

# 混合氨基酸中甘氨酸的高效液相色谱分析方法

智月洁 邱广林 王笑 韦广丰 刘亚龙(安道麦辉丰(江苏)有限公司, 江苏 盐城 224000)

**摘要:**建立高效液相色谱分析法测定混合氨基酸中甘氨酸的分析方法。使用 Zorbax XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6×150mm, 5micron) 和 DAD 检测器 (360nm), 以 0.04M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7.2) 缓冲液 -55% 乙腈水为流动相, 流速 1.0mL/min 的情况下, 筛选了流动相梯度、2,4-二硝基氟苯用量、衍生温度和时间、柱温, 测定了线性关系和回收率。实验结果表明利用 FDBN 衍生法分析检测甘氨酸含量时最适的条件为: 1%FDBN 用量为 3.0g, 衍生温度 60℃, 衍生时间 60min, 柱温 40℃, 该分析方法的精密度和准确度令人满意, 可应用于甘氨酸含量的分析检测。

**关键词:** 高效液相色谱; 2,4-二硝基氟苯; 甘氨酸

## 1 引言

在高效液相色谱法分析游离氨基酸方便, 2,4-二硝基氟苯 (FDBN) 衍生法是一种常用的实验室分析方法<sup>[1]</sup>。甘氨酸又名氨基乙酸, 是一种非必须氨基酸, 用于制药工业、生化试验及有机合成, 是氨基酸系列中结构最为简单, 人体非必需的一种氨基酸, 在分子中同时具有酸性和碱性官能团, 在水中可电离, 具有很强的亲水性, 通过水溶液酸碱性的调节可以使甘氨酸呈现不同的分子形态。

实验人员在 2,4-二硝基氟苯柱前衍生, HPLC 测定甘氨酸 (GLY) 方面已做了一些的工作<sup>[2]</sup>。流动相梯度、衍生剂用量、柱温等条件对 GLY 的分离度和相应关系有一定影响<sup>[3]</sup>。

## 2 室验部分

### 2.1 仪器与试剂

Agilent LC 1260 高效液相色谱仪 (DAD 检测器)。

FDBN 为大连物化所生产, 乙腈 (色谱级), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (分析纯), NaHCO<sub>3</sub> (分析纯), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (分析纯), 纯水 (屈臣氏纯净水)。

### 2.2 实验条件

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (4.6×150mm, 5micron)。

流动相: A: 0.04M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7.2) 缓冲液 (分别称取 5.44g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 7.13g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 加入 1L 水中, 搅拌, 使其充分溶解); B: 55% 乙腈水。

流速: 1.0mL/min; 检测波长 360nm; 进样量 10μL。(其他条件见试验条件)。

#### 2.2.2 试验条件

试验样品: 160μg/mL GLY (纯度 99%)。

变化不同衍生试剂用量、加热时间、加热温度, 筛选最佳条件。

衍生温度分别为: 50℃、60℃、70℃、80℃。

衍生加热时间: 30min、60min、90min。

流动相梯度分别见表 1。

表 1 流动相梯度

时间	(1)		(2)		(3)		(4)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
0.0	100	0	84	16	88	12	86	14
2.0			88	12	88	12	88	12
4.0	86	14	86	14	86	14	86	14
10.0	60	40	70	30	70	30	70	30

20.0	20	80	30	70	30	70	30	70
21.0							10	90
24.0	0	100	0	100	0	100	0	100

## 3 结果与分析

### 3.1 检测波长的选择

通过对 GLY 标准溶液在 190~400nm 波长范围内做 DAD 全波长扫描, 发现此溶液在 360nm 处有最大吸收, 且杂质及其空白试剂在此波长处吸收很小, 所以选定 360nm 为检测波长。

### 3.2 流动相的选择

在 Zorbax XDB-C<sub>18</sub> 柱色谱柱上比较用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH=7.0)、乙腈 - 水做流动相, 在筛选最佳流动相时, 柱温为 40℃, 试剂用量为 10μL, 按不同流动相梯度对 GLY 和衍生剂做分离度比较, 发现分离度最好的是④流动相梯度, ①次之; ②一般; ③最差; 所以总体分析, ④流动相梯度较好 (见图 1)。

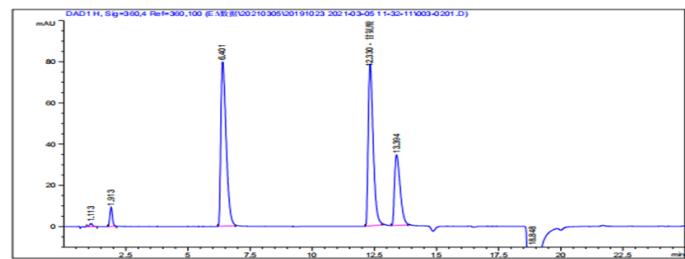


图 1 40℃, ④流动相 GLY 标准样品

### 3.3 衍生剂用量及其衍生温度和时间的选择

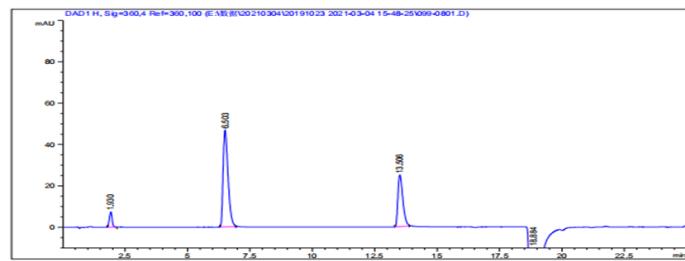


图 2 空白衍生剂

在筛选最佳衍生剂用量时, 流动相为①, 柱温 40℃, 分别在 4 组不同加热条件下, 分别衍生加热不同时间, 确定最佳的衍生剂溶液 (见图 2) 比较加入不同量的衍生剂的量观察是否将 GLY 甘氨酸完全衍生。实验表明, 在同一浓度的 GLY 样品中, 分别加入 1.0g、1.5g、2.0g、2.5g、3.0g、3.5g 的 0.1%FDBN, 在衍生温度 60℃, 加热 60min 时, 3.0g 和 3.5g 的峰响应值几乎不变, 由此可得出最佳衍生条件。

(下转第 136 页)

化，对一些常规不动管柱井下作业提供可靠依据。

### 3 结束语

可视化井下电视设备无论是镜头材质、光源渗透性、视频图像信号传输、井下密闭性、耐高温高压等方面都有成熟可借鉴可实现的技术支持，井下组成部分包含摄像密封防护单元、信号传输单元，井上部分分为供电单元、视频图像采集处理单元，对于井下摄像头，包括大小、材质、角度、分辨率、照明亮度、渗透性等不能技术指标的不断优化，对于油气田的开发成产过程能起到良好效果，对提高采收率，检修井别有很好的参考价值，避免免费时费财的大修等作业。同时对于设备本身，材质、技术参数等也有较为严苛的要求，对于产品设计，用材正确也是一种考验，对于更加复杂的油气田，例如：气井、注水井、高含水油井等，可以直观检测吸入流出，观测杂质分布，寻找井下落物准确位置，为打捞提供可视化依据，延伸到不同领域，例如：地质勘探中观测地质特征构造、煤矿观测厚度裂缝倾角煤层开采、地下管道观测断裂长度宽度走向等领域都

(上接第134页)元的智能控制带来的好处和存在的风险，综合判断是否将其纳入信息管理智能控制。

### 2.3 运营管理平台主要功能

运营管理平台针对农村污水的实际运营需求，应包含针对污水处理站的站点管理，包括站点基本信息、站点位置、站点设计处理量、站点设计水质目标等；针对运营人员的人力管理，包括人员名称、工号、工种、联系方式、负责的站点等；针对站内设备的管理，包括设备名称、设备编号、设备类型、厂家、重点参数等；以及针对站点内日常运营事务的管理，包括工单名称、工单类型、工单流程、工单责任人等。其中，针对站点内日常运营事务的管理是业务运营管理平台的核心流程，是站点在无人化管理的情况下，能够保障事务得到高效执行的重要手段。平台以工单为单位对运营事务进行管理，以工单的流程化处理来约

束事务的有效执行，以工单各环节信息的标准化管理保障事务内容的全面和可追溯。

### 3 结语

展开化工废水处理工作，不仅能够保护生态环境，还能提高资源的利用效率，促使化工行业与社会经济保持可持续发展。在今后的发展中，需要高度重视化工废水处理研究工作，使用高效的化工废水处理技术，保护生态环境，可以通过物理方法、化学方法、生物法、物理化学法等，降解、去除、净化废水中的有毒有害物质。

### 参考文献：

- [1] 马京杰,李海亮,马相波.井下摄像系统的研制及应用[J].地震地磁观测与研究,2011,32(2):67-69.
- [2] 刘祥.井下摄像测试技术研究与应用[J].中国石油和化工标准与质量,2016,36(23):113-115.
- [3] 郭嗣杰,孟刚,蔡晓波.井下电视技术的发展和应用[J].舰船防化,2010(3):6-9.

(上接第133页)

### 3.4 线性关系的测定

准备称取 GLY50mg 与 50mL 容量瓶中，加纯水定容，摇匀备用，作为标准储备液，分别准确吸取标准储备液 0.10mL、0.20mL、0.30mL、0.40mL、0.50mL 与 10mL 容量瓶中，再依次加入 3.0gFDBN (1%)，1.0gNaHCO<sub>3</sub> (50g/L) 和 1.0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01M)，最后用乙腈定容，摇匀。按上述液相色谱条件分析，根据峰面积 Y 对质量浓度 X 做标准曲线。经检测，GLY 在质量浓度在 0.008mg/mL~0.040mg/m<sup>3</sup> 呈线性关系，回归方程为  $y=18116x+18.79$  ( $R^2=0.998$ )，由此可见，该方法有较好的准确度。具体数据见表 2。

表 2 GLY 的 HPLC 线性范围实验数据表

浓度 (mg/mL)	0.0082	0.0164	0.0245	0.0327	0.0409
峰面积	162.9	313.0	480.5	600.1	760.3

### 3.5 精密度实验

准确称取一个浓度的 GLY 标准溶液，平行测定 6 次，

峰面积分别是 600.3、604.0、599.7、601.6、597.9、602.3，平均值是 600.97。测得该峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 0.63%，明显小于 2%，由此可见该方法具有较高的精密度。

### 参考文献：

- [1] 张宏杰,周建军,李新生,等.2,4-二硝基氟苯衍生法测定游离氨基酸方法的优化[J].氨基酸和生物资源,2000,22(4):59-62.
- [2] 商振华,于亿年.反高效液相色谱紫外吸收法测定灵芝中氨基酸的含量[J].药物分析杂志,1994,14(4):30-32.
- [3] 陈娅东,付宜和.十八种氨基酸注射液的 HPLC 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法含量测定[J].药物分析杂志,1990,10(3):149-151.

### 作者简介：

智月洁 (1992-)，女，汉族，江苏盐城人，学士，助理工程师，主要从事工艺研发分析和分析方法开发。