

超高效液相色谱-串联质谱法测定南瓜中 γ -氨基丁酸的含量

秦 宇, 侯蓓蓓, 张斌骏, 葛 宇*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测南瓜中 γ -氨基丁酸的分析方法。**方法** 南瓜样品用水作为提取剂, 在 80 °C 水浴条件提取分离 10 min。以 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)进行分离, 以乙腈和 0.1%(V:V)甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 在电喷雾离子源正离子模式(ESI+)和多反应监测(multiple response monitoring, MRM)模式下进行定性定量分析。**结果** γ -氨基丁酸在 0.10~2.00 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2) ≥ 0.999 , 检出限(limit of detection, LOD)为 0.10 mg/kg。在低、中、高 3 个加标水平下的回收率为 82.3%~93.8%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.9%~4.5%。**结论** 该方法灵敏高效, 回收率优良, 重复性好, 适用于 γ -氨基丁酸的有效检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; γ -氨基丁酸; 南瓜

Simultaneous determination of γ -aminobutyric acid in pumpkin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

QIN Yu, HOU Bei-Bei, ZHANG Bin-Jun, GE Yu*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of γ -aminobutyric acid in pumpkin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Pumpkin samples were extracted with water as the extractant, and extracted and separated at 80 °C for 10 min. Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC column (150 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) was used for separation. Gradient elution was performed with acetonitrile and 0.1% (V:V) formic acid as mobile phase qualitative and quantitative analysis was performed in electrospray ion source positive ion mode (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** γ -aminobutyric acid had good linear relationship in the range of 0.10 to 2.00 mg/L with the correlation coefficients(r^2) higher than 0.999. The limit of detection (LOD) was 0.10 mg/kg. The recovery rate at the 3 levels of low, medium and high was 82.3%–93.8%. The relative standard deviation (RSD) was 1.9%–4.5% ($n=6$). **Conclusion** This method is sensitive and efficient, and has excellent recovery and good repeatability, which is suitable for the effective detection of γ -aminobutyric acid.

基金项目: 上海市科学技术委员会国内合作项目(18395800200)

Fund: Supported by Domestic Cooperation Project of Shanghai Science and Technology Commission (18395800200)

***通讯作者:** 葛宇, 教授级高级工程师, 博士, 主要研究方向为食品质量安全检测与评估。E-mail: geyu@sqi.org.cn

***Corresponding author:** GE Yu, Professor, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: geyu@sqi.org.cn

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; γ -aminobutyric acid; pumpkin

1 引 言

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是广泛分布于动植物体内的天然氨基酸^[1]。GABA 具有降压、治疗癫痫、增强记忆力等功效,以 GABA 为功效因子的新型功能食品被广泛开发应用。富含 GABA 的食品的开发利用以及针对不同食品中 GABA 的检测方法研究成为了新的研究热点^[2,3]。目前针对 γ -氨基丁酸的检测对象多集中于茶叶^[4]、桑叶^[5]、发芽糙米^[6]、酒^[7]或者保健食品^[8]等食品基质,但南瓜基质中的研究却未见报道。南瓜是葫芦科一年生的蔓生类植物,亦可作为粮食代用品,南瓜中富含 GABA、多糖、类胡萝卜素、果胶、氨基酸和矿物质元素^[9],其中 GABA 作为一种重要的营养物质,目前检测方法主要使用高效液相色谱法^[10-12]、Berthelot 比色法^[13]、改良纸层析法^[14]。其中纸层析法和比色法基质干扰较大,检测的精确性和灵敏度的较低。近年来,高效液相法因测定结果准确,灵敏度高,可同时检测多种氨基酸,常用于 GABA 的检测。但是因高效液相色谱法检测器的限制,多数检测通过柱前或柱后衍生的方法进行检测,衍生步骤繁琐且衍生剂选择性较小等缺点凸显。随着高效液相色谱串联质谱法^[15-18]的日益普及,其因专属性好、灵敏度高、简单快捷等优点得到了极为广泛的应用。

传统的 GABA 检测方法操作复杂且需要衍生,针对该问题,本研究利用超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)

建立南瓜中 GABA 的检测方法,并将此方法应用于不同产地南瓜中 GABA 的检测,以期为南瓜的高值利用提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

供试南瓜品种为上海艾妮维农产品专业合作社从新西兰引进的小南瓜品种,所需样品采自本课题在新疆喀什地区泽普的南瓜试验示范种植基地。其余南瓜购于超市卖场。

γ -氨基丁酸(纯度 $\geq 98\%$,北京曼哈格生物科技有限公司)

标准储备溶液: 1.00 g/L: 称取 γ -氨基丁酸标准品 100.00 mg,用适量水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至 100 mL,于 4 °C 下保存备用。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher Chemical

公司);甲酸(色谱纯,美国 ACS 色谱试剂);实验室用水为超纯水。

2.2 仪器与设备

Waters XEVO TQ-XS 三重四极杆串联质谱仪、带电喷雾离子源(ESI)、MassLynx V4.2 仪器控制及数据处理软件[沃特世科技(上海)有限公司];MSZO 204S 型电子天平(瑞士 MettlerToleo 公司);Centrifuge 5804 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);D-91126 多管涡旋振荡器(德国 Heidolph 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 前处理方法

准确称取均质后的试样 5.00 g 于 50 mL 具塞离心管中,加 20.0 mL 去离子水与 2 粒陶瓷均质子,涡旋 2 min;在 80 °C 水浴中提取 10 min,以 9000 r/min 离心 2 min,收集上清液转移至 50 mL 容量瓶中,残余物质重复上述步骤,合并 2 次上清液,用水定容至刻度,取 1.00 mL 过 0.22 μ m 滤膜,供液相色谱串联质谱分析。

2.3.2 仪器条件

色谱条件: 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m),流速: 0.50 min/mL 柱温: 35 °C,进样量: 2 μ L 流动相: 0.1%甲酸水和乙腈,洗脱程序: 梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Program of gradient elution

时间/min	流速 (mL/min)	流动相	
		A/%	B/%
0	0.5	0	100
2	0.5	100	0
3	0.5	100	0
3.1	0.5	0	100
4.0	0.5	0	100

注: A: 0.1% 甲酸; B: 乙腈

质谱条件: 电喷雾离子源: 正离子模式;多反应监测模式;母离子: 104.0;定量离子与定性离子分别为: 87.1(碰撞能量: 8 V), 69.1(碰撞能量: 15 V);锥孔电压: 70 V;离子源温度: 350.0 °C;电喷雾压力: 5500.0 V;毛细管电压: 3.5000 V。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

γ -氨基丁酸属于亲水性化合物,极性较大;当使用 Waters BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m)作为色谱柱,乙腈-0.1%甲酸水(10:90, V/V)作为流动相时, γ -氨基丁酸在 0.2 min 出峰,容易受到样品杂质的干扰;本研究同时考察 AtantisRT3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μ m)对目标物进行梯度洗脱,同样较难实现理想的分离效果。当选用 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱时, γ -氨基丁酸在乙腈-0.1%(V/V)甲酸水(15:85, V/V)等度条件下可以实现较好分离,考虑到南瓜基质较为复杂,本研究用梯度洗脱方式对目标物进行分离,具体洗脱梯度明细见表 1。

3.2 质谱条件优化

配制 γ -氨基丁酸 1.0 μ g/mL 的混合标准溶液,采用注射泵直接进样的方式注入质谱仪。采用 ESI+扫描方式进行一级质谱分析,确定母离子[M+H]⁺,优化锥孔电压(cone)。对母离子进行二级质谱扫描,优化碰撞能,选取相对丰度较高且稳定的 2 个特征碎片离子为定性、定量离子,以满足欧盟 657/2002/EC 号指令对于禁用药物液相色谱-质谱方法定性检测的规定,即满足 1 个母离子、至少 2 个子离子共 4 个识别点数的要求。本研究最终确定 γ -氨基丁酸的质谱条件为:电喷雾正离子模式;离子对:104.0→87.1(定量),104.0→69.1,碰撞能量分别为 8 V, 15 V;裂解电压:70 V。 γ -氨基丁酸的色谱和质谱图结果如图 1 和 2 所示。

3.3 前处理条件

文献[19]和[20]表明: γ -氨基丁酸的最佳提取溶剂是水,最佳的提取温度为 80 $^{\circ}$ C,本研究依此实验条件对南瓜中 γ -氨基丁酸进行提取分析,通过添加 10.0 mg/kg 的 γ -氨基丁酸进行方法验证得到满意的回收率,同时用 GB5009.124-2016^[21]方法对同一种新疆小南瓜样品 GABA 进行测试,其结果分别为 19.8 mg/kg(GB 方法)和 20.4 mg/kg(本研究方法),结果偏差小于 10%。故本研究

确定此条件作为南瓜中 γ -氨基丁酸的提取条件。

3.4 方法学参数

3.4.1 检出限及线性范围

用去离子水配制 0.10~2.00 mg/L 质量浓度的标准品,分别取 2 μ L 进行色谱分析,测试结果以质量浓度为 X 轴,峰面积为 Y 轴作线性方程,并进行线性回归分析,得到线性回归方程如表 2 所示。仪器检出限是指分析仪器能检出与噪音相区别的小信号的能力,添加 1.0 mg/kg 的标准品进行上述前处理操作,根据仪器 S/N $\geq$ 3 确定仪器的最低检出限(limit of detection, LOD)为 0.10 mg/kg。

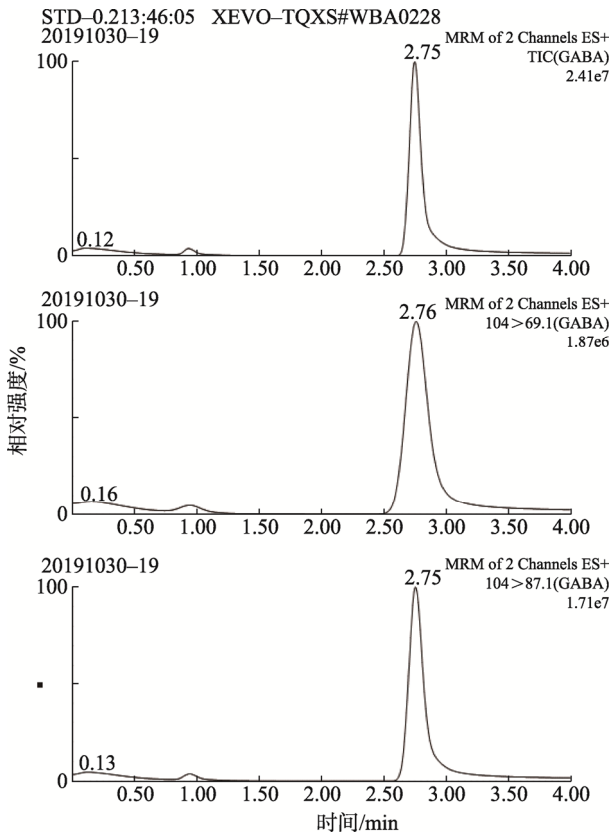


图 1 γ -氨基丁酸的色谱图
Fig.1 Chromatogram of γ -aminobutyric acid

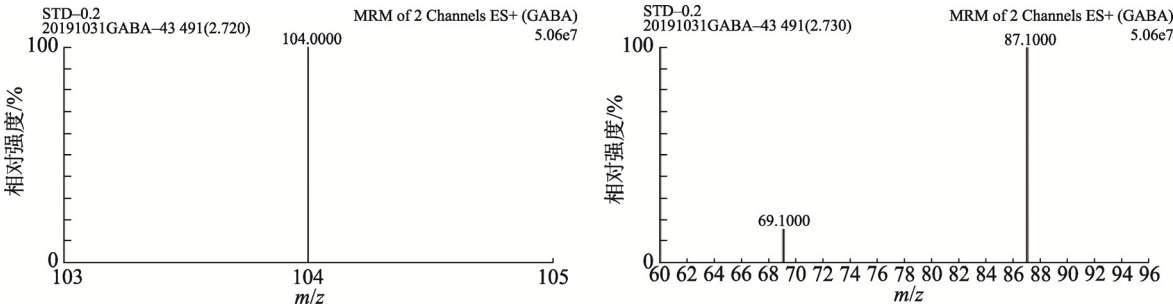


图 2 γ -氨基丁酸质谱图
Fig.2 Mass spectrum of γ -aminobutyric acid

表 2 γ -氨基丁酸的线性回归方程和相关系数
Table 2 Linear equations, correlation coefficients (r) of the γ -aminobutyric acid in pumpkin

浓度 C /(mg/L)	0.10	0.20	0.50	1.00	2.00
峰面积 Y	831822	2588752	7729252	17854774	36910688
线性相关系数 r	0.9995				
线性方程	$Y=1.88583\times10^7X-1.14923\times10^6$				

从表 2 得出, 在相同的检测条件下, 当线性相关系数 $r>0.99$ 时, γ -氨基丁酸的线性浓度范围为 0.10~2.00 mg/L。

3.4.2 精密度和准确度验证试验

样品重复性试验: 按上述方法处理南瓜, 重复测定 5 次, 计算测定结果得平均值和相对标准偏差。样品加标回收率: 以南瓜为本底, 添加已知质量浓度的 γ -氨基丁酸标准溶液, 按照上述方法进行液相色谱串联质谱测定, 计算其加标回收率。

准确性试验: 本研究对 γ -氨基丁酸检测的峰面积的精密度和日内稳定性进行实验得到, 6 次测定峰面积的相对偏差小于 3.2%, 每 1 h 进 1 次, 6 h 内峰面积的相对偏差小于 3.5%, 说明 γ -氨基丁酸具有较强的稳定性。通过添加回收率可以得到: 南瓜中 γ -氨基丁酸的测定, 在低、中、高 3 水平加标下的回收率为 82.3%~93.8%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 1.9%~4.5%, 结果见表 3。

表 3 南瓜中 γ -氨基丁酸的平均回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Average recovery and precision of γ -aminobutyric acid in pumpkin ($n=6$)

名称	加标水平/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
γ -氨基丁酸	1.0	82.3	4.5
	1.5	93.8	3.3
	2.0	93.6	1.9

3.5 实际样品检测

应用所建立方法对市场销售的南瓜进行了 6 批次分析检测, 其中, γ -氨基丁酸的含量如表 4 所示, 其含量为 10.9~28.0 mg/kg。

4 结 论

本研究建立了高效液相色谱-质谱联用法测定南瓜中 γ -氨基丁酸含量的分析方法。该方法前处理方便简单, 抗干扰能力强, 测定结果准确可靠。采用 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 4 min 内完成分析, 分离效果良好, 方法检测专属性强。通过添加不同浓度的 γ -氨基丁酸标准溶液, 回收率为 82.3%~93.8%, 相对标准偏差为 1.9%~4.5%, 回

收率和精密度良好, 该方法为检测南瓜中 γ -氨基丁酸的含量提供可靠实验方法, 为更好研究南瓜中营养成分提供技术支持。

表 4 不同产地南瓜样品中 γ -氨基丁酸的含量($n=6$)
Table 4 Contents of GABA in pumpkin samples from different habitats ($n=6$)

样品名称	产地	γ -氨基丁酸含量/(mg/kg)			RSD/%
		样品 1	样品 2	平均值	
新疆小南瓜	新疆喀什地区	19.88	20.93	20.4	3.64
迷你南瓜	上海	27.05	28.85	28.0	4.55
金韩南瓜	山东	10.55	11.25	10.9	4.54
姜柄瓜	云南省玉溪市	14.58	16.1	15.3	7.01
贵族瓜	新疆	21.78	23.39	22.6	5.04
新鲜嫩南瓜 特产小南瓜	湖北天门	16.67	14.69	15.7	8.93

参考文献

[1] 何瑾, 屈凡伟, 张峻, 等. 超高效液相色谱/质谱法测定血液中 γ -氨基丁酸[J]. 分析实验室, 2015, 34(9): 1022-1025.
He J, Qu FW, Zhang J, et al. Determination of γ -aminobutyric acid in blood by ultra high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Lab, 2015, 34(9): 1022-1025.

[2] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞. γ -氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 546-551.
Yang SY, Lu ZX, Lv FX. Physiological function and research and development progress of GABA [J]. Food Sci, 2005, 26(9): 546-551.

[3] 张晖, 姚惠源, 姜元荣. 富含 γ -氨基丁酸保健食品的研究与开发[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 69-72.
Zhang H, Yao HY, Jiang YR. Research and development of health food rich in GABA [J]. Food Ferment Ind, 2002, 28(9): 69-72.

[4] 李晓彤, 吴丹妮, 陈军辉, 等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定茶叶中 γ -氨基丁酸和茶氨酸[J]. 理化检验-化学分册, 2019, 55(2): 130-135.
Li XT, Wu DN, Chen JH, et al. Determination of γ -aminobutyric acid and theanine in tea by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2019, 55(2): 130-135.

[5] 湛珍, 刘青茹, 张晓伟, 等. 高效液相色谱法测定桑叶 γ -氨基丁酸和谷氨酸[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 162-166.
Chen Z, Liu QR, Zhang XW, et al. Determination of γ -aminobutyric acid

- and glutamic acid in mulberry leaves by HPLC [J]. Food Res Dev, 2019, 40(3): 162–166.
- [6] 程威威, 周婷, 吴跃, 等. 高效液相色谱法测定发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 98–101.
- Cheng WW, Zhou T, Wu Y, *et al.* Determination of GABA in germinated brown rice by HPLC [J]. Food Sci, 2014, 35(12): 98–101.
- [7] 胡雪莲, 王宏华, 王莉娜. 高效液相色谱法测定黑莓果汁机黑莓啤酒中的 γ -氨基丁酸[J]. 中国酿造, 2015, 34(3): 150–153.
- Hu XL, Wang HH, Wang LN. Determination of GABA in blackberry beer by HPLC [J]. China Brew, 2015, 34(3): 150–153.
- [8] 刘晓茂, 杨志伟, 崔宗岩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定芦笋保健食品中 L-茶氨酸和 γ -氨基丁酸[J]. 食品科技, 2018, 43(3): 277–281.
- Liu XM, Yang ZW, Cui ZY, *et al.* Simultaneous determination of L-theanine and γ -aminobutyric acid in asparagus health food by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(3): 277–281.
- [9] 徐薇, 张丝瑶, 董世荣, 等. 无糖营养南瓜粥的研究与开发[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(11): 15–18.
- Xu W, Zhang SY, Dong SR, *et al.* Research and development of sugar free pumpkin porridge [J]. Grain Oil, 2019, 32(11): 15–18.
- [10] Tu YF, Yang X, Zhang S, *et al.* Determination of theanine and gamma-aminobutyric acid in tea by high performance-liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(2): 184–189.
- [11] Inoue K, Miyazaki Y, Unno K, *et al.* Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues [J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(1): 55–61.
- [12] Horie H, Kohata K. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2000, 881(1/2): 425–438.
- [13] 陈恩成, 张名位, 彭超英. 比色法快速测定糙米中 γ -氨基丁酸含量研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(1): 125–128.
- Chen EC, Zhang MW, Peng CY. Rapid determination of γ -aminobutyric acid in brown rice by colorimetry [J]. Chin J Grain Oil, 2006, 21(1): 125–128.
- [14] 张晖, 徐永, 姚惠源. 纸层析法定量测定米胚芽中的 γ -氨基丁酸[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2004, 23(2): 101–103.
- Zhang H, Xu Y, Yao HY. Quantitative determination of γ -aminobutyric acid in rice germ by paper chromatography [J]. J Wuxi Light Ind Univ (Food Biotechnol), 2004, 23(2): 101–103.
- [15] 黎亮星, 张迪. 高效液相色谱-质谱联用法测定粮食制品中 γ -氨基丁酸的含量[J]. 辽宁化工, 2019, 48(5): 490–492.
- Li LX, Zhang D. Determination of γ -aminobutyric acid in food products by HPLC-MS [J]. Liaoning Chem Ind, 2019, 48(5): 490–492.
- [16] Carvalho E, Punyasiri PAN, Somasiri PPS, *et al.* Quantification of gamma-aminobutyric acid in Sri Lankan tea by means of ultra performance tandem mass spectrometry [J]. Nat Prod Commun, 2014, 9(4): 525–528.
- [17] Horie H, Kohata K. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2000, 881(1/2): 425–438.
- [18] Zhang RT, Chen JH, Shi Q, *et al.* Phytochemical analysis of Chinese commercial Ziziphus jujube leaf tea using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Food Res Int, 2014, (56): 47–54.
- [19] 黄亚辉, 曾贞, 郑红发, 等. GABA 茶中 γ -氨基丁酸的 TLC 测定及提纯研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 11–15.
- Huang YH, Zeng Z, Zheng HF, *et al.* TLC determination and purification of GABA in GABA Tea [J]. Amino Acid Biol Res, 2008, 30(3): 11–15.
- [20] Lin SD, Mau JL, Hsu CA. Bioactive components and antioxidant properties of γ -aminobutyric acid (GABA) tea leaves [J]. LWT-Food Sci Technol, 2012, 46(1): 64–70.
- [21] GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].
- GB 2760-2011 National food safety standard-Determination of amino acids in food [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



秦宇, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: qinyu@sqi.org.cn



葛宇, 教授级高级工程师, 博士, 主要研究方向为食品质量安全检测与评估。

E-mail: geyu@sqi.org.cn