

高效液相色谱法测定欧李不同部位 γ -氨基丁酸的含量

董姊怡, 王安萁, 李卫东*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要: 采用柱前衍生化高效液相色谱法测定欧李不同部位的 γ -氨基丁酸(GABA)含量。色谱条件采用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.1% 乙酸溶液为流动相, 检测波长为 254 nm。 γ -氨基丁酸在 5 ~ 100 μ g·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。结果表明, 欧李不同部位的 GABA 含量差异较大, 含量由高到低顺序为: 当年生茎>芽>叶>花>花蕾>果肉>根, 当年生茎中 GABA 含量最高(912.9 μ g·g⁻¹), 根中 GABA 含量最低(263.3 μ g·g⁻¹)。该方法操作简便、结果稳定、适合于欧李不同部位中 γ -氨基丁酸含量测定, 为欧李资源的综合开发提供了基础数据。

关键词: γ -氨基丁酸; 欧李; 含量; 不同部位

中图分类号: S662.5

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)02-0060-05

Determination of the Content of γ -aminobutyric acid in Different Parts of *Cerasus humilis* by High Performance Liquid Chromatography Method

DONG Ziyi, WANG Anqi, LI Weidong*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Using pre-column derivatization and high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine the content of gamma-aminobutyric acid (GABA) in different parts of *Cerasus humilis*. The chromatographic conditions adopt the C_{18} chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 microns) with acetonitrile - 0.1% acetic acid solution as mobile phase and the detection wave length of 254 nm. GABA showed a good linear relationship in the linear range inside 5-100 μ g·mL⁻¹. Results showed that the content of GABA in root, stem, leaf, bud, flower, flower buds, fruits were really different, and it is the highest in the stem and the lowest in the root, which is 912.9 μ g·mg⁻¹ and 263.3 μ g·mg⁻¹, respectively. This method is easy to operate, meanwhile it has stable results and is really suitable for determining the content of GABA in different parts of the *C. humilis*, which provides the basis in the comprehensive development of the *C. humilis*.

Key words: Gamma-aminobutyric acid; *Cerasus humilis*; Content; Different parts

欧李(*Cerasus humilis*)为蔷薇科樱桃属的小灌木,为我国特有的一个物种,主要分布在内蒙古、辽宁、山西、河南、河北等地区^[1],具有抗寒耐旱、耐盐碱、适应性强等特点^[2],欧李的种子入药称郁李仁,研究表明精炼欧李仁油中含有大量的不饱和脂肪酸,其中最主要的是油酸和亚油酸,具有很好的抗氧化性质,对羟自由基的清除率达

90.28%^[3]。因其果实中钙含量居水果之首,故又称“钙果”^[4]。欧李果实香气浓郁,风味独特^[5],富含矿物质^[6]、氨基酸、维生素等多种营养成分^[7],以及多酚、类黄酮、单宁、花色苷等活性成分^[8],其中 γ -氨基丁酸也是其重要的功能性成分之一^[9]。 γ -氨基丁酸又名 4-氨基丁酸(4-Aminobutanoic acid, 4-AB, 简称 GABA)和 γ -氨基酪酸,广泛存在于自然界,由谷氨酸(Glutamic acid, Glu)经谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, EC4.1.1.15, 简称 GAD 或 GDC)催化而来^[10],是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,是一种多功能分子^[11-12]。GABA 对人与动物均有多种生理功能,例如利尿、调节血压、镇静安神、促进脑部血流、增进脑活力、营养神经细胞、增加生长激素分泌、健肝利肾、预防肥胖、

收稿日期: 2017-01-26

基金项目: 国家林业局公益性行业科研专项(201504710); 北京中医药大学国家级创新训练计划项目(BJGJ1533)

作者简介: 董姊怡(1994-),女,在读本科,研究方向: 中药学(临床中药方向)。

通讯作者: 李卫东,男,博士,研究员,博士生导师, E-mail: liweidong2005@126.com

促进乙醇代谢(醒酒)、改善更年期综合症等多种功效^[13-17]。最新研究发现,GABA能促进人的胰岛 β 细胞增生,提示GABA有望用于人类I型糖尿病的治疗^[18]。刘俊英等^[19]仅对欧李叶片中GABA含量进行了研究,但对欧李其他部位未开展相关研究工作。

本研究建立了柱前衍生化高效液相色谱分析GABA含量的方法,应用该方法测定欧李不同部位中GABA含量,研究结果为进一步开发欧李系列功能性产品提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Alliance(e2695)型高效液相色谱仪(Waters); DIKMA Diamonsil C18 色谱柱(迪马科技,4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);G20型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);PHS-3CW pH计(上海般特仪器制造有限公司);101-2AB型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);LRH-150-G光照培养箱(广东省医疗器械厂);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,总功率500 W,频率40 KHz);旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂

γ -氨基丁酸(上海源叶生物科技有限公司,色谱纯,纯度 $\geq 99\%$);茚甲氧羰酰氯 Fmoc-Cl(上海麦克林生化科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$);甘氨酸(天津市福晨化学试剂厂,纯度 $\geq 99.9\%$);乙腈(Fisher化学,色谱纯,纯度 $\geq 99.9\%$);冰乙酸(天津市丰越化学品有限公司,优级纯,纯度 $\geq 99.8\%$);氢氧化钠、硼酸、氯化钾(北京化工厂,分析纯),纯净水(杭州娃哈哈百立食品有限公司)。

1.3 样品采集与预处理

样品采自于河北省保定市满城区欧李种植基地的“京欧2号”品种^[20]。2015年11月采集根。2016年4~5月,采集当年生茎、叶、芽、花、花蕾,于烘干箱中65 $^{\circ}$ C烘24 h,粉碎机粉碎,过60目筛,备用。

2016年7月,采集成熟果实,取果肉于烘干箱中65 $^{\circ}$ C烘48 h,研磨粉碎,过20目筛,备用。

1.4 对照品溶液的制备

精密称取10.00 mg GABA对照品,置10.0 mL容量瓶中,加水定容至刻度,摇匀即为1.00 mg $\cdot$ mL⁻¹ GABA对照品溶液。分别用水稀释至5、10、20、

40、60、80、100 μ g $\cdot$ mL⁻¹的GABA系列标准溶液,摇匀备用。

1.5 样品制备

分别准确称取2.0 g各部位样品(平行3份)于100 mL锥形瓶,加去离子水超声提取,每次加60 mL,提取3次(功率70%,每次10 min),合并提取液,抽滤滤过,70 $^{\circ}$ C减压回收,浓缩至约20 mL,用去离子水定容于25 mL容量瓶,待测样品。

1.6 样品柱前衍生化

参考史正琴、宋志峰等^[21-22]的方法,略有改动。分别取150 μ L样品上清液和系列标准品溶液,加入150 μ L硼酸缓冲盐(pH=8.5),涡旋振荡10 s,加300 μ L Fmoc-CL溶液,涡旋振荡10 s,25 $^{\circ}$ C水浴20 min,涡旋振荡10 s,加150 μ L甘氨酸溶液,涡旋振荡10 s,加150 μ L 0.1%乙酸,涡旋振荡10 s,加300 μ L纯净水,涡旋振荡10 s,经0.22 μ m滤膜过滤,装液相小瓶,4 $^{\circ}$ C保存,待测。

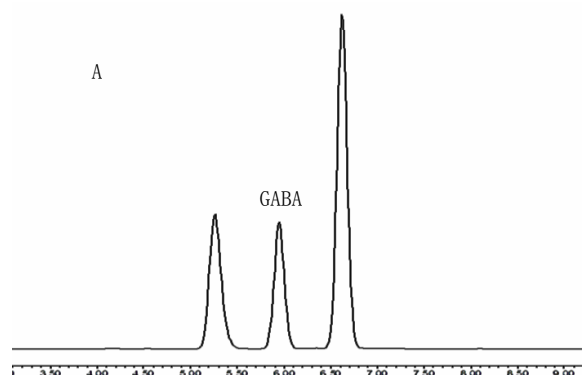
1.7 色谱条件

参考史正琴等^[21]的方法,略有改动。色谱柱为DiKMA Diamonsil C18 色谱柱(迪马科技,4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m),流动相A为0.1%乙酸溶液,流动相B为乙腈(A:B=45:55),等度洗脱。紫外检测波长254 nm,流速为1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温50 $^{\circ}$ C,样品温度4 $^{\circ}$ C,进样量20 μ L。

2 方法学考察

2.1 专属性

取80 μ g $\cdot$ mL⁻¹的GABA对照品溶液,按照2.2样品处理方法及2.3样品柱前衍生化方法处理,制备溶剂空白对照溶液,吸取20 μ L,注入高效液相色谱仪中,得到色谱图如图1所示,A图与C图GABA的保留时间分别为5.950 min、6.012 min,且衍生化试剂的色谱峰对于GABA色谱峰无干扰,表明该方法专属性良好。



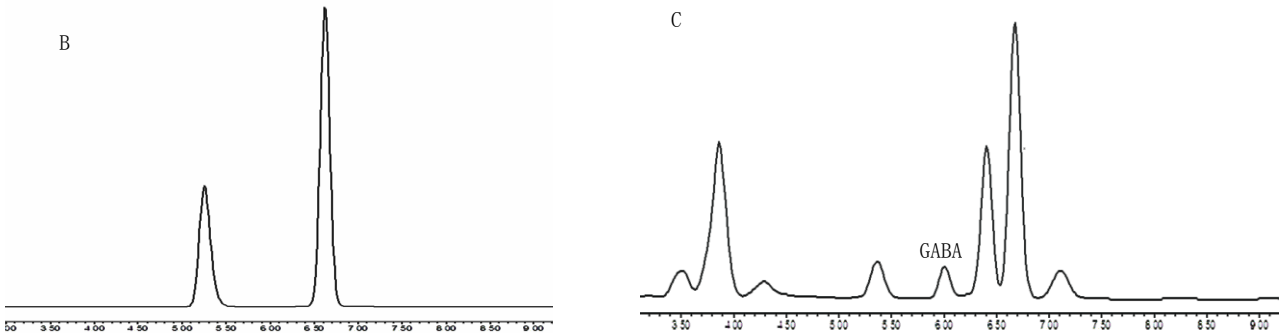


图1 GABA 高效液相色谱图
A.γ-氨基丁酸;B.溶剂空白对照;C.样品(当年生茎)

2.2 线性关系

取 5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液进样,按照 2.2 样品处理方法及 2.3 样品柱前衍生化方法处理,准确吸取衍生化处理过的系列对照品溶液各 20 μL ,注入高效液相色谱仪中。以 GABA 质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,以 GABA 各浓度的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y=1.0\times10^{-7}X+0.0005$, $R^2=0.9996$,表明 GABA 在 5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。以 3 倍噪

声所相当的待测物质的浓度作为方法的检出限,计算最低检出限质量浓度为 0.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;以 10 倍噪声所相当的待测物质的浓度作为方法的定量限,计算最低定量限质量浓度为 1.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度试验

取 6 份欧李叶,按照 2.2 样品处理方法及 2.3 样品柱前衍生化方法处理,进样测定,以 GABA 含量考察重复性,GABA 的 RSD 为 1.45%,小于 2%。结果如表 1 所示,表明该方法的精密度良好。

表 1 精密度试验测定结果

编号	峰面积(AU)	平均峰面积(AU)	RSD(%,n=6)
1-6	552 331、566 727、560 606、564 697、559 313、545 115	558 131.5	1.45

2.4 稳定性试验

取 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GABA 对照品溶液,按照 2.2 样品处理方法及 2.3 样品柱前衍生化方法处理后,分别于 24 h 内每隔 2 h 进样一次,进行 GABA 含量测

定,结果见表 2。由表 2 可知,GABA 峰面积的 RSD 值为 1.2%,表明 GABA 衍生物在 24 h 内稳定。

2.5 回收率试验

取已知含量的欧李根,一年生茎、叶、花、花蕾、果实样品,以含量 1:1 的比例加入一定质量的 GABA 对照品(重复 3 次),按照 2.2 样品处理方法及 2.3 样品柱前衍生化方法处理,进行检测,结果显示欧李的根,一年生茎、叶、芽、花、花蕾、果肉的 GABA 的平均回收率分别为 98.6%,104.2%,102.1%,99.3%,88.4%,90.3%,105.3%。RSD 分别为 2.52%,1.38%,1.86%,3.18%,1.22%,2.97%,2.86%。结果表明,此分析方法和测量系统准确度良好。

2.6 不同超声功率对 GABA 含量的影响

按照 2.2 的样品制备方法制备样品,改变超声功率(50%、60%、70%、80%、90%、100%),再按 2.3 样品柱前衍生化方法处理后,按照 2.4 的色谱条件进行检测,计算得到叶中 GABA 的含量分别为 586.4、590.3、596.0、468.6、549.3、483.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结果显示,提取时超声功率为 70% 时所提取的 GA-

表 2 稳定性试验测定结果

测定时间(h)	峰面积(AU)	平均峰面积(AU)	RSD(%,n=13)
0	974 739	997 872	1.2
2	1 006 631		
4	999 431		
6	1 015 678		
8	991 502		
10	982 985		
12	1 001 801		
14	1 011 443		
16	989 837		
18	1 000 819		
20	989 837		
22	994 804		
24	1 004 302		

BA 含量最高。因此,本研究采取 70% 功率作为 GABA 的超声提取功率。

2.7 样品含量测定

按照 2.2 进行样品制备,按照 2.3 衍生化,按照 2.4 色谱条件进行测定,得样品含量测定结果如表 3 所示。

表 3 样品含量测定结果($\bar{X} \pm S, n=3$)

部位	GABA 含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD(% , $n=3$)
根	263.3 $\pm$ 2.30 ^e	0.87
当年生茎	912.9 $\pm$ 0.65 ^a	0.07
叶	596.0 $\pm$ 5.69 ^c	0.95
芽	850.9 $\pm$ 4.04 ^b	0.48
花	574.4 $\pm$ 4.97 ^d	0.86
花蕾	526.5 $\pm$ 5.93 ^e	1.13
果肉	406.7 $\pm$ 4.87 ^f	1.20

注:不同字母表示 $P<0.05$ 水平上有显著性差异

表 3 表明,欧李不同部位的 GABA 含量差异较大,含量由高到低顺序为:当年生茎>芽>叶>花>花蕾>果肉>根,当年生茎中 GABA 含量最高,根含量最低,分别为 $912.9\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $263.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 提取条件的优化

本文探究了不同超声功率(50%、60%、70%、80%、90%、100%)对于 GABA 含量的影响。以欧李叶作为样品,按照 2.2 的样品制备方法制备,只改变超声功率,再按 2.3 样品柱前衍生化方法处理后,按照 2.4 的色谱条件进行检测,计算得到 GABA 的含量分别为 $586.4\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $590.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $596.0\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $468.6\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $549.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $483.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果显示提取超声功率为 70% 时所提取的 GABA 含量最高。因此,本实验选取 70% 的功率作为 GABA 的提取功率。

3.2 GABA 在其他植物中的含量分布

前人的研究表明,GABA 在其他植物的不同部位分布差异较大。如杨晶晶等^[23]的研究表明,GABA 质量分数在三七茎叶中为 0.49%,花中为 0.53%,而主根中不含 GABA。史正琴等^[21]研究了 GABA 在桑树不同部位的含量差异,结果表明,芽和叶中 GABA 的含量最高,质量分数分别为 0.97%、0.165%,皮部次之,果和木质部最低。

关于植物不同部位 GABA 含量差异较大的原因,Oliveira 等^[24]、Gustavsson 等^[25]认为,当植物细胞对 L-谷氨酸和谷氨酰胺需求减少时,L-谷氨酸可

转变成 GABA 而成为一种氮暂时贮存的形态,以备在合成蛋白质和氨基酸时利用。叶是主要的光合作用部位;新梢是生长最旺盛的部位之一,即一些基本生命物质前体的转运目的部位;芽生长代谢旺盛,尤其是对氨基酸与蛋白质的需求量和代谢量较大。这可能是植物生长、代谢旺盛的部位 GABA 含量较高的主要原因。

4 结 论

欧李作为我国特有的植物,含有多种营养成分,具有良好的开发前景,根据文献采用 70% 超声功率提取,选取 FMOC-CL 溶液作为衍生化试剂,利用 HPLC 法测定欧李不同部位(当年生茎、芽、叶、花、花蕾、果肉根)中的 GABA 含量,色谱条件采用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 乙酸溶液为流动相,检测波长为 254 nm。该方法具有精密度高、重复性好,结果准确,操作简便、耗时短,检测成本低等优点,适合作为欧李不同部位中 GABA 含量的检测方法。应用该方法分析结果表明,欧李不同部位的 GABA 含量差异较大,其中当年生茎中 GABA 含量最高,根中含量最低,分别为 $912.9\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $263.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 张 娟,闫福军.欧李选种及繁殖研究综述[J].吉林农业科学,2007,32(6):55-57.
- [2] 杜俊杰.我国大西北干旱区域退耕还林的先锋树种—欧李[J].北方果树,2001(5):31-32.
- [3] 高友君,任 清.人工栽培欧李仁油的提取、成分分析及抗氧化性[J].食品科学,2015,36(4):80-85.
- [4] 李卫东,李 欧,和银霞,等.基于 TXRF 法的欧李果肉中营养成分特征分析[J].食品科学,2015,36(4):164-167.
- [5] Ye Liqin, Yang Chunxiang, Li Weidong, et al. Evaluation of volatile compounds from Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.) germplasms by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography - mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 217: 389-397.
- [6] Li W D, Li O, Mo C, et al. Mineral element composition of 27 Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.) genotypes collected in China[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2014, 89(6): 674-678.
- [7] 张美莉,邓秋才,杨海霞,等.内蒙古欧李果肉和果仁中营养成分分析[J].氨基酸和生物资源,2007,29(4):18-20.
- [8] 曹 琴,杜俊杰.野生欧李营养特性分析[J].中国野生植物资源,1999,18(1):34-35.
- [9] 蔡愈杭,王小曼,戴文君.HPLC 法测定欧李果实中 γ -氨基丁酸的含量[J].食品工业,2014,35(7):156-158.
- [10] 叶惟玲. γ -氨基丁酸的发现史[J].生理科学进展,1986,17(2):187-189.

- [11] Gulati O D, Stanton H C. Some effects on the central nervous system of gamma-amino-n-butyric acid (GABA) and certain related amino acids administered systemically and intracerebrally to mice[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1960, 129(2): 178-185.
- [12] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs.[J]. *International Review of Cytology—a Survey of Cell Biology*, 2002, 213(4): 1-47.
- [13] Jiang B, Fu Y, Zhang T. Gamma-Aminobutyric Acid[M]. Canada and China: Yoshinori Mine, Eunice Li-Chan and Bo Jiang, 2010:121-133.
- [14] Narayan V S, Nair P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants[J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(2): 367-375.
- [15] Park K, Oh S. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(8): 1675-1679.
- [16] 许凡凡, 司辉清, 沈 强, 等. GABA 茶的生理功能及富集技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 381-385.
- [17] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 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): 528-533.
- [18] Purwana I, Zheng J, Li X, et al. GABA promotes human β -cell proliferation and modulates glucose homeostasis[J]. *Diabetes*, 2014, 63(12): 4197-4205.
- [19] 刘俊英, 辛秀兰, 苏东海, 等. 一种高 γ -氨基丁酸茶的制备方法: 中国, CN101897377A[P]. 2010-12-01.
- [20] 李卫东, 刘志国, 魏胜利, 等. 中熟欧李新品种‘京欧2号’[J]. *园艺学报*, 2010(5): 847-848.
- [21] 史正琴, 刘 超, 向 伟, 等. 桑树不同部位的 γ -氨基丁酸含量测定及提取条件优化[J]. *蚕业科学*, 2015(5): 908-913.
- [22] 宋志峰, 王 丽, 纪 锋, 等. 氨基酸分析中的柱前衍生技术[J]. *吉林农业科学*, 2004, 29(6): 54-58.
- [23] 杨晶晶, 刘 英, 崔秀明, 等. 高效液相色谱法测定三七地上部分 γ -氨基丁酸的含量[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(4): 606-609.
- [24] Oliveira R V, Pietro A C D, Cass Q B. Quantification of cephalixin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup[J]. *Talanta*, 2007, 71(3): 1233-1238.
- [25] Gustavsson E, Bjurling P, Åse Sternesjö. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468(1): 153-159.

(责任编辑:王 昱)