

# 反相高效液相色谱法测定食品中 $\gamma$ -氨基丁酸的研究

李遂勤<sup>1</sup>, 王立忠<sup>1</sup>, 彭海成<sup>2</sup>

(1. 郑州铁路卫生监督所, 郑州 450052; 2. 河南工业大学, 郑州 450052)

**[摘要]** 目的: 建立反相-HPLC 法测定食品中  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA) 的测定方法。方法: 用正亮氨酸作为内标物, 样品中的  $\gamma$ -氨基丁酸和正亮氨酸与 2,4-二硝基氟苯(FDNB) 反应转化成稳定的衍生物并用乙醚萃取, 挥发后, 残余物溶解在 NaOH 溶液中, 处理液注入反相-HPLC 中, 用甲醇溶液在盐酸缓冲液中线性梯度洗脱, 于 400 nm 处检测。结果: GABA、正亮氨酸分别和 FDNB 反应 60 min 后达到平衡, 流出液检测峰位分别在 45 min 和 60 min。GABA 在 1 ng/ml ~ 100 ng/ml 范围内具有良好的线性, 其相关系数大于 0.999, 检出限为 1 ng/ml, 实际样品加标回收率为 98.4 ± 2.3%。结论: 此方法简单、准确, 用于实际样品检测, 结果满意。

**[关键词]**  $\gamma$ -氨基丁酸; 反相高效液相色谱; 正亮氨酸

**[中图分类号]** O657.7+2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2011)09-2179-03

## Research on determination of $\gamma$ -aminobutyric acid in food by RP-HPLC

LI Sui-qin<sup>1</sup>, WANG Li-zhong<sup>1</sup>, PENG Hai-cheng<sup>2</sup>

(1. Zhengzhou Rail Bureau Public Health Surveillance Center, Zhengzhou 450052, China; 2. Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an analytical method to determine  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) concentration in food using RP-HPLC. **Methods:** GABA in samples reacts with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) to form a stable derivative, which is extracted by ether. After evaporation, residue is re-dissolved in NaOH solution and injected into a RP-HPLC. The stable derivative is washed out in a methanol Tris-HCl gradient and detected at 400 nm. Isoleucine is used as an internal standard. **Results:** The derivatisation reactions with FDNB take 60 minutes to reach equilibriums for both GABA and isoleucine. The GABA-derivative and isoleucine-derivative have retention time of 45 min and 60 min respectively. There is a good linear relationship between peak area and GABA concentration in the range of 1 ng/ml ~ 100 ng/ml. The linear correlation coefficient is over 0.999. The detection limit for GABA is 1 ng/ml. The recovery rate for food samples is 98.4 ± 2.3%. **Conclusion:** The analytical method described here is simple and accurate. It has been tested to analyse food samples with satisfactory results.

**[Key words]**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); RP-HPLC; Isoleucine

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA) 是中枢神经系统中很重要的抑制性神经递质, 它是一种天然存在的非蛋白组成的氨基酸, 具有极其重要的生理功能。能够促进脑的活化性, 健脑益智, 抗癫痫, 促睡眠, 美容润肤, 延缓脑衰老机制, 降低血压, 促进肾功能改善和保护作用, 抑制脂肪肝和肥胖症, 活化肝功能。近年来, 富含  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA) 的功能食品有了很大的发展。因此, 发展和评估含有 GABA 的功能性食品, 简单有效的定量分析食品中所含的 GABA 是很重要的。目前检测 GABA 的方法有分光光度法<sup>[2]</sup> 和改良纸层析法<sup>[1]</sup> 等, 由于 GABA 在紫外光区和可见光区及荧光区没有显著的吸收, 需要被转化成在 UV 或可见光区及荧光区有强吸收的物质来测定, 天然产品中又含有其它能被紫外或荧光吸收的物质可能干扰吸收, 因此需要用高效液相色谱(HPLC) 分离天然产品中的干扰物质, 这种方法还只能在特定的实验室使用氨基酸分析仪来测定, 易

受检测条件限制。因此本文研究利用 GABA 与 FDNB 反应生成稳定的衍生物, 在普通的 HPLC 条件下检测食品中的 GABA。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 主要仪器与试剂

岛津 LC20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司) 检测器: UV 检测器; 色谱柱: 3.9 × 150 nm C<sub>18</sub> 柱; 进样量: 50  $\mu$ l; 0.2  $\mu$ m 滤膜; 岛津氨基酸分析仪(LC-10ADvp) 台式离心机(GT10-2 型); 2,4-二硝基氟苯(FDNB) (色谱纯)、正亮氨酸, 用氨基酸分析仪测定。

#### 1.2 色谱条件

Tris-HCl 缓冲液(10 mM, pH 6) 中甲醇的梯度洗脱(0% ~ 80%)。流速: 0.5 ml/min 检测波长: 400 nm 进样量: 50  $\mu$ l。

#### 1.3 样品前处理

1.3.1 取 0.2 ml 含有 GABA 和作为内标物的正亮氨酸(正亮氨酸已用氨基酸分析仪测定) 样品, 加入到 2 ml 的 500 mM

【作者简介】 李遂勤(1972-) 女, 本科, 主管技师, 主要从事理化检验工作。

NaHCO<sub>3</sub> 加入 0.4 ml 含 5% 的 FDNB 的乙醇溶液, 混合液在 37℃ 搅拌平衡 1 h, 用 6 ml 的乙醚萃取除去多余的 FDNB。在 37℃, 1 h 内 GABA 和正亮氨酸完全与 FDNB 反应, 水相含有 DNP-GABA 和 DNP-正亮氨酸, 水相用 0.4 ml 6 M 的 HCl 调至 pH=2, 然后提取物用 6 ml 乙醚分两次提取, 集中提取物并在 37℃ 减压干燥, 含有 DNP-GABA 和 DNP-正亮氨酸的黄色干燥残留物溶解在 3 ml 的 NaOH 中并且 40 倍稀释, 用 0.1 M Tris-HCl (pH=6) 调至 pH=8, 用 0.2 μm 滤膜过滤, HPLC 法待测。

1.3.2 取 250 μmol 正亮氨酸加入样品中作为内标。采 2 g 含有 GABA 和正亮氨酸样品, 用 200 ml 80℃ 水浸取、保温 1 h, 离心, 沉淀部分化合物的浸取液用热水重复操作, 混合浸取液并减压浓缩至 40 ml, 浓缩液中成分和内标物与 FDNB 反应, 并且 HPLC 法待测, 如上所述。

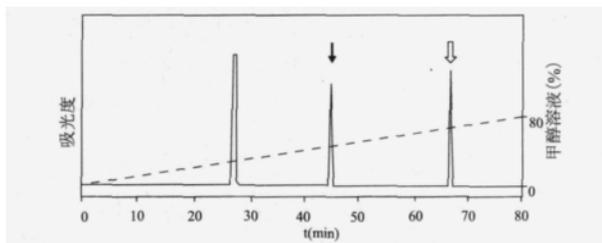
#### 1.4 样品分析

反相 HPLC 色谱条件下, 在 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH=6.0) 中甲醇作为流动相线性梯度洗脱, 在波长 400 nm 处检测, 根据色谱峰的保留时间确定色谱峰的归属。运用内标法确定正亮氨酸和 GABA 的回收率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 根据流出液检测的峰位确定检测物质成分

为了从提取液干扰物质中分离出 GABA 和正亮氨酸衍生物, 将提取液注入到经 Tris-HCl (10 mM, pH=6) 缓冲液平衡过的 Atlantis™ dC<sub>18</sub> (3.9 nm × 150 nm) 色谱柱。样品在同样的缓冲溶液中用 0% ~ 80% 的甲醇溶液线性梯度洗脱 80 min, 检测系统在 400 nm 处检测流出物的吸收 (已通过相同的色谱分析条件, 用标准物质, 准确的检测 DNP-GABA 和 DNP-正亮氨酸流出时间)。DNP-GABA 和 DNP-正亮氨酸色谱图表明: DNP-GABA 和 DNP-正亮氨酸的单一峰位流出时间分别为 45 min 和 60 min (色谱图 1)。



黑色箭头标注的为 DNP-GABA 衍生物的吸收峰, 白色箭头标注的为 DNP-正亮氨酸衍生物的吸收峰。未标注为溶剂峰。

图 1 DNP-GABA 衍生物和 DNP-正亮氨酸衍生物的 HPLC 色谱图

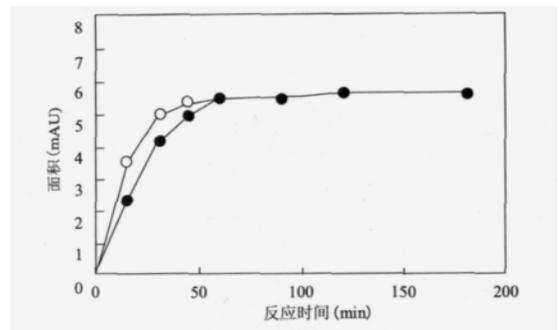
### 2.2 GABA、正亮氨酸与 FDNB 反应时间的比较 (图 2)

60 min 后, GABA 和正亮氨酸与 FDNB 的反应分别达到了平衡, 完全反应, GABA 和正亮氨酸等量地转化成了相应的衍生物。GABA 和正亮氨酸的衍生物能够最少稳定数小时。因此, 选择 GABA 和正亮氨酸与 FDNB 的反应平衡 1 h 后测定, 并且 GABA 和正亮氨酸等量地转化成了相应的衍生物。

### 2.3 方法的线性范围和检测限, 加标回收率

采用本方法测定 GABA 和正亮氨酸的线性关系和最低检出限等指标, 见表 1。

以 5 倍信噪比计算, 进样量 50 μl。



●, DNP-GABA 衍生物; ○, DNP-正亮氨酸衍生物。

图 2 GABA、正亮氨酸与 FDNB 的衍生物的峰面积与反应时间的关系

表 1 方法线性范围、相关系数和加标回收率

化合物	线性范围 (ng/ml)	相关系数 (r)	检出限 (ng/ml)	检测次数 (n)	加标回收率 (%)
GABA	1 ~ 100	0.999	1	5	98.4 ± 2.3
正亮氨酸	1 ~ 100	0.999	1	5	98.0 ± 2.5

### 2.4 检测计算

反相高效液相色谱法测定正亮氨酸加标回收率计算:  $A = 100 \times (B/C)$

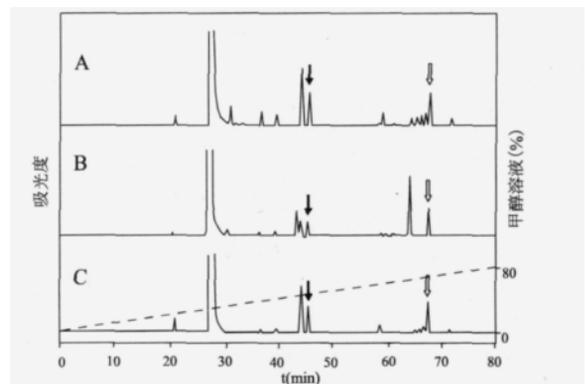
A: 正亮氨酸加标回收率(%) ; B: 正亮氨酸加标从食物中回收量 ; C: 正亮氨酸加标量。

食品中 GABA 含量计算公式: 食品中 GABA 含量 = 检测到 GABA 总量 × 100/A

A: 得到的正亮氨酸回收率。

### 2.5 样品检测

选择市场采集豆豉 (黄豆发酵制作)、绿茶、优酸乳饮料, 采用本办法检测。为了准确地检测样品中 GABA 总量, 样品中加入 250 μmol 的正亮氨酸做内标物。取 2 g 样品 (加入内标物) 加入 200 ml 80℃ 水中浸泡 1 h, 然后离心, 沉淀物上面方法重复提取, 混合提取物并减压浓缩至 40 ml, 各成分与 FDNB 反应, 如上文所述, 液相色谱法待测, 色谱条件如上, 进样量: 50 μl, 见图 3。



A: 豆豉 B: 绿茶 C: 优酸乳饮料。黑色箭头标注的为 DNP-GABA 衍生物的吸收峰, 白色箭头标注的为 DNP-正亮氨酸衍生物的吸收峰。

图 3 利用正亮氨酸内标法测量食品中 GABA 的含量

(下转第 2182 页)

## 2 结果

### 2.1 消化体系的选择

GBZ/T160.22-2004 中采用的是硫酸-硝酸混合酸体系消化样品,该方法需要严格控制电热板温度(140℃~160℃),还需赶尽硫酸。消化温度过高会生成难溶性焦硫酸盐或二氧化锡,造成结果偏低。若硫酸未赶尽,会产生分子吸收,同样也会造成实验结果的偏低。采用传统的硝酸和高氯酸混合酸体系消化,样品溶液在消化过程中也极易出现混浊,造成回收率偏低。黄忠科等<sup>[4]</sup>曾报道用盐酸消化样品,但需要严格控制消化时间,消化时间过长极易造成样品碳化,消化终点难于控制。我们采用 3.0 ml 盐酸混合 0.5 ml 硝酸的混合酸体系消化样品,易于掌握消化终点并获得了满意的结果。

### 2.2 消化温度的选择

我们选择了 150℃~300℃ 来消化样品,发现温度高于 300℃,会有二氧化锡沉淀产生而造成结果偏低。温度高于 200℃,溶液极易爆沸,也会造成样品损失。而消化温度过低,消化时间会过长。最终,我们选择了 200℃ 做为电热板的消化温度。

### 2.3 燃气流量的选择

我们选择浓度为 20.0 μg/ml 的锡标准溶液为调试液,火焰点着后,上下调整乙炔的流量。当乙炔流量为 1.8 L/min,火焰稳定,测试液的吸光度值最高,仪器测定锡的效果达到最佳状态。

### 2.4 精密度和回收率实验

2.4.1 精密度实验 为验证本方法的重复性,取 6 份空白滤膜,分别加入 100 μg/ml 锡标准溶液 1.0 ml,按本法步骤消化后进行精密度实验,相对标准偏差(RSD)为 4.3%,见表 1。

表 1 精密度结果

试样浓度 μg/ml	吸光度						均值	RSD%
	平行样 1	平行样 2	平行样 3	平行样 4	平行样 5	平行样 6		
10.0	0.047	0.048	0.048	0.052	0.047	0.051	0.049	4.3

2.4.2 准确度及回收率实验 为了验证本方法的准确性,测定了标准物质 ZK021-1 和 ZK021-2 滤膜中锡的含量,结果见表 2;取了 3 份空白滤膜进行回收率实验,分别加入高、中、低浓度的锡标准溶液,结果见表 3。

表 2 标准物质测定结果

编号	标准值(μg/张)	测定值(μg/张)
ZK021-1	200 ± 10	204
ZK021-2	400 ± 15	407

表 3 回收率测定结果

样品编号	加标浓度(μg/ml)	测定值(μg/ml)	回收率(%)
1	5	4.6	92
2	15	14.5	97
3	30	30.2	101

## 3 结论

本方法采用盐酸混合硝酸的混合酸体系消化样品,选择乙炔流量在 1.8 L/min 测定滤膜中的锡,回收率为 92%~101%。方法简便、快速、准确,可以作为日常检测空气中锡及其化合物的有效方法。

### [参考文献]

- [1] 李红莉,高虹,徐晓琳,等.有机锡化合物在中国环境行为的研究状况[J].环境科学动态,2003,28(2):15-17.
- [2] 高俊敏,建英,郑泽根.有机锡的人体暴露分析[J].环境与健康杂志,2005,22(1):72-75.
- [3] Z/T160.22-2004.工作场所空气有毒物质测定 锡及其化合物[S].
- [4] 黄忠科,艾中元,宋为丽,等.火焰原子吸收分光光度法测定工作场所空气中锡及其化合物[J].中国卫生检验杂志,2009,19(8):1932-1933.

(收稿日期:2011-04-07)

(上接第 2180 页)

表 2 样品测定结果

样品名称	GABA 含量	标准方差(n=4)
豆豉	14.82(mg/g)	0.01
绿茶	1.02(mg/g)	0.01
乳饮料	10.83(mg/100ml)	0.16

## 3 结论

在实际检测中由于实验分析的敏感性的不同,并且很难消除仪器误差,为了克服这个问题,选择加入一种和待测物质能够等量测定的内标物质是一个办法,本法测定 GABA 选择正亮氨酸作为内标物有以下优点:其在自然界中比较少见,并与 FDNB 定量反应;正亮氨酸并不干扰其他生物物质与 FDNB 发生反应。

目前紫外吸收和荧光法检测 GABA 虽存在缺陷,但在现实中较多使用。本文研究利用 GABA 与 FDNB 反应转变成稳定的衍生物,通过反相高效液相色谱在 400 nm 处检测吸收,来定量测定 GABA,为食品中的 GABA 测定提供了更加准确的方法。

### [参考文献]

- [1] 陈海军,林亲录,王婧,等.γ-氨基丁酸测定方法研究[J].食品工业科技,2007,(5):235-238.
- [2] 孙波,梁海文,迟玉杰,等.比色法快速测定酶转化反应中的γ-氨基丁酸含量的测定[J].食品科技,2008,(5):210-213.
- [3] 何秋云,杨志伟.马铃薯中γ-氨基丁酸快速测定方法研究[J].食品科技,2010,(10):74-76.

(收稿日期:2011-07-08)