

文章编号:1009-038X(2004)02-0101-03

纸层析法定量测定米胚芽中的 γ -氨基丁酸

张 晖, 徐 永, 姚惠源

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 通过对点样量、展开体系、显色方法等研究, 解决了利用纸层析法定量测定 γ -氨基丁酸误差大、重现性差的问题, 从而建立了以纸层析法定量测定 γ -氨基丁酸的方法. 结果表明, 此法定量测定 γ -氨基丁酸简单易行, 耗费低廉, 可作为食品中 γ -氨基丁酸分析测定的手段.

关键词: γ -氨基丁酸; 纸层析; 定量测定

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

Quantitative Determination of γ -Aminobutyric Acid in Rice Germ with Paper Chromatography

ZHANG Hui, XU Yong, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The accuracy and repeatability in γ -aminobutyric acid (GABA) determination with paper chromatography method were improved by means of the sample dose, the developer and the color reaction. The quantitative technique for detecting GABA with paper chromatography-mottle elution method was established. The results showed that this method was simple, cheap and was suggested as a conventional method for detecting GABA.

Key words: γ -aminobutyric acid; paper chromatography; quantitative determination

γ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白质氨基酸, 为哺乳动物中枢神经系统内重要的氨基酸类神经递质; 它广泛存在于植物以及植物的各个部分中, 在植物的抗逆境中起着一定的作用^[1]. 大米加工副产品——米胚芽中含有谷氨酸脱羧酶, 可将谷氨酸转化为 GABA, 从而使 GABA 得到富集. 因此将米胚芽经适当处理后, 可以得到富含 GABA 的食品配料, 应用于功能食品中. 1994 年, 日本农林水产省中国农业试验场成功开发了富含 GABA 的米胚芽^[2]. 动物实验表明, 富含 GABA 的米胚芽具有降血压、改善肝、肾功能、促进乙醇代谢等功效^[3]. 近

年来, GABA 在食品中的应用研究正在兴起, 而食品中 GABA 测定方法的报道尚不多见.

由于 GABA 对电化学和紫外、可见光的不灵敏性, 用直接方法对它进行测定比较困难. 关于 GABA 的测定近年来国内外有酶法^[4]、色质联用法、柱层析荧光测定法、纸电泳比色、毛细管气相色谱法^[5]、放射性受体法^[6]、毛细管电泳法^[7], 以及液相色谱法^[8, 9]等, 这些方法大多用于医学领域, 且价格昂贵, 不适用于大量的定量分析. 因此, 本实验在进行米胚芽富集 GABA 工艺参数的筛选、优化中, 研究了纸层析法对 GABA 的定量分析, 确定

收稿日期: 2003-07-10; 修回日期: 2003-08-31.

作者简介: 张晖(1966-), 女, 上海人, 副教授.
万方数据

了点样量、展开系统、洗脱系统、比色测定的一套分析方法,并对此法的精密度、回收率等进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1) GABA 购自美国 Fluka 公司。

2) 展开剂: $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$, 0.1 g/dL 茛三酮; $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$, 0.2 g/dL 茛三酮; $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$, 0.3 g/dL 茛三酮; $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$, 0.4 g/dL 茛三酮; $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$, 0.5 g/dL 茛三酮。

3) 洗脱剂: $V(1 \text{ g/L 硫酸铜}) : V(\text{体积分数 } 75\% \text{ 乙醇}) = 2 : 38$

4) 其它: 层析纸、层析缸、722 型分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 测定米胚芽中原有 GABA 时,将米胚芽用 80 °C 的水提取 2 h,离心分离后取上清液直接点样测定。测定米胚芽富集 GABA 后的含量时,将不同工艺富集的米胚芽液于沸水中煮沸 5 min,离心分离,取上清液测定。

1.2.2 GABA 含量测定 吸取 5~8 μL 样品,点样线距滤纸 2.0 cm,样品间距 2.0 cm。将点样后的滤纸条在展开剂中展开、风干显色,将与标准品位置一致的斑点剪下,用洗脱液洗脱,520 nm 处比色测定。

2 结果与讨论

2.1 展开剂和显色剂体积分数的选择

关于纸层析法定量测定氨基酸,不同文献使用了不同的展开剂和配比,但没有专门分离 GABA 的报道,作者选择了几种展开剂配方,发现展开剂 $V(\text{正丁醇}) : V(\text{醋酸}) : V(\text{水}) = 4 : 1 : 3$ 时,能够很好地将 GABA 与其它氨基酸分离。

为了克服传统喷雾显色造成的重现性差、定量不准确的缺点,作者改进了显色方法,将一定量的茛三酮溶解于展开剂中,在展开过程中,茛三酮随着展开剂沿滤纸向上移动,由于固定了显色剂的量,使测定结果更准确。不同质量浓度的茛三酮显色,洗脱后比色结果显示,0.4 g/dL 的质量浓度较为合适(见表 1)。

2.2 显色温度和时间的选择

为了定量的准确性和重现性,减少操作引起的

误差,应将显色温度和洗脱时间确定下来。将点有 GABA 标准品层析纸展开后放入烘箱,在 80, 90, 100, 110 °C 分别显色 10, 20, 30, 40 min,剪下显色斑点洗脱比色,结果见表 2。

表 1 不同茛三酮质量浓度显色的结果

Tab. 1 Effect of the concentrations of ninhydrin on absorbency

茛三酮质量浓度/(g/dL)	OD _{520 nm}
0.1	0.24
0.2	0.28
0.3	0.30
0.4	0.35
0.5	0.36

表 2 不同显色温度对 OD 值的影响

Tab. 2 Effect of the chromogenic temperature on absorbency

时间/min	温度/°C			
	80	90	100	110
10	0.232	0.239	0.231	0.230
20	0.234	0.240	0.232	0.232
30	0.233	0.238	0.230	0.231
40	0.232	0.239	0.231	0.229

由表 2 可见,温度低于 90 °C,洗脱液的 OD 值偏低,可能由于 GABA 显色不完全所致。当温度高于 90 °C 时,洗脱液的 OD 值也偏低,并且不太稳定,可能是由于温度过高,GABA 与茛三酮的反应物与层析纸结合牢固,不能被洗脱下来在洗脱液中形成铜的络合物。因此,选择显色温度和时间为 90 °C, 10 min。

2.3 颜色稳定性确定

由图 1 可知,茛三酮和 GABA 反应物的洗脱液在放置超过 1 h 时,OD 值明显下降。洗脱液在 10~50 min 内颜色较稳定,在这个时间范围内,可以采用茛三酮比色法定量测定 GABA 含量。

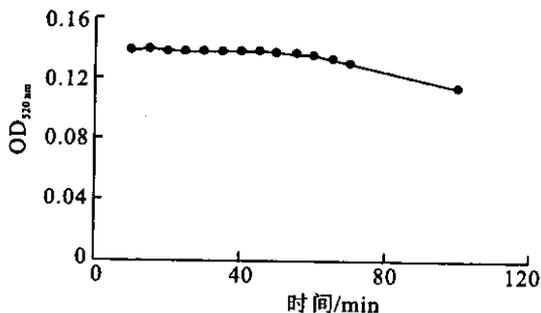


图 1 放置时间对 OD 值的影响

Fig. 1 Effect of the staying time on absorbency

2.4 测定范围的确定

由图 2 可见, 当点样量在 8~40 μg 时, 洗脱液的吸光度值与 GABA 的量呈线性关系, 可在此范围内绘制标准曲线, 定量测定 GABA 质量. 标准曲线显示, GABA 质量与吸光度之间关系密切, 其相关系数 $R^2=0.9986$, 由此可以推出米胚芽富集液中 GABA 质量的计算公式为

$$x = 8.4358A - 0.3788$$

式中: x 为米胚芽富集液中 GABA 质量; A 为吸光度值.

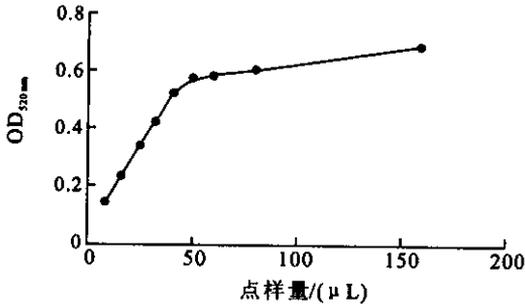


图 2 GABA 质量与吸光度值的关系曲线

Fig. 2 Correlation curve of GABA content and absorbency

2.5 精密度测定

取标准品 10 μL 重复点样测定 ($n=5$), 结果

OD_{520nm} 值分别为: 0.361, 0.355, 0.351, 0.356, 0.354, 计算所得相对标准偏差为 0.79%.

2.6 回收率测定

样品按方法 1.2.1 处理, 取 10 μL 滤液点样, 对样品进行回收实验, 回收率为 96.6%~101.6%, 结果见表 3.

表 3 样品测定结果及回收率

Tab. 3 Result of sample determination and recovery

样品	测定值 质量浓度/ (mg/mL)	外标加入量 质量浓度/ (mg/mL)	加外标后 质量浓度/ (mg/mL)	回收 率/%
1	1.789	1.000	2.834	101.6
2	1.789	1.000	2.694	96.6
3	1.789	1.000	2.769	99.3
4	2.050	2.000	4.039	99.7
5	2.050	2.000	4.061	100.3
6	2.050	2.000	4.018	99.2

根据测定结果, 米胚芽中 γ -氨基丁酸质量分数由富集前的 30.1 mg/hg 提高到了 439 mg/hg, 可作为食品配料应用于调节血压等保健食品中. 本实验建立的米胚芽中 γ -氨基丁酸分离、测定的纸层析方法, 简便易行, 耗费低廉, 可广泛应用于其它食品分析.

参考文献:

- [1] 田小磊, 吴效岚, 张蜀秋, 等. γ -氨基丁酸在高等植物逆境反应中的作用[J]. 生命科学, 2002, 14(4): 215-219.
- [2] Saikusa T. Accumulation of gamma aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58(12): 2291-2292.
- [3] 冈田忠司. GABA 富化工米胚芽の生理機能[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 7-9.
- [4] 胡红焱, 杨树德. 细菌荧光法酶生物发光分析法测定血清 γ -氨基丁酸[J]. 临床检验杂志, 1998, 16(2): 67-69.
- [5] 徐小平, 郭平, 宋玉如, 等. 脑内 γ -氨基丁酸的毛细管气相色谱测定法[J]. 华西药理学杂志, 1990, 5(2): 107-109.
- [6] Nahorski SR. A radioreceptor assay using 3H-muscimol for GABA in Human CSF[J]. *Br J Pharmacol*, 1981, 72: 16.
- [7] 朱珠. 递质氨基酸的毛细管电泳-安培检测[J]. 分析测试学报, 1999, 18(4): 36-38.
- [8] Lindroth P, Mopper K. High-performance liquid chromatography determination of subpicomole of amino acids by fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde[J]. *Anal Chem*, 1975, 51(10): 1667-1669.
- [9] Liu HJ. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr*, 1994, 670(1): 59-62.

(责任编辑: 杨 勇)