

柱前衍生-高效液相色谱法检测测定沉香叶中 γ -氨基丁酸的含量

张 健, 陆颖珊, 温嘉倩, 郑秀榕, 闫 冲* (广东医科大学, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 建立测定沉香叶中 γ -氨基丁酸的高效液相色谱方法。**方法** 样品经过2,4-二硝基氟苯衍生化后, 高效液相色谱法测定衍生物的含量。采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相A为V(乙腈): V(超纯水)=1:1, 流动相B为pH6.8含有3%四氢呋喃的磷酸盐缓冲液, A:B=35:65; 检测波长为360 nm, 柱温为27 $^{\circ}$ C, 流速为1.000 mL/min。**结果** γ -氨基丁酸衍生物在0.01~0.1 g/L范围内呈良好线性关系, $r=0.9994$; 3批样品中 γ -氨基丁酸平均含量为0.2983 mg/g。**结论** 沉香叶中含有 γ -氨基丁酸, 所建立的含量测定方法可准确测定沉香叶中 γ -氨基丁酸的含量。

关键词: γ -氨基丁酸; 沉香叶; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2019)05-0510-03

Determination of the content of γ -aminobutyric acid in leaves of *aquilaria sinensis* (Lour.) spreng with pre-column derivatization-high performance liquid chromatography

ZHANG Jian, LU Ying-shan, WEN Jia-qian, ZHENG Xiu-ron, YAN Chong* (Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the determination of γ -aminobutyric acid in leaves of *aquilaria sinensis* (Lour.) spreng. **Methods** Sample was prepared with 2,4-dinitrofluorobenzene derivatization and the content was determined with HPLC. In the HPLC analysis, the Kromasil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) was used, the mobile phase A consisted of acetonitrile-water (1:1) while the mobile phase B was pH6.8 phosphate buffer with 3 % tetrahydrofuran added (A:B=35:65), the UV detection wavelength was 360 nm and the column temperature was 27 $^{\circ}$ C. **Results** γ -aminobutyric acid derivatives showed a good linear relationship in the range of 0.01-1.0 g/L, $r=0.9994$. The average content of γ -aminobutyric acid in three batches of samples was 0.2983 mg/g. **Conclusion** The established method is simple, rapid and accurate. It can be used for the determination of γ -aminobutyric acid in leaves of *aquilaria sinensis* (Lour.) spreng.

Key words: γ -aminobutyric acid; *aquilaria sinensis* (Lour.) spreng; HPLC

γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)是一种重要的中枢神经系统抑制性神经递质, 在谷氨酸脱羧酶(GAD)的作用下由谷氨酸脱羧生成, 与突触后膜的GABA受体结合而发挥作用。随着研究技术的发展, 越来越多的证据表明GABA系统异常与常见重性精神疾病如精神分裂症、双相障碍、重性抑郁障碍等密切相关^[1]。另外, GABA拥有良好的水溶性和热稳定性, 以及食用安全性, 并可用于饮料等食品的生产^[2]。沉香叶为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng的叶子。《中国药

典》(2015版)中记载: 沉香行气止痛, 温中止呕, 纳气平喘, 用于胸腹胀闷疼痛, 胃寒呕吐呃逆, 肾虚气逆喘急。相对于沉香而言, 沉香叶的各种研究还处于起步阶段, 很多学者已经意识到曾经被当做废料处理的沉香叶, 其中所含的有效成分也有很大的开发利用价值^[3]。有文献报道沉香叶的乙醇提物具有镇痛、抗炎、促进小肠运动、泻下、止血、抗脑缺血缺氧、降血糖、抗肿瘤等活性^[4]。沉香叶中黄酮类化合物有抗氧化活性^[5], 但未见有文献报道沉香叶含有GABA。因此, 为进一步提高沉香树的综合利用价值, 本实验建立了沉香叶中GABA含量的HPLC测定方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Agilent 1100高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 超纯水设备(北京中科齐力科技公司), JJ224

基金项目: 东莞市社会发展科技项目(No.2014108101056), 广东医科大学大学生创新创业训练项目 (No.GDMU2018174)

收稿日期: 2019-05-03; 修订日期: 2019-08-31

作者简介: 张 健(1996-), 男, 在读本科生

通信作者: 闫 冲(1980-), 男, 博士, 教授

BC电子天平(常熟市双杰测试仪器厂), HH-1数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司), TGL-16 G高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), PB-10标准型pH计(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

1.2 试剂

GABA对照品购自上海源叶生物科技有限公司(LOT Z08A8H33553); 2, 4-二硝基氟苯购自上海麦克林生化科技有限公司。乙腈(acetonitrile)为色谱纯; 甲醇(CH_3OH)、氢氧化钠(NaOH)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)均为分析纯。

1.3 材料

沉香叶摘于广东医科大学(东莞校区)药用植物园, 原植物经广东医科大学闫冲教授鉴定为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备

精确称取GABA对照品适量, 用超纯水溶解, 制成1 g/L的对照品溶液, 精密量取一定质量浓度的GABA标准溶液1 mL于10 mL棕色瓶中, 加入0.5 mol/L碳酸氢钠(pH9.0)溶液1 mL, 再分别加入1% 2, 4-二硝基氟苯(FDNB)乙腈溶液0.2 mL, 置于60 ℃水浴锅中避光加热30 min后取出, 冷却, 分别添加pH6.8的磷酸盐缓冲液至10 mL, 混匀, 10 000 r/min离心15 min, 经0.22 μm 微孔过滤, 作为对照品溶液^[6]。

2.2 样品溶液的制备

从不同沉香树中随机摘取沉香叶, 混合后60 ℃烘干, 打粉, 过40目筛。称取干燥沉香叶粉末5.00 g于锥形瓶中, 加超纯水约90 mL, 95 ℃水浴加热40 min, 放冷后过滤, 滤渣再用水洗涤后, 合并滤液, 定容至100 mL。

量取1 mL上述溶液置于10 mL棕色容量瓶中, 加入0.5 mol/L碳酸氢钠(pH9.0)溶液1 mL, 再分别加入1% FDNB(2, 4-二硝基氟苯)乙腈溶液0.2 mL, 置于60 ℃水浴锅中避光加热30 min后取出, 冷却至室温, 添加pH6.8磷酸盐缓冲液至10 mL, 混匀。取适量溶液至离心管中, 10 000 r/min离心15 min, 经0.22 μm 微孔过滤, 作为样品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Kromasil C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相A: V(乙腈): V(超纯水)=1:1, 流动相B: pH=6.8的含有3%四氢呋喃的磷酸盐缓冲液, A:B=35:65; 检测波长: 360 nm; 柱温: 27 ℃;

流速: 1.000 mL/min; 进样量: 5 μL 。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取浓度为0.01、0.02、0.06、0.08、0.1 g/L的GABA标准溶液, 参照“2.1”方法进行衍生化反应, 按照“2.2”色谱条件进样检测, 以其峰面积为纵坐标(y , Au), 质量浓度为横坐标(x , g/L), 绘制标准曲线。线性回归方程为 $y=286.1x+3.57$, $r=0.9994$ 。

2.4.2 精密度试验 取质量浓度为0.04 g/L的GABA对照品溶液, 按“2.2”方法操作后, 在“2.1”色谱条件下重复进样6次, 其峰面积RSD为0.89%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批沉香叶样品溶液, 分别于配置2、4、8、12 h后按照2.2色谱条件进样检测GABA含量。GABA衍生物峰面积RSD为1.20%, 说明检测物在12 h内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同批沉香叶样品溶液, 按样品处理方法制备沉香叶样品溶液5份, 分别测定样品溶液中GABA的含量, 结果其峰面积RSD为2.50%, 说明该实验重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取5.00 g已知含量的沉香叶粉末9份, 按表1分别加入GABA对照品溶液, 按照样品方法处理后, 测定GABA含量, 结果见表1。

表1 方法的回收率实验结果 ($n=3$)

GABA含量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
1.53	1.20	2.52	82.5	3.9
1.51	1.50	2.85	89.3	3.3
1.51	1.80	3.17	92.2	3.1

2.5 样品定性分析及含量测定

2.5.1 样品定性分析 通过试验多种流动相的比例, GABA对照品与样品保留时间均一致, 且二者的紫外吸收光谱特征也一致(扫描波长为200~400 nm)。对照品和样品色谱图见图1。

2.5.2 样品定量分析 取3批沉香叶粉末样品及对照品溶液, 外标法测定GABA含量, 分别为0.3028、0.2815和0.3105 mg/g, 平均0.2983 mg/g。

3 讨论

本实验首次建立了沉香叶中GABA含量的HPLC测定方法, 重复性好, 简便快捷, 为进一步的开发研究沉香叶的功能提供了基础和依据。实验结果表

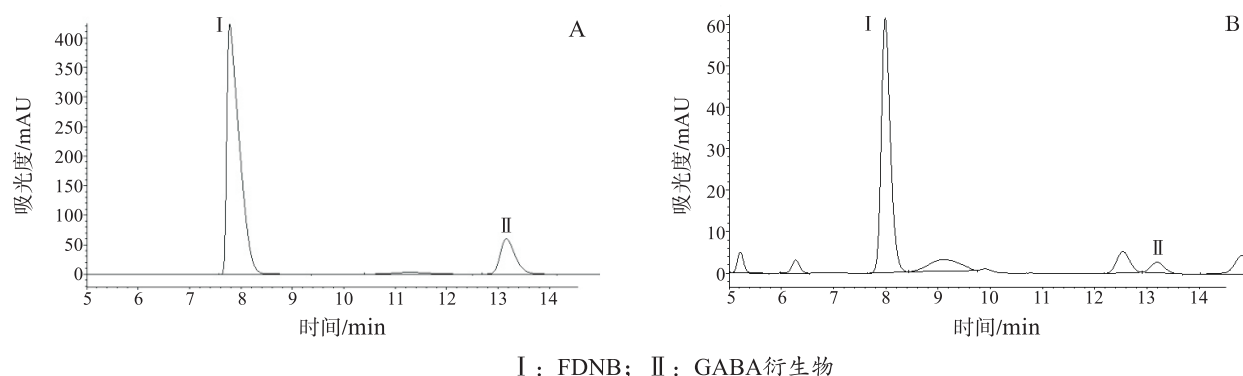


图1 GABA对照品(A)和沉香叶样品(B)的高效液相色谱图

明沉香叶中含有一定量的GABA, 3批沉香叶中GABA含量分别为0.3028、0.2815和0.3105 mg/g, 说明沉香叶中含有的GABA具有很大的开发利用价值。

除此之外, 本实验还探索了流动相pH为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0时各组峰的峰形及分离度, 最终发现流动相pH为6.8时, GABA和其结构近似峰达到最好的分离度。在流动相pH为6.8时, 流动相A和B的比例为35:65时, GABA保留时间控制在14 min以内, 此时各组峰的峰形良好且能达到基线分离。

参考文献:

- [1] 李科, 俞兰秀, 刘小雨, 等. γ -氨基丁酸改善睡眠作用机制的研究进展[J/OL]. 食品工业科技: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20190306.1640.090.html>.
- [2] 艾学东. γ -氨基丁酸的生理活性及其在饮料中的应用现状[J]. 饮料工业, 2017, 20(5): 67-69.
- [3] 刘明石, 胡艺红, 杨秋霞, 等. 沉香叶中有效成分研究[J]. 广东化工, 2017, 44(15): 139.
- [4] 林焕泽, 李红念, 梅全喜, 等. 沉香叶的研究进展[J]. 今日药学, 2011, 21(9): 547-549.
- [5] 段宙位, 李维国, 窦志浩, 等. 沉香叶黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 45-50.
- [6] 陈烟兰, 杨民和. 产谷氨酸脱羧酶真菌的检测和筛选[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(4): 22-29.

版 权 声 明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据-数字化期刊群、维普网、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播, 其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣), 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部