

研究简报

## 高效液相色谱分析 L-瓜氨酸的研究

牟 昶 袁其朋\* 翁南梅 东惠茹  
(北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

**摘 要:** 文中建立了 L-瓜氨酸的 HPLC 检测方法, 实验应用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)柱前衍生化法将 L-瓜氨酸衍生后在 HPLC 上进行定量分析, 探讨和优化了 L-瓜氨酸的 HPLC 分析色谱条件。研究结果表明, L-瓜氨酸样品检测线性范围为 2~10  $\mu\text{g}$ , 相关因数  $r=0.9990$ , 精密密度为 1.7%。该方法灵敏, 重复性好, 结果准确, 分析迅速, 能有有效的指导 L-瓜氨酸的发酵生产。

**关键词:** L-瓜氨酸; 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法; 高效液相色谱  
**中图分类号:** O652.63

L-瓜氨酸, 又名氨基甲酰鸟氨酸, 是一种非蛋白质氨基酸, 近年来国外的众多研究表明, L-瓜氨酸具有很多重要的生理功能, 如清除自由基, 异体排斥效应指示剂, 血管舒张作用, 稳定血压以及治疗风湿关节炎, 抗氧化等<sup>[1-5]</sup>, 应用前景十分广阔。

由于 L-瓜氨酸无紫外吸收和荧光发射特性, 因此要提高 L-瓜氨酸分析检测的灵敏度和分离选择特性, 通常将 L-瓜氨酸衍生后进行定量分析。实验用发酵法制得 L-瓜氨酸, 采用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)柱前衍生化法<sup>[6]</sup>, 将 L-瓜氨酸衍生后用 HPLC 进行定量分析。该方法快速、准确、操作简便、结果具有良好的线性和准确度, 衍生化反应彻底, 衍生产物 DNP-瓜氨酸稳定, 过量的 DNFB 对 L-瓜氨酸定量测定无干扰, 分析周期短, 适用范围广。这一分析方法能对发酵法工业生产 L-瓜氨酸起到指导性作用。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

日本日立高效液相色谱仪, HITACHI L-7100, HITACHI L-7300 柱温箱, HITACHI 公司 L-7420 UV-VIS 检测器, T2000 色谱工作站, SARTORIUS 公司 0.00001 g 精密天平。

收稿日期: 2003-11-16

第一作者: 女, 1978 年生, 硕士生

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

\* 通讯联系人

**试剂** 乙腈为色谱纯; NaAc、HAc、N,N-二甲基甲酰胺、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  均为分析纯; 二硝基氟苯, 超纯水; L-瓜氨酸标准品(购自美国 Sigma 公司)。

#### 1.2 衍生化试剂的配制

**$\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液的配制** 准确称取  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和  $\text{NaHCO}_3$ , 配制 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 0.5 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液, 用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调  $\text{NaHCO}_3$  的 pH 值为 9.0, 即制得  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液。

**2,4-二硝基氟苯-乙腈溶液的配制** 准确量取 2,4-二硝基氟苯溶于乙腈, 制得体积分数 1% 的 2,4-二硝基氟苯-乙腈溶液。

**$\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液的配制** 准确称取  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 配制 0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和 0.1 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液, 互调至 pH 值为 7.0, 即制得  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液。

#### 1.3 衍生化方法

精确称取 L-瓜氨酸标准品, 用去离子水溶解并定容。准确吸取配好的标准品 1 mL, 放入 10 mL 的棕色容量瓶中(因为衍生物见光易分解), 加入配制好的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液 1 mL, 再加入 1 mL 的 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液后摇匀, 60  $^\circ\text{C}$  水浴加热 1 h 后, 用  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液定容。

发酵液衍生化方法与标准品基本相同, 只是将 1 mL 的标准品换为 1 mL 离心后的发酵液。

#### 1.4 分析方法

使用 Diamonsil<sup>TM</sup> C-18 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6

mm),流动相 A 为乙腈-水,流动相 B 为 1 % N,N-二甲基甲酰胺的 0.05 mol/L NaAc 和 HAc 缓冲溶液,进样量 5  $\mu$ L。为了有效的分离 L-瓜氨酸和发酵产生的杂蛋白,实验采用梯度洗脱,流动相 A 和 B 的体积比为:初始 A 与 B 的体积比为 25 75;10 min 后 A 与 B 的体积比为 60 40;13 min 时 A 与 B 的体积比增至 95 5;17 min 时 A 与 B 的体积比还原为 25 75;20 min 洗脱结束。

2 结果与讨论

2.1 分析方法的线性相关性

精密称取 0.020 90 g L-瓜氨酸标准品,配制成质量浓度为 2.09 g/L 的溶液,然后衍生化。精密进样 2.09,4.18,6.27,8.36,10.45  $\mu$ g,梯度洗脱。以峰面积积分值为纵坐标,进样质量为横坐标进行线性相关分析。实验表明,不同仪器、色谱柱对进样量大小的要求是有差别的。如果进样量很少,则组分峰面积过小,仪器噪声干扰明显,测定偏差会超出合理范围。实验结果显示进样量在 2 ~ 10  $\mu$ g 范围内与峰面积呈较好的线性关系,回归方程及相关因数为: $y = 594\,618x + 66\,758$ , $r = 0.999\,0$ 。

2.2 分析方法精密度考察

同一样品定量平行进样 5 次,测得样品的相对标准偏差为 1.7 %。表明实验方法有较好的精密度。

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 紫外波长对 L-瓜氨酸检测的影响 为了找到最大吸收波长,实验调节检测波长为 340 nm,350 nm,360 nm,370 nm 和 380 nm,结果见表 1。

表 1 紫外波长对 L-瓜氨酸检测的影响

Table 1 Effect of ultraviolet wavelength on L-citrulline

波长/nm	峰面积/(min·mV)
340	4 136 272
350	5 431 662
360	6 125 718
370	5 666 399
380	4 893 373

由表 1 可以看出在波长为 360 nm 时,得到 L-瓜氨酸衍生物的最大吸收峰。

2.3.2 柱温对 L-瓜氨酸检测的影响 柱温对样品组分分离的影响相对于其他因素而言比较小。然而,改变柱温也是优化组分分离的方法之一。实验

考察了柱温对分析效果的影响,实验结果如表 2 所示。

表 2 不同柱温下 L-瓜氨酸的测定结果

Table 2 Analysis results under different column temperatures

柱温/	保留时间/min	峰面积/(min·mV)
30.0	7.586	6 125 718
35.0	7.415	6 110 671
40.0	7.077	5 856 453

可以看出,随柱温的升高组分的保留时间略有前移,峰面积减少、柱压降低。由于高柱温对色谱柱使用寿命不利,因此,实验选择 30 为最适温度。

2.3.3 流速对 L-瓜氨酸检测的影响 改变流速会对柱效及柱压产生影响,同时也会影响样品组分的分离度。选择 0.8,1.0,1.2 mL/min 流量检测样品,结果见表 3。

表 3 流动相的流速对检测 L-瓜氨酸的影响

Table 3 Analysis results under different flow rates of mobile phase

流量/(mL/min)	保留时间/min	峰面积/(min·mV)
0.8	9.120	7 696 110
1.0	7.586	6 125 718
1.2	6.507	5 091 215

流量增加,保留时间缩短,柱压随之加大,样品的分离度降低。综合考虑保留时间相对短,柱压适中,分离度良好等因素,采用流量 1.0 mL/min 比较合适。

2.3.4 流动相比对 L-瓜氨酸检测的影响 在 L-瓜氨酸的柱前衍生化中,选用乙腈的水溶液和 NaAc 和 HAc 缓冲溶液为流动相,调整乙腈-水的配比,对样品组分保留时间及样品的分离度有一定影响。考察乙腈-水体积比为 62.5 37.5,75 25,82.5 17.5,结果见表 4。

表 4 流动相比对 L-瓜氨酸检测的影响

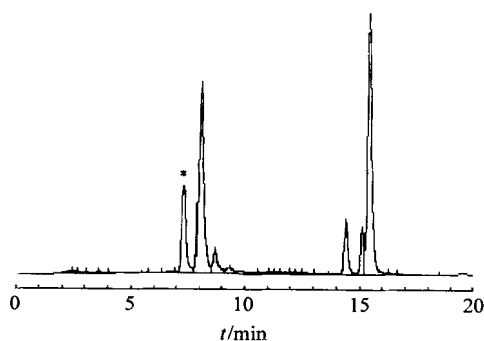
Table 4 Effect of different proportions of mobile phase on L-citrulline

乙腈-水体积比	保留时间/min	峰面积/(min·mV)
62.5 37.5	8.541	6 041 731
75.0 25.0	7.586	6 125 718
82.5 17.5	7.390	6 316 847

随有机相的增加组分保留时间明显减少,柱压随着有机相的增加而减少,当乙腈-水的体积比为 62.5 37.5 时,组分分离度不好,且保留时间有所增加,体积比为 82.5 17.5 时,出峰虽然很快,分离度也较好,但考虑到流动相 B 为盐,在高浓度的乙腈溶液中,盐有可能析出,会影响到柱子的寿命及样品的分离。体积比为 75 25 时,出峰时间较短,峰分离度较好,峰形也较好。因此,选择乙腈-水体积比为 75 25 较为适宜。

#### 2.4 样品的 HPLC 检测

依最优的色谱条件检测样品,色谱图见图 1。



\*L-瓜氨酸    L-citrulline

图 1 L-瓜氨酸的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of L-citrulline

### 3 结 论

实验得到了定量检测 L-瓜氨酸的 HPLC 方法,

并且通过对 L-瓜氨酸的 HPLC 分析研究,优化得到了高效液相色谱柱测定 L-瓜氨酸的色谱条件,即检测波长 360 nm,柱温 30 °C,流动相 A 为乙腈-水(75 25),流动相 B 为 1% N,N-二甲基甲酰胺的 0.05 mol/L NaAc 和 HAc 缓冲溶液,流速 1 mL/min。同时,实验也验证了 HPLC 法检测 L-瓜氨酸灵敏可靠,分析迅速,准确性高。

#### 参 考 文 献

- [1] Kinya Akashi, Chikahiro Miyake, Akiho Yokota. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger[J]. FEBS Letters, 2001, 508(3): 438
- [2] Peter A Pappas. Presentation and outcomes for organ donation in patients with cerebral gunshot wounds[J]. Clinical Transplantation, 2001, 72(7): 1212
- [3] Santhanam A V Raghavan, Madhu Dikshit. L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings[J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 431 (1): 61
- [4] Marx Stephen, Vedernikov Yuri, Saade George R. Compose CCP in artificial method [J]. J Pharmacology, 2000, 130: 713
- [5] 曾晓峰. 关节炎与基因治疗[J]. 中华风湿病学杂志, 2001, 15(5): 281
- [6] 陈娅兰,付宜和,王国林,等. 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

## High performance liquid chromatographic analysis of L-citrulline

Mu Yi Yuan Qi-peng Weng Nan-mei Dong Hui-ru

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** A HPLC method for analyzing L-citrulline was established and the HPLC chromatographic conditions such as the ultraviolet wavelength, column temperature, flow rate and proportion of the mobile phase were optimized. The linear relationship is very good ( $r=0.9990$ ) within the range of 2~10  $\mu\text{g}$ . This analysis method is sensitive and accurate for determining the concentration of L-citrulline and plays an instructive role in the production of L-citrulline.

**Key words:** L-citrulline; 2,4-DNFB pre-column derivation; high performance liquid chromatography

(责任编辑 云志学)