

# 流动注射化学发光法测定氨基乙酸的研究\*

方卢秋, 马兴菊, 卢红发, 彭江, 谭霞  
(涪陵师范学院 化学及环境科学系, 重庆 408003)

**摘要** 实验研究了影响化学发光信号强度值的各种因素, 初步探讨了体系产生化学发光的可能机理。在优化的实验条件下, 氨基乙酸在  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的质量浓度范围内与化学发光信号强度呈良好的线性关系, 检出限 ( $3\sigma$ ) 为  $3 \times 10^{-8} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对质量浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨基乙酸溶液连续测定 11 次, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.8%, 将该方法用于氨基乙酸模拟样品的分析, 结果满意。

**关键词** N-溴代琥珀酰亚胺; 二氯荧光素; 氨基乙酸; 流动注射; 化学发光

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2007)01-0062-04

## A Study of Determination of Amino Acetic Acid with Flow-injection Chemiluminescence Method

FANG Lu-qiu, MA Xing-ju, LU Hong-fa, PENG Jiang, TAN Xia

(Dept. of Environment and Chemistry, Fuling College University, Chongqing 408003, China)

**Abstract** The new method for the determination of Amino acetic acid with flow injection chemiluminescence is here described. It is based on the chemiluminescence during the oxidation of Amino acetic acid by N-bromosuccinimide in alkaline medium in the presence of dichlorofluorescein as energy transfer. Various factors influencing the chemiluminescence system are studied thoroughly and a preliminary discussion on the mechanism of the CL reaction is also given. The linear range for Amino acetic acid is  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  with the relative standard deviation of 2.8% ( $C = 1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n = 11$ ). Under the optimum conditions. The detection limit ( $3\sigma$ ) is  $3 \times 10^{-8} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the recommended method has been successfully used for the analysis of Amino acetic acid of simulation sample.

**Key words** N-bromosuccinimide; dichlorofluorescein; Amino acetic acid; flow injection; chemiluminescence

氨基乙酸又名甘氨酸(Gly), 是结构最简单的氨基酸类化合物, 也是人体非必需的不带电极性氨基酸, 广泛用于农药、医药、日用化工、食品和饲料添加剂领域, 其中 80% 用于除草剂草甘膦的生产<sup>[1-2]</sup>。目前, 测定氨基乙酸的方法有电位滴定法<sup>[3]</sup>、交流示波极谱滴定法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5-7]</sup>、间接原子吸收光谱法<sup>[8]</sup>等。这些方法存在使用仪器昂贵、所用试剂对人体有毒害、操作繁杂、所需时间长等缺点。氨基乙酸分子中含有  $-\text{NH}_2$ , 已有的研究表明分子中含  $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}$  的物质能被 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)氧化, 产生化学发光的现象<sup>[9]</sup>。结合流动注射分析技术<sup>[10]</sup>, 建立流动注射化学发光分析法。此法具有

仪器设备简单、操作方便、分析速度快、灵敏度高、价格低廉等特点, 而采用化学发光分析法测定氨基乙酸在以往的文献中尚未报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器和试剂

IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司); 日立 F-4500 型荧光分光光度计(日立公司)。准确称取 0.253 g 氨基乙酸固体粉末配制 25 mL 的  $1 \times 10^{-2} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  标准溶液, 称取 20.83 g 氢氧化钠配成 500 mL 的  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, 称取 0.502 g 二氯荧光素溶解于 0.1 mol ·

\* 收稿日期 2006-04-25 修回日期 2006-06-15

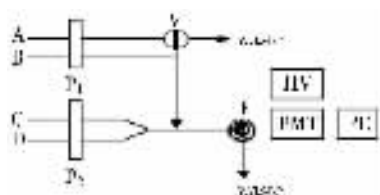
资助项目: 第二批重庆市高等学校优秀中青年骨干教师资助计划 [渝教人(2005)2号]

作者简介: 方卢秋(1965-)男, 四川遂宁人, 副教授, 研究方向为化学发光分析、农业资源与环境。

$L^{-1}$  氢氧化钠溶液, 配制 250 mL 的  $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  的储备液, 称取 1.778 g 十六烷基三甲基氯化铵, 配制 500 mL 的  $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  储备液, N-溴代琥珀酰亚胺现配现用, 其它试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

## 1.2 实验方法

按图 1 所示的实验装置操作。将各输液管插入相应溶液, 启动仪器, 待管路中溶液流动平稳, 基线稳定后, 通过进样阀向载流液中注入氨基乙酸样品或标准溶液, 记录增强化学发光信号强度值, 以相对峰高定量。



注: A-样品溶液; B-载流(水); C-CTAC + D-flu + NaOH 溶液; D-NBS 溶液; P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>-蠕动泵; V-进样阀; F-流通池; PMT-光电倍增管; HV-负高压; PC-计算机控制的化学发光分析仪。

图1 测定氨基乙酸的实验流程图

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应条件的选择

**2.1.1 NBS 浓度的影响** 化学发光体系中常见的氧化剂有  $KIO_4$ 、 $K_2Cr_2O_7$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $KMnO_4$  和 NBS, 不同的氧化剂种类影响化学发光信号强度值。实验表明, 以  $NBS^{11}$  作为氧化剂时, 化学发光信号强度值最大, 化学发光信号稳定, 重复性好(见图 2)。故本实验选择 NBS 作为化学发光体系的氧化剂, 测试了 NBS 浓度在  $0.006 \sim 0.014 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  范围内影响化学发光信号强度值的情况(见图 3)。当 NBS 的浓度为  $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  时, 相对化学发光信号强度最大, 基线最稳定, 因此, NBS 的优化浓度选择  $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 。

**2.1.2 反应介质种类及浓度的选择** 作为化学发光体系, 选择合适的反应介质是必要的。研究了 5 种碱性物质  $KOH$ 、 $NaOH$ 、 $Na_4P_2O_7$ 、 $NaHCO_3$ 、 $Na_2CO_3$  对化学发光体系的影响, 结果表明  $NaOH$  对化学发光体系影响最大。测定了  $NaOH$  浓度在  $0.10 \sim 0.18 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  范围内对化学发光信号强度值的影响。当  $NaOH$  的浓度为  $0.17 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  时, 相对化学发光强度值最大, 但基线不稳定; 而  $NaOH$  的浓度为  $0.15 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  时, 相对化学发光强度最大, 基线较稳定, 故本实验选择  $0.15 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  的  $NaOH$  用于后续实验研

究。

图2 D-flu-NBS-CTAC-Gly 体系的化学发光信号图

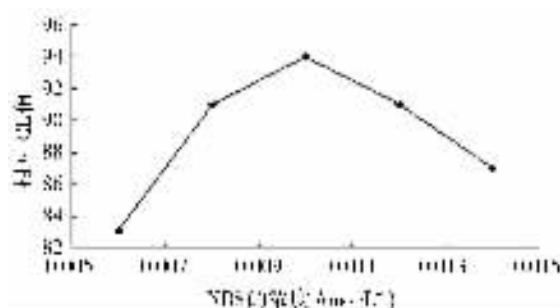


图3 NBS 的浓度对化学发光强度的影响

**2.1.3 反应介质中荧光素种类及浓度的选择** 在化学发光反应体系中, 荧光物质起能量转移作用, 增加化学发光体系的发光效率。本实验研究了荧光素、二氯荧光素(D-flu)、罗丹明、罗丹明6G、喹啉、荧光素钠等6种常见能量转移剂对化学发光体系的影响。结果表明, 二氯荧光素的信噪比最大, 基线较稳定, 相对化学发光强度值最高, 因此, 选择二氯荧光素作为化学发光体系的能量转移剂。实验研究了二氯荧光素的浓度在  $1.0 \times 10^{-4} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  范围内对化学发光信号强度值的影响(图 4), 当二氯荧光素浓度为  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  时信噪比最大, 基线较稳定, 所以, 选择二氯荧光素浓度为  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 。

**2.1.4 反应介质中表面活性剂种类及浓度的选择** 实验研究了6种表面活性剂, 即吐温80、聚乙二醇400、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基苯磺酸钠、曲拉通100对化学发光体系的影响。结果表明, 除 Tween80 和 SDBS 外, 其余4种表面活性剂对化学发光体系均有增敏作用, 以 CTAC 的增敏作用最强。CTAC 浓度对化学发光信号强度有显著影响(见图 5)。当 CTAC 的浓度为  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  时, 化学发光信号强度值最大, 本实验选择  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  的 CTAC 作为增敏剂。

**2.1.5 载流酸碱性的影响** 实验考察了载流酸碱

性对化学发光信号强度值的影响。结果显示,当载流为  $\text{H}_2\text{SO}_4$  时,虽然相对化学发光强度值最大,但波形不好。当载流为  $\text{NaOH}$  时,相对化学发光信号强度值较大,基线值小且稳定,化学发光光谱图波形良好。因此,采用  $\text{NaOH}$  为载流,测定了载流中  $\text{NaOH}$  浓度在  $0.13 \sim 0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内对化学发光信号强度值的影响,当  $\text{NaOH}$  浓度为  $0.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,化学发光信号最强。故选择浓度为  $0.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaOH}$  溶液作为载流液。

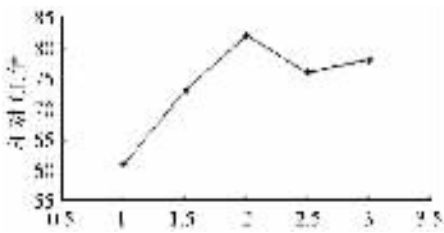
## 2.2 校准曲线、精密度及检出限

在选定的实验条件下,氨基乙酸质量浓度在  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内与化学发光信号强度值呈线性关系。为了提高测定的精密度,对校准曲线分段绘制,各段校准曲线回归方程为

$\Delta I = 572.85 C (\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}) + 17.579$  ( $r = 0.9988$ , 负高压为  $700 \text{ V}$ ) 浓度范围  $1.0 \times 10^{-7} \sim 7.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  
 $C (\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.0244 \Delta I - 2.4096$  ( $r = 0.9984$ , 负高压为  $500 \text{ V}$ ) 浓度范围  $7.0 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

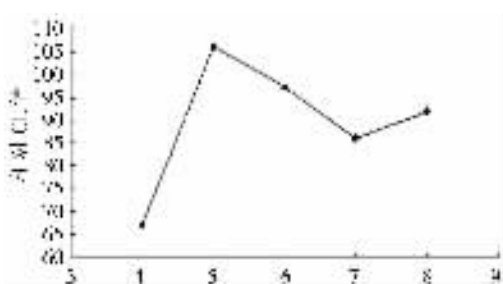
$C (\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.1544 \Delta I - 221.33$  ( $r = 0.9828$ , 负高压为  $500 \text{ V}$ ) 浓度范围  $3.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

对浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨基乙酸溶液进行了 11 次平行测定,相对标准偏差为 2.8%,根据 IUPAC 建议,计算出方法的检出限 ( $3\sigma$ ) 为  $3 \times 10^{-8} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



二氯荧光素浓度 ( $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 4 二氯荧光素浓度对化学发光信号的影响



CTAC 的浓度 ( $\times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图 5 CTAC 的浓度对化学发光信号的影响

## 2.3 干扰实验

以浓度为  $5 \times 10^{-7} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨基乙酸溶液做干扰实验,要求相对误差小于  $\pm 5\%$ ,研究了实际样品中常见的阳离子及其它分子物质对测定的干扰情况。结果表明 200 倍  $\text{Na}^+$ 、糊精,150 倍  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ , 25 倍  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、草酸钠、EDTA、草酸、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、酒石酸、柠檬酸,5 倍  $\text{Vc}$ ,1 倍  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、葡萄糖,不干扰测定;麦芽糖、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4^+$ ,有干扰。

## 2.4 样品分析

按照实验部分所述方法,对模拟样品溶液中氨基乙酸的含量进行测定,同时进行了加标回收实验。由于本实验很难获到氨基乙酸工业品,故以模拟样品进行测定分析。模拟样品的配制:准确移取氨基乙酸标准溶液配制成浓度为  $1.0 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨基乙酸溶液,与几种主要的杂质混合,定容于  $25 \text{ mL}$  的容量瓶中,杂质的种类及相应含量为草酸  $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸  $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、尿素  $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{K}^+$   $2.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}^+$   $2.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{I}^-$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ac}^-$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NO}_3^-$   $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测定结果列于表 1。

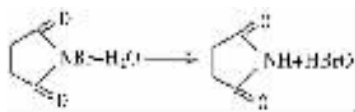
表 1 回收率数据表

初始质量浓度/ $\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$	加入质量浓度/ $\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$	测得质量浓度/ $\times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 /%	RSD /%
4.0	2.0	5.9	93	1.5
2.0	4.0	6.2	100	1.2
4.0	4.0	8.4	105	0.71

## 3 结论

在 NBS 与荧光物质构成的化学发光体系中,化学发光体一般为激发态的荧光物质。在本研究中可能的机理为:在弱碱性条件下,NBS 的氧化性来自其水解产物  $\text{HBrO}$ ,比  $\text{HBrO}$  稳定;氨基乙酸分子中含有氨基,可以被  $\text{HBrO}$  氧化,产生化学能激发共存的二氯荧光素。为了证实这一推测,去掉二氯荧光素,其余条件如优化结果,以  $5 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的氨基乙酸进行实验,结果未发现有明显的化学发光产生。当加入二氯荧光素,则产生明显可测的化学发光。另外,用日立 F4500 型荧光分光光度计扫描了该体系各种不同溶液混合后的发光光谱,最大发射波长为  $524 \text{ nm}$ (见图 6)。罗万芬<sup>[12]</sup>等研究了 NBS-荧光

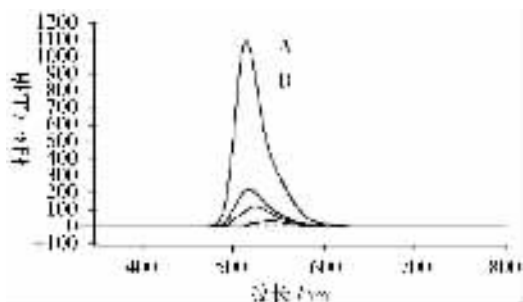
素体系的最大发射波长为 515 nm,比本体系最大发射波长略小,说明化学发光体系的发光体确实为激发态的二氯荧光素,且光谱发生了红移,故推测本化学发光体系的可能反应机理为



$\text{Gly} + \text{HBrO} + \text{OH}^- \rightarrow \text{产物}^*$ ;

$\text{产物}^* + \text{二氯荧光素} \rightarrow \text{二氯荧光素}^* + \text{产物}$ ;

$\text{二氯荧光素}^* \rightarrow \text{二氯荧光素} + h\nu (\lambda = 524 \text{ nm})$



A:  $\text{NBS} (5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{CTAC} (2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{二氯荧光素} (7.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{NaOH} (7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{氨基乙酸} (5.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1})$ ;

B:  $\text{二氯荧光素} (7.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{NaOH} (7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{CTAC} (2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ;

C:  $\text{二氯荧光素} (7.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{NaOH} (7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ;

D:  $\text{NBS} (5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{CTAC} (2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{二氯荧光素} (7.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{NaOH} (7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$

图 6 化学发光体系的荧光光谱

#### 参考文献:

- [1] 张林雅, 赵地顺. 氨基乙酸的合成及应用[J]. 河北化工, 2003(3): 7-10, 18.  
 [2] 汪多仁. 氨基乙酸的开发与应用[J]. 现代农药, 2004, 3(4): 21-24.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.  
 [4] 宫莲珍, 郭秀英, 刘春祥, 等. 测定甘氨酸含量的新方法-交流示波极谱法[J]. 西北药学杂志, 1994, 9(1): 9-11.  
 [5] 巍柳珍, 苏玉永. 高效液相色谱法测定强力宁注射液中甘氨酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(5): 289-290.  
 [6] SAMANIDOU V F, STAFYLIS A H, PAPADOYANNIS I N. Direct High-performance Liquid Chromatog Method for Determination of Glycine Betaine and Its Metabolite, N,N-dimethylGlycine, in Pharmacokinetic Studies[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2001, 24(1): 1-14.  
 [7] 杜建丽, 李平, 吕桂华. HPLC 法测定羊水中兴奋性氨基酸: 天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸的含量[J]. 中国医学理论与实践, 2004, 14(7): 982-984.  
 [8] 周原, 刘新玲, 朱监宝, 等. 间接原子吸收光谱法测量甘氨酸的研究[J]. 湖南工程学院学报, 2002, 12(3): 77-79.  
 [9] 方卢秋. 流动注射化学发光法测定盐酸吗啡[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 66-68.  
 [10] 方卢秋. 高锰酸钾-硫酸体系流动注射化学发光法测定乙二醛的含量[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2006, 23(1): 58-60.  
 [11] 方卢秋, 杨季冬, 李晓燕, 等. NBS-荧光素-CTAC 流动注射化学发光体系测定尿素的含量[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2004, 27(3): 288-291.  
 [12] 罗万芬, 章竹君, 王周平, 等. N-溴代琥珀酰亚胺-荧光素体系流动注射能量转移化学发光法测定妥布霉素[J]. 分析化学, 2004, 32(1): 5-8.

(责任编辑 欧红叶)