DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260225003
引用格式: 廖祥兵, 陆建伟, 李彬彬, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法结合丹磺酰氯柱前衍生测定酸菜发酵液中 γ-氨基丁酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 208–217.
Liao Xiangbing, Lu Jianwei, Li Binbin, et al. Determination of γ-aminobutyric acid in suancai fermentation broth by high performance liquid chromatography with diode array detection combined with dansyl chloride pre-column derivatization [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 208–217. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱-二极管阵列检测器法结合丹磺酰氯柱前衍生测定酸菜发酵液中 γ-氨基丁酸

廖祥兵[1,2], 陆建伟[3], 李彬彬[1], 陈 器[1], 黄嘉莉[1], 潘 维[3], 夏燕平[1*]

(1. 遂宁市疾病预防控制中心, 遂宁 629000; 2. 剑阁县产品质量检验中心, 广元 628300;
3. 广元市疾病预防控制中心, 广元 628017)

摘 要: 目的 通过高效液相色谱-二极管阵列检测器法(high performance liquid chromatography with diode array detection, HPLC-DAD)结合丹磺酰氯柱前衍生测定酸菜发酵液中 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)。**方法** 本研究利用 HPLC-DAD 对衍生物进行实时在线光谱扫描, 结合单因素实验法, 系统优化了衍生反应条件和色谱分离参数。**结果** 以 $NaHCO_3$-Na_2CO_3 为缓冲体系、45 ℃水浴衍生反应 5 min、不加氨水时衍生效果最佳, 但测定酸菜发酵液时仍需将样品 pH 调节至 10 以上。流动相在 0~15 min、30%~42%乙腈、70%~58% 20 mmol/L 磷酸的条件下既能实现基线平稳, 又能使目标物与干扰物基线分离; 当有机流动相由甲醇变为乙腈时衍生物 λ_{max} 由 219 nm 变为 222 nm, 即 λ_{max} 发生了红移; 在 λ_{max}(222 nm)波长下决定系数达 0.99999、灵敏度最高、检出限最低(0.023 mg/L), 即 λ_{max} 为最适检测波长。方法学验证结果显示, 优化后的方法在 0.05~100.00 mg/L 质量浓度范围内呈现良好的线性关系, 方法检出限为 0.074 μg/mL, 定量限为 0.241 μg/mL, 加标回收率为 87.02%~107.25%, 相对标准偏差为 2.34%~3.49%。此外, 发现 GABA 稳定性较差, 即使冷藏也不宜长时间贮存。**结论** 优化后的方法能够用于测定基质复杂的酸菜发酵液中 GABA, 且灵敏度、精密度、重现性良好; 同时验证了氨水会诱发衍生副反应、有机流动相改变时会引起 λ_{max} 的改变以及 GABA 稳定性较差。

关键词: γ-氨基丁酸; 丹磺酰氯; 高效液相色谱-二极管阵列检测器法; 酸菜
中图分类号: TS2 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0208–10

Determination of γ-aminobutyric acid in suancai fermentation broth by high performance liquid chromatography with diode array detection combined with dansyl chloride pre-column derivatization

LIAO Xiang-Bing[1,2], LU Jian-Wei[3], LI Bin-Bin[1], CHEN Qi[1], HUANG Jia-Li[1], PAN Wei[3], XIA Yan-Ping[1*]

收稿日期: 2026-02-25
基金项目: 广元市科技计划项目(22ZDYF0059); 遂宁市卫生健康科技计划项目(24GGWS02)
第一作者: 廖祥兵(1989—), 男, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: 1091632331@qq.com
***通信作者:** 夏燕平(1985—), 女, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为理化卫生检验。E-mail: 183209711@qq.com

(1. *Suining Center for Disease Control and Prevention*, *Suining* 629000, *China*; 2. *Jiange County Product Quality Inspection Center*, *Guangyuan* 628300, *China*; 3. *Guangyuan Center for Disease Control and Prevention*, *Guangyuan* 628017, *China*)

ABSTRACT: Objective　To determine of γ-aminobutyric acid (GABA) in suancai fermentation broth by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) coupled with pre-column derivatization with dansyl chloride. **Methods**　In this study, HPLC-DAD was used to perform real-time online spectral scanning of derivatives. Combined with single factor experimental method, the derivatization reaction conditions and chromatographic separation parameters were systematically optimized. **Results**　Using $NaHCO_3$-Na_2CO_3 as buffer system, 45 ℃ water bath derivatization reaction for 5 min, and without ammonia, the derivatization effect was the best, but the sample pH still needed to be adjusted to more than 10 when determining the suancai fermentation broth. The mobile phase with 0–15 min, 30%–42% acetonitrile, 70%–58% 20 mmol/L phosphoric acid could not only achieved a stable baseline, but also made the target and interferents baseline separation. when the organic mobile phase changed from methanol to acetonitrile, the derivative λ_{max} changed from 219 nm to 222 nm, that was the λ_{max} shifted red. At the wavelength of λ_{max}(222 nm), coefficient of determination reached 0.99999, with the highest sensitivity and the lowest limit of detection (0.023 mg/L), which revealed that λ_{max} was the optimal detection wavelength. The method validation results showed that the optimized method exhibited a good linear relationship within the mass concentration range of 0.05–100.00 mg/L. The limit of detection of the method was 0.074 μg/mL, and the limit of quantitation was 0.241 μg/mL. The recovery rate was 87.02%–107.25%, with a relative standard deviation of 2.34%–3.49%. Furthermore, it was found that GABA had poor stability and should not be stored for extended periods even under refrigeration. **Conclusion**　The optimized method can be used to determine GABA in suancai fermentation broth with complex matrices, demonstrating good sensitivity, precision and reproducibility. It is also confirmed that ammonia can induce derivative side reactions, changes in the organic mobile phase can cause changes in λ_{max}, and the GABA has poor stability.

KEY WORDS: γ-aminobutyric acid; dansyl chloride; high performance liquid chromatography with diode array detectection; suancai

0　引　言

γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)于 1949 年被 Steward 等[1]在马铃薯块茎中首次发现, 为一种非蛋白质氨基酸, 在植物、微生物、动物和人类中广泛存在[2–3]。GABA 是哺乳动物中枢神经系统中一种重要的抑制性神经递质[4], 具有促进睡眠、抗焦虑、预防糖尿病、增强免疫力及潜在抗癌等多种生理功能[5–7]。原卫生部于 2009 年批准 GABA 作为新资源食品, 允许其在一些食品中使用[8]。因此, GABA 的准确定量检测具有重要意义。

GABA 检测方法包括比色法[9]、高效液相色谱-质谱法[3,10]和高效液相色谱-二极管阵列检测器法(high performance liquid chromatography with diode array detection, HPLC-DAD)[11]等, 其中 HPLC-DAD 是最常用的方法[12]。HPLC-DAD 相较于比色法, 具有较高的精密度和广泛的适用性[12–13], 相较于液相色谱-质谱法, 硬件成本较低、易普及。由于 GABA 对紫外和可见光不敏感[14], 因此在采用 HPLC-DAD 对其进行检测时需对其进行衍生化处理, 以提升检测灵敏度、改善色谱特性[13]。丹磺酰氯(5-dimethylamino-1-naphthalenesulphonyl chloride, DNS-Cl)为一种常用且稳定的 GABA 的柱前衍生剂[14], 其化学反应方程式见图 1。目前, HPLC-DAD 结合 DNS-Cl 柱前衍生测定 GABA 存在衍生条件与色谱参数使用较为混乱的现象, 例如检测波长包括 216[15]、254[16–20]、331[21]、386 nm[22–23]等, 衍生反应温度和时间包括室温静置 2 min[15]、30 ℃反应 30 min[21–22]、45 ℃反应 60 min[18]、55 ℃反应 60 min[16–17,19]和 60 ℃反应 30 min[20], 缓冲液选择包括不使用缓冲液[16–17,19]、$NaHCO_3$-Na_2CO_3 体系[21–23]、硼酸体系[15]和 $NaHCO_3$ 体系[18,20], 衍生反应结束后不加氨水[15–17,19,21–22]和加氨水[18,20]等。另外, 本实验室采用王能凤[21]报道的 HPLC-DAD 结合 DNS-Cl 柱前衍生测定酸菜发酵液中 GABA 时发现存在干扰测定的峰重叠现象。而以往研究多聚焦于 GABA 的增产[9,20]、提取工艺优化[15]、部分衍生条件和色谱参数的优化[19,21]等, 缺少对检验方法参数的系统优化。综上, 亟需系统优化 HPLC-DAD 结合 DNS-Cl 柱前衍生测定 GABA 的方法参数, 以提高检测的准确性、灵敏度。

本实验室前期研究发现, 市售广元无盐酸菜发酵液中 GABA 含量较为丰富, 且其中既存在微生物发酵源性的游离

氨基酸、生物胺等干扰物, 又存在植物源性游离氨基酸、色素等干扰物, 具有较好的复杂基质样品代表性, 因此本研究以广元酸菜发酵液为样品, 采用单因素实验法, 系统优化衍生条件及色谱参数, 同时考察了样品和标准溶液中 GABA 的稳定性。本研究旨在系统优化 HPLC-DAD 结合 DNS-Cl 柱前衍生测定 GABA 的方法参数, 提高检测方法的稳定性和准确性, 以期为 GABA 相关检验检测方法标准的制修订提供参考。

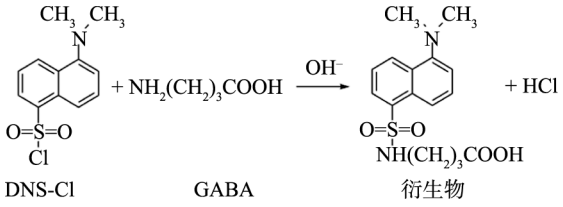


图 1 DNS-Cl 与 GABA 衍生反应方程式

Fig.1 Derived reaction equation of DNS-Cl and GABA

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

广元无盐酸菜发酵液: 剑阁县修城坝农贸市场。

GABA 标准品(纯度 99.6%)、DNS-Cl(分析纯)(坛墨质检科技股份有限公司); $NaHCO_3$、Na_2CO_3、硼酸、磷酸(分析纯)、甲醇、乙腈(色谱纯)、氨水(色谱纯, 质量分数 25%~28%)(成都科隆化学品有限公司)。

1.2 仪器与设备

JA2003D 电子天平(精度 1 mg, 上海衡际科学仪器有限公司); 1290II高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); TGL-16 高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司); Milli-Q Direct 16 超纯水机(德国 Merck Millipore 公司); Shim-pack Scepter C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(日本岛津公司)。

1.3 方 法

1.3.1 溶液的配制

GABA 标准溶液的配制: 准确称取 100.0 mg GABA 标准品用水定容至 100 mL, 得到质量浓度为 1.00 mg/mL 的标准溶液, 置于 0~4 ℃保藏备用, 其他低浓度的标准溶液以超纯水为稀释液现配现用。

DNS-Cl 衍生剂的配制: 准确称取 0.9 g DNS-Cl, 用乙腈溶解并定容至 100 mL, 得到质量浓度为 9.0 g/L 的衍生剂溶液, 置于 0~4 ℃避光保藏备用。

1.3.2 基础色谱参数和衍生条件

衍生条件[21]: 移取样品或标准溶液 500 μL 于 5 mL 离心管, 依次加入 500 μL 缓冲液和 1000 μL 衍生剂, 振荡混匀, 在 30 ℃水浴避光反应 30 min, 过 0.22 μm 有机滤膜, 备用。

色谱参数[21]: 色谱柱: Shim-pack Scepter C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.5%甲酸, 洗脱程序为 0~15 min, 60%~80% A; 15~16 min, 80%~100% A; 16~20 min, 100% A; 20~21 min, 100%~60% A; 21~25 min, 60% A; 流速为 1 mL/min; 柱温为 35 ℃; 进样体积为 10 μL; 检测波长 331 nm(带宽 4 nm), 扫描范围 190~500 nm(参比波长 450 nm, 参比带宽 40 nm)。

1.3.3 衍生条件的优化

采用单因素实验法考察不同温度下衍生反应不同时间(温度 30、45、60、75 ℃, 时间 2、5、15、30、60 min)、不同缓冲体系($NaHCO_3$-Na_2CO_3 组、硼酸组、$NaHCO_3$ 组)、不同样品 pH [4.5(酸菜原始 pH)、6、7、8、9、10、11、12]及氨水对衍生效果的影响。

由于氨水既可能与衍生剂反应, 也可能与 DNS-Cl 和 GABA 的衍生物反应, 因此在优化后的衍生条件和色谱参数的基础上, 设计了以下 3 个实验以考察氨水对衍生的影响。

(1)氨水对衍生结果的影响

为明确氨水是否会影响衍生结果, 选取质量浓度为 100 mg/L 的 GABA 标准溶液, 在上述优化后的条件下进行衍生, 衍生完后加入 100 μL 氨水, 即为“正常+氨水组”; 衍生完后加入 100 μL 超纯水, 即为“正常+水组”, 每个处理重复 3 次。

(2)氨水与衍生剂的反应

为明确氨水与衍生剂所发生的反应, 依次加入 500 μL 超纯水、500 μL 缓冲液、500 μL 衍生剂, 按上述优化后的衍生条件进行衍生, 最后加入 100 μL 氨水, 即为“衍生剂+氨水组”。在“衍生剂+氨水组”的基础上将氨水替换为超纯水, 即为“衍生剂+水组”。

(3)氨水与衍生物的反应

为明确氨水是否与衍生物产生了反应, 将 1.00 mg/mL 标准溶液按上述优化后的衍生条件进行衍生并上机, 接取衍生物出峰段的检测器流出液, 即为纯衍生物溶液, 依次加入 500 μL 纯衍生物溶液、500 μL 缓冲溶液和 100 μL 氨水, 混匀后上机, 即为“衍生物+氨水组”。在“衍生物+氨水组”的基础上将氨水替换为超纯水, 即为“衍生物+水组”。

1.3.4 色谱条件优化

(1)流动相对基线的影响

基于优化后的衍生条件, 选取质量浓度为 100 mg/L 的 GABA 标准溶液进行衍生, 通过改变流动组成和梯度洗脱程序, 考察流动相对基线的影响。实验先将流动相 B 由 0.5%甲酸调整为 20 mmol/L 磷酸(磷酸为一种在低波长下紫外吸收较低的离子化抑制剂), 以减少基线噪声; 再将衍生物出峰时间段的流动相由梯度洗脱改为了等度洗脱(0~15 min、60%~80% A 调整为 0~15 min、60% A), 以减小基线漂移。

(2)分离效果优化

基于上述优化结果, 对酸菜发酵液进行衍生, 将流动相 A 由进行多次调整, 以优化衍生物的分离效果。实验先将流动相 A 的比例调大或调小(0~15 min、60% A 调整为 0~15 min、55% A 或 0~15 min、65% A), 以改善分离效果;

再将流动相 A 由甲醇调整为乙腈, 且改变流动相比例, 0~15 min、60% A 调整为 0~15 min、30%~42% A, 乙腈的洗脱梯度由基础色谱参数中甲醇洗脱强度按公式(1)换算并适当调整所得[24], 以进一步优化分离效果。

$$\varphi_{乙腈} = 0.32\varphi^2_{甲醇} + 0.57\varphi_{甲醇} \quad (1)$$

(3)衍生物最大吸收波长的考察

由于流动相组分的改变不仅会改变化合物的分离度, 也可能使目标物的最大吸收波长发生变化[25–27], 实验以 100 mg/L 的 GABA 标准为对象进行衍生处理, 分别在采用甲醇、乙腈为有机流动相的条件下进行光谱扫描, 以寻找最大吸收波长并观察其变化。

(4)衍生物最适检测波长的确定

采用优化后的衍生条件分别对 0、0.05、0.10、0.50、2.00、5.00、10.00、50.00、100.00 mg/L 标准溶液进行衍生处理, 基于最佳分离效果的色谱条件下进行光谱数据采集, 将衍生物的最大紫外-可见吸收波长 λ_{max} 与 222、254、331、386 nm 波长下的灵敏度(斜率)、仪器检出限(3*S*/*N*)、基线噪声进行对比, 以确定最适检测波长。

1.3.5　*方法学考察*

方法线性范围、检出限、定量限: 基于上述最适波长下对各系列质量浓度的标准溶液数据采集结果, 以质量浓度为横坐标(*X*, mg/L), 峰面积为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线, 并确定线性范围。向样品中添加不同浓度的标准溶液, 以信噪比(*S*/*N*)为 3 时对应浓度作为检出限, 以 *S*/*N*=10 时对应浓度作为定量限。

加标回收率和重复性: 基于上述衍生条件和色谱参数优化结果, 根据酸菜样品原始 GABA 浓度, 适当稀释(稀释后的 GABA 质量浓度在 10~20 mg/L), 加标质量浓度设置为 10、40、80 mg/L, 重复 5 次。

稳定性考察: 以酸菜发酵液和 100 mg/L 的 GABA 为样品, 设置常温(20~30 ℃)和冷藏(4 ℃)组, 每 0、1、2、4、8 d 取样进行衍生后上机测定, 重复 3 次。

1.4　数据处理

使用 Origin 2024 软件绘图, 使用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行差异显著性分析。每组实验重复测量 3 次, 数据均为 3 次平行实验平均值, 结果以平均值±标准偏差表示。

2　结果与分析

2.1　衍生条件优化

由于 GABA 本身无紫外吸收, 故标准溶液和样品溶液中的 GABA 需要进行衍生化处理, 进而实现定量测定目标物质的目的。本研究采用 DNS-Cl 作为柱前衍生化试剂, 使 DNS-Cl 与 GABA 在弱碱性反应体系下发生衍生反应, 生成较为稳定且具有紫外吸收的物质, 但衍生反应的时间和温度、缓冲液体系、样品 pH、氨水均会对衍生反应造成影响, 因此本研究对这些衍生条件进行了系统性考察。

2.1.1　*反应温度和时间对衍生的影响*

选取同一质量浓度的 GABA 标准溶液, 分别设置衍生温度为 15、30、45、60、75 ℃, 每个温度下分别进行 2、5、15、30、60 min 的衍生处理, 以考察衍生反应温度和时间对衍生反应的影响, 结果如图 2 所示。

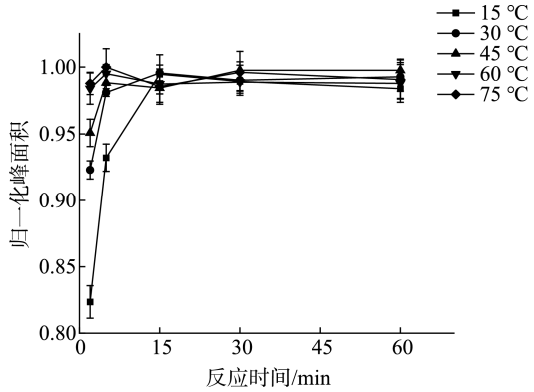


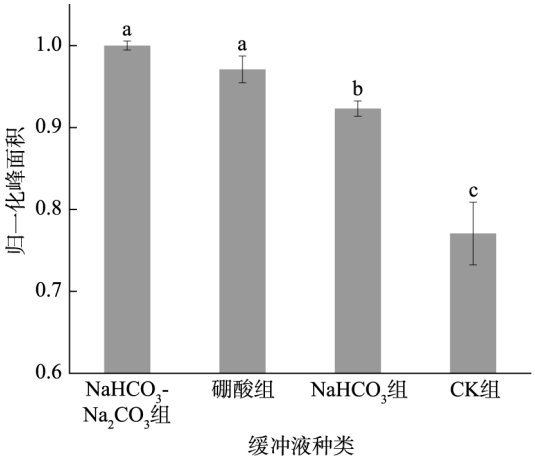
图 2　时间和温度对衍生的影响

Fig.2　Effects of time and temperature on derivatization

由图 2 可知, 在 15 ℃和 30 ℃条件下, 反应时间小于 15 min 时, 衍生物的峰面积随反应时间的增大而增大, 15 min 时达到最大值, 且随后无明显变化; 在 45 ℃条件下, 5 min 时达到最大值, 且随后无明显变化; 在 60 ℃和 75 ℃条件下, 均在 2 min 时衍生物的峰面积达到最大值, 且随后无明显变化。综上可知, 随温度的增加标准溶液达到最大响应的时间逐渐缩短。综合考虑时间和能耗, 最终确定以 45 ℃下反应 5 min 为最适衍生条件。

2.1.2　*不同缓冲液对衍生的影响*

在 45 ℃、5 min 的衍生条件下, 选取同一质量浓度的 GABA 标准溶液, 分别采用 $NaHCO_3$-Na_2CO_3、硼酸(0.4 mol/L)、$NaHCO_3$(质量浓度为 20 g/L)为缓冲液进行衍生处理, 以考察不同缓冲液对衍生效果的影响, 结果如图 3 所示。



注: 组间不同字母表示差异显著(*P*<0.05), 下图同; CK 组为空白组, 实验中加入缓冲液对应量的超纯水。

图 3　缓冲液对衍生的影响

Fig.3　Effects of buffer on derivatization

由图 3 可知, $NaHCO_3$-Na_2CO_3 组和硼酸组的峰面积显著高于 $NaHCO_3$ 组和 CK 组, CK 组的峰面积显著低于其他所有实验组, 其中 $NaHCO_3$-Na_2CO_3 组和硼酸组的峰面积无显著性差异(P>0.05), 但 $NaHCO_3$-Na_2CO_3 组的峰面积略高于硼酸组。综上可知, 以 $NaHCO_3$-Na_2CO_3 为缓冲液体系的衍生效果最佳。

2.1.3 样品 pH 对衍生的影响

由于酸菜发酵液基质成分复杂且样品 pH 较低, 相较于标准溶液, 在加入样品后可能无法让反应体系维持在合适的 pH 条件, 因此在上述衍生条件优化结果的基础上, 分别将酸菜发酵液 pH 调节至 4.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 后进行衍生处理(衍生反应前快速测定反应体系 pH), 以考察样品 pH 对衍生效果的影响, 结果如图 4 所示。

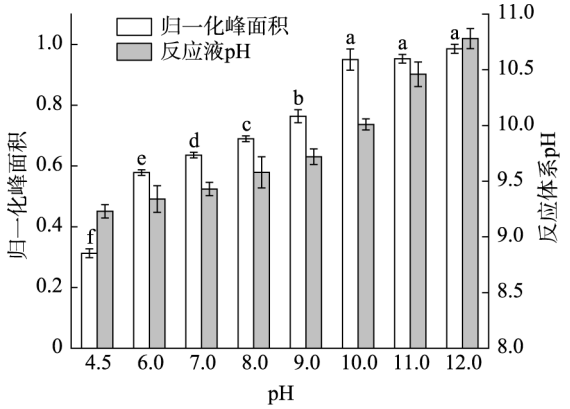


图 4 缓冲液及样品 pH 对衍生的影响

Fig.4 Effects of buffer and sample pH on derivation

由图 4 可知, 衍生化反应的效率显著依赖于反应体系的 pH。具体而言, DNS-Cl 与 GABA 衍生物的归一化峰面积随样品 pH 升高而增加, pH 为 10.0 时达到峰值, 随后 pH 升高归一化峰面积无显著变化。结合反应体系 pH 分析发现, 当反应体系的 pH 在 10.0 以下时, 衍生物归一化峰面积随 pH 的增加而增加, 当反应体系的 pH 达到 10.0 及以上时, 衍生物归一化峰面积无明显变化。综上可知, 在进行酸菜发酵液中 GABA 检测时应将样品 pH 进行适当调整(使反应体系 pH 达 10.0 以上), 以便衍生反应进行完全。

2.1.4 氨水对衍生的影响

由于氨水为衍生结束后加入, 其既可能与衍生剂反应, 也可能与 DNS-Cl 与 GABA 生成的衍生物反应, 从而影响衍生结果。为明确氨水是否和衍生剂、衍生物均发生了反应, 实验设计了氨水对衍生结果影响实验、氨水与衍生剂反应实验和氨水与衍生物反应实验, 结果如图 5 所示。

由图5(a)可知, 相对于“正常+水组”在 7.35 min 处衍生物的信号“正常+氨水组”明显减小, 在 2.82 min 处的吸收峰消失、分别在 2.26、3.26、6.02 和 6.98 min 处出现了 4 个新的吸收峰, 其既可能是氨水与衍生剂的反应产物、也可能是氨水与衍生物的反应产物。由图 5(b)可知, “衍生剂+水组”仅在 2.81 min 处存在吸收峰, 说明其为衍生剂的试剂本底吸收峰; “衍生剂+氨水组”在 2.81 min 处的吸收峰消失[该结果与图 5(a)结果一致], 而在 2.26、3.31、6.01 min 处出现了 3 个新的吸收峰, 说明氨水可以与衍生剂反应生成多种物质。由图 5(c)可知, 相对于“衍生物+水组”在 7.34 min 处衍生物的信号“衍生物+氨水组”明显减小[这与图 5(a)结果一致], 而在 2.28、2.62 和 6.67 min 处的吸收峰信号明显增加, 说明在一定条件下衍生物会自发反应并转变其他多种物质, 而氨水会加剧这种转变。上述结果表明, 氨水不仅可与衍生剂反应生成多种副产物, 还可诱导衍生物自身发生转化, 引发多重副反应, 从而对检测结果产生影响。以往文献报道[16–20], DNS-Cl 与 GABA 反应过程中会产生多种副反应, 本研究发现氨水可能是导致这些副反应的关键因素。综上, 衍生时以不加氨水为宜。

2.2 色谱参数优化

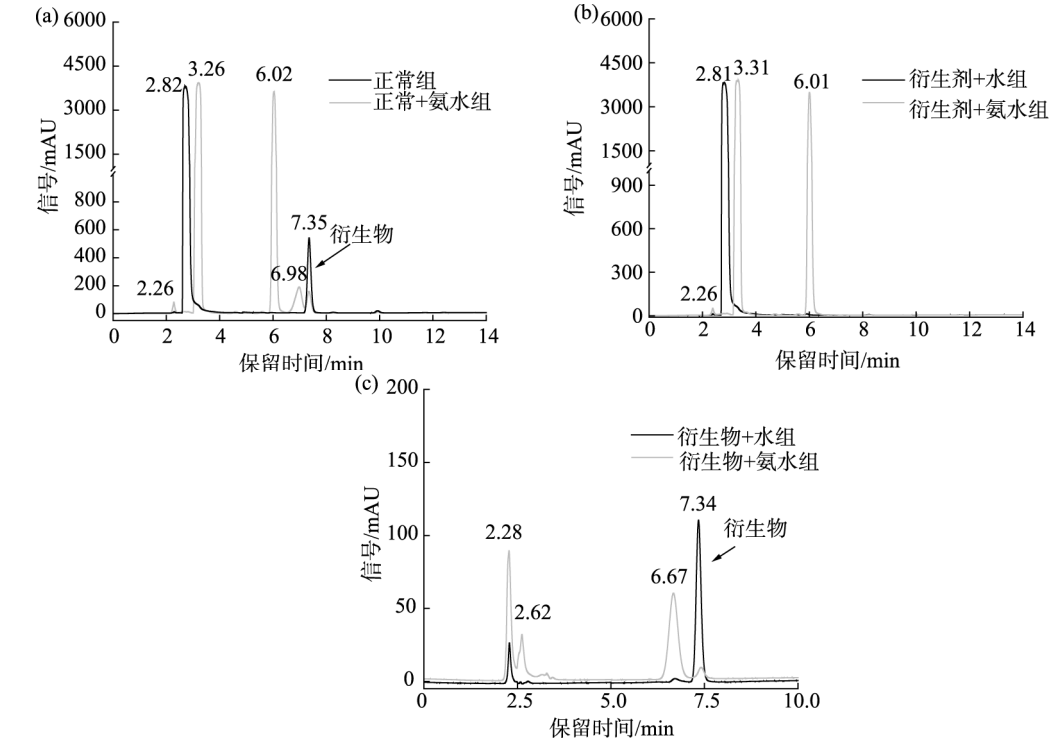
2.2.1 流动相对基线的影响结果

基线噪声过大会造成待检测物检出限偏高, 基线漂移过大则会影响待检测物定量准确性, 研究基于优化后的衍生条件, 选取一标准溶液进行衍生, 检测波长选择 219 nm(当以甲醇为流动相时, λ_{max} 为 219 nm), 先将流动相 B 由 0.5%甲酸调整为在低波长下紫外吸收较低的离子化抑制剂—20 mmol/L 磷酸, 以减少基线噪声; 再将引起衍生物出峰时间段基线漂移的甲醇由梯度洗脱改为等度洗脱, 以减小基线漂移, 结果如图 6 所示。

由图 6(a)可知, 在 0~15 min、60%~80%甲醇(A)、40%~20% 0.5%甲酸(B)条件下, 衍生物保留时间为 6.37 min, 峰型正常, 但基线噪声(31.52 mAU)和基线负漂移(–3170.06 mAU/h)过大。在此时间段流动相中 0.5%甲酸的比例逐渐下降, 且羧酸的最大吸收波长在 200~210 nm 处[24], 说明甲酸在流动相中的变化和波动是导致基线噪声和基线漂移偏大的主要原因。由图 6(b)可知, 在将流动相 B 由 0.5%甲酸更换为20 mmol/L 磷酸后, 衍生物的保留时间为6.34 min, 峰型正常, 且基线噪声 0.45<<31.52 mAU、基线漂移 29.55<<|–3170.06| mAU/h, 但基线正漂移仍较大。进一步分析发现, 在此时间段流动相中甲醇的比例逐渐上升, 且由于 219 nm 接近甲醇作为流动相的透过波长下限(210 nm[24]), 因此引起基线正漂移主要原因为甲醇在流动相中比例增加。由图 6(c)可知, 在将甲醇在流动相中比例保持不变后, 衍生物的保留时间为 6.61 min, 峰型正常, 且基线噪声(0.21 mAU)和基线漂移均较小(–0.51<29.55 mAU/h)。综上, 以 0~15 min、60%甲醇、40% 20 mmol/L 磷酸可让基线噪声和基线漂移同时保持相对稳定。

2.2.2 样品中衍生物的分离效果优化

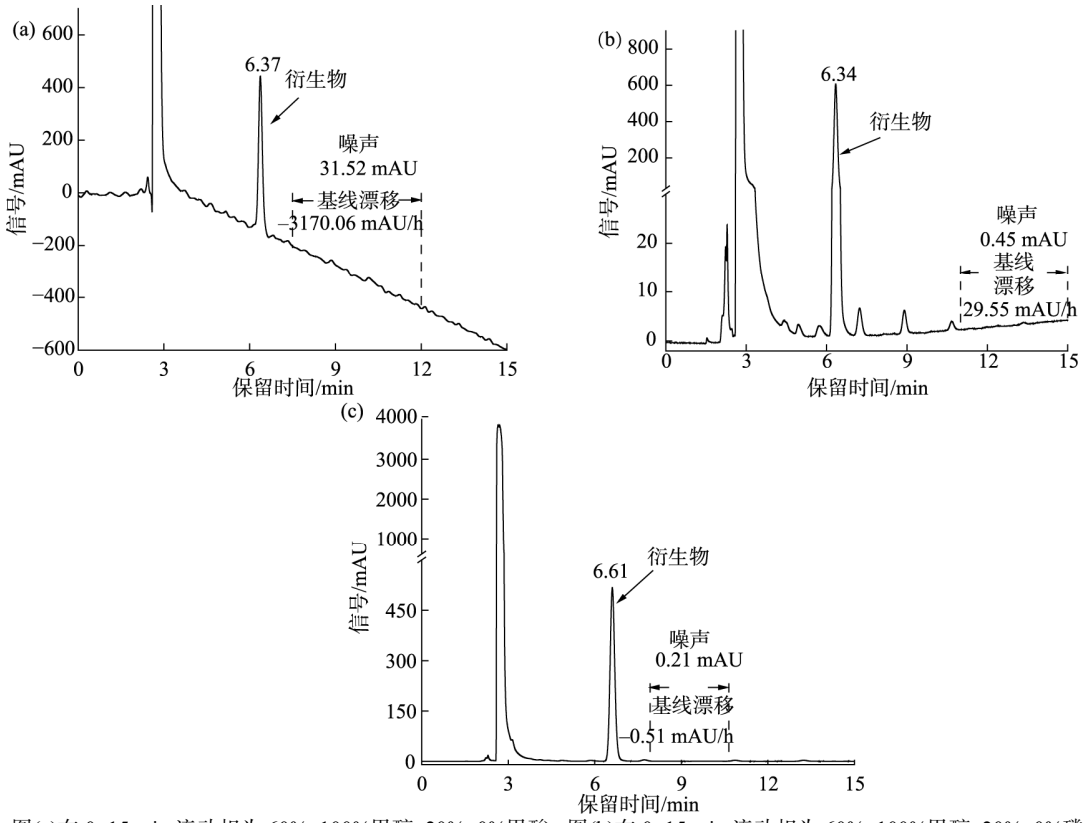
在定量检验检测中既要基线噪声和基线漂移同时保持相对稳定, 也需目标物与杂质色谱峰的完全分离。实验以含有氨基酸、生物胺等多种 GABA 与 DNS-Cl 衍生干扰物的广元酸菜发酵液为样品, 以优化后的衍生条件进行衍生处理, 先在 2.2.1 实验结果的基础上增大或减小甲醇在流动相中的比例, 以改善色谱分离效果。再将流动相 A 由甲醇改为乙腈, 以进一步优化色谱分离效果, 结果如图 7 所示。同时选取一标准溶液进行衍生, 对流动相调整后的基线再次进行了考察, 结果如图8 所示。



注: 在 0~15 min 流动相均为 30%~42%乙腈, 70%~58%磷酸。

图 5　氨水对衍生的影响

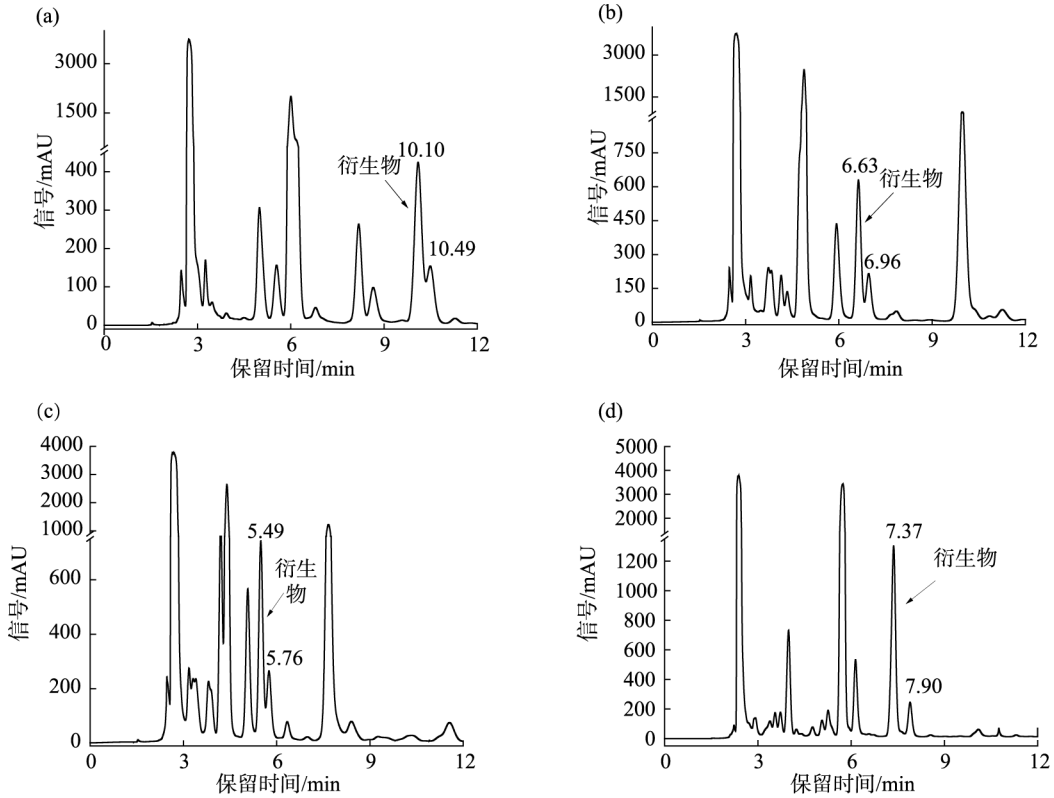
Fig.5　Effects of ammonia on derivation



注: 图(a)在 0~15 min 流动相为 60%~100%甲醇, 20%~0%甲酸; 图(b)在 0~15 min 流动相为 60%~100%甲醇, 20%~0%磷酸; 图(c)在 0~15 min 流动相为 60%甲醇, 40%磷酸(等度)。

图 6　不同流动相对基线的影响

Fig.6　Effects of different mobile phases on the baseline



注: 图(a)在 0~15 min 流动相为 60%甲醇, 40%磷酸(等度); 图(b)在 0~15 min 流动相为 55%甲醇, 45%磷酸(等度); 图(c)在 0~15 min 流动相为 65%甲醇, 35%磷酸(等度); 图(d)在 0~15 min 流动相为 30%~42%乙腈, 70%~58%磷酸。

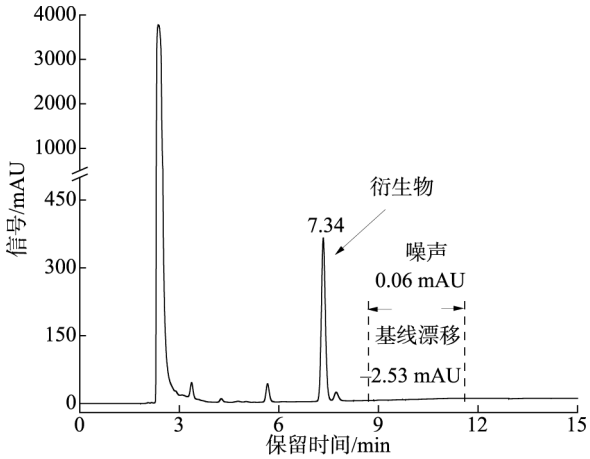
图 7 样品中衍生物分离效果优化

Fig.7 Optimization of derivative separation efficiency in the sample

由图 7(a)可知, 在 0~15 min、60%甲醇、40% 20 mmol/L 磷酸条件下, 样品中 GABA 与 DNS-Cl 衍生物(6.63 min)与干扰物(6.96 min)的色谱峰存在较大程度重叠, 分离效果较差。许芮菁等[28]在研究不同衍生剂对植物提取物及其制品中 GABA 测定的影响时也发现在文献报道的条件下目标物与杂质峰未分离, 需优化流动相比例。由于改变流动相比例可改变分离效果, 因此研究通过调整甲醇在流动相中的比例以改善分离效果。由图 7(b)和 7(c)可知, 无论将甲醇比例调大或调小均无法减小衍生物与干扰物色谱峰的重叠程度, 即分离效果无明显改善。由图 7(d)可知, 在将流动相 A 由甲醇改为乙腈后, 衍生物保留时间为 7.37 min, 峰型正常, 衍生物与干扰物(7.90 min)色谱峰完全分离, 且基线噪声和基线漂移均相对较小(图 8)。选择不同的有机溶剂不仅影响溶质的保留, 对分离选择性也有影响[24], 这与本研究结果一致。综上, 以 0~15 min、30%~42%乙腈、70%~58% 20 mmol/L 磷酸条件下, 既能使基线相对平稳, 又能将衍生物从复杂的样品完全分离。

2.2.3 衍生物最大吸收波长的考察结果

由于流动相组分的改变不仅会改变化合物的分离度, 也可能使目标物的最大吸收波长发生变化[25−26], 研究选取 100 mg/L 质量浓度的标准溶液进行衍生, 分别采用流动相组分改变前后的色谱参数进行光谱扫描, 以寻找衍生物的最大吸收波长并观察其变化, 结果如图 9 所示。



注: 在 0~15 min 流动相为 30%~42%乙腈, 70%~58%磷酸。

图 8 色谱参数优化后的基线

Fig.8 Baseline after optimized chromatographic conditions

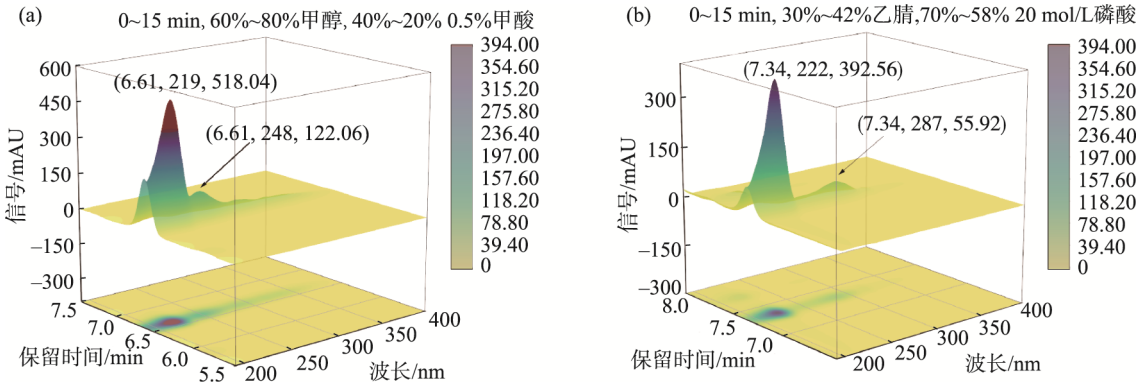


图 9　不同流动相下衍生物光谱扫描图

Fig.9　Spectralscans of derivatives under different mobile phases

由图 9(a)可知, 以甲醇为流动相 A 时衍生物有两个特征吸收峰, 分别在 219 nm 和 248 nm 处, 且 219 nm 处的特征峰远高于 248 nm 的特征峰, 即 λ_{max} 为 219 nm。而由图 9(b)可知, 以乙腈为流动相 A 时衍生物同样有两个特征吸收峰, 分别在 222 nm 和 287 nm 处, 且 222 nm 处的特征峰远高于 287 nm 处的特征峰, 即 λ_{max} 为 222 nm。进一步分析发现, 相较于甲醇作为流动相以乙腈作为流动相时衍生物的特征吸收峰出现了红移(219→222 nm, 248→287 nm)。以往研究也发现, 流动相成分的变化对目标物的影响较大, 不仅会改变化合物的分离度, 还会使吸收波长发生移动[25–26]。

2.2.4　衍生物的最适检测波长

一般选择被分析物的最大吸收波长为检测波长, 以获得最大的灵敏度和抗干扰能力[24], 研究以上述优化后的衍生条件和色谱参数为基础, 对各标准溶液进行衍生并采集色谱数据, 以验证 λ_{max}(222 nm)波长下的线性回归决定系数(R^2)、灵敏度、检出限(3S/N)及基线噪声是否优于文献报道的检测波长(216、222、254、287、331 和 386 nm), 结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 各波长下衍生物浓度与峰面积的线性回归决定系数均能达到 0.9999; 基线噪声随波长增大呈先减后增的趋势, 以 216 nm 下最大、254 nm 下最小; 以 222 nm 下的斜率最大, 为 3.831; 以 222 nm 下检出限最低, 为 0.023 mg/L。斜率越大, 衍生物相同浓度的变化引起的峰面积变化越大, 即灵敏度越高[24]。综上, 在 222 nm 下线性回归决定系数与其他波长相当, 但灵敏度和检出限均优于其他波长, 且基线噪声适中, 即以 λ_{max}(222 nm)为衍生物的最适检测波长。

2.3　方法学验证

2.3.1　方法的线性范围、检出限和定量限

基于 2.2.4 最适波长下的测定数据, 以标准溶液质量浓度作为横坐标(X, mg/L), 峰面积为纵坐标(Y), 考察在 0.05~100.00 mg/L 质量浓度范围内的线性方程及其相关系数, 以 S/N=3 时对应的样品的质量浓度为计算检出限, 以 S/N=10 时对对应的样品的质量浓度为计算定量限。在 0.05~100.00 mg/L 质量浓度范围内呈现良好的线性关系(r^2=0.99999), 线性方程为: Y=3.831X+0.092, 检出限为 0.074 μg/mL, 定量限为 0.241 μg/mL。该方法相较于潘玲等建立的 HPLC-DAD 测定植物源性食品中 GABA 的线性范围(1.092~131.064 μg/mL)更宽[14], 比刘宗乐等[29]建立的 HPLC-DAD 测定乳酸菌发酵液中 GABA 的检出限(0.02 μg/mL)略高, 但远低于 Marija 等[30]建立的 HPLC-DAD 测定老鼠脑匀浆中 GABA 的检出限(0.26 μg/mL)。

2.3.2　加标回收率和精密度

基于上述优化后的衍生条件和色谱参数, 对经适当稀释的酸菜发酵液(GABA 质量浓度在 10~20 mg/L)加标后进行衍生处理, 加标的 GABA 质量浓度设置为 10(低)、40(中)、80 mg/L(高), 以考察方法的加标回收率及精密度,。

表 1　各波长下衍生物的相关参数

Table 1　Relevant parameters of derivatives at various wavelengths

波长/nm	基线噪声/mAU	斜率	R^2	检出限/(mg/L)
216	0.1194	3.016	1.00000	0.031
222	0.0604	3.831	0.99999	0.023
254	0.0406	0.323	1.00000	0.343
287	0.0458	0.543	0.99999	0.236
331	0.0517	0.070	0.99999	1.915
386	0.0723	0.013	0.99993	16.781

3 个加标水平下平均回收率分别为 87.02%、107.25%、86.85%，相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 3.49%、2.78%、2.34%，满足 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》要求(加标浓度>100 μg/kg，≤1000 mg/kg，则回收率应在 80%~110%；样品中目标物浓度>100 μg/kg，≤10 g/kg，则精密度应≤10%)，因此经优化后的方法准确度和精密度良好，分析方法可靠。

2.3.3 稳定性

为明确酸菜发酵液和标准溶液中 GABA 的稳定性，研究对不同存放时间和条件的样品中 GABA 进行测定，以便严格控制检验检测质量，结果如图 10 所示。

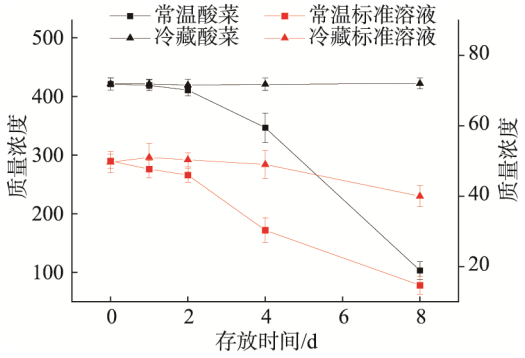


图 10 酸菜样品和标准溶液的稳定性

Fig.10 Stability of pickled chinese cabbage samples and standard solutions

由图 10 可知，在冷藏条件下酸菜发酵液中 GABA 含量随存放时间增加无明显变化，而在常温条件下随时间增加而明显减小。说明冷藏条件下酸菜发酵液中的 GABA 较为稳定，而常温条件下不稳定，这可能是由于常温下酸菜出现了变质导致，实验过程中也发现第 4 d、8 d 的酸菜出现了明显的恶臭。在常温下标液中 GABA 的含量随时间增加而逐渐减小，而在冷藏下 GABA 的含量相对稳定，但第 8 d 时仍出现明显减小。说明 GABA 标准溶液稳定性较差，不宜常温存放且冷藏存放时间也不宜过长。

2.4 实际样品检测

取 10 份酸菜发酵液，在 2.1 的条件下衍生，按照 2.2 参数测定，样品中 GABA 含量超出线性范围时进行适当稀释后重测，平行 3 次。经测定，酸菜发酵液中 GABA 含量在 22.35~418.37 mg/kg 范围内。

3 结 论

本研究对 HPLC-DAD 结合 DNS-Cl 柱前衍生测定 GABA 的衍生条件和色谱参数进行了优化。衍生条件优化结果表明，GABA 与 DNS-Cl 衍生反应以 $NaHCO_3$-Na_2CO_3 为缓冲体系、45 ℃水浴衍生反应 5 min、不加氨水时衍生效果最佳，同时在检测酸菜发酵液时需将样品 pH 调节至 10 以上。色谱参数优化发现，流动相以 0~15 min、30%~42%乙腈、70%~58% 20 mmol/L 磷酸条件下，既能使基线相对平稳，又能将衍生物从复杂的样品中完全分离；该流动相下的 λ_{max} 为 222 nm，且 λ_{max} 为最适检测波长；同时发现流动相中有机相由甲醇变为乙腈时会导致最大吸收波长红移。方法学考察显示，优化后的方法在 0.05~100.00 mg/L 质量浓度范围内呈现良好的线性关系(r^2=0.99999)，方法检出限为 0.074 μg/mL，方法定量限为 0.241 μg/mL，加标回收率为 87.02%~107.25%，RSD 为 3.49%~2.34%；另外发现，GABA 稳定性较差，即使冷藏也不宜长时间贮存。综上所述，本研究通过系统性优化，建立了一种灵敏度高、检出限低、准确度与精密度良好的 GABA 检测方法，明确了影响检验检测结果的关键点，提高了检测方法的稳定性和准确性，可为相关检验检测方法标准的制修订提供参考。

参考文献

[1] Steward F C, Thompson J F, Dent C E J S. γ-Aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber? [J]. Science, 1949, 110(2861): 439–440.

[2] Hou Dianzhi, Tang Jian, Feng Qiqian, et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA): a comprehensive review of dietary sources, enrichment technologies, processing effects, health benefits, and its applications [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(24): 8852–8874.

[3] 张芳, 耿思奕, 韩华凤, 等. 食醋中 γ-氨基丁酸的检测及变化规律研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 197–204.
Zhang Fang, Geng Siyi, Han Huafeng, et al. Study on detection and changing rules of γ-aminobutyric acid in vinegar [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(9): 197–204.

[4] Sakthivel K, Balasubramanian R, Sampathrajan V, et al. Transforming tomatoes into GABA-rich functional foods through genome editing: a modern biotechnological approach [J]. Functional & Integrative Genomics, 2025, 25(1): 27–38.

[5] Jiang Chengji, Chen You, Sun Tao. From the gut to the brain, mechanisms and clinical applications of γ-aminobutyric acid (GABA) on the treatment of anxiety and insomnia [J]. Frontiers in Neuroscience, 2025, 19: 1570173.

[6] Barakat H, Aljutail Y T. Role of γ-aminobutyric acid (GABA) as an inhibitory neurotransmitter in diabetes management: mechanisms and therapeutic implications [J]. Biomolecules, 2025, 15(3): 399.

[7] Zhang Qingli, Zhu Lei, Li Hailong, et al. Insights and progress on the biosynthesis, metabolism, and physiological functions of gamma-aminobutyric acid (GABA): a review [J]. Peerj, 2024, 12: e18712.

[8] 国家卫生健康委. 关于批准 γ-氨基丁酸、初乳碱性蛋白、共轭亚油酸、共轭亚油酸甘油酯、植物乳杆菌(菌株号 ST-III)、杜仲籽油为新资源食品的公告(2009 年第 12 号)[EB/OL]. (2009-10-10) [2026-07-07]. https://www.nhc.gov.cn/sps/c100088/200910/35d4c27c984940f8a41454e820b6e968.shtml.
National Health Commission of the People's Republic of China. Announcement on approving γ-aminobutyric acid, colostrum basic protein, conjugated linoleic acid, conjugated linoleic acid glyceride, *Lactobacillus plantarum* (Strain ST-III), and *Eucommia ulmoides* seed oil as new resources of food (No.12, 2009) [EB/OL]. (2009-10-10) [2026-07-07]. https://www.nhc.gov.cn/sps/c100088/200910/35d4c27c984940f8a41454e820b6e968.shtml.

[9] 郭超, 刘芳, 刘玉春, 等. 复合菌株固态发酵对脱脂米糠 γ-氨基丁酸产量及功能活性的影响[J/OL]. 食品与发酵工业, 2025-12-05.

https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.044012.
Guo Chao, Liu Fang, Liu Yuchun, et al. Effects of solid-state fermentation with mixed strains on γ-aminobutyric acid production and functional activities of defatted rice bran [J/OL]. Food & Fermentation Industries, 2025-12-05. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.044012.

[10] 苗雪雪, 苗莹, 旷娜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定稻米和米糠中 γ-氨基丁酸含量及相关性分析[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(1): 152–156.
Miao Xuexue, Miao Ying, Kuang Na, et al. Determination of γ-aminobutyric acid in rice and rice bran by HPLC-MS /MS and its correlation analysis [J]. Cereals & Oils, 2023, 36(1): 152–156.

[11] Araslanova A, Bessonova E, Platonova N, et al. Investigation of amino acid profiles in GABA tea from the 'Colchida' cultivar: production and analytical method optimization using HPTLC and HPLC-DAD [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2025, 141: 107341.

[12] 周俊萍, 徐玉娟, 温靖, 等. γ-氨基丁酸(GABA)的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 393–401.
Zhou Junping, Xu Yujuan, Wen Jing, et al. Research progress of γ-aminobutyric acid (GABA) [J]. Science & Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 393−401.

[13] Tufail T, Ul Ain H B, Virk M S, et al. GABA (γ-aminobutyric acid) enrichment and detection methods in cereals: unlocking sustainable health benefits [J]. Food Chemistry, 2025, 464: 141750.

[14] 潘玲, 顾海华, 王煜博, 等. 高效液相色谱法测定植物源性食品中 γ-氨基丁酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 206–214.
Pan Ling, Gu Haihua, Wang Yubo, et al. Determination of γ-aminobutyric acid content in foods of plant origin by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 206–214.

[15] 吴蓉, 周玮, 何慧园. 高效液相色谱法测定固体饮料中 γ-氨基丁酸含量[J]. 食品工程, 2016(4): 59–63.
Wu Rong, Zhou Wei, He Huiyuan, et al. HPLC analysis of γ-aminobutyric acid in solid beverages [J]. Food Eegineering, 2016(4): 59–63.

[16] 刘四磊, 赵允, 戴绚丽, 等. 高效液相色谱法测定饮料中 γ-氨基丁酸含量的不确定度评定[J]. 饮料工业, 2017, 20(4): 5–10.
Liu Silei, Zhao Yun, Dai Xuanli, et al. Uncertainty evaluation for the determination of γ-aminobutyric acid in beverages by HPLC [J]. The Beverage Industry, 2017, 20(4): 5–10.

[17] Liu Tiebing, Li Bobin, Zhou Yifeng, et al. HPLC determination of γ-aminobutyric acid in Chinese rice wine using pre-column derivatization [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(1): 163–166.

[18] Liu Sijin, Xu Juanjuan, Ma Changlu, et al. A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC [J]. Food Chemistry, 2018(266): 275–283.

[19] 刘铁兵, 龚金炎, 朱银邦, 等. 柱前衍生化法农产品中 γ-氨基丁酸的检测方法研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 118–121, 128.
Liu Tiebing, Gong Jinyan, Zhu Yinbang, et al. Study on the determination method of γ-aminobutyric acid in agricultural products by pre-column derivatization [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(10): 118–121, 128.

[20] 司阔林, 徐捐捐, 岳田利, 等. 布氏乳杆菌产 γ-氨基丁酸发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 87–93.
Si Kuolin, Xu Juanjuan, Yue Tianli, et al. Optimization of fermentation conditions for γ-aminobutyric acid production by *Lactobacillus buchneri* [J]. Food Science, 2020, 41(2): 87–93.

[21] 王能凤. 红枣 γ-氨基丁酸测定方法的优化及应用研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022: 9–20.
Wang Nengfeng. Research on optimization and application of determination method of γ-aminobutyric acid in Jujube [D]. Alae: Tarim University, 2022: 9–20.

[22] 周婷, 程威威, 林亲录, 等. 丹磺酰氯柱前衍生发芽糙米中 γ-氨基丁酸的 HPLC 分析[J]. 食品科技, 2014, 39(1): 282–286.
Zhou Ting, Cheng Weiwei, Lin Qinlv, et al. HPLC analysis of γ-aminobutyric acid in germinated brown rice by pre-column derivatization with dansyl chloride [J]. Food Science, 2014, 39(1): 282–286.

[23] 马莉, 刘慧燕, 方海田, 等. 产 γ-氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 94–100.
Ma Li, Liu Huiyan, Fang Haitian, et al. Isolation and identification of γ-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and optimization of fermentation conditions [J]. China Brewing, 2022, 41(7): 94–100.

[24] 张玉奎. 分析化学手册 6 液相色谱分析[M]. 第三版. 北京: 化学工业出版社, 2016: 98–105.
Zhang Yukui. Handbook of analytical chemistry: Vol.6, liquid chromatography analysis [M]. 3th ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 98–105.

[25] 刘秀华, 李东旭, 蔺金贤, 等. HPLC-DAD 法分析硝基化合物的影响因素[J]. 分析试验室, 2017, 36(3): 329–334.
Liu Xiuhua, Li Ddongxu, Lin Jinxian, et al. Factors affecting the analysis of nitro compounds by HPLC-DAD [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2017, 36(3): 329–334.

[26] 毕富春, 吴国旭, 翟立红. 不同流动相对化合物最大吸收波长的影响[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(1): 42–45.
Bi Fuchun, Wu Guoxu, Zhai Lihong. Effects of different mobile phases on the maximum absorption wavelength of compounds [J]. Pesticide Science and Administration, 2012, 33(1): 42–45.

[27] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 第三版. 北京: 化学工业出版社, 2019: 234.
Yu Shilin. Methods and applications of high-performance liquid chromatography [M]. 3th ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2019: 234.

[28] 许芮菁, 刘锐. 不同衍生剂对植物提取物及其制品中 γ-氨基丁酸测定的影响[J]. 化学研究与应用, 2025, 37(2): 263–272.
Xu Ruijing, Liu Rui. Effect of different derivatization reagents on the determination of γ-aminobutyric acid in plant extracts and their products [J]. Chemical Research and Application, 2025, 37(2): 263–272.

[29] 刘宗乐, 高林森, 张东东, 等. 高效液相色谱法测定乳酸菌发酵液中 γ-氨基丁酸[J]. 中国酿造, 2022, 41(11): 233–238.
Lin Zongle, Gao Linsen, Zhang Dongdong, et al. Determination of γ-aminobutyric acid in lactic acid bacteria fermentation broth by HPLC [J]. China Brewing, 2022, 41(11): 233–238.

[30] Marija S G, Nikola M S, Marko Z M, et al. An HPLC-based assay for improved measurement of glutamate decarboxylase inhibition/activation [J]. Neurochemistry International, 2022, 161: 105433.

(责任编辑: 蔡世佳　韩晓红)