

纸色谱萃取分光光度法测定 - 氨基丁酸的研究

王 兢, 江 波*, 冯 翥

(食品科学与安全教育部重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏 无锡

214036)

摘 要: 对 - 氨基丁酸的定量方法(纸色谱萃取分光光度法和高效液相色谱法)进行了初步研究。分析研究了纸色谱萃取分光光度法测定 - 氨基丁酸的最佳实验条件, 结果表明该方法最低检测浓度为 0.0176g/L, 线性测量范围为 0.3~10g/L, 平均回收率为 99.04%, 平均相对标准偏差为 2.376%。与高效液相色谱法相比, 纸色谱萃取分光光度法具有良好的相关性和较高的准确性和精密度, 是一种简单、有效和费用低廉的方法。

关键词: - 氨基丁酸; 纸色谱; 分光光度法; 高效液相色谱法

Determination of GABA by Paper Chromatogram and Extract-spectrophotometry

WANG Jing, JIANG Bo*, FENG Biao

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science,
Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: An efficient and sensitive analysis of -aminobutyric acid (GABA) was described. The results showed that the minimum detection limit was 0.0176g/L. The standard curve for GABA showed good linearity over the concentration range of 0.3~10g/L. It indicated that the average recovery is 99.04% with a relative standard deviation of 2.376%. The method is sensitive, convenient and accurate, meeting the practical requirement.

Key words: -aminobutyric acid (GABA); paper chromatogram; extract-spectrophotometry; HPLC

中图分类号: 0657.32

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0225-05

- 氨基丁酸(GABA)是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸, 是哺乳动物中枢神经系统的抑制性传递物质^[1-2]。GABA 具有降低血压、安定神经、改善肝肾机能、营养神经、提高脑活力等生理功能^[3-5], 因而它在功能性食品及医药领域具有广阔的应用前景。目前生产 GABA

的主要方法是化学合成法和生物合成法两种, 生物合成法具有条件温和、安全和成本较低等优势, 最具产业化前景。开发天然 GABA 产品及其功能性食品已成为现今食品科学及食品生物技术领域的研究热点之一。

定量化学分析是科学研究的基础之一。已报道的关

收稿日期: 2005-11-12

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20436020)

作者简介: 王兢(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物技术食品中的应用。

时间要适当。若处理时间过长会使凝胶温度过高, 导致显色背景变深、脱色时间也需延长, 严重时还会使胶片产生气泡爆点、损坏胶片。

参考文献:

[1] CHEN C Q, BELANGER R R, BENHAMOU N, et al. Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria and *Pythium aphanidermatum*[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2000, 56: 13-23.

[2] 崔艳丽, 王生余, 张真. 微波技术在尿蛋白谱检测中的应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2002, 17: 35-36.

[3] LOGIN G R, DWYER B K, DVORAK A M. Rapid primary microwave-osmium fixation. I. Preservation of structure for electron microscopy in seconds[J]. *J Histochem Cytochem*, 1990, 38: 755-762.

[4] HAFIZ S, SPENCER R C, LEE M, et al. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining[J]. *J Clin Pathol*, 1985, 38: 1073-1076.

[5] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 90.

[6] 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进[J]. *植物学通报*, 2002, 19: 607-610.

于 GABA 含量的检测方法有色谱分析法^[6-13]、联用技术^[14-16]、光谱分析法^[17]和放射受体分析法^[18]等。在探讨微生物代谢合成 GABA 的过程中,需要采集大量实验数据。本实验室前期的研究发现^[19-21],生物发酵液中成分复杂,常含有微生物代谢副产物,除了高效液相色谱法外其他的方法都具有一定的局限性。高效液相色谱法具有检测速度快、分辨率高、灵敏度好、柱子可反复使用等优点,但是由于存在操作步骤复杂、仪器维护繁琐和价格昂贵等缺点,限制了其在实验室的应用和推广。因此建立一种简单、有效及费用低廉的检测方法至关重要。

本研究的纸色谱萃取分光光度法,是建立在纸色谱对物质的高效分离,以及 GABA 与茚三酮定量反应的基础上,利用可见分光光度计进行定量测定 GABA 的方法,并将它与高效液相色谱法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 原料

GABA 样品 实验室制备;GABA 标准品 Sigma 公司;新华 1 号层析纸 杭州新华纸业有限公司;茚三酮、硫酸铜、无水乙醇、正丁醇、冰醋酸均为分析纯;醋酸钠、甲醇、乙腈均为色谱醇。

1.2 仪器

美国 Agilent 1100 液相色谱仪,紫外检测器,高效液相色谱实验用水为石英蒸馏水;层析缸;微量注射器;UV-1100 紫外-可见分光光度计;722 型分光光度计;烘箱;恒温振荡水浴;高速离心机。

1.3 方法

1.3.1 展开剂及洗脱剂的配制

展开剂:将正丁醇、冰醋酸、水按体积比 6:1:3 的比例(内含 0.5% 茚三酮)在棕色容量瓶中混合定容,转移至分液漏斗振摇后静置分层,弃去下部水层,取上层有机相放置 2 d 后供展开使用。

洗脱剂:75% 乙醇:CuSO₄·5H₂O=38:2(V/W)。

1.3.2 样品预处理

5ml GABA 发酵液加入 2ml 10% 的三氯乙酸(V/V),振荡均匀,离心(2000 × g, 10min),取上清液稀释一定倍数,经 0.45 μm 滤膜过滤备用。

1.3.3 纸色谱萃取分光光度法

取新华 1 号层析纸,点样 4 μl,点样线距离层析纸底部和两端各 2.0cm,样品间距为 2.5cm,点样完毕后制成圆筒。先悬于层析缸中饱和 1 h,再放入展开剂中,以上行法^[22]在 30℃ 恒温条件下垂直展开至距层析纸上端 2cm 处,取出风干后于电热恒温鼓风干燥箱中加热显色。

将与标准品 R_f 值(相对迁移率)相同的斑圈剪下,置于 25ml 具塞试管中,添加 5ml 洗脱剂后恒温振荡洗脱(30℃, 100r/min),以未点样点,且与标准品 R_f 值及面积相同的空白斑圈为参比,于最大吸收峰处比色,并从标准曲线中查出 GABA 含量。

1.3.4 高效液相色谱法

取经过预处理的 1 μl 样品进样,进行色谱分析。

色谱条件:色谱柱 Hypersil ODS C₁₈(4 × 125mm) 卡套柱,柱温 40℃;流动相:A-20mmol 醋酸钠,B-20mmol 醋酸钠:甲醇:乙腈=1:2:2(V/V);流速 1ml/min;检测波长为 338nm;采用 OPA 柱前自动衍生化方法。

2 结果与分析

2.1 纸色谱萃取分光光度法

2.1.1 吸收波长的检测

以去离子水作为参比,在 UV-1100 紫外-可见分光光度计上对洗脱剂及其洗脱后产物进行波长扫描,平行 3 次,对比两组吸收曲线发现产物在 512 ± 0.5nm 有最大吸收值。因而选用 512nm 作为检测波长。结果见图 1。

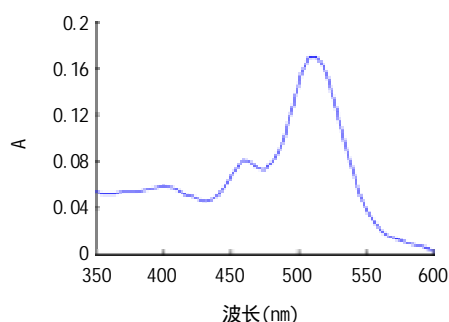


图1 GABA 标准品吸收光谱图

Fig.1 Absorbance spectra of standard GABA

2.1.2 纸色谱显色条件的选择

显色温度和时间是影响实验精度的两个重要参数。点取 3g/L GABA 标准品,考察不同显色温度和作用时间的情况下的显色强度变化。结果见表 1。

表 1 显色温度和时间对显色反应的影响(n=3, $\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Effect of color-developing temperature and time on determination(n=3, $\bar{X} \pm SD$)

反应温度(℃)	A _{512nm}			
	作用时间(min)			
	5	10	15	20
80	0.382 ± 0.004	0.416 ± 0.002	0.420 ± 0.003	0.422 ± 0.004
85	0.410 ± 0.006	0.435 ± 0.004	0.436 ± 0.002	0.435 ± 0.003
90	0.407 ± 0.004	0.434 ± 0.005	0.431 ± 0.004	0.427 ± 0.002

温度对显色反应的影响主要表现在两方面,即显色速度的快慢和最终产物颜色的稳定性。由表 1 可知,不

同温度下作用 5 min 后测得的显色强度明显低于作用 10 min 的结果,这可能是由于烘箱的门在关闭后,温度的平衡需要一定时间,从而造成短时间内显色强度不够。而高温长时间条件下反应产物的稳定性较差。因此综合考虑后选择显色条件为 85 、10 min。

2.1.3 洗脱条件的选择

比色的测定中,最终产物的生成量是根据洗脱溶液的消光值大小来确定,因此在测定方法上要求显色反应得到的颜色在一定时间内具有较好的稳定性。

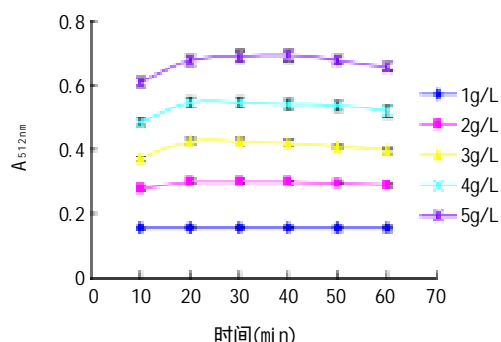


图2 GABA点样浓度与洗脱产物稳定性的关系(n=3)

Fig.2 Effect of GABA concentration on determination(n=3)

图2显示,洗脱反应 20 min 后,5 个浓度的样品基本达到平衡。根据茚三酮比色法测氨基酸原理^[23]和物理热运动规律,洗脱产物的颜色深浅与起始 GABA 含量成正比。待测样品起始浓度越大,反应达到平衡需要的时间越长;随着产物放置时间的延长,因产物颜色衰减,试验误差将增大;且吸光度越大其随时间的衰减效应越明显。综合考虑,洗脱条件为 30 、20 ~ 50 min。

2.1.4 标准曲线的绘制

精密称取 GABA 标样 500.0 mg,先用少量去离子水溶解,定容至 100 ml,再分别稀释定容,配成 1、2、3、4、5 mg/ml 的标准溶液,点样 4 μ l,层析后洗脱,于波长 512 nm 处测定吸光度,求 A。以 GABA 浓度(g/L)为横坐标,以吸光度 A 值为纵坐标,绘制标准曲线。计算得回归方程和相关系数: $A=0.0263+0.1341C(g/L)$, $R^2=0.9988$ 。通过 7 次平行测定得到其相对标准偏差为 2.378%。结果见图 3。

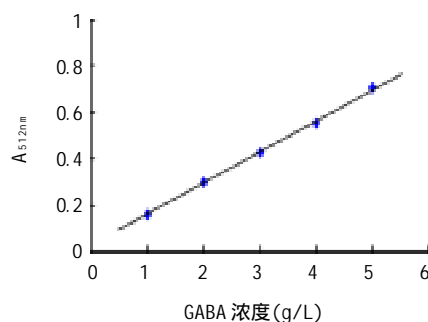


图3 GABA标准曲线

Fig.3 Standard curve of GABA

2.1.5 检测限的估计与测量线性范围的确定

对空白 7 次测定的标准偏差 $S_B=0.000787$,当测定信号大于等于 3 倍多次测定的空白标准偏差时(即 A 检测限 $=3S_B$),可以认为样品被检出。通过回归方程计算 GABA 的最低检测浓度为 0.0176 g/L。实验结果表明,洗脱反应产物的吸光值与 GABA 含量呈良好的线性关系,本方法线性范围为 0.3 ~ 10 g/L。

2.1.6 干扰实验

针对样品中一些副产物和金属离子可能存在干扰,以 3 g/L GABA 为标准,分别添加不同浓度可能的干扰物质,按误差小于或等于 10% 计,对干扰情况进行实验,结果见表 2。

表2 干扰物质对测定值的影响

Table 2 Effect of concomitant on determination

共存物质	谷氨酸	精氨酸	FeSO ₄	ZnSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	NH ₄ NO ₃
允许倍数	50	100	30	50	30	10	30

由表 2 可知,由于不同氨基酸的化学结构不同,其迁移速率也有所不同,谷氨酸和精氨酸是发酵液中存在较多的氨基酸,在本实验中其检测偏差最大可为 50 和 100 倍。在相同阳离子情况下,阴离子不同,其 R_f 值也会出现显著差别,其中硫酸盐移动速率最慢, R_f 最小,硝酸盐移动最快, R_f 最大,氯化物居中间。

2.1.7 加标回收实验

采用标准加入法(外标法),分别在不同浓度的发酵液中加入 GABA 标准液,加入 GABA 标准液浓度分别为 1.000、2.000、3.000 g/L。本方法具有较高的精密度

表3 回收率的测定

Table 3 Results of recovery

GABA 含量(g/L)	外加 GABA 含量(g/L)	测得总 GABA 的量(g/L)					平均回收率(n=5)	RSD (%)
1.099	1.000	2.123	2.144	2.118	2.078	2.098	101.02	2.197
1.099	2.000	3.054	3.168	3.135	3.081	3.077	100.20	2.342
1.099	3.000	3.959	4.044	4.133	4.082	4.003	98.17	2.295
1.627	1.000	2.632	2.604	2.611	2.599	2.655	99.32	2.333
1.627	2.000	3.521	3.566	3.503	3.586	3.612	96.53	2.339
1.627	3.000	4.548	4.502	4.578	4.695	4.616	98.69	2.466

表4 纸色谱萃取分光光度法与HPLC法测定GABA的比较(n=3, g/L)
Table 4 Comparison of two different determination methods(n=3, g/L)

样品	纸色谱萃取分光光度法					高效液相色谱法				相对误差 (%)
	测定值	平均值	RSD (%)	测定值	平均值	RSD (%)	测定值	平均值	RSD (%)	
1	1.021	1.071	1.046	1.046	2.390	1.098	1.085	1.075	1.086	3.683
2	2.019	1.978	2.078	2.025	2.482	2.125	2.097	2.139	2.120	4.496
3	3.256	3.402	3.406	3.355	2.548	3.565	3.518	3.496	3.526	4.868

和回收率。结果见表3，总平均回收率为99.04%，平均RSD为2.376%(n=5)。

2.2 高效液相色谱法

精确称取GABA标准品200mg，定容至1L，将浓度分别稀释为10、20、40、100、150mg/L。分别进样1μl，平行进样2次，测定不同质量浓度的峰面积。将GABA的峰面积Y对质量浓度X(mg/L)进行线性回归，得回归方程为 $Y=38.801998X+3.030833$ ， $R^2=0.9999$ 。

2.3 纸色谱萃取分光光度法和高效液相色谱法的比较

分别用纸色谱萃取分光光度法和高效液相色谱法测定样品中的GABA含量。与高效液相色谱法相比，纸色谱萃取分光光度法检测样品的相对误差分别为3.683%、4.496%、4.868%，多次检测结果的相对误差均在5%以下，结果见表4。

3 结论

3.1 高效液相色谱法是目前较为先进的分析手段，具有检测速度快、分辨率高、灵敏度好、柱子可反复使用等优点，但是由于存在操作步骤复杂、仪器维护繁琐和价格昂贵等缺点，限制了其在实验室的广泛应用。

3.2 纸色谱萃取分光光度法准确度和重复性较好，相关系数为0.9988，相对标准偏差为2.304%，线性测量范围为0.3~10g/L。经过多次实验结果表明：本方法简便易行，所需样品量少，价格低廉，是一种有效的定量检测方法。

参考文献：

- [1] 万选才, 杨天祝, 徐承焘. 现代神经生物学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999: 185-162.
- [2] 杨藻宸. 药理学和药物治疗学: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 487-503.
- [3] 冈田忠司. GABA富化コメ胚芽の生理机能[J]. 食品と开发, 2001, 36(6): 7-9.
- [4] 杉下朋子. コメ胚芽由来GABA素材の開発[J]. 食品と开发, 2001, 36(6): 10-11.
- [5] 许建军, 江波, 许时婴. γ -氨基丁酸(GABA)——一种新型的功能食品因子[J]. 食品工业科技, 2003, 24(1): 109-110.
- [6] SCHMID R, KAROBATH M. Specific and sensitive method for the determination of γ -aminobutyric acid using gas chromatography with the electron-capture or mass fragmentography detection[J]. Journal of Chromatography A, 1977, 11(9): 101-109.
- [7] SARHAN S, SEILER N, GROVE J, et al. Rapid method for the assay

of 4-aminobutyric acid (GABA), glutamic acid and aspartic acid in brain tissue and subcellular fractions[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1979, 11(4): 561-572.

- [8] LI Hua, WANG Hong, CHEN Jin-he, et al. Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with bical in prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 788, 93-101.
- [9] BENTURQUI N, PARROT S, SAUVINT V, et al. Simultaneous determination of vigabatrin and amino acid neurotransmitters in brain microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 806: 237-244.
- [10] LU M, CHIU T C, CHANG P L, et al. Determination of glycine, glutamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 538: 143-150.
- [11] CAUDILL W L, HOUCK G P, WIGHTMAN R M. Determination of γ -aminobutyric acid by liquid chromatography with the electrochemical detection[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1982, 12(2): 331-339.
- [12] KHUAWAR M Y, RAJPER A D. Liquid chromatographic determination of γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 788: 413-418.
- [13] ZACHARIS L C, THEODORIS D G A, VOULGAROPoulos A N. On-line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of γ -aminobutyric acid in human biological fluids[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 808: 169-175.
- [14] HOLDINESS M R, JUSTICE J B, SALSMONE J D, et al. Neill. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of glutamic acid decarboxylase activity in subregions of rat brain[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1981, 9(10): 283-290.
- [15] BALDACCIO A, THEURILLAT R, CASLAVSKA J, et al. Determination of γ -hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 990: 99-110.
- [16] SCHAAFA J M, TEELKEN A W, MUSKIEB F A J, et al. A specific and sensitive determination of gamma-aminobutyric acid in CSF and brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Neuroscience Methods, 1985(5): 257-265.
- [17] 胡红焱, 杨树德. 细菌荧光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.
- [18] BARACZKA K, SPERK G. Measurement of gamma-aminobutyric acid in human cerebrospinal fluid: Radioreceptor assay using [3H] muscimol[J]. Clinica Chimica Acta, 1981, 8(1): 77-82.
- [19] 许建军, 江波, 许时婴. *Lactococcus lactis*谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 79-84.

高效液相色谱法测定脱臭馏出物深加工物中的维生素E和甾醇

邵平, 姜绍通, 潘丽军, 陈晓燕
(合肥工业大学生物与食品工程学院 安徽 合肥 230009)

摘 要:建立了一种分析菜籽油脱臭馏出物深加工物中维生素E和甾醇含量的分析方法。该方法采用反相C₁₈柱, 流动相为96:4(V/V)的甲醇水混合液, 流速1.0ml/min, 柱温30℃, 二极管阵列检测, 外标法定量。结果表明所采用的标准曲线有良好的线性关系、回收率, 方法精密度良好。将该方法用于脱臭馏出物深加工物中维生素E和甾醇的测定, 简单快速, 结果准确、可靠。

关键词:脱臭馏出物; VE; 甾醇; 高效液相色谱

Determination of Vitamin E and Sterols in Refined Products from Deodorizer Distillate
by High Performance Liquid Chromatography

SHAO Ping, JIANG Shao-tong, PAN Li-jun, CHEN Xiao-yan
(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method for the determination of vitamin E and sterols has been established. Separation was carried out on a C₁₈ column (Atlantis column) at 30℃ with mobile phase of methanol and water (96:4, V/V), and PDA detection for vitamin E at 292nm and for sterols at 205nm. The experimental results showed that there is a good linear relationship between the peak area and the concentration of components. The average recoveries and relative standard deviation were well showed. The results showed that the method is simple, rapid and accurate for determination of vitamin E and sterols in deodorizer distillate.

Key words: deodorizer distillate; VE; sterol; high performance liquid chromatography

中图分类号: 0657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0229-03

脱臭馏出物是油脂在脱臭过程中所得到的各馏分的混合物。脱臭馏出物主要含有大量脂肪酸、生育酚、甾醇及甾醇酯、甘油酯及其他组分等。甾醇是一类具有生理活性的物质, 具有明显的降胆固醇、消炎、退热等疗效, 广泛地运用于医药、食品、化妆品等行业。天然VE具有抗自由基, 抗衰老, 提高人体及动物的体能免疫功能等许多重要的生理功能, 对人体无毒副作用,

其长期使用的安全性远高于合成VE^[1]。

VE和甾醇的测定方法主要有分光光度法, 荧光法和高效液相色谱法。而光度法和荧光法只能测定VE的总量。运用高效液相色谱法分别测定VE和甾醇报道较多, 油脂样品直接运用甲醇溶解, 由于油脂在甲醇中的溶解度不高, 实际效果并不理想^[2-5]。在脱臭馏出物深加工过程中, 如何有效确定分离产物的成分含量是精

收稿日期: 2005-11-28

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(03041302)

作者简介: 邵平(1980-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事农产品生物化工方面研究。

[20] 许建军, 江波, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及应用[J]. 微生物学通报, 2004(2): 71-76.

[21] 许建军, 江波, 许时婴. 谷氨酸脱羧酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2004(7): 131-133.

[22] 张承圭. 生物化学仪器分析及技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 115-141.

[23] 大连轻工业学院, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 235-237.