化学学报 ACTA CHIMICA SINICA **1994**, *52*, 496~499

色氨酸-亚硝酸体系荧光性质的研究及应用

揭念琴* 杨景和 孟凡琴 黄慕宾

(山东大学化学系，济南，250100)

本文首次提出了利用亚硝酸氧化色氨酸的荧光反应测定色氨酸的方法. 亚硝酸氧化色氨酸，继而在氢氧化钠介质中生成荧光物质，其激发波长和发射波长分别是：$\lambda_{ex}=320nm$，$\lambda_{em}=392nm$. 当色氨酸浓度为0.2～1.6μg／mL时，工作曲线呈良好的线性. 本方法用于测定蛋白质样品中的色氨酸，结果令人满意. 本文还对反应产物的特性进行了研究.

关键词：色氨酸，亚硝酸，荧光光度法.

色氨酸是所有微生物、植物和动物蛋白中最基本的氨基酸之一，也是人体的一种必需氨基酸，它是生物活性物质，如5-羟基色胺、色胺、梅拉通宁和β-咔啉的产物母体. 本文研究了亚硝酸—*L*-色氨酸—氢氧化钠（HNO_2—*L*-Try—NaOH）体系，发现亚硝酸在酸性介质中氧化色氨酸，而后将介质变成碱性，可得一强荧光物质，据此反应对色氨酸进行定量分析. 本文还研究了多种常见氨基酸和糖对测定的干扰作用，并对反应产物结构进行了分析，进而探讨了荧光反应的机理. 测定色氨酸的方法已有文献[1~3]报道，但其中有的方法灵敏度较低，有的方法费时. 本文讨论的方法与某些文献相比，具有操作简便、灵敏度高、稳定性好的优点. 更可取的是在本法中除了加入$NaNO_2$和色氨酸外，无其它有机物加入，有利于制备纯净的产物，便于反应机理的探讨.

实　　验

主要仪器和试剂　RF-540荧光分光光度计（日本岛津）.

L-色氨酸贮存液0.2mg／mL：准确称取*L*-色氨酸(第二军医大学药学系合成药物研究室)0.2000g于50mL烧杯中，加适量蒸馏水溶解，然后移入100mL容量瓶中，以蒸馏水定容. 使用时直接取用或根据需要稀释.

亚硝酸钠：0.5‰水溶液，棕色试剂瓶盛放，冰箱中保存. 盐酸：$6mol\cdot dm^{-3}$. 氢氧化钠：30%水溶液.

实验方法　在25mL比色管中，依次加入*L*-色氨酸溶液1.0mL $6mol\cdot dm^{-3}$HCl溶液和0.6mL 0.5‰$NaNO_2$溶液，用水稀释至10mL，摇匀，沸水浴加热30min，冷却后再加入7.5mL 30%NaOH溶液，以水定容，摇匀，放置10min后测其荧光强度. 液池1cm，$\lambda_{ex}=320nm$，$\lambda_{em}=392nm$，同时做试剂空白.

1992年12月21日收到. 修改稿于1993年4月3日收到. 本项目系山东省自然科学基金资助的课题.

结 果 与 讨 论

荧光物质的荧光光谱

取 0.3mL *L*−色氨酸溶液 (0.2mg／mL)，按实验方法操作，扫描荧光光谱，见图 1. 荧光物质的激发和发射波长分别为 320nm 和 392nm.

实验条件的选择

各种试剂的用量 根据实验结果发现，0.5‰$NaNO_2$ 溶液用量在 0.5～0.8mL; 6mol · dm^{-3}HCl 溶液用量在 0.75～1.25mL; 30% NaOH 溶液用量在 7.0～8.0mL 时，体系的荧光强度最大且稳定，故本实验中选用 0.6mL$NaNO_2$ 溶液(0.5‰)，1.0mLHCl 溶液(6mol · dm^{-3})和 7.5mLNaOH 溶液(30%)为试剂最佳用量.

加热时间 在各试剂最佳用量的条件下，改变加热时间，测其荧光强度，发现体系在沸水浴中加热 30min 时，荧光强度最大且稳定.

色氨酸的标准曲线方程 在最佳条件下，得到色氨酸的标准曲线方程为：$\Delta F = 42.68[Try] + 1.214$，相关系数为 0.9996. 色氨酸浓度在 0.2～1.6μg／mL 范围内与荧光强度成直线关系. 在信噪比为 3 时，其检测线为 0.01μg／mL.

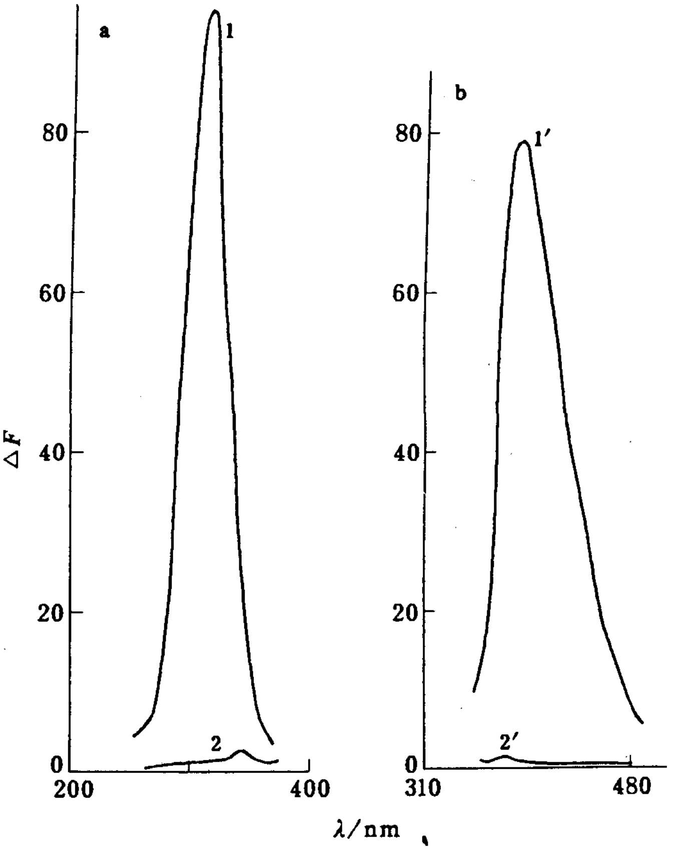


图 1 荧光物质的激发光谱(a)和发射光谱(b)
[Try] = 2.4μg／mL, [NO_2^-] = 16μg／mL;
1, 1′—荧光物质; 2, 2′—试剂空白

共存物质的影响 在 2.4μg／mL 色氨酸存在下，考察了多种物质在同样条件下对测定结果的影响. 相对误差≤5%时，各种共存物质的最大允许量列于表 1. 由表 1 可见酪氨酸干扰严重. 鉴于某些蛋白质样品中色氨酸含量较高，其他氨基酸的存在不足以影响分析结果，因此本方法的选择性可满足分析要求.

表 1 共存物质的最大允许量

共存物质	共存量[μg／(Try)μg]	共存物质	共存量[μg／(Try)μg]
组氨酸	2.7	丝氨酸	2.7
甘氨酸	4	缬氨酸	8.3
谷氨酸	2	半胱氨酸	1.7
赖氨酸	5.5	胱氨酸	1.7
丙氨酸	6.7	葡萄糖	53
天冬氨酸	1.3	酪氨酸	0.3

样品分析

合成样品的分析　合成样品中色氨酸的测定结果列于表 2.

表 2　合成样品中色氨酸的测定

色氨酸的加入量(μg／mL)	外加物质*	色氨酸回收率(%)
6.0	a	100
6.0	b	101
2.4	c	102

*a　—谷氨酸 (2μg／mL)，天冬氨酸 (4μg／mL)，甘氨酸 (3μg／mL)，组氨酸 (0.6μg／mL)；
b　—丝氨酸 (3μg／mL)，丙氨酸 (5μg／mL)，胱氨酸 (1μg／mL)，天冬氨酸 (4μg／mL)，赖氨酸 (5μg／mL)；
c　—半胱氨酸 (1μg／mL)，缬氨酸 (2μg／mL)，葡萄糖 (20μg／mL)．

蛋白质样品中色氨酸的测定　在玻璃试管中加入准确称量的适量样品，再加 10mL 5mol · dm^{-3}NaOH，用酒精喷灯封口后，在 120℃下连续加热 24h. 水解液冷却后，用稍过量的 HCl 酸化，抽滤除去所有不溶物（用水洗涤），将滤液及洗涤液全部转入 25mL 容瓶中，定容，摇匀. 取适量水解液，按实验方法测定，结果列于表 3.

表 3　蛋白质样品中色氨酸的测定结果*

样品	分子量	色氨酸摩尔数／蛋白质摩尔数			
		本法结果	标准偏差	文献值	参考文献
α-酪蛋白	26,000	0.98	0.08	1.1	[4]
胰蛋白酶	23,800	3.16	0.16	3.2	[5]
血红蛋白	64,500	3.92	0.33		

*五次结果平均值.

反应机理的探讨

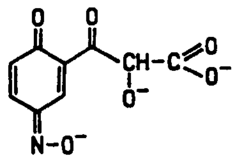
产品的制备　在 250mL 三颈瓶中，加入准确称取的纯色氨酸 1.2g，60mL3mol · dm^{-3}HCl 溶液，边搅拌边滴加 2%$NaNO_2$ 溶液 60mL，然后沸水浴加热回流 2h. 反应冷却后，用 30%NaOH 溶液碱化至强碱性，水浴蒸干，无水乙醇重结晶得产品.

产品结构分析　用 KBr 压片法在 NICOLET−5DX 型红外光谱仪对产物进行红外光谱的测定. 谱图上只显示了少数几个吸收峰. 3130～3030cm^{-1} 处 N—H 伸缩振动消失，说明色氨酸中的氨基与 HNO_2 作用经重氮化发生了水解. 1640cm^{-1} 处的吸收由 C＝O 伸缩振动引起. 1384cm^{-1} 处的吸收表明了 N＝O 伸缩振动存在.

为了进一步确定产物结构，还对它进行了化学分析，结果如下:

(1) 物态: 橙红色带有金属光泽的晶体.

(2) 溶解度: 易溶于水和乙醇，微溶于乙醚，说明极性很强.



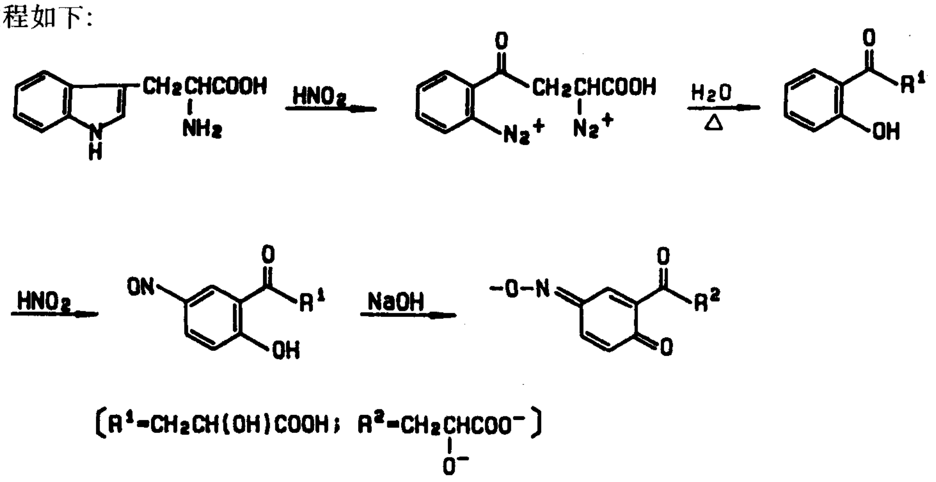
(I)

(3) 官能团检验: 2,4−二硝基苯肼试验显正性结果，说明存在羰基; 饱和溴水试验显正性，说明可能存在醌式或 α, β−不饱和酮结构; $Fe(OH)_2$ 试验显负性，靛酚试验显正性结果，说明产物中有亚硝基而不存在硝基.

根据以上信息，推测荧光物质为(Ⅰ)的结构. 该结构中羟基质子全部被 Na^+置换生成盐，所以 IR 上未出现 O—H 伸缩振动峰. 因共轭效应影响，C＝O 双键减弱，键力常数变

小，因而振动频率降低，发生红移．结构（Ⅰ）也能很好地解释荧光光谱的结果，它的共轭程度大于色氨酸，所以离域 π 电子更易于激发，表现为荧光激发波长（320nm）、发射波长（392nm）比色氨酸相应的波长（287nm，384nm）长，荧光强度增大．

反应机理　根据结构推断荧光反应经过了重氮化、氧化、水解、苯环亲电取代的历程，反应过程如下:



参 考 文 献

[1] Eigiro, K.; Masaaki, K.; Yosuke O., *Anal. Chim. Acta*, **1991**, *248*, 213.

[2] Garcia Borron, J. C.; Escribano, J.; Jimenez, M.; Iborra, J. L., *Anal. Biochem.*, **1982**, *125*, 277.

[3] 刘升一，李耀辉，张炳真，氨基酸杂志，**1990**，*1*，34.

[4] Spande, T. F.; Witkop, B., *"In Methods in Enzymology"*, ed. by Hri, C. H., Academic Press, New York, **1967**, p.498.

[5] Sasaki, T.; Abrams, B.; Horecker, B. L., *Anal. Biochem.*, **1975**, **65**, 396.

Fluorescence Properties of Tryptophan–Nitrous Acid System and Its Application

Jie, Nian–Qin* Yang, Jing–He Meng, Fan–Qin Huang, Mu–Bin

(*Department of Chemistry, Shandong University, Jinan*, 250100)

Abstract

Tryptophan is oxidized by nitrous acid at elevated temperature produce a phenolic intermediate which further reacts with nitrous acid to form a fluorescent species. The fluorescent species has the excitation and emission maxima at 320 and 392nm, respectively. The fluorescent intensity is linear over the range of 0.2～1.6μg / mL tryptophan. The method has been applied to the determination of tryptophan in synthetic and protein samples. A plausible mechanism is proposed to explain this behaviour.