_1 + K_{p2}C_2 + \dots + K_{pn}C_n + a_p$$

(1)

如果写成矩阵形式, 则可简写为:

$$\begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} & \dots & A_{1m} \\ A_{21} & A_{22} & \dots & A_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_{p1} & A_{p2} & \dots & A_{pm} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{11} & K_{12} & \dots & K_{1n} \\ K_{21} & K_{22} & \dots & K_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ K_{p1} & K_{p2} & \dots & K_{pn} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & \dots & C_{1m} \\ C_{21} & C_{22} & \dots & C_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ C_{n1} & C_{n2} & \dots & C_{nm} \end{bmatrix}$$

上述表达式可简写为 $[A]_{p \times m} = [K]_{p \times n} [C]_{n \times m}$

式(1)即可求得 K 矩阵, 在多元分析中称为校正, 然后再依据所确定的数学模型对未知样品进行分析。本文采用多元线性回归法和偏最小二乘法处理, 结果较为满意。

2.2 仪器和试剂

756MC 型紫外分光光度计、751G 型紫外分光光度计(上海分析仪器厂); AB204-N 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];

DL-色氨酸 $C_{11}H_{12}NO_2$ (层析纯, 中国科学院生物化学研究所); DL-酪氨酸 $C_9H_{11}NO_3$ (纸色谱纯, 政翔医用科技实业服务部化学试剂研究所); 复方氨基酸注射液(国药准字 H20013240, 18AA, 四川科伦大药厂有限责任公司); 氢氧化钠(分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心)。实验用水为二次蒸馏水。

2.3 配制储备液

准确称量 2.000g NaOH 用水配制 0.1mol/L NaOH 溶液 500mL, 再称取色氨酸 0.0204g 和酪氨酸 0.0181g, 分别用 0.1mol/L NaOH 溶液为溶剂配制 1.0×10^{-3} mol/L 色氨酸和 1.0×10^{-3} mol/L 酪氨酸标准储备液各 100mL。

2.4 实验方法

分别用 0.1mol/L NaOH 溶液配制一系列标准混合液, 用 1cm 的石英比色皿在 280—310nm 范围内以 0.1mol/L NaOH 溶液为参比液每隔 1nm 测其吸光度值。对标准混合液的吸光度数值用偏最小二乘法和多元线性回归法进行运算, 然后用其校正结果处理所测复方氨基酸溶液的吸光度数据, 即可得出实际样品氨基酸注射液中色氨酸和酪氨酸的含量。

3 结果与讨论

3.1 吸收曲线

取已配制好的 1.0×10^{-3} mol/L 色氨酸和 1.0×10^{-3} mol/L 酪氨酸各 5mL 分别置于 100mL 的容量瓶中, 用 0.1mol/L NaOH 稀释至刻度, 得 5.0×10^{-5} mol/L 色氨酸和 5.0×10^{-5} mol/L 酪氨酸

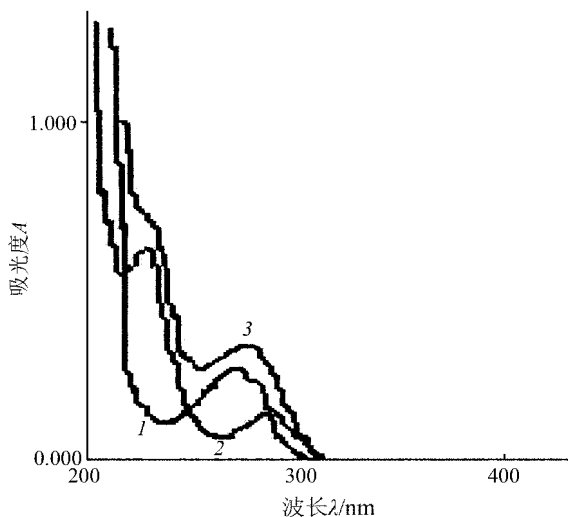


图 1 吸收曲线

- 1—— 5.0×10^{-5} mol/L 色氨酸;
2—— 5.0×10^{-5} mol/L 酪氨酸;
3—— 5.0×10^{-5} mol/L 色氨酸和
 5.0×10^{-5} mol/L 酪氨酸的混合液。

标准溶液。取 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 色氨酸、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 酪氨酸标准溶液和 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 色氨酸和 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 酪氨酸的混合标准液, 然后用 1 cm 石英比色皿以 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液为参比, 在 $200\text{—}400 \text{ nm}$ 范围内测其吸光度并绘制相应的吸收曲线, 见图 1。由标准溶液的吸收曲线可知, 在 $260\text{—}310 \text{ nm}$ 范围内, 色氨酸在 280 nm , 酪氨酸在 293 nm 处分别有最大吸收。

3.2 标准液测定

3.2.1 人工合成标准混合液的吸光度值的测定

取不同体积的 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 色氨酸和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 酪氨酸标准储备液混合, 配制成浓度不同的含两种氨基酸的标准混合液, 见表 1。然后在 $280\text{—}310 \text{ nm}$ 间以 0.1 mol/L NaOH 溶液为参比每隔 1 nm 测定吸光度值。

表 1 标准混合液的浓度 ($\times 10^{-5} \text{ mol/L}$)								
编号	1	2	3	4	5	6	7	8
Try/Tyr(V/V)	0.5/0.15	0.5/0.2	0.55/0.2	0.6/0.2	0.65/0.2	0.65/0.25	0.9/0.25	0.9/0.3
Try	5.0	5.0	5.5	6.0	6.5	6.5	9.0	9.0
Tyr	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	3.0

3.2.2 标准溶液的校正结果

选 6 个标准溶液作为校正集, 在 $280\text{—}310 \text{ nm}$ 范围内从所测的吸光度值数据中选其中的 20 个波长点借助计算机用偏最小二乘法运算; 选在 285 nm 和 291 nm 处所得的吸光度值数据借助计算机用多元线性回归法运算得:

$$285 \text{ nm} \quad y = - 9.031177 \times 10^{-3} + 4.522207 \times 10^{-2} x_1 + 1.960689 \times 10^{-2} x_2 \quad r = 0.9998$$
$$291 \text{ nm} \quad y = - 1.963584 \times 10^{-3} + 3.944449 \times 10^{-2} x_1 + 2.439358 \times 10^{-2} x_2 \quad r = 0.9998$$

x 代表浓度(mol/L), y 代表吸光度。

测定结果由表 2 列出。

表 2 标准混合液校正结果								($\times 10^{-5}\text{mol/L}$)		
编号	加入量		PLS				MLR			
	T _{ry}	T _{yr}	T _{ry}	T _{yr}	校正值(%)		T _{ry}	T _{yr}	校正值(%)	
					T _{ry}	T _{yr}			T _{ry}	T _{yr}
1	5.00	1.50	4.79	1.74	- 4.20	16.00	5.15	1.34	3.00	10.66
2	5.00	2.00	4.89	1.77	- 2.20	- 11.50	5.20	1.83	4.00	8.50
3	5.50	2.00	5.50	1.93	0.00	- 3.50	5.83	1.76	6.00	- 12.00
4	6.00	2.00	6.22	2.11	3.67	5.50	5.80	2.13	- 3.33	6.50
5	6.50	2.00	6.68	2.23	2.77	11.50	6.64	1.83	2.15	- 8.50
6	6.50	2.50	6.89	2.29	6.00	- 8.40	6.44	2.70	0.92	8.00
7	9.00	2.50	8.71	2.76	- 3.22	10.40	8.93	2.58	- 0.77	3.20
8	9.00	3.00	9.00	2.83	0.00	- 5.67	9.13	2.82	1.44	- 6.00

3.3 样品测定

取 5 mL 复方氨基酸置于 50 mL 的容量瓶中, 加入 0.1 mol/L 的 NaOH 至刻度, 再分别取出 1.2 、 1.5 、 2.0 mL 于 3 支不同的比色管中, 再用 0.1 mol/L NaOH 溶液稀释到刻度, 然后在 $280\text{—}310 \text{ nm}$ 间以 0.1 mol/L NaOH 溶液为参比, 每隔 1 nm 测定其吸光度值。选择其中 20 个波长点, 用经过偏最小二乘法和多元线性回归法校正的结果处理所测实际样品的吸光度值, 复方氨基酸的测定结果如表 3。

1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

表 3 实际样品的测定结果 ($\times 10^{-5} \text{mol/L}$)

编号	按标示量计算含量		PLS		MLR	
	Try	Tyr	Try	Tyr	Try	Tyr
1	5.280	1.668	5.300	1.870	4.660	2.214
2	6.600	2.085	6.420	2.160	6.004	2.379
3	8.800	2.780	8.220	2.630	8.254	2.598

由标准溶液的校正结果, 计算出所测复方氨基酸注射液中两种氨基酸的含量。由偏最小二乘法得色氨酸含量为 $4.220 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, 酪氨酸为 $1.438 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 。由多元线性回归法处理得色氨酸含量为 $4.000 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, 酪氨酸为 $1.576 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 。

3.4 讨论

- (1) 由人工配制的标准混合液的测定可知, 两种方法同时测定色氨酸和酪氨酸的含量是可行的, 准确度较好, 从计算原理及测定过程看, 多元线性回归法比偏最小二乘法更简单, 更易于推广。
- (2) 这两种方法测定复方氨基酸中色氨酸、酪氨酸含量, 不需要分离, 操作也比较简单, 结果准确度也都比较高。说明研究化学计量学新方法, 并应用这些方法来解决常规方法所不能解决的问题, 具有一定的理论和现实意义, 值得推广和应用。

4 结论

以 0.1mol/L NaOH 为溶媒, 18 种组成蛋白氨基酸在 $280\text{—}310 \text{nm}$ 波长仅色氨酸和酪氨酸有吸收峰。利用这一特性, 提出了色氨酸和酪氨酸混合体系的紫外光谱的测定方法, 同时用偏最小二乘法(PLS)和多元线性回归法(MLR)等化学计量学方法对光谱数据直接进行解析, 结果都较为满意。本法已用于复方氨基酸注射液的测定, 结果也很满意。

参考文献

[1] 吴艳平, 程国斌, 马步伟. 紫外分光光度法测定对氨基苯酚的适宜条件探讨[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21(s2): 100—101.

[2] 高倩. 紫外分光同时测定四种食用色素[J]. 食品科学, 1999, (3): 56—58.

[3] 李心泓, 杨江丰, 孙靖霞. 茶普生分散片中赖氨酸的含量测定[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(10): 696—697.

[4] 霍光华. 等吸光度法测定复方氨基酸注射液中色氨酸含量[J]. 江西农业大学学报, 1994, 16(4): 404—407.

[5] 王怀友, 惠秋莎. 二阶导数荧光分光光度法同时测定色氨酸和酪氨酸[J]. 光谱学与光谱学分析, 2000, 20(3): 427—429.

[6] 程霜. 导数光谱法直接测定大豆水溶性蛋白质中色氨酸和酪氨酸[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(5): 61—63.

Simultaneous Determination of Tryptophan and Tyrosine by UV Spectrophotometry

XU Lan AN Wei^a

(Department of Biochemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000, P. R. China)
a(Maize Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Xinzhou, Shanxi 034000, P. R. China)

Abstract There were only absorbing peaks of tryptophan and tyrosine in wavelengths of $280\text{—}310 \text{nm}$ in 18 amino acids with 0.1mol/L NaOH as the solvent. A sensitive method was presented for the simultaneous determination of tryptophan and tyrosine by UV spectrophotometry. The spectral data were analysed by the partial least squares and multiple linear regression with satisfactory results. Then this method is successfully applied to determine compound amino acids injection with satisfactory results.

Key words Partial Least Squares; Multiple Linear Regression; Tryptophan; Tyrosine