

HPLC-CAD 测定复方氨基丁酸维 E 胶囊中 GABA 的含量

陈红英¹, 林耿雪², 王健松¹, 袁晓^{2,3*}¹广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广州 510515;²广州牌牌生物科技有限公司, 广州 510540; ³中国科学院武汉植物园, 武汉 430074

摘要: 采用高效液相联合 CAD 检测器, Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱, 以 0.05% 九氟戊酸水: 甲醇(97:3) 为流动相等度洗脱, 根据 γ -氨基丁酸(GABA) 对照品标准曲线及方程测定复方氨基丁酸维 E 胶囊中 GABA 的含量。本方法的线性范围为 52 ~ 415 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性方程为 $y = -0.00004x^2 + 0.0602x + 1.6924$, $r = 0.9997$, 平均加样回收率为 101.6%, RSD% 为 1.9% ($n = 9$)。本法测定简便, 快速, 可用于复方氨基丁酸维 E 胶囊中 GABA 含量的测定。

关键词: 复方氨基维 E 胶囊; γ -氨基丁酸; CAD 检测器; 高效液相色谱法

中图分类号: O656.3; R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.022

Determination of GABA Content in Compound Aminobutyric Acid and Vitamin E Capsule by HPLC-CAD

CHEN Hong-ying¹, LIN Geng-xue², WANG Jian-song¹, YUAN Xiao^{2,3*}¹Guangzhou Bai Yun Shan pharmaceutical group co., LTD., Bai Yun Shan Pharmaceutical Factory, Guangzhou, 510515, China;²Guangzhou PI & PI Biotech Inc. Ltd., Guangzhou, 510540, China;³Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430074, China

Abstract: This experiment was done by using HPLC combined with CAD. Hypersil GOLD C₁₈ was used as the chromatographic column. The mixture solution of Nonfluoropentanoic acid (0.05% in water) and methanol with a proportion of 97:3 was used as the mobile phase for the isocratic elution. Determination of GABA content in compound aminobutyric acid and vitamin E capsule was done by comparison of the described curve and equation of the standard GABA compound. The Linear equation in this experiment was described as $y = -0.00004x^2 + 0.0602x + 1.6924$, $r = 0.9997$, with the linear range of 52 ~ 415 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The mean recovery of samples was 101.6% and RSD% was 1.9% ($n = 9$). This method is simple and convenient, which could give a rapid determination of GABA content in aminobutyric acid vitamin E capsule.

Key words: aminobutyric acid vitamin E capsule; GABA; CAD; HPLC

复方氨基丁酸维 E 胶囊的主要成份为 γ -氨基丁酸、氯化胆碱、谷维素、维生素 E、维生素 B1、烟酸、三七粉、丹参浸膏、刺五加浸膏、何首乌浸膏及石菖蒲浸膏, 其中, γ -氨基丁酸为主要成份之一。 γ -氨基丁酸又名氨酪酸, 为一种非蛋白质组成的天然氨基酸, 是中枢神经系统中抑制性神经递质^[1], 具有降低血压、镇静及预防老年性痴呆等功能^[2]。

目前测定 γ -氨基丁酸的方法有比色法、高效液相色谱法^[3]。比色法容易受到其它物质干扰, 不适用于复杂成份的检测; 高效液相色谱法可精确测定

微量 γ -氨基丁酸的质量浓度, 故被广泛应用。由于 γ -氨基丁酸在紫外-可见光区没有吸收, 目前国内外多使用柱前衍生-紫外检测法, 常用的衍生化试剂为邻苯二甲醛(OPA)、*N*-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)^[4]、2,4-二硝基氟苯(FDNB)、异硫脲酸苯酯(PITC)等^[5]。根据各个衍生化试剂的不同, 其检测方法也各有差异, OPA 法衍生物不稳定, 需快速进样; PITC 法衍生化需在严格无水条件下进行^[6], 而采用衍生化法进行测定时样品前处理相对复杂, 时间长且容易受反应试剂干扰, 均给检测带来一定不利条件, 故本文采用高效液相联合 CAD 检测器进行试验, 被测样品溶于纯水经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后可直接进样, 无需进行复杂的前处理过程, 且不受其它试剂

影响。

电喷雾 (CAD) 检测器为通用型检测器, 其不依赖于化合物的结构, 适用于在紫外-可见光区无吸收物质的检测, 与高效液相色谱联用灵敏度高, 重现性好, 能准确地进行定量或半定量分析^[7]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: Milli-Q Reference 超纯水 (Merck, 德国); 甲醇 (Merck, HPLC 4L); 九氟戊酸 (Tokyo chemical industry); 氨酪酸 (东北制药集团股份有限公司, 含量: 98%); 复方氨基丁酸维 E 胶囊 (批号: 1170005、1170006 广州白云山医药集团股份有限公司, 白云山制药总厂)。

仪器: UPLC DIONEX Ultimate 3000 Rs Pump; Rs Autosampler; Rs Column Compartment; Corona Veo Rs Charged Aerosol Detector。

1.2 实验方法

色谱条件: 色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈ (100 × 2.1 mm, 1.9 μm); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 15 μL; 运行时间: 12 min; 流动相: 0.05% 九氟戊酸水-甲醇 (97:3)。

1.3 专属性

空白溶剂: 水

空白溶液: 除 γ-氨基丁酸外制剂中的所有成份按配方比例进行混合, 称取约 280 mg 置于 100 mL 容量瓶中, 加适量水超声 10 min 溶解后定容至 100 mL, 精密量取 2 mL 于 10 mL 容量瓶, 加水定容至 10

mL。

空白溶剂与空白溶液检测, 考察对 γ-氨基丁酸检测是否存在干扰。

1.4 精密度

1.4.1 系统适用性

称取 γ-氨基丁酸对照品适量, 加水溶解并稀释配成浓度为 100 μg/mL 溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 连续进样 6 次。以 γ-氨基丁酸峰面积及保留时间考察系统适用性。

1.4.2 方法重复性

取复方氨基丁酸维 E 胶囊一颗, 倒出胶囊内容物, 称重后置于 100 mL 容量瓶中, 加适量水超声 10 min 溶解后定容至 100 mL, 精密量取 2 mL 于 10 mL 容量瓶, 加水定容至 10 mL, 平行配制 6 份, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后检测。以 6 份溶液测得的 γ-氨基丁酸峰面积及保留时间考察方法重复性。

1.5 检测限与定量限

信噪比法: 把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较, 以信噪比为 3 ± 1 时注入仪器的量确定检测限, 以信噪比为 10 ± 2 时注入仪器的量确定定量限。

1.6 线性关系试验

对照品储备液配制: 称取 γ-氨基丁酸对照品 10.6 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至 10 mL。

以水为稀释剂将对照品储备液进行适当稀释, 配成下表浓度, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 检测。

表 1 对照品溶液浓度

Table 1 The concentration of reference material

编号 number	1	2	3	4	5	6	7	8
浓度 Concentration (μg/mL)	51.9	103.9	155.8	207.7	259.7	311.6	363.6	415.5

以对照品溶液峰面积值为纵坐标, 对照品溶液浓度为横坐标对其进行拟合, 用 $y = ax^2 + bx + c$ 进行拟合作标准曲线。

1.7 加样回收率测定

1.7.1 回收率试验品溶液配制

称取 γ-氨基丁酸对照品 10.4 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至 10 mL。

1.7.2 供试品溶液配制

取复方氨基丁酸维 E 胶囊一颗, 倒出胶囊内容

物, 称重后于 100 mL 容量瓶中, 加适量水超声 10 min 溶解后定容至 100 mL, 精密量取 2 mL 于 10 mL 容量瓶, 加水定容至 10 mL。

1.7.3 供试品溶液检测

取 1.7.2 配制的供试品溶液 6 份经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后检测, 计算供试品溶液中 γ-氨基丁酸的浓度, 并求出 6 份溶液中 γ-氨基丁酸浓度的平均值。

1.7.4 回收率试验

取复方氨基丁酸维 E 胶囊一颗,倒出胶囊内容物,称重后于 100 mL 容量瓶中,加适量水超声 10 min 溶解后定容至 100 mL,精密量取 2 mL 于 10 mL 容量瓶,分别添加回收率试验对照品溶液 0.3 mL、0.4、0.5 mL,以水为溶剂定容至 10 mL,配制成供试品溶液浓度的 80%、100%、120%,每个限度平行配制三份。测定其含量,计算回收率,以 9 个回收率数据及其相对标准偏差评价准确度。

1.8 含量测定

将两批制剂按 1.7.2 项下供试品溶液配制,过滤,检测,一个样品重复进样两次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 图谱

γ -氨基丁酸对照品、供试品溶液色谱图见图 1、2。

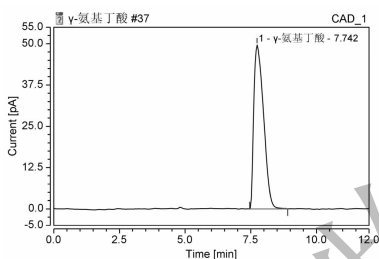


图 1 γ -氨基丁酸对照品

Fig. 1 Reference material of γ -aminobutyric acid

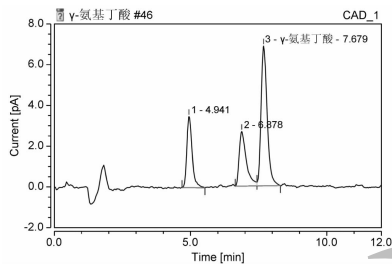


图 2 供试品溶液

Fig. 2 The solution of sample

2.2 专属性测定结果

经检测,空白溶剂与空白溶液均对 γ -氨基丁酸检测无干扰,该方法专属性良好。

2.3 精密度测定结果与分析

2.3.1 系统适用性

经 6 次连续进样后, γ -氨基丁酸峰面积和保留时间如表 2 所示,峰面积 RSD% 为 2.4%,保留时间 RSD% 为 0.2%,表明其系统适用性良好。

2.3.2 方法重复性

配制供试品溶液 6 份,经检测 γ -氨基丁酸峰面积和保留时间如表 3 所示,峰面积 RSD% 为 2.1%,保留时间 RSD% 为 0.1%,表明其方法重复性良好。

2.4 检测限与定量限

将 γ -氨基丁酸对照品稀释配制成适当浓度,进样量均为 15 μ L 经检测其结果如表 4;定量限连续进样 6 次, γ -氨基丁酸峰面积和保留时间如表 5 所示, γ -氨基丁酸的峰面积 RSD% 为 2.1,保留时间的 RSD% 为 0.1%,表明定量限精密度良好。

表 2 系统适用性结果

Table 2 The result of system suitability

序号 Serial number	1	2	3	4	5	6	相对标准偏差 RSD (%)
峰面积 Peak area	7.04	6.90	6.68	6.89	6.70	6.61	2.4
保留时间 Retention Time (min)	7.20	7.21	7.20	7.18	7.20	7.22	0.2

表 3 方法重复性结果

Table 3 The result of method repeatability

序号 Serial number	1	2	3	4	5	6	相对标准偏差 RSD (%)
峰面积 Peak area	4.55	4.36	4.43	4.41	4.33	4.29	2.1
保留时间 Retention Time (min)	7.26	7.28	7.26	7.26	7.26	7.26	0.1

表 4 检测限与定量限

Table 4 Limit of detection and limit of quantification

名称 Name	样品浓度 Concentration of sample ($\mu\text{g/mL}$)	信噪比 Signal to noise	样品量 Quality of sample (ng)
检测限 Limit of detection	1.07	3.82	16.05
定量限 Limit of quantification	3.21	10.80	48.2

表 5 定量限精密度

Table 5 The precision of LOQ

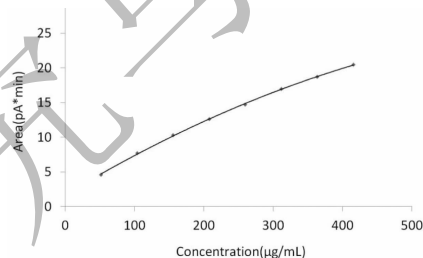
序号 Serial number	1	2	3	4	5	6	相对标准偏差 RSD (%)
峰面积 Peak area	0.54	0.56	0.56	0.55	0.56	0.57	2.1
保留时间 Retention Time (min)	7.30	7.30	7.29	7.30	7.30	7.28	0.1

2.5 线性试验结果

将已知浓度的 γ -氨基丁酸对照品溶液经检测后,将测得峰面积(y)对浓度(x)作非线性拟合,其拟合方程 $y = -0.00004x^2 + 0.0602x + 1.6924$, $r = 0.9997$ 。标准曲线图见图 3。

2.6 回收率结果

供试品溶液 6 份经测定,其平均浓度为 $77.7 \mu\text{g/mL}$;配制 9 份回收率供试品溶液经检测后,具体结果如表 6 所示,9 份供试品溶液的平均回收率为 101.6% , $RSD\%$ 为 1.9% ($n = 9$),表明该方法测定 γ -氨基丁酸含量准确。

图 3 γ -氨基丁酸标准曲线Fig. 3 The standard curve of γ -aminobutyric acid

2.7 含量检测结果

含量检测结果见表 7。

表 6 回收率结果

Table 6 The result of recovery

序列名称 Serial number	加入量 Addition of concentration ($\mu\text{g/mL}$)	实测值 Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average of Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
R-80-1	61.2	140.42	102.4	101.6	1.9
R-80-2	61.2	139.93	101.6		
R-80-3	61.2	139.07	100.2		
R-100-1	81.6	161.81	103.0	101.6	1.9
R-100-2	81.6	159.65	100.4		
R-100-3	81.6	162.03	103.3		
R-120-1	102.0	184.38	104.6	101.6	1.9
R-120-2	102.0	180.71	101.0		
R-120-3	102.0	177.93	98.2		

3 结论

本文通过对精密度、检测限与定量限、标准曲线

及准确度进行验证,验证结果表明该检测方法具有良好的灵敏度及重复性,灵敏度高,适用于 γ -氨基丁酸含量检测。在制作标准曲线时,以峰面积对 γ -

表7 含量检测结果

Table 7 The result of content determination

批号 Batch number	实测量 Calculated quality (mg)	标示量 Labeled amount (mg)	胶囊内容物质量 Quality of capsule's content (mg)	含量 Percentage of quality (%)
1170005	40.2	37.5	322.4	12.9
1170006	39.5	37.5	306.5	12.5

氨基丁酸对照品浓度进行标准曲线制备,采用是非线性方程 $y = ax^2 + bx + c$ 进行拟合,方程为 $y = -0.00004x^2 + 0.0602x + 1.6924$,相关拟合系数 $r = 0.9997$,以加样回收率评价此方程的准确度,9个样品的回收率在 97.0% ~ 105.0%,平均回收率为 101.6%,RSD% = 1.9 ($n = 9$);而采用线性方程 $y = ax + b$ 进行拟合,方程为 $y = 0.0431x + 3.1718$,相关拟合系数 $r = 0.9959$,以加样回收率评价此方程的准确度,9个样品的回收率在 108.0% ~ 120.0%,平均回收率为 115.2%,RSD% = 4.2 ($n = 9$)。试验结果表明,当用线性拟合,方程的拟合程度较非线性拟合的差,加样回收率的测得结果偏大且9个样品测得值与理论值偏差较大,其准确度结果较非线性拟合的差,故采用方程采用非线性拟合进行含量测定。

参考文献

- 1 Lin Q(林谦). Outline of physiologic function of γ -aminobutyric acid[J]. *J YuLin Nomal Univ*(玉林师范学院学报), 2010, 31(2):62-65.
- 2 Liu J, Chen J, Li W, et al. Study on γ -aminobutyric acid-producing monascus purpureus treated with heavy ion beam ra-

diation, 1[J]. *IMP&HIRFL Annual Report*, 2009: 125-126.

- 3 Xu HH(徐慧慧), Zhang YM(张益明), Liang XZ(梁新珍). Comparison on the analysis methods of γ -aminobutyric acid[J]. *Bull Fermen Sci Tech*(发酵科技通讯), 2014, 43(3):37-41.
- 4 Tu YF(涂云飞), Yang XF(杨秀芳), Zhang SK(张士康), et al. Determination of theanine and γ -aminobutyric acid in tea by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization[J]. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2012, 30:184-189.
- 5 Zhang ZQ(张志清), Xu J(徐杰), Cong J(丛军), et al. Determination of γ -aminobutyric acid (GABA) in germinated wheat seed by HPLC[J]. *J Chin Cereal Oil Ass*(中国粮油学报), 2015, 30:135-139.
- 6 Zheng HJ(郑洪健), Ye LB(叶立斌), Li JR(励建荣), et al. Determination of γ -aminobutyric acid (GABA) by RT-HPLC with 2,4-dinitrofluorobenzene derivatives[J]. *J Chin Cereal Oil Ass*(中国粮油学报), 2011, 26:104-106.
- 7 Liu LY(刘立洋), Liu X(刘肖). A new type of universal detector-charged aerosol detector[J]. *Environ Chem*(环境化学), 2011, 30:1830-1832.

(上接第88页)

- 10 Chen XX(陈晓晓). Chemical constituents in root of *Actinidia chinensis* [D]. Jinan: University of Jinan(济南大学), 2011.
- 11 Yang L(杨岚), Zhao YY(赵玉英), Tu YY(屠呦呦). Chemical constituents of the rhizome of *Matteuccia struthiopteris*[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2003, 28:278-279.
- 12 Gong WF(龚韦凡), Zou DJ(邹大江), Gao RX(高瑞锡), et al. Chemical constituents from roots of *Smilax riparia*[J]. *Chin Med Mat*(中药材), 2017, 77:1596-1600.
- 13 Liu ZD(刘志东), Guo BH(郭本恒), Wang YY(王荫瑜). Methods to determine antioxidative activity[J]. *Nat Prod Res*

Dev(天然产物研究与开发), 2008, 20:563-567.

- 14 Zhu YC(朱玉昌), Jiao BN(焦必宁). Research progress on ABTS assay in determination of TAA in fruits and vegetables in vitro[J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2005, 31(8):77-80.
- 15 Zheng SY(郑善元), Chen TF(陈填峰), Zhen WJ(郑文杰), et al. Spectrometric investigation of the antioxidant activities of Dangcong tea aqueous extracts against DPPH and ABTS free radicals[J]. *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析), 2010, 30:2417-2423.
- 16 LI WK(李文魁), Lin X(林新), Peng Y(彭勇), et al. The materia medica resource of Chinese polygala and the traditional curative effect[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 1997, 8:481-482.