

来稿摘登

高效液相色谱荧光检测法测定瓜子中的 4-氨基丁酸

明永飞^{1,3} 尤进茂² 傅晓云² 李永民¹ 陈立仁^{*1}

¹ (中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000) ² (曲阜师范大学化学系, 曲阜 273165)

³ (中国科学院研究生院, 北京 100039)

1 引言

在众多的氨基酸中, 4-氨基丁酸是一种非蛋白质类氨基酸, 它在医学上是一种抑制性神经递质, 由于其自身的特点, 一些常规的直接测定法灵敏度较低。尽管对其测定有较多报道, 但采用柱前衍生的分离测定的报道相对较少, 且测定结果不很理想。本实验采用新型荧光试剂吡唑-9-乙基氯甲酸酯 (CEOC) 作为衍生试剂在 Hypersil C₁₈ 柱上分离测定了 4-氨基丁酸 (GABA)。结果表明, 所建立的方法简单、快速, 灵敏度高。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂 655 型高效液相色谱仪 (日本日立公司); 650-10S 荧光分光光度计检测器、色谱工作站 (大连依立特公司)。吡唑-9-乙基氯甲酸酯 (自制)、乙腈 (色谱纯, 山东禹王实业总公司化工厂)、无水乙腈 (自制)、4-氨基丁酸标样 (生化试剂, 中国科学院上海生物化学研究所东风生化技术公司)。其他试剂皆为分析纯。

2.2 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm 5 μm) (大连依立特公司)。柱温 35 °C; 流动相 A: 20% 乙腈, 含 0.05 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 (pH = 4.0); 流动相 B: 90% 乙腈; 梯度条件: 在 0 ~ 20 min, 由 100% A 变化到 100% B, 继续用 B 洗脱 5 min。流速为 1 mL/min。荧光激发波长为 330 nm, 发射波长为 360 nm。

2.3 流动相和衍生试剂的配制 流动相 A: 取 100 mL 乙腈和 100 mL 0.05 mol/L NaAc-HAc 缓冲液置于 500 mL 的容量瓶中, Milli-Q 超纯水定容到刻度, 然后用 0.45 μm 滤膜过滤器抽滤备用。流动相 B: 取 450 mL 乙腈置于 500 mL 的容量瓶中, Milli-Q 超纯水定容到刻度, 过滤备用。CEOC 衍生试剂: 准确称取 2.60 mg CEOC 溶于无水乙腈, 定容到 100 mL 的容量瓶中, 浓度为 1.0×10^{-3} mol/L。

2.4 标准溶液及样品处理 准确称量 4-氨基丁酸标准样品 5.16 mg 于 50 mL 容量瓶中, 超纯水定容, 得 1.0×10^{-3} mol/L 的标准液, 然后稀释 10 倍, 从而得到 1.0×10^{-4} mol/L 的标准溶液。将瓜子去皮研细, 准确称取 5.0 g 置于圆底烧瓶中, 加入乙醇与水的混合液 (V/V = 3/2) 50 mL, 于 88 °C 水浴中回流两次 (30 min), 合并提取液, 加入 2 mL 3.0 mol/L 的盐酸, 减压浓缩干燥, 然后加入硼酸缓冲液 (pH = 9.0) 使其溶解后定容到 50 mL 的容量瓶中, 过滤备用。取样品液 20 μL 加入到含有 100 μL 硼酸缓冲液的安培瓶中, 再依次加入无水乙腈 100 μL, 衍生试剂 100 μL, 摇动 2 ~ 3 min, 加入 100 μL 乙腈的水溶液, 稀释备用。

3 结果与讨论

3.1 色谱分离 按前述色谱条件, 在 Hypersil C₁₈ 柱上对衍生的标样及实际样品组分进行了分离。4-氨基丁酸在柱上的保留时间为 11 min, 实际样品中其它氨基酸和杂质对测定无干扰。

3.2 标准曲线的绘制 取缓冲溶液 200 μL, 4-氨基丁酸 100 μL, 衍生试剂 50 μL 在安培瓶中混合, 放置 5 min, 然后加入 20 μL 36% 的醋酸溶液和 100 μL 无水乙腈, 4-氨基丁酸的实际浓度为 2.127×10^{-5} mol/L。依次稀释, 并分别进样 20 μL, 进样量 X (pmol) 与峰面积 Y (mV · min) 之间的线性回归方程为: $Y = 2947.38 + 751.06X$, 回归系数 $r = 0.9995$ 。

3.3 回收率实验 准确称取 4-氨基丁酸标准样品 3 份, 分别加入到 3 份已称量好的样品中, 并重复样品的制备过程, 测得平均回收率分别为 98.80%、96.99%、98.05%。

3.4 精密度实验 准确吸取 4-氨基丁酸标准液 20 μL 连续 5 次进样, 测得峰面积的相对偏差为 1.33%, 标准偏差为 0.26。

3.5 测量结果 按前述色谱方法和样品的制备过程对 3 种瓜子中的 4-氨基丁酸含量进行了测量, 南瓜子、西瓜子和葵花瓜子中 4-氨基丁酸的含量分别为 14.0、91.0 和 62.2 μg/g。结果表明: 不同瓜子中 GABA 的含量差别很大, 其中, 西瓜子中含量最高, 南瓜子中含量最低。

2003-05-07 收稿; 2004-09-21 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20075016) 和中国科学院“百人计划”资助项目