

茶叶中 γ -氨基丁酸提取、分离及薄层扫描测定的研究

郑红发¹, 黄亚辉^{2,*}, 黄怀生¹, 粟本文¹, 袁英芳¹

(1. 湖南省茶叶研究所, 湖南 长沙 410125 2. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 对茶叶中 γ -氨基丁酸的提取、分离及检测方法进行了研究, 分别采用水和乙醇作为提取溶剂, 结果发现用水提取能达到更好的效果, γ -氨基丁酸含量提高 20%; 同时采用离子交换树脂对 γ -氨基丁酸提取液进行分离, 提取液上 732 阳离子树脂柱(2.5 × 50 cm), 使用柠檬酸和氨水缓冲液进行 pH 线性梯度洗脱, 洗脱液中 γ -氨基丁酸最高浓度达 39%; 采用薄层扫描仪对 γ -氨基丁酸的含量进行检测, 研究并确定了检测的条件及参数。

关键词: γ -氨基丁酸; 提取; 分离; 测定

Study on Extraction and Determination of γ -Aminobutyric Acid in Tea

ZHENG Hong-fa¹, HUANG Ya-hui^{2,*}, HUANG Huai-sheng¹, SU Ben-wen¹, YUAN Ying-fang¹

(1. Huan Tea Research Institute, Changsha 410125, China;

2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The method has been studied to extract isolate and determine the γ -aminobutyric acid in tea. Taking water or alcohol as solvent, it was discovered that water can achieve a better effect with, γ -aminobutyric acid content to be enhanced 20%. With the ion exchange resin for isolation and 732 positive ions resin columns (2.5 × 50 cm) for adsorption, and citric acid and ammonia water as buffer liquids, so as to carry on pH linear gradient elution the results indicated that the γ -aminobutyric acid concentration can reach roughly 39%. By thin layer scanner to continue the mensuration, the assaying conditions and parameters can be determined.

Key words: γ -aminobutyric acid; extract; separate; determine

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0347-05

γ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白质氨基酸, 广泛存在于哺乳动物脑和脊髓中, 是一种重要的抑制性神经传递物质, 具有极强的生理活性。已有的研究表明^[1-2], γ -氨基丁酸具有激活脑内葡萄糖代谢、促乙酰胆碱合成、降血氨、抗惊厥、降血压、恢复脑细胞的功能等多种药理作用。由于 γ -氨基丁酸独特的药理作用, 富含 γ -氨基丁酸的植物资源越来越引起科研人员的高度重视, 发芽糙米^[3-4]、高 γ -氨基丁酸茶^[5-6]等产品已经成为比较成熟的富含 γ -氨基丁酸的保健食品。黄亚辉等^[7-8]对高 γ -氨基丁酸茶加工过程中 γ -氨基丁酸的动态变化及其他游离氨基酸的变化进行了深入的研究, 探明了其变化规律, 为高 γ -氨基丁酸茶的加工提供了理论支持。虽说研究人员对提高植物资源中 γ -氨基丁酸的

含量进行了大量卓有成效的研究^[9], 对 γ -氨基丁酸的测定研究报道也较多^[10-12], 但是对从植物资源中分离 γ -氨基丁酸的研究报道较少, 本实验对茶叶中 γ -氨基丁酸的提取、分离及检测方法进行了研究探索。

1 材料与方法

1.1 仪器

日本岛津 CS-9000 型薄层扫描仪; 点样毛细管(5 μ l); 旋转蒸发仪上海亚荣生化仪器厂; ED2140 电子分析天平; LGJ-12 多歧管压盖型冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; GL-12M 高速冷冻离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; Φ 2.5 cm × 50 cm 玻璃层析柱。

1.2 材料与试剂

收稿日期: 2007-04-15

基金项目: 国家科技攻关计划项目(2001BA525L-18)

作者简介: 郑红发(1975-), 男, 助理研究员, 研究方向为茶叶加工与利用。E-mail: zhenghongfa11@sina.com

* 通讯作者: 黄亚辉(1969-), 男, 研究员, 博士研究生, 研究方向为茶叶生化及药用植物。E-mail: yahuihuangzz@126.com

样品1(普通加工的茶叶);样品2(湖南省茶叶研究所实验生产的高 γ -氨基丁酸茶叶)。样品粉碎,分别装入干燥的磨口瓶中; γ -氨基丁酸标准品 湖南省生物制品检定所;薄层层析硅胶G 青岛海洋化工有限公司;水合茚三酮(AR)西德进口分装;正丁醇(AR)国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸(AR)上海试剂一厂;732树脂 南开大学化工厂;其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 γ -氨基丁酸提取

1.3.1.1 水提取法

茶粉50g→加去离子水400ml→55℃浸提2h→过滤→保留滤液;滤渣→加去离子水400ml→55℃浸提3h→过滤→合并滤液;滤渣→去离子水300ml→55℃浸提2h→过滤→合并滤液;滤渣弃掉→55℃减压浓缩至50ml→离心(5000r/min)15min→清液加无水乙醇100ml→静置3h→过滤→去乙醇→取上层清液,保留待用。

1.3.1.2 乙醇提取法

茶样50g→加70%乙醇400ml→浸提2h→过滤→保留滤液;滤渣→加70%乙醇400ml→浸提3h→过滤→合并滤液;滤渣→70%乙醇300ml→浸提2h→过滤→合并滤液;滤渣弃掉→55℃减压浓缩至50ml→离心(5000r/min)15min→取上层清液,保留待用。

1.3.2 γ -氨基丁酸薄层检测实验

1.3.2.1 展开剂的选择

展开剂的选择采用纸层析法对展开剂系统进行考察,将点好样品(水提液)的滤纸板,分别放进加有叔丁醇:乙酸:水(7:3:1 V/V);正丁醇:醋酸:水(7:3:1 V/V);正丁醇:醋酸:水(4:1:1 V/V);正丁醇:醋酸:水(7:5:1 V/V)的不同溶剂系统的层析缸中进行单向展开。同时也采用双向展开法对①正丁醇:甲乙酮:水:28%氨水(25:15:7:3 V/V),正丁醇:乙酸:水(4:1:5 V/V);②叔丁醇:乙酸:水(7:3:1 V/V),苯酚:氨水(1:1 V/V);③正丁醇:乙酸:水(4:1:5 V/V),间苯酚:苯酚(1:1 V/V)三组展开溶剂系统进行考察。

1.3.2.2 扫描波长对的确定

取 γ -氨基丁酸标准品,加蒸馏水溶解配成1mg/ml的标准溶液,分别吸取标准品溶液1 μ l点于自制的硅胶G薄层板上,以正丁醇:醋酸:水体积比4:1:1为展开剂,取出晾干后用体积分数0.2%茚三酮乙醇溶液显色,105℃烘数分钟,直至获最大斑点,进行不同波长的薄层扫描。

1.3.2.3 回收率和精密度

准确称取已知含量的样品约1.0g,分别加入浓度为1.0mg/ml的对照品溶液3、5和8ml,并按样品测定方法点样、展开、显色烘干后扫描,测定其含量。

1.3.2.4 检测限和线性范围

在硅胶板上分别点样 γ -氨基丁酸标准溶液,浓度分别为0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、12、15 μ g/ μ l,按薄层层析条件展开,显色烘干后扫描测定。

1.3.2.5 不同提取方法 γ -氨基丁酸的含量测定

分别取水提液和乙醇提取液各1 μ l,在硅胶G板上点样,然后放入层析缸中展开,显色烘干测定色斑面积。

1.3.3 732阳离子交换树脂吸附 γ -氨基丁酸实验

1.3.3.1 吸附量的测定

准确称取预处理好的树脂5.0g,装入具塞磨口三角瓶中,准确加入已知浓度的 γ -氨基丁酸粗提液20ml,恒温水浴振荡24h,充分吸附后,过滤,测定溶液中 γ -氨基丁酸的浓度(采用HPLC法^[13])。同时按照下式计算各种树脂的吸附量。

$$\text{吸附量 (mg/g)} = \frac{\text{吸附液初始浓度} - \text{吸附液最后浓度 (mg/ml)}}{\text{树脂质量 (g)}} \times \text{溶液体积 (ml)}$$

1.3.3.2 解吸率的测定

准确称取按照测定吸附量处理好的树脂5.0g,准确加入50ml 95%(V/V)的乙醇,恒温水浴振荡24h,过滤,测定滤液中 γ -氨基丁酸的浓度(采用HPLC法^[13]),按照下式计算各种树脂的解吸率。

$$\text{解吸率 (\%)} = \frac{\text{解吸液体积 (ml)} \times \text{解吸液浓度 (mg/ml)}}{\text{树脂质量 (g)} \times \text{吸附率 (mg/g)}} \times 100\%$$

1.3.3.3 静态吸附动力学特性测定

准确称取阳离子交换树脂5.0g,装入具塞三角瓶中,准确加入已知浓度的 γ -氨基丁酸茶粗提液50ml,恒温水浴振荡,在12h内,每小时取0.5ml测定其 γ -氨基丁酸含量(采用HPLC法^[13]),绘制静态吸附动力学曲线。

1.3.3.4 阳离子交换树脂动态吸附以及洗脱实验

通过阳离子交换树脂对 γ -氨基丁酸茶粗提液的静态吸附实验,对筛选出的阳离子交换树脂进行动态吸附实验,包括洗脱流速、上样液体的pH值和上样液体的浓度。将预处理好的阳离子交换树脂装入玻璃层析柱中,将 γ -氨基丁酸茶粗提液上柱,控制一定的流速,分步收集(2ml/试管),当流出液出现与标准品同一直线上的斑点时,认为已经有 γ -氨基丁酸透过,停止上样,然后按照不同pH(3.0、4.0、5.0、6.0和8.0~9.0)洗脱液进行洗脱,分步收集。按照下式计算吸附量。

$$\text{吸附量 (mg)} = \text{上样液浓度 (mg/ml)} \times \text{流出液体积 (ml)}$$

1.3.4 γ -氨基丁酸分离、纯化实验

1.3.4.1 732阳离子交换树脂的处理

取732阳离子树脂约100ml,装入2.5×50cm的柱

子中,用2mol/L的HCl 200~300ml冲洗,再用蒸馏水洗至中性,接着用2mol/L的NaOH 200~300ml冲洗用蒸馏水洗至中性,然后再用2mol/L的HCl 200~300ml冲洗,最后用蒸馏水洗至中性即可以,整个冲洗流速控制在3.0ml/min。

1.3.4.2 过柱

取样品2提取液(水提取法)40ml,调溶液pH3,过732离子交换柱,用pH为3、4、5、6的柠檬酸缓冲液和0.25mol/L氨水,0.5mol/L氨水各80ml依次洗脱,流速控制在3ml/min,每3ml左右收集一管,编号,待测。

1.3.4.3 薄层分析

分别吸取5 μ l γ -氨基丁酸标准品溶液和样品洗脱液,点于自制的硅胶G薄层板上,以正丁醇:醋酸:水体积比为4:1:1为展开剂展开,取出晾干,用体积分数0.2%茚三酮乙醇溶液显色,105 $^{\circ}$ C烘数分钟,直至获最大斑点,薄层扫描测定。

2 结果与分析

2.1 γ -氨基丁酸薄层检测方法

2.1.1 展开剂

通过纸层析实验发现,单向展开能够完全分开目标物质,因而不需要进行双向展开操作;通过不同展开剂在层析缸中展开实验发现,以正丁醇:醋酸:水(4:1:1 V/V)分离效果最好, R_f 值为0.46。

2.1.2 扫描波长对

通过不同波长扫描研究发现, γ -氨基丁酸在500nm处有最大吸收峰,600nm后吸收最低。因而选择扫描波长为 $\lambda_s=515\text{nm}$, $\lambda_R=680\text{nm}$ 。为了避免分离度不佳的其他氨基酸相互干扰和提高灵敏度,实验采用双波长扫描法。

2.1.3 回收率和精密度

研究发现平均回收率为98.75%,RSD=2.21%(n=6),精密度高(见表1)。

表1 回收率实验
Table 1 Recovery experiment

样品 (μ)	对照品 量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1.0741	18.5819	3.00	21.5807	99.96		
1.0315	18.5819	3.00	21.5954	100.45		
0.9735	18.5819	5.00	23.3984	96.33	98.75	2.21
1.1573	18.5819	5.00	23.3609	95.58		
1.2178	18.5819	8.00	26.5795	99.97		
1.0104	18.5819	8.00	26.5995	100.22		

2.1.4 检测限和线性范围

通过线性范围实验,我们发现,在扫描条件:反射式双波长锯齿扫描, $\lambda_s=515\text{nm}$, $\lambda_R=680\text{nm}$,狭缝 $5.0 \times 0.45\text{mm}$,SX=1。用最小二乘法对标准溶液点样量和色谱峰面积值进行回归分析,得到回归方程 $A=13172.9C-6832.6$,相关系数 $r=0.9952$,线性范围:0.5~15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,检测底限为0.5 μl 。

2.1.5 不同提取方法对 γ -氨基丁酸含量的影响

取采用水提取法和乙醇提取法后,提取液中 γ -氨基丁酸的含量见表2,由表可知普通茶叶采用水提取方法比采用乙醇提取方法 γ -氨基丁酸含量要提高21.4%,高 γ -氨基丁酸实验茶采用水提取方法比采用乙醇提取方法 γ -氨基丁酸含量要提高19.3%,总体上看,采用水提取方法比采用乙醇提取方法 γ -氨基丁酸含量要提高20%左右。

表2 不同提取方法对 γ -氨基丁酸含量的影响
Table 2 Effects on different extract technique to the content of γ -amino butyric acid

样品	体积数 (ml)	总干 重(g)	扫描峰 面积	γ -氨基丁酸 含量(%)
水提取(普通茶叶)	5	1.1413	18716.5	0.17
水提取(高 γ -氨基丁酸实验茶)	5	0.8626	189579.2	1.73
乙醇提取(普通茶叶)	5	1.0884	13229.3	0.14
乙醇提取(高 γ -氨基丁酸实验茶)	5	0.8375	153209.7	1.45

2.2 732阳离子交换树脂吸附 γ -氨基丁酸的条件

2.2.1 732树脂静态吸附

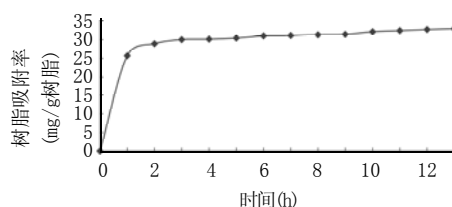


图1 732阳离子树脂吸附量与时间关系
Fig.1 Relations between 732 positive resin adsorption quantity and time

利用732阳离子树脂对实验茶中 γ -氨基丁酸初提液进行处理,在初始浓度1.608mg/ml的条件下,测定其吸附后平衡浓度(即树脂充分吸附或吸附达到平衡后溶液浓度),可以得到732阳离子树脂对茶叶中 γ -氨基丁酸的吸附量为32.9mg/g。上述方法充分吸附的树脂再利用0.5mol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 在25 $^{\circ}$ C的条件下进行解吸,测定解吸率为98.08%。

同时考虑吸附量以及解吸率,对732阳离子树脂进行吸附动力学实验。实验结果表明(图1),732阳离子树脂在1h内的吸附速度非常快,基本已经超过其吸附

量的70%，到5h后已经超过了90%。从吸附量、解吸率和吸附率三方面来考虑，732阳离子树脂很适合分离纯化茶叶中 γ -氨基丁酸。

2.2.2 732阳离子树脂动态吸附

将实验茶 γ -氨基丁酸提取液调节成不同的pH(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0和7.0)上样，进行吸附实验(结果见图2)。在样液pH值很小(即强酸性)下，如图中的pH值为2.0时，树脂的吸附量较低；随着pH值的升高，树脂的吸附量渐渐增加，当pH值为3.0时，树脂的吸附量达到最大值，为32.9mg/g树脂。而随着pH的进一步增大，树脂的吸附量反而呈现下降的趋势。造成此种结果的原因是 γ -氨基丁酸本身就是一种酸，同时也带有碱性基团氨基。在酸性环境中氨基结合一个质子而成阳离子状态，容易被树脂吸附；而在碱性条件下羧基电离一个质子而带负电呈阴离子状态，从而很难被阳离子交换树脂吸附。

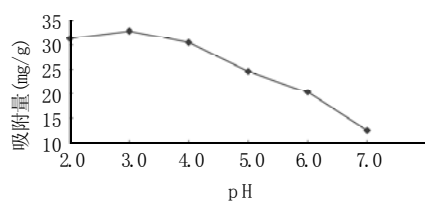


图2 不同上样pH对吸附量的影响
Fig.2 Effects of pH values on adsorption capacity

不同的吸附流速，物质与树脂的接触时间不同，所以吸附量也有所差异。将实验茶 γ -氨基丁酸提取液按照1.0、3.0、5.0、7.0ml/min和9.0ml/min的流速上样。从图3可以看出，当流速达到5.0ml/min后，树脂的吸附量明显的下降，到9.0ml/min后，树脂的吸附量只有在3.0ml/min时的75%，而在流速为1.0ml/min时，虽然树脂的吸附量较高，但是导致实验周期延长，因而将吸附流速控制在3.0ml/min。

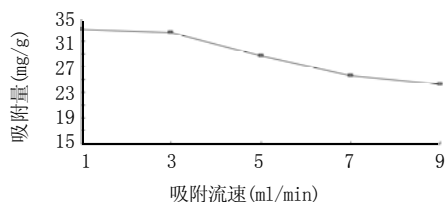


图3 不同吸附流速对吸附量的影响
Fig.3 Effects of different adsorption speed of flow on adsorption capacity

不同pH的洗脱液对 γ -氨基丁酸的洗脱程度不同，将吸附好的树脂柱分别用pH为3.0、4.0、5.0、6.0、

8.0和9.0的柠檬酸缓冲液和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 缓冲液进行洗脱。从表3可以看到，使用低pH值(5.0以下)洗脱液洗脱， γ -氨基丁酸不能被洗脱，虽然在pH6.0时有少部分被洗脱，但主要集中在pH值8.0~9.0，因而在收集样品时，也从这一点开始。

表3 不同pH洗脱液对 γ -氨基丁酸的洗脱影响
Table 3 Effects of pH values of fluid to γ -amino butyric acid

收集液	薄层显色(与标准品对照)
穿漏收集液	无色斑
pH3.0的洗脱液	无色斑
pH4.0的洗脱液	无色斑
pH5.0的洗脱液	无色斑
pH6.0的洗脱液	有微略色斑，需对光观看
pH8.0~9.0的洗脱液	有明显色斑，颜色比标准色斑深

2.3 γ -氨基丁酸分离、纯化结果

2.3.1 洗脱液梯度分布情况：

1~19号：pH3的洗脱液；20~46号：pH4的洗脱液；47~77号：pH5的洗脱液；78~121号：pH6的洗脱液；122~166号：pH8~9的洗脱液。

2.3.2 洗脱液颜色分布情况

1号：无色；2~5号：深褐色，与提取液相似，3，4号颜色较深；6~12有浅黄色，颜色渐浅；13~112号：无色；113~123号：有浅黄色，颜色依次渐深；124~130号：深褐色，颜色依次渐深；131~148号：深褐色，颜色渐浅；149~166号：深黄色。

2.3.3 薄层显色初筛结果

1~115号标准色斑水平线上无色斑，不含 γ -氨基丁酸；116~120号：有微略色斑，需对光观看；121~125：有明显色斑，颜色深浅与标准色斑一致；126~130号：有明显色斑，颜色深浅比标准色斑深；131~166号：无 γ -氨基丁酸色斑，不含 γ -氨基丁酸。

2.3.4 薄层扫描分析

薄层扫描色斑明显的121~130号，同时把120~130号试管冷冻干燥，测量干物质重量，结果见表4。研究表明， γ -氨基丁酸在以0.25mol/L氨水为洗脱液进行洗脱时可以与其他物质很好地分离被集中洗脱下来，洗脱液中含有高纯度的 γ -氨基丁酸，其中126号试管 γ -氨基丁酸含量高达39.15%(表4)。

3 讨论

本次实验首次对茶叶中 γ -氨基丁酸的提取和分离进行了研究。根已报道的米胚芽中 γ -氨基丁酸的提取方法相比^[14]，由于茶叶本身浸出率很高， γ -氨基丁酸相对容易提取，因此使用水作为提取溶剂效果非常好。

表4 分离液中 γ -氨基丁酸的含量
Table 4 Content of γ -amino butyric acid in separation fluid

试管 编号	体积数 (ml)	总干 重(g)	扫描峰 面积	γ -氨基丁酸 含量(%)
121	2.8	0.0374	43337.3	5.70
122	3.0	0.0312	96845.7	15.01
123	2.8	0.0294	94412.1	14.64
124	3.0	0.0282	117095.6	20.02
125	2.9	0.0307	159685.2	23.88
126	3.0	0.0231	191687.3	39.15
127	2.8	0.0226	162055.8	31.77
128	2.7	0.0268	114130.4	18.51
129	2.9	0.0342	89068.5	12.35
130	3.0	0.0392	24614.2	3.65

实验还对 γ -氨基丁酸的分离技术进行了研究,通过离子交换树脂,然后进行pH线性梯度洗脱,能够分离出含量很高的 γ -氨基丁酸提取物。采用其它的分离方法以及不同类型的离子交换树脂是否能得到更好的分离效果,有待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 郭晓娜, 朱永义, 朱科学. 生物体内 γ -氨基丁酸的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 70-72.
- [2] 杨胜远, 陆兆新, 吕风霞, 等. 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): 546-550.
- [3] 横田哲治. マグマ米(发芽玄米)の时代がくる[J]. 食の科学, 2000(10): 34-37.
- [4] 顾振新, 陈志刚, 岳建华, 等. 发芽糙米制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 70-72.
- [5] 黄亚辉, 郑红发, 曾贞. 金白龙茶(GABARON)的研制及临床试验[J]. 茶叶通讯, 2001, (4): 3-5.
- [6] 林智, 林钟鸣, 尹军峰, 等. 厌氧处理对茶叶 γ -氨基丁酸含量及其品质的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 35-39.
- [7] 黄亚辉, 郑红发, 黄怀生, 等. 高 γ -氨基丁酸茶游离氨基酸的变化及机理分析[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 56-59.
- [8] 黄亚辉, 郑红发, 刘霞林, 等. 茶加工过程中 γ -氨基丁酸和谷氨酸的动态变化研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 117-120.
- [9] 顾振新, 蒋振晖. 食品原料中 γ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集技术[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 65-69.
- [10] 谭少云, 余伟鸣, 叶放. HPLC法测定脑复清胶囊中 γ -氨基丁酸的含量[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(11): 865-867.
- [11] 孙玮, 潘峰, 张正治. 氨基酸快速分析法测定高原低氧大鼠下丘脑 γ -氨基丁酸的含量[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(1): 60-63.
- [12] 陈体强, 吴锦忠, 徐洁. 几种中药材中 γ -氨基丁酸的测定[J]. 海峡药学, 2005, 17(5): 75-77.
- [13] 张晖, 吴胜芳, 姚惠源. OPA柱前自动衍生-紫外检测米胚芽中的 γ -氨基丁酸的HPLC法研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(10): 50-52.
- [14] 林少琴, 吴若红, 邹开煌, 等. 米胚芽中 γ -氨基丁酸的分离提取及鉴定[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 76-78.