

**NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP ĐỘNG HỌC HUỖNH QUANG
XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI TYROSIN VÀ TRYPTOPHAN
DỰA TRÊN PHẢN ỨNG VỚI PHỨC RUTHENI(II) POLYPYRIDIN**

Đến tòa soạn 21-3-2017

Nguyễn Xuân Trường

Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Phạm Thị Thủy, Nguyễn Thị Ánh Hoàng

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

SUMMARY

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TYROSINE AND TRYPTOPHAN
BY FLUORESCENCE KINETICS OF RUTHENIUM(II) POLYPYRIDYL
COMPLEX**

A fluorescence-kinetic method has been developed and validated for simultaneous determination of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) in protein based on their photoredox reactions with rutheni(II) polypyridine complexes. The proposed method is simple and accurate with a recovery of 99 – 104 %. The detection limit is 2.91×10^{-5} M with a RSD < 3 % (n=6). The results of Tyr and Trp analyses in protein samples using the proposed method and HPLC are identical. Therefore, the fluorescence-kinetic method is applicable to determine Tyr and Trp.

1. MỞ ĐẦU

Tryptophan là một trong 8 amino axit thiết yếu. Nó là tiền chất của serotonin, một chất dẫn truyền thần kinh trong não, giúp xử lý thông tin khi ngủ, có vai trò điều hòa giấc ngủ, giúp cơ thể có cảm giác thư giãn. Đồng thời, tryptophan được gan chuyển hóa thành niacin (vitamin B3) để tạo thành các coenzym tham gia vào quá trình giải phóng năng lượng từ thực phẩm [1,2].

Tyrosin là một trong 12 amino axit không thiết yếu nhưng rất cần thiết cho cơ thể. Nó là nguyên liệu cho quá trình tổng hợp một số chất dẫn truyền thần kinh (adrenalin, dopamin,...) trong não bộ, giúp cho quá trình truyền thông tin liên lạc giữa các tế bào thần kinh tác động đến tâm trạng của con người [1,2,6,7]. Đồng thời Tyrosin ảnh hưởng đến các hoạt động của tuyến thượng thận, tuyến giáp và tuyến yên, giữ

nhiệm vụ sản xuất và điều chỉnh các nội tiết tố. Tryptophan và tyrosin thường được bổ sung vào cơ thể từ những loại thực phẩm như sữa, phô mai, trứng, đậu nành [2]...

Định lượng axit amin rất quan trọng trong các nghiên cứu phân tích đánh giá thành phần dinh dưỡng của thực phẩm. Định lượng một số axit amin như Tyrosin, Tryptophan,... cũng rất quan trọng trong y sinh học khi nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng các tiền chất tham gia trong quá trình sinh tổng hợp và trong quá trình trao đổi chất ở cơ thể sống. Tryptophan và tyrosin có thể được xác định bằng phương pháp quang phổ đo quang [8,9] và phổ biến hơn là phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang (HPLC/FLD) [3,10,11]. Tuy nhiên, mỗi phương pháp đều có những hạn chế riêng. Chẳng hạn như với HPLC/FLD, thường phải tạo dẫn xuất axit amin để tăng độ nhạy của phép phân tích. Việc tạo dẫn xuất phải trải qua nhiều bước để cho hợp chất huỳnh quang ổn định, tách tốt và có độ lặp lại cao. Nói chung, phương pháp truyền thống trên có nhược điểm là tốn thời gian để chuẩn bị mẫu và đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu phương pháp động học huỳnh quang để định lượng đồng thời amino axit tyrosin và tryptophan dựa trên phản ứng với phức rutheni(II) polypyridin. Phương pháp phân tích này có ưu điểm là đơn giản, chính xác và tiết kiệm thời gian. Phức chất nhạy sáng rutheni(II) polypyridin được dùng làm đầu dò huỳnh quang xác định tyrosin và tryptophan do khả năng tương tác chọn lọc của nó với amino axit thông qua phản ứng cho – nhận electron (phản ứng quang oxi hóa – khử) [4,12,13].

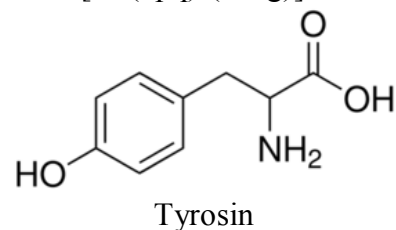
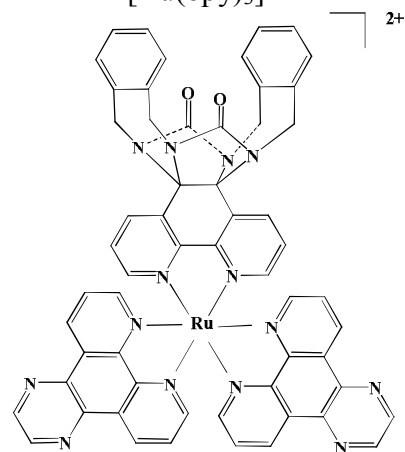
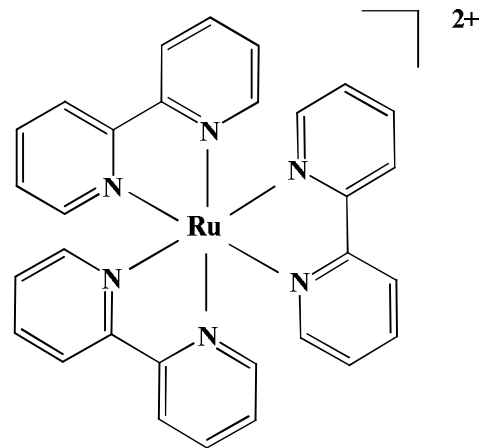
2. THỰC NGHIỆM

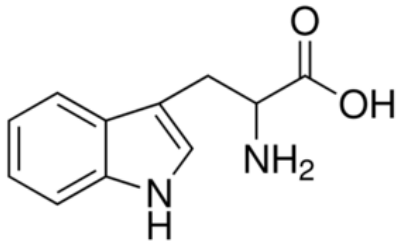
2.1. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất: tyrosin, tryptophan, casein,

albumin từ huyết thanh bò (BSA), NaOH, NaCl (Sigma-Aldrich). Phức rutheni(II) polypyridin gồm: $Ru[(bpy)_3]Cl_2$ (Sigma-Aldrich) và $[Ru(dpq)_2(bxbg)]Cl_2$ [4]; với bpy = bipyridin, dpq = dipyrido[3,2-d:2,3-f]quinoxalin, bxbg = bis(o-xylene)bipyridin glycoluril.

Thiết bị: Máy quang phổ UV-Vis Agilent 8453. Hệ thiết bị huỳnh quang phân tử phân giải thời gian – Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.





Tryptophan

Hình 1: Công thức cấu tạo của phức rutheni(II) polypyridin và amino axit

2.2. Thục nghiệm

Mẫu đo được chuẩn bị từ các dung dịch gốc tương ứng. Dung dịch mẫu sau đó được chuyển sang cuvet huỳnh quang và tiến hành sục khí Ar trong vòng 10 min để đuổi hết O₂ hòa tan. Tốc độ sục khí 10 ml/min. Dung dịch pH 12 với lực ion I = 0,05 M được pha từ NaOH tinh thể và thêm NaCl.

2.3. Xác định thời gian tồn tại của phức chất ở trạng thái kích thích

Phức ở trạng thái kích thích phân hủy theo phương trình động học bậc nhất:

$$I_t = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

Trong đó:

I_0 và I_t là cường độ phát xạ huỳnh quang của phức chất ở trạng thái kích thích thời điểm $t = 0$ và sau thời gian t .

τ : thời gian tồn tại hay thời gian “sống” (lifetime) của phức chất ở trạng thái kích thích trong dung dịch nghiên cứu.

Từ dữ liệu thực nghiệm ghi phổ phát xạ phân tử phân giải thời gian của phức chất và phương trình (1), sử dụng phần mềm xử lý số liệu Origin 9© để xác định τ .

2.4. Xác định hằng số tốc độ phản ứng quang oxi hóa-khử (k_q) giữa phức chất và axit amin

Hằng số tốc độ phản ứng quang oxi hóa-khử (k_q) được xác định theo phương trình Stern-Volmer [14]:

$$\tau^0/\tau - 1 = k_q \tau_0 [AA] \quad (2)$$

Trong đó:

τ_0 và τ tương ứng là thời gian sống của phức chất ở trạng thái kích thích trong dung dịch nghiên cứu không có và có amino axit;

[AA]: nồng độ axit amin trong dung dịch.

Giá trị k_q được tính từ hệ số góc của đường thẳng biểu diễn mối quan hệ giữa đại lượng $\tau^0/\tau - 1$ và [AA].

2.5. Tính toán nồng độ Tyrosin và Tryptophan

2.5.1. Tính nồng độ Tyrosin

[Tyr] trong mẫu nghiên cứu được xác định dựa trên phản ứng của tyrosin với phức [Ru(bpy)₃]Cl₂ theo phương trình (3).

$$\frac{\tau_{01}}{\tau_1} - 1 = k_{q1} \times \tau_{01} \times [Tyr] \quad (3)$$

Trong đó,

τ_{01} , τ_1 : thời gian sống của phức [Ru(bpy)₃]Cl₂ trong dung dịch mẫu trắng và dung dịch mẫu nghiên cứu tương ứng;

k_{q1} : hằng số tốc độ phản ứng của tyrosin với phức [Ru(bpy)₃]Cl₂.

2.5.2. Tính nồng độ Tryptophan

Phức [Ru(dpq)₂(bxbg)]Cl₂ phản ứng với cả tyrosin và tryptophan trong mẫu nghiên cứu. Từ phương trình (4) và với [Tyr] đã biết, tính được [Trp].

$$\frac{\tau_{02}}{\tau_2} - 1 = k_{q2} \times \tau_{02} \times [Tyr] + k_{q3} \times \tau_{02} \times [Trp] \quad (4)$$

Trong đó,

τ_{02} , τ_2 : thời gian sống của phức [Ru(dpq)₂(bxbg)]Cl₂ trong dung dịch

mẫu trắng và dung dịch mẫu nghiên cứu;

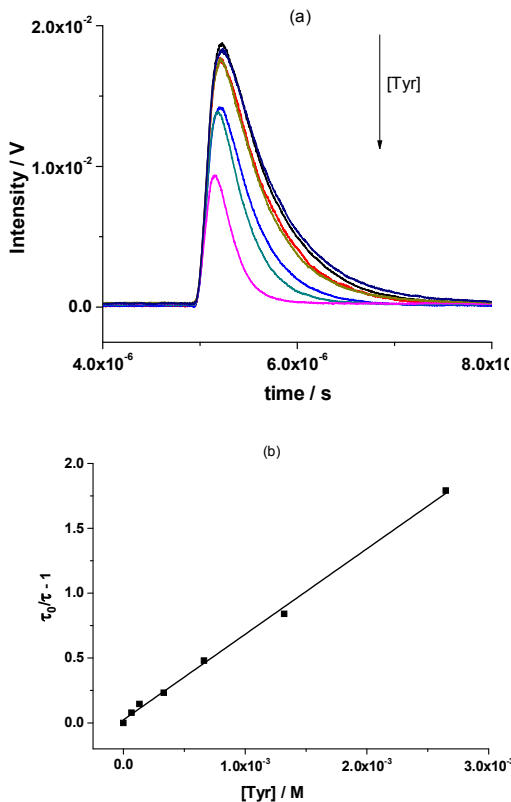
k_{q2} : hằng số tốc độ phản ứng của tyrosin với phức $[Ru(dpq)_2(bxbg)]Cl_2$;

k_{q3} : hằng số tốc độ phản ứng của tryptophan với phức $[Ru(dpq)_2(bxbg)]Cl_2$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thẩm định phương pháp phân tích

Giá trị sử dụng của phương pháp được đánh giá qua phản ứng quang oxi hóa – khử giữa phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ và tyrosin. Phổ phát xạ phân tử phân giải thời gian của phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ trong dung dịch với nồng độ tyrosin tăng dần và biểu diễn Stern-Volmer được chỉ ra ở hình 2.



Hình 2: (a) Phổ phát xạ phân tử phân giải thời gian của phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ trong dung dịch với nồng độ tyrosin tăng dần, $\lambda_{ex} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$; (b) biểu diễn Stern-Volmer.

Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và khoảng nồng độ tuyến tính phân tích Tyr theo phương pháp động học huỳnh quang được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Phương trình đường chuẩn, LOD, LOQ và khoảng tuyến tính phân tích Tyr dựa trên phản ứng với phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$

Phương trình đường chuẩn	$Y = 659,63X + 0,024^a$
Hệ số tương quan (R^2)	0,997
LOD (M)	$2,91 \times 10^{-5}$
LOQ (M)	$9,71 \times 10^{-5}$
Khoảng tuyến tính (M)	$1,04 \times 10^{-4} - 2,65 \times 10^{-3}$
$^a Y = \dots - 1; X: [Tyr] \text{ (M)}$	

Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp phân tích - bảng 3 cho thấy, tại các nồng độ khảo sát, độ lặp lại của phép thử tốt với độ lệch chuẩn tương đối $RSD < 3 \%$ ($n = 6$).

Bảng 3: Độ lặp lại ($n=6$) của phương pháp phân tích Tyr dựa trên phản ứng với phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$

Nồng độ khảo sát (M)	$2,10 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-3}$	$1,72 \times 10^{-3}$
Độ lệch chuẩn (M)	$5,89 \times 10^{-6}$	$1,75 \times 10^{-5}$	$4,09 \times 10^{-5}$
Độ lệch chuẩn tương đối (%)	2,8	1,7	2,4

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá thông qua độ thu hồi (R %). Kết quả thu được chỉ ra ở bảng 4 với R đạt 99,1 % – 103,6 %. Như vậy, kết quả đánh giá độ lặp lại và độ đúng của phương pháp cho thấy rằng phương pháp phân tích có độ chính xác cao theo quy định của AOAC (hội phân tích hóa học) [5].

Bảng 4: Độ đúng của phương pháp phân tích Tyr dựa trên phản ứng với phức $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ ($n = 6$)

Nồng độ khảo sát (M)	$3,31 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-3}$	$1,99 \times 10^{-3}$
Độ lệch chuẩn (M)	$8,90 \times 10^{-6}$	$1,75 \times 10^{-5}$	$2,88 \times 10^{-5}$
Độ thu hồi (%)	103,6	99,1	100,2

Bảng 5 chỉ ra kết quả xác định các giá trị k_q của phản ứng giữa phức rutheni(II) polypyridin và axit amin tương ứng.

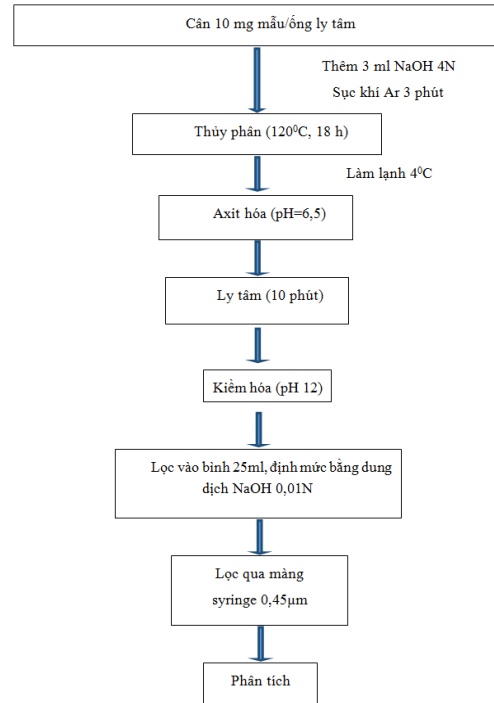
Bảng 5: Hằng số tốc độ phản ứng quang oxi hóa – khử

Phức và amino axit		$10^{-9} \times k_q$ ($M^{-1}s^{-1}$)
$[Ru(bpy)_3]Cl_2 + Tyr$	k_{q1}	$1,10 \pm 0,02$
$[Ru(dpq)_2(bxhg)]Cl_2 + Tyr$	k_{q2}	$1,99 \pm 0,07$
$[Ru(dpq)_2(bxhg)]Cl_2 + Trp$	k_{q3}	$0,54 \pm 0,02$

3.2. Phân tích định lượng tyrosin và tryptophan trong mẫu protein

3.2.1. Xử lý mẫu

Sau khi khảo sát thể tích NaOH cần dùng, nhiệt độ và thời gian thủy phân, mẫu protein phân tích được chuẩn bị theo quy trình như sau: cân ~ 10 mg mẫu trên cân phân tích, chuyển mẫu vào bình thủy phân. Thêm 3 ml dung dịch NaOH 4N và tiến hành sục khí Ar trong 3 phút với tốc độ 10 ml/phút. Mẫu được thủy phân ở 120°C trong 18 giờ. Sau đó lấy mẫu và thực hiện các bước tiếp theo như sơ đồ ở hình 3.



Hình 3: Sơ đồ quy trình xử lý mẫu protein phân tích tyrosin và tryptophan

3.2.2. Kết quả phân tích

Kết quả phân tích hàm lượng tyrosin và tryptophan trong mẫu protein theo phương pháp động học huỳnh quang và phương pháp so sánh HPLC được trình bày ở bảng 6. Nhận thấy, hai phương pháp phân tích cho kết quả tương đồng. Như vậy, quy trình phân tích đồng thời tyrosin và tryptophan bằng phương pháp động học huỳnh quang là đáng tin cậy.

Bảng 6: Kết quả phân tích Tyrosin và Tryptophan trong mẫu protein

Protein	Chỉ tiêu	Phương pháp phân tích	
		Động học huỳnh quang (mg/100ml)	HPLC ^a (mg/100ml)
Casein	Tyr	$2,05 \pm 0,11$	2,00
	Trp	$0,22 \pm 0,08$	0,22
Albumin huyết thanh bò (BSA)	Tyr	$3,40 \pm 0,63$	3,47
	Trp	$0,46 \pm 0,14$	0,40

^a Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc Gia

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình phân tích đồng thời tyrosin và tryptophan dựa trên phản ứng với phức chất rutheni(II) polypyridin theo phương pháp động học huỳnh quang. Phương pháp phân tích có độ chính xác cao với hiệu suất thu hồi đạt ~ 99 – 104 %. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $2,91 \times 10^{-5}$ M với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 3 % (n = 6). Phương pháp phân tích cho kết quả tương đồng với phương pháp đối chiếu HPLC. Như vậy cùng với phương pháp HPLC truyền thống, hoàn toàn có thể sử dụng phương pháp động học huỳnh quang để định lượng tyrosin và tryptophan.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài 13/2014/HĐ-NĐT – Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng (2007), *Hóa sinh học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
- [2] Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Ngô Hữu hợp (1994), *Hóa học thực phẩm*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [3] Lê Thị Hồng Hào, Phạm Luận, Nguyễn Xuân Trung (2006), *Ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với dẫn xuất trước cột AQC để tách và xác định đồng thời 17 axit amin trong cá*, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, tập 11, số 4, trang 15-23.
- [4] Hoàng Thị Thuận, Trần Quang Tùng, Nguyễn Xuân Trường (2016), *Tổng hợp phức chất ruthenium(II) polypyridyl ứng dụng làm đầu dò huỳnh quang phát hiện một số phân tử sinh học*, Tạp chí Phân tích Hóa-Lý và Sinh học, 21 (2), 112-119.
- [5] Trần Cao Sơn (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [6] Lieberman HR, Corkin S, Spring BJ, Wurtman RJ, Growdon JH (1985), *The effects of dietary neurotransmitter*

precursors on human behavior". Am J Clin Nutr. 42 (2): 366–370.

[7] Magill RA, Waters WF, Bray GA, Volaufova J, Smith SR, Lieberman HR, McNevin N, Ryan DH (2003), *Effects of tyrosine, phentermine, caffeine D-amphetamine, and placebo on cognitive and motor performance deficits during sleep deprivation*, Nutritional Neuroscience, 6 (4): 237–46.

[8] Luigi Servillo, Giovanni Colonna, Ciro Balestrieri, Raffaele Ragone, Gaetano Irace (1982), *Simultaneous determination of tyrosine and tryptophan residues in proteins by second-derivative spectroscopy*, Analytical Biochemistry, 126, 251-257.

[9] J. Chrastil (1986), *Spectrophotometric determination of Tryptophan and Tyrosine in peptides and proteins based on new color reactions*, Analytical Biochemistry, 158, 443-446.

[10] Susana Maria Halpine (2006), *Amino acids analysis by HPLC*, Encyclopedia of Chromatography.

[11] Rita Steed (2010), *Analysis of Amino acids by HPLC*, Agilent Technologies, Inc.

[12] Truong X. Nguyen, Stephan Landgraf, Guenter Grampp (2017), *Kinetics of photoinduced electron transfer reactions of ruthenium(II) complexes and phenols, tyrosine, N-acetyl-tyrosine and tryptophan in aqueous solutions measured with modulated fluorescence spectroscopy*, J Photochem Photobiol B., 116, 28-34.

[13] Lo, K.K.-W., A.W.-T. Choi, and W.H.-T. Law (2012), *Applications of luminescent inorganic and organometallic transition metal complexes as biomolecular and cellular probes*, Dalton Trans., 41, p. 6021-6047.

[14] Joseph R. Lakowicz (2006), *Principle of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer.