

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2013.02.024

檀香叶中的 γ -氨基丁酸的 HPLC 测定研究



YANG Yan

杨艳¹, 贺丽苹^{1,2*}, 高向阳¹

(1. 华南农业大学食品科学学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学测试中心, 广东 广州 510642)

摘要: 建立了檀香叶中 γ -氨基丁酸(GABA)含量的高效液相色谱检测方法。以乙醚为溶剂,采用索氏提取除去色素,水提醇沉去除糖类和蛋白质的净化方法,以丹酰氯为衍生剂,高效液相色谱法分离,荧光检测器测定,外标法定量。峰面积与浓度之间线性关系良好,回归方程为 $y = 475\ 211x + 69\ 037$, $R^2 = 0.999\ 8$,加标回收率为 112%~120%,检测限为 7 $\mu\text{g/g}$ 。该方法操作步骤简单,灵敏度高,用于檀香叶中 GABA 的检测,方法简便、准确、高效。

关键词: 檀香叶; γ -氨基丁酸; 丹酰氯; 高效液相色谱

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2013)02-0134-05

Determination of γ -Aminobutyric Acid in Leaves of *Santalum album* L. by HPLC

YANG Yan¹, HE Li-ping^{1,2}, GAO Xiang-yang¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Instrumental Analysis & Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A method was established by reversed-phase high performance liquid chromatography for determining the content of γ -aminobutyric acid (GABA) in leaves of *Santalum album* L. The sample was pretreated by soxhlet extraction to eliminate the pigments with ether, and then by water extraction and alcohol precipitation to eliminate sugar and protein. GABA was derivatized with dansyl chloride (Dns-Cl) and isolated by reversed-phase HPLC. GABA was detected quantitatively by HPLC with fluorescence detection. Nice linear relationship between peak area and concentration was obtained with the linear regression equation as $y = 475\ 211x + 69\ 037$, $R^2 = 0.999\ 8$. The recovery of standard addition was in the range of 112% to 120%. The detection limit of GABA was 7 $\mu\text{g/g}$. The established HPLC method is simple, economic, stable and accurate with good reproducibility. It can be applied on determination of GABA in leaves of *Santalum album* L.

Key words: leaves of *Santalum album* L.; γ -aminobutyric acid(GABA); dansyl chloride; HPLC

檀香别名白檀,是檀香科檀香属常绿小乔木。因檀香芯材是珍贵的木材和药材,檀香已在广东、广西等地大面积种植。檀香人工林经营周期较长,但产生的大量檀香叶却被遗弃,如果能加以应用可产生可观经济效益。目前对檀香的研究多集中在芯材,叶子的研究报道较少。在印度,民间用檀香叶提取物与牛奶一起口服缓解淋病^[1]及用混合的檀香叶粉末与椰子油外敷治疗荨麻疹^[2]。闫冲等^[3]从檀香叶中分离出牡荆苷、异牡荆苷等 8 种黄酮类单体,而牡荆苷、异牡荆苷是抗癌抗肿瘤的天然药物成分。秦明芳等^[4]研究发现檀香叶水提醇沉液具有加强衰竭离体蛙心正性肌力和增加心率作用,还具有较好的抗疲劳作用。这些研究表明檀香叶含有很多生理活性物质,具有良好的开发潜力。黄娟娟等^[5]研究得知檀香叶无毒,叶中富含 30 多种氨基酸,其中谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸含量较高,还含有 γ -氨基丁酸(GABA)和较高含量的硒,已将其开发成多种檀香保健茶。近年来国内外兴起了对茶叶中 GABA 的富集研究^[6-8]。GABA 是非蛋白质天然氨基酸,具有降血压、促进生长激素分泌等多种生理功能。在谷氨

收稿日期:2012-03-19

作者简介:杨艳(1986-),女,江西樟树人,硕士,研究方向为食品质量与安全

* 通讯作者:贺丽苹,博士,硕士生导师,研究领域为食品营养与化学,生物分析化学;E-mail:heliping@scau.edu.cn。

酸脱羧酶(GAD)的作用下谷氨酸可转化为GABA。而檀香叶中谷氨酸的含量高,可为GABA的富集提供天然的来源。本研究檀香叶中GABA的检测方法可为其开发利用、GABA的富集研究奠定基础。目前国内外对GABA的分析检测方法有比色法^[9]、氨基酸分析法^[10]、高效液相色谱法(HPLC)^[11-12]等。氨基酸分析法需用生理体液体系测定,耗时太长(130 min)。胺的定量方法传统上采用将氨基用丹酰氯、4-二甲氨基苯基偶氮苯磺酰氯等进行柱前衍生后,HPLC分离检测的方法,但由于檀香叶中大量色素、其他氨基酸、糖类等的干扰,丹酰氯^[13-14]柱前衍生-HPLC法不能直接用于檀香叶中GABA的检测。本研究采用索氏提取除色素、水提醇沉除糖类和蛋白质的预处理方法,以丹酰氯为衍生试剂,柱前衍生,生成的衍生产物在4℃下稳定性高,经HPLC分离后以荧光检测器检测,可获得理想的结果。

1 实验

1.1 仪器与试剂

LC-10AD 高效液相色谱仪(岛津)附荧光检测器(RF-10AXL);AXW-8 Temp Controller 柱温箱;电热鼓风干燥箱;HH-1 恒温水浴锅;高速离心机 Eppendorf Centrifuge 5810,德国;MILLIPORE 超纯水机,德国。 γ -氨基丁酸(GABA)标准品,美国 Sigma 公司;丹酰氯(Dns-Cl):Alfa Aesar;乙腈(acetonitrile),色谱纯;甲醇(CH₃OH)、碳酸氢钠(NaHCO₃)、乙酸钠(NaAc)、三氯化铝(AlCl₃)、氢氧化钾(KOH),均为分析纯。檀香叶由广东省佛山市绿缘生态科技有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 檀香叶的干燥处理 对2010年9月采集的檀香老叶和嫩叶混在一起,直接40℃干燥处理。对2011年7月采集的檀香老叶(第8至12片叶)和嫩叶(一芽四叶)进行3种处理,处理1:直接40℃干燥;处理2:微波灭酶后40℃干燥;处理3:微波灭酶后80℃干燥。对2011年9月采集的檀香叶微波灭酶后80℃干燥。

1.2.2 样品前处理方法 分别采用了3种净化方法去除色素、糖等干扰物质。

1)采用甲醇,AlCl₃法^[15]分别去除脂溶性色素和水溶性色素。称取2.5g样品加入装有10mL甲醇的离心管中,离心,弃上清液,待沉淀干燥后,将沉淀转移至烧杯内,水提,提取液定容至25mL,取1mL样品提取液,分别加入100、120、140、150、160、170、180 μ L和2mol/L AlCl₃溶液,为保证体积相同再分别加入80、60、40、30、20、10和0 μ L的蒸馏水,室温振荡15min,放置于高速冷冻离心机内12000r/min离心5min,各取0.5mL上清液,分别加入300 μ L 1mol/L KOH溶液,室温振荡5min后,12000r/min离心5min,取上清液,340nm处测定吸光值。

2)采用液-液萃取法去除色素。茶叶中 γ -氨基丁酸的提取方法一般为水提法和70%乙醇提取法^[16]。采用70%乙醇提取GABA后,通过真空浓缩去除提取液中的乙醇,再用乙醚进行萃取除色素。

3)采用索氏提取乙醚脱色、水提醇沉法净化。

1.2.3 样品制备 将2010年9月采集后40℃烘干的檀香叶,用粉碎机充分搅碎后全部过孔径0.25mm筛,然后准确称取0.25g的檀香叶粉末,用乙醚进行索氏提取脱色,直至索氏提取器中的乙醚呈现无色为止。将脱色后的样品全部转移至烧杯中,然后加入10mL的蒸馏水,80℃水浴下提取20min,将上清液吸出,重复此操作3次,将3次提取液合并进行过滤,然后向过滤液中加入乙醇,使样品液中乙醇体积分数达90%,放置4℃冰箱中静置过夜,10000r/min下离心10min,将上清液真空浓缩干燥至刚刚蒸干,加入0.2mol/L的pH值为9.8的NaHCO₃溶液定容至2mL备用。

1.2.4 标准溶液的配制 准确称取GABA标准品10mg用0.2mol/L的pH值为9.8的NaHCO₃定容至10mL,置4℃冰箱储存备用。

1.2.5 样品衍生化 取NaHCO₃定容的样液20 μ L于1.5mL离心管中,加入80 μ L 0.2mol/L的pH值为9.8的NaHCO₃,100 μ L 20g/L丹酰氯的丙酮溶液,摇匀后避光60℃水浴60min,再加入50 μ L的100g/L丙氨酸水溶液,摇匀后继续避光60℃水浴30min,加入甲醇750 μ L使溶液总体积至1mL,经0.45 μ m滤膜过滤后作为上机测定液。

1.2.6 色谱条件 色谱柱为反相C18柱(Dikm)(150mm \times 4.6mm,5 μ m);流动相A为25mmol/L pH值5.94的乙酸钠溶液(含3%正丙醇,10%乙腈);流动相B为乙腈;荧光检测,发射波长340nm,激发

波长 510 nm;流速为 1 mL/min;柱温为 40 ℃;进样量 10 μL。以不同配比的 A-B(体积分数比 100%:0%, 71.4%:28.6%, 10%:90%, 10%:90%, 100%:0%)进行梯度洗脱,时间分别为 0、25、30、35、40 min。

2 结果与分析

2.1 样品预处理的探讨优化试验

由于植物叶子中色素含量较高,干扰测定,首先参照已有方法^[15]——甲醇、AlCl₃ 分别进行了去除檀香叶中脂溶性色素和水溶性色素的试验,在 340 nm 下进行紫外测定,发现样品溶液的紫外吸收值大于 1(见图 1),而文献[15]在应用此方法处理桑叶后,紫外测定吸收值小于 0.5。表明采用文献的这种方法,无法有效地去除檀香叶中的大量色素,该方法不适合檀香叶中色素的有效去除,而且这种预处理方法也无法去除檀香叶中的糖类物质。

采用液-液萃取除色素的方法,醇提乙酰萃取后,样品液呈现黄绿色且黏稠,衍生后上机测定显示尽管可鉴别到 GABA 的峰,但达不到完全分离。表明其中的色素、尤其是糖类等仍残留较多,净化不理想,干扰了 GABA 的分离。

而改用索氏提取法除去色素、再用水提醇沉除去糖类和蛋白质的预处理方法对样品进行净化后,获得的样品溶液澄清透明呈浅黄色,上机测定获得了对 GABA 良好的基线分离,如图 2(c)所示。表明采用此预处理法,能成功除去檀香叶中大量的色素、糖类、蛋白质等干扰测定的物质,保证了随后色谱法的有效分离。

2.2 HPLC 方法的建立

采用 1.2.2 节优化的前处理方法净化样品并进行衍生后上机测定,从以下几个方面对建立的 HPLC 方法进行评价。

2.2.1 标准曲线 取 1.2.5 节衍生后的 GABA 质量浓度分别为 2、4、6、10、20 mg/L 的标准液各 10 μL 进样,按上述色谱条件测定,测得 GABA 标准品的色谱图如图 2(b)所示。以峰面积积分为纵坐标,标准品浓度为横坐标,绘制得到标准曲线,其回归方程为 $y = 475\ 211x + 69\ 037$, $R^2 = 0.999\ 8$,表明此方法线性好。

2.2.2 精密度与重复性试验 取同一批次的 GABA 样品衍生溶液,精密吸取 10 μL,连续进样 5 次,测定 GABA 的峰面积,分别为 437 753、440 903、436 900、441 000、440 950,计算得到其峰面积的标准偏差(RSD)为 0.46% ($n=5$),结果显示分析方法的精密度良好。

取同一样品 5 份,制备 GABA 衍生溶液,分别进样,GABA 峰面积分别为 440 903、437 790、440 700、437 050、440 030,其积分值的 RSD($n=5$)为 0.40%,结果显示分析方法的重复性好。

2.2.3 稳定性考察 取同一样品溶液,按 1.2.6 节色谱条件分别在衍生反应后的 0、4、8、12、18、24 h 进行检测,GABA 峰面积的 RSD($n=5$)为 0.94%;日间稳定性采用每周测定一次,连续测定 3 次,GABA 峰面积的 RSD($n=5$)为 4.23%。表明 4 ℃ 条件下储藏的衍生化的氨基酸溶液在日内和日间稳定性良好,且此反应溶液在 4 ℃ 下可储藏 14 d,结果见表 1。

2.2.4 回收率试验及最低检测限 向已知 GABA 含量的檀香粉末中加入质量相等的 GABA,GABA 提取、衍生后进样测定分析,计算前加标回收率,结果见表 2,回收率为 108%~116%,RSD 为 3.50% ($n=3$)。向已知浓度的檀香叶样品中添加不同浓度水平的标准溶液,添加量分别为 0.5、1 和 2 μg,重复样品的衍生处理后进样测定分析,扣除样品中原有的含量,计算加标回收率,结果见表 3,回收率为

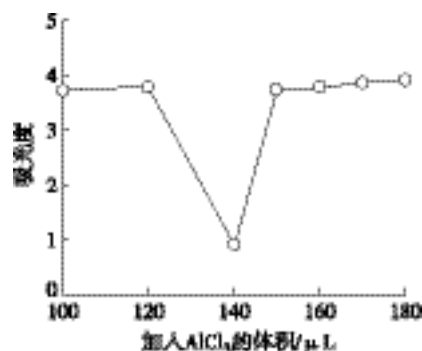


图 1 去色素效果实验

Fig.1 The tests of eliminating pigments

表 1 稳定性实验结果

Table 1 Results of stability tests

时间 time	峰面积 area	RSD/%	
0 h	355 379		
4 h	352 624		
日内 intra-day	8 h	354 785	0.94
	12 h	349 580	
	18 h	359 700	
	24 h	354 946	
	0 week	355 379	
日间 inter-day	1 week	375 273	
	2 week	386 450	

112%~120%。每毫升样品加标量为 1 μg 时,做了 2 个平行,回收率分别为 119.7% 和 120%。前加标和后加标回收率偏高有待进一步研究。以 3 倍信噪比计算检出限,最低检测限可达 7 $\mu\text{g/g}$,表明此分析方法灵敏度高,满足檀香叶中 GABA 的定量检测。

表 2 前加标回收率试验

Table 2 The recovery tests that GABA was added to the samples of leaves of *Santalum album* L. before extraction ($n=3$)

样品质量/g quality	加入标品质量/mg adding quality of GABA	样品含 GABA/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) GABA content of samples	实测 GABA 含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) measuring content of GABA	前加标回收率/% recovery	RSD/%
0.25	0.06	0.2411	0.5271	116	3.50
0.25	0.06	0.2411	0.5012	108	
0.25	0.06	0.2411	0.5124	113	

2.3 檀香叶中 GABA 的测定

按照本方法对檀香叶中 GABA 含量进行测定,结果见表 4。

植物体内 GABA 是由谷氨酸经 GAD 脱羧而来。Tsushida 和 Murai^[17]报道了茶叶中 GAD 的最适温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。酶

是一种由生物活细胞具有催化功能的蛋白质,它与其它蛋白质一样,也有等电点和蛋白质变性作用。蛋白质变性的不可逆性,确定了用加热能钝化酶或者使酶完全丧失活性的物理基础。微波加热时的物理环境有温度场和电磁场,两种场同时存在,其合作用能大大加强被加热物料的蛋白质变性作用,从而使酶钝化或完全丧失活性。从研究(表 4)也可以看出,微波具有使檀香叶中 GAD 失活的作用;在 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥条件下,嫩叶中 GAD 活性明显高于老叶;与微波灭酶处理相比,直接在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干的过程中,嫩叶利用自身的谷氨酸转化为 GABA,使 GABA 含量增加了 0.29 mg/g ,表明檀香嫩叶具备可被开发为富含 GABA 保健茶的潜能。

表 4 不同处理檀香叶中 GABA 含量测定结果

Table 4 The GABA result of leaves of *Santalum album* L. by different processing

采摘时间 time	檀香叶样品处理条件 samples of leaves of <i>Santalum album</i> L.	GABA 的含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) content of GABA
2011 年 7 月 July, 2011	40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 dried at 40 $^{\circ}\text{C}$	嫩叶 young leaves 0.40 老叶 old leaves 0.10
	微波灭酶后 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 dried at 40 $^{\circ}\text{C}$ after microwave treatment	嫩叶 young leaves 0.11 老叶 old leaves 0.077
2011 年 7 月 July, 2011	微波灭酶后 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 dried at 80 $^{\circ}\text{C}$ after microwave treatment	嫩叶 young leaves 0.063 老叶 old leaves 0.058
	微波灭酶后 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 dried at 80 $^{\circ}\text{C}$ after microwave treatment	嫩叶 young leaves 0.064 老叶 old leaves 0.052

同时从表 4 可以看出,在秋季不同的月份采摘的檀香老叶和嫩叶中 GABA 的含量差异不大。

图 2(a)为空白反应的谱图,b 为 4 mg/L GABA 标准品的谱图,c 为按 1.2.2 节的方法 3) 处理后衍生的样品谱图,从图 2 可看出经索氏提取除色素、再用水提醇沉去除糖类和蛋白质的预处理方法,能有效去除干扰物质,获得样品中 GABA 的良好分离。

以上研究结果表明,檀香叶中色素、糖类、蛋白质等干扰物质较多,用简单的除色素方法不能达到测定效果,而采用索氏提取除色素、再用水提醇沉去除糖类和蛋白质的预处理方法,能有效去除干扰物质,衍生化后进行色谱分析,可获得对样品中 GABA 的良好基线分离和高灵敏度、准确的测定,GABA 的出峰时间约为 22 min,黄晓等^[18]研究丹酰氯柱前衍生高效液相色谱法测定大鼠脑组织中的 GABA 含量,其出峰时间超过 32 min,本研究建立的方法比之分析时间也大大缩短。

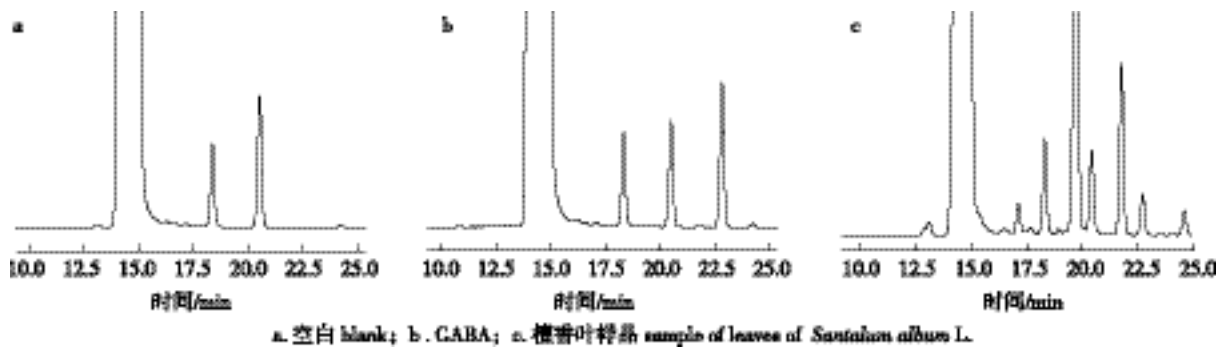


图2 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram

3 结论

3.1 建立了采用索氏提取除色素、水提醇沉去除糖类和蛋白质的预处理方法,以丹酰氯为衍生试剂,利用高效液相色谱进行分析,能准确测定檀香叶中 γ -氨基丁酸(GABA)的含量。

3.2 檀香嫩叶中含有谷氨酸脱羧酶(GAD),在 40 °C 条件下,可将内源谷氨酸转化为 GABA,表明檀香叶具有富集 GABA 的潜力。本方法在 0~20 mg/L 范围内有良好的线性关系($R^2 = 0.9998$);样品的精密度试验,其峰面积的标准偏差 RSD 为 0.46% ($n = 5$);样品的重复性试验,其峰面积的 RSD ($n = 5$) 为 0.40%;检测限为 7 $\mu\text{g/g}$;前加标回收率为 108%~116%,RSD 为 3.50% ($n = 3$);后加标回收率为 112%~120%;表明本方法操作较为简便,精密度高,具有较好的分离度,测定结果准确可靠,灵敏度高。本方法不仅能满足檀香叶中 GABA 含量的检测,此方法还可应用于林产植物、饮料、发酵液中 GABA 的检测及 GAD 酶活的测定。

参考文献:

- [1] ALAGESABOOPATHI C. Ethnomedicinal plants and their utilization by villagers in Kumaragiri hills of salem district of Tamilnadu, India[J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2009, 6(3): 222-227.
- [2] RAJAKUMAR N, SHIVANNA M B. Ethno-medicinal application of plants in the eastern region of Shimoga district, Karnataka, India[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 126(1): 64-73.
- [3] 闫冲, 林励, 刘红菊, 等. 檀香叶黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3130-3133.
- [4] 秦明芳, 谢金鲜, 周红海, 等. 檀香茶叶水提醇沉液对心血管的作用及抗疲劳的实验研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 962-968.
- [5] 黄娟娟, 杨艳, 贺丽苹, 等. 檀香叶提取物急性和亚急性毒性研究[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 179-185.
- [6] 邢志强. 茶叶 γ -氨基丁酸富集方法及其检测方法的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2009.
- [7] 黄亚辉. 茶树种质间谷氨酸脱羧酶活性差异及 γ -氨基丁酸茶的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学博士学位论文, 2010.
- [8] SAWAI Y, YAMAGUCHI Y, MIYAMA D, et al. Cycling treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the content of γ -aminobutyric acid in tea shoots[J]. Amino Acids, 2001, 20(3): 331-334.
- [9] 陈恩成, 张名位, 彭超英, 等. 比色法快速测定糙米中 γ -氨基丁酸含量研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(1): 125-127.
- [10] 任红波. 氨基酸分析仪快速测定糙米中的 γ -氨基丁酸[J]. 杂粮作物, 2003, 23(4): 246-247.
- [11] 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.
- [12] 郑连姬, 李智, 周雅琳, 等. 发芽糙米中 γ -氨基丁酸的 HPLC 分析方法[J]. 食品科技, 2011, 36(8): 274-276.
- [13] 黄俊. 利用短乳杆菌制备 γ -氨基丁酸相关过程研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2006.
- [14] MINOCHA R, LONG S. Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1035(1): 73-73.
- [15] 黄柳舒, 沈莲清, 王向阳. 改良比色法测桑叶中 γ -氨基丁酸含量及其热稳定性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 328-335.
- [16] 黄怀生, 陈金华, 李志刚. 茶叶中 γ -氨基丁酸的提取测定方法研究进展[J]. 福建茶叶, 2006(3): 7-9.
- [17] TOJIRO T, TOSHINOBU. Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(11): 2865-2871.
- [18] 黄晓, 康学军, 蒙艳斌. 改良丹酰氯柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸类神经递质[J]. 检验医学, 2009, 24(2): 157-158.