

# 高效液相色谱法测定板栗种子中的 $\gamma$ -氨基丁酸

高 茜<sup>1,2</sup>, 杜常健<sup>3</sup>, 史胜青<sup>3</sup>, 江泽平<sup>1,2</sup>, 韩振泰<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 2. 国家林草局森林生态环境重点实验室, 北京 100091; 3. 中国林业科学研究院林业研究所国家林草局林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法测定板栗种子中  $\gamma$ -氨基丁酸的分析方法。**方法** 板栗样品使用 2,4-二硝基氟苯乙腈进行衍生化前处理后, 以磷酸缓冲溶液(pH=7)、乙腈和水为流动相, 采取梯度洗脱的方式进行测定, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20  $\mu$ L, 使用紫外检测器, 测定波长为 360 nm。**结果** 本方法标准曲线呈现良好的线性关系, 相关系数达到 0.9996。方法的回收率为 109%, 相对标准偏差为 0.4%,  $\gamma$ -氨基丁酸最小检出限 0.05  $\mu$ g/mL。精密度实验得出 5 次进样的相对标准偏差为 0.55%。对 3 种不同品种的板栗种子进行测定时, 3 种样品的 RSD 分别为 3.077%、3.219%、5.333%, 平行性较好。**结论** 该方法快速、易操作, 具有较高的测量精密度和准确度, 对实际样品进行测试时能避免杂质峰的干扰, 重现性好, 能够满足对板栗种子中  $\gamma$ -氨基丁酸含量的检测要求。

**关键词:** 高效液相色谱法;  $\gamma$ -氨基丁酸; 板栗种子

## Determination of $\gamma$ -amino butyric acid in chestnut seed by high performance liquid chromatography

GAO Qian<sup>1,2</sup>, DU Chang-Jian<sup>3</sup>, SHI Sheng-Qing<sup>3</sup>, JIANG Ze-Ping<sup>1,2</sup>, HAN Zhen-Tai<sup>1,2\*</sup>

(1. *Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;*  
2. *State Forestry Administration Key Laboratory of Forest Ecology and Environment, Beijing 100091, China;* 3. *Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Beijing 100091, China*)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of teraminobutyric acid in chestnut seeds by high performance liquid chromatography. **Methods** After the sample was derivatized by 2, 4- dinitrofluorobenzene, it was determined by gradient elution with phosphate buffer solution (pH=7), acetonitrile and water as mobile phases. The column temperature was selected at 35 °C, the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 20  $\mu$ L, and the detection wavelength was 360 nm with ultraviolet detector. **Results** The standard curve of this method showed a good linear relationship with a correlation coefficient of 0.9996. The recoveries were 109%, the relative standard deviations was 0.4%, and the limit of quantitation was 0.05  $\mu$ g/mL. The precision experiment showed that the relative standard deviation of 5 injections was 0.55%. When the seeds of 3 different varieties of chestnut were measured, the

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAFRIFEEP201407)、国家林业和草原局科技发展中心项目(KJZXSA2019045)、中国林科院林业所林木培育重点实验室专项(ZDRIF201712)

**Fund:** Supported by Special Fund for Basic Research Business Expenses of Central-Level Public Welfare Research Institutes (CAFRIFEEP201407), Science and Technology Development Center of National Forestry and Prairie Bureau (KJZXSA2019045), and Special Funds for Forestry Cultivation Key Laboratory of Forestry Institute of Chinese Academy of Forestry (ZDRIF201712)

\***通讯作者:** 韩振泰, 高级实验师, 主要研究方向为液相色谱分析。E-mail: fenzixz@caf.ac.cn

\***Corresponding author:** HAN Zhen-Tai, Senior Experimenter, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China. E-mail: fenzixz@caf.ac.cn

RSD of the three samples were 3.077%, 3.219%, and 5.333%, respectively, with good parallelism. **Conclusion** The proposed method is fast and easy to operate, with high precision and accuracy of measurement, which can avoid the interference of impurity peaks when testing actual samples. It has good reproducibility, and is suitable for detecting  $\gamma$ -amino butyric acid in chestnut seeds.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography;  $\gamma$ -amino butyric acid; chestnut seeds

## 1 引言

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -amino butyric acid, GABA)是中枢神经系统中一种很重要的抑制性神经递质,具有降血压、抗惊厥、镇痛和改善记忆等生理活性,是很好的医疗药物及保健品原料<sup>[1,2]</sup>。GB 2760-2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<sup>[3]</sup>中规定 GABA 可以作为食品用合成香料,目前已广泛使用于饮料、巧克力制品、糖果、膨化食品中的制作过程中<sup>[4]</sup>。它也是一种天然活性成分,广泛存在于动植物体内。植物如豆属、参属、中草药等的种子、根茎和组织液中都含有 GABA<sup>[5]</sup>。同时在植物中, GABA 参与了包括调节细胞内 pH 环境、碳(C)、氮(N)营养平衡、花粉管的发育、抑制昆虫啃食、氧化还原调控、渗透调节、信号传递等在内的各种生理生化反应<sup>[6,7]</sup>。板栗(*Castanea mollissima* BL.)是我国重要的经济林树种之一,对展开胁迫研究和营养价值研究都具有重要的意义, GABA 不只可以作为营养评价的指标,更是一种胁迫信号,对于缓解胁迫具有重要的意义。因此研究板栗种子中 GABA 的定性与定量分析方法有着重要意义。

目前 GABA 的测试方法主要有薄层扫描法、酶法、毛细管电泳法、电极电位法、比色法、气相色谱法、液相色谱法等<sup>[8-14]</sup>。随着色谱技术的发展,高效液相色谱法因其样品预处理简单,方法准确度、精密度及灵敏度较高,在测定 GABA 的应用中日益广泛。由于对紫外、可见光不灵敏,目前对 GABA 的测定主要是采用衍生化法。本研究采用 2,4-二硝基氟苯乙腈(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)<sup>[15]</sup>作衍生试剂,对板栗种子中 GABA 进行衍生化处理后进行测定。衍生产物相比于原目标物有更高的灵敏度和检出限,使得 GABA 可以通过紫外检测器进行测定。以往未发现有针对板栗开展的 GABA 检测研究,且由于不同研究对象中杂质有很大区别,选取文献中色谱条件时存在杂质干扰,本文旨在对板栗种子衍生后的色谱条件进行优化,以期去除干扰,建立适用于板栗中 GABA 的液相色谱分析方法,为进一步研究 GABA 在板栗中的胁迫信号作用提供方法基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Waters 2695 型液相色谱仪、2487 紫外检测器、

Empower 工作站、Sunfire 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m)、KQ-600E 型超声波振荡器(昆山舒美有限公司); CR22GIII 型高速冷冻离心机(日本日立有限公司)。

GABA 的标准品(纯度>99%, 美国 Sigma 公司); 衍生试剂为 DNFB(源叶生物有限公司); 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 磷酸(分析纯, 北京化工厂); 水为 18.2  $\Omega$  的超纯水(英国 ELGA 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

准确称取 GABA 标准品 10.0 mg 至 25 mL 容量瓶中,加少量水超声波震荡至完全溶解,加水定容至刻度线摇匀后进行衍生处理。

取 1%DNFB(避光)和 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub>、标准溶液比例按照 1:1:1 混合,置于 60 °C 水浴中暗处理 1 h。处理后上机待测。

#### 2.2.2 色谱条件

柱温: 35 °C; 检测波长: 360 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20  $\mu$ L。

流动相 A 相: 磷酸缓冲溶液(pH=7): 0.2 mol/L NaHPO<sub>4</sub> 和 0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 比例为 61:39, 混合后稀释 2 倍; B 相: 乙腈; C 相: 水。梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相梯度表  
Table 1 Gradient table of mobile phases

序号	时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
1	0	84	8	8
2	20	20	35	45
3	30	84	8	8

#### 2.2.3 实际样品的制备和测定

在液氮冷却的条件下,将板栗种子研磨成粉末,取 0.4 g 加入 2 mL 蒸馏水,回收 GABA 处理取 0.4 g 加入 1 mL 蒸馏水和 1 mL 50  $\mu$ g/mL GABA,沸水水浴 90 min,离心取上清液进行衍生化处理,衍生方法同标准溶液。选择 3 个品种的板栗种子,每个处理 3 个重复。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件的优化

由于针对板栗种子中 GABA 的检测方法在文献中未

见报道, 使用参考文献中的色谱条件进行分析时, 往往出现干扰, 故对衍生后的色谱条件进行了优化。如流动相的比例, 色谱柱的选择等, 色谱柱选择 Sunfire 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m), 文献中流动相梯度见表 2, 色谱条件改变前后样品色谱图见图 1、图 2。优化条件后避免了杂质峰的干扰, 分离度更佳, 且峰的对称性很好。

### 3.2 标准曲线的绘制

取 20  $\mu$ L 标准溶液在上述色谱条件下进行色谱分析, 得到 GABA 的标准溶液色谱图(图 3)。重复进样 3 次, 求标样的峰面积平均值, 外标法计算 GABA 含量。

分别取 GABA 标准溶液 5、10、15、20、25、30  $\mu$ L, 在

上述色谱条件下进行色谱分析, 以进样量与峰面积作标准曲线, 得到标准样线性方程为  $Y=5.25e^{+007}X+6.17e^{+005}$ , 相关系数达到 0.9996, 呈良好的线性关系。

表 2 参考文献中流动性梯度表  
Table 2 Gradient table of mobile phases in reference

序号	时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
1	0	84	8	8
2	20	20	40	40
3	30	84	8	8

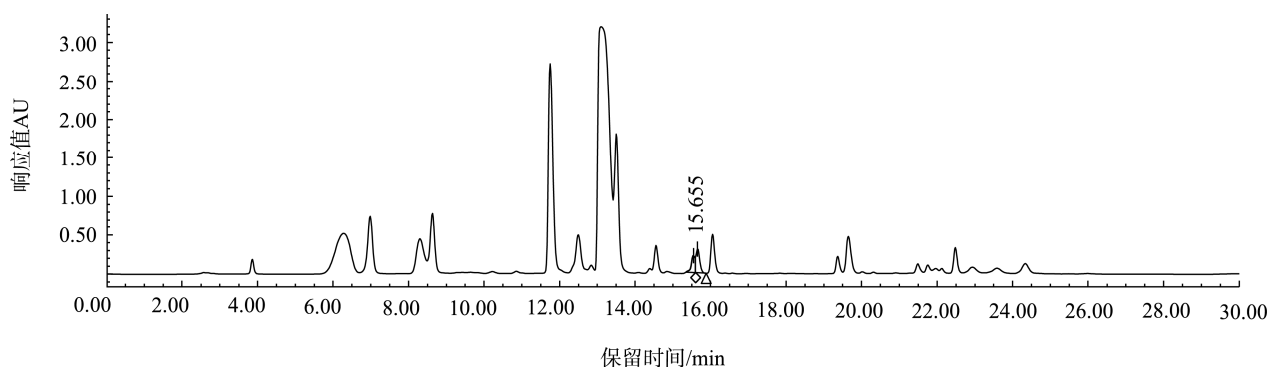


图 1 色谱条件改变前样品色谱图

Fig.1 Sample chromatogram before changing chromatographic conditions

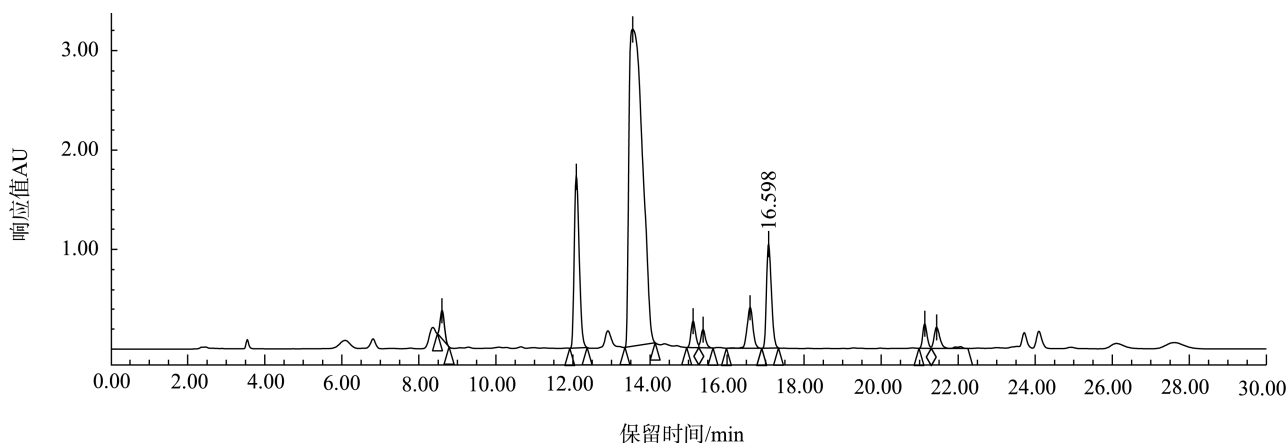


图 2 色谱条件改变后样品色谱图

Fig.2 Sample chromatogram after changing chromatographic conditions

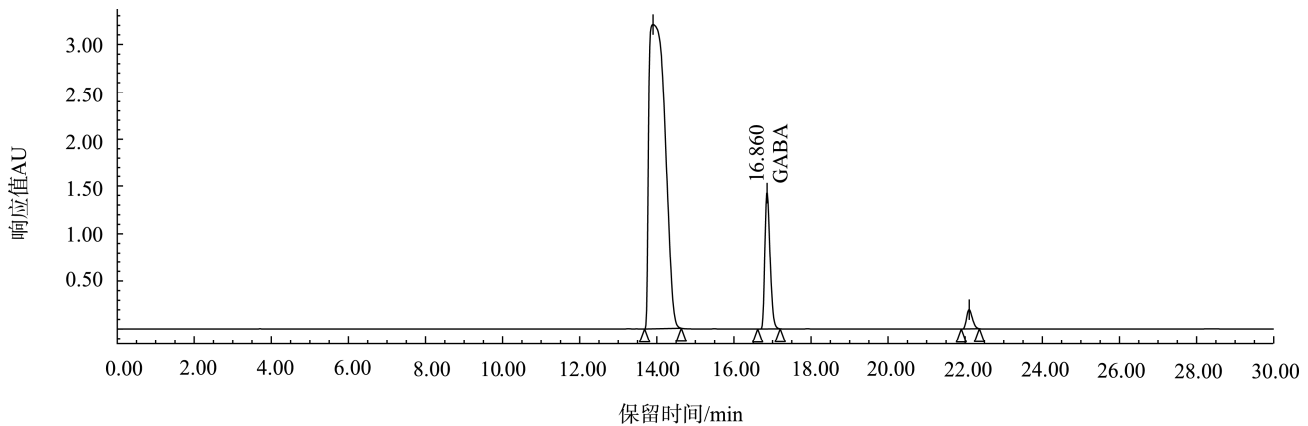


图 3 GABA 标准品色谱图  
Fig.3 Chromatogram of GABA standard

### 3.3 方法回收率及检出限

取 6 份等量样品, 其中 3 份加入 GABA 标准品按照 2.2.3 中方法制备样品溶液进行测定, 计算 GABA 的回收率, 得出平均回收率为 109.2%, RSD 为 5.24%( $n=3$ )。在选定的色谱条件下, 以信噪比的 3 倍峰高对应的 GABA 含量为检测限, 计算最小检测限为 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明本方法回收率稳定, 灵敏度高, 可以满足对板栗样品中 GABA 的检测要求。

### 3.4 精密度实验

将 GABA 标准溶液连续进样 5 次(浓度为 0.2  $\text{mg}/\text{mL}$ ), 每次进样 20  $\mu\text{L}$ , 峰面积平均值为 14428265, RSD 为 0.55%。表明该方法具有较高的测量精密度。

### 3.5 实际样品的测定

3 种不同品种的板栗种子, 进行衍生化处理后上机测试其中 GABA 的含量。测试结果见表 3 从表中可以看出, 对实际样品进行测定时, 3 个样品的 RSD% 分别为 3.077%、3.219%、5.333%。平行性较好。

表 3 实际样品中 GABA 的含量  
Table 3 The amount of GABA in the actual sample

样品编号	GABA 含量 /( $\text{mg}/100\text{ g}$ )	平均值 /( $\text{mg}/100\text{ g}$ )	RSD/%
1	5.071	4.914	3.077
	4.900		
	4.770		
2	6.671	6.662	3.219
	6.443		
	6.871		
3	2.343	2.493	5.333
	2.595		
	2.542		

## 4 结 论

使用 2,4-二硝基氟苯乙腈作为衍生试剂对板栗种子中的 GABA 进行衍生化前处理后, 应用高效液相色谱法对 GABA 含量进行测定。色谱条件为以磷酸缓冲溶液( $\text{pH}=7$ )、乙腈和水为流动相, 采取梯度洗脱的方式, 测定波长为 360 nm, 流速 1.0  $\text{mL}/\text{min}$ 。应用本方法测定, 前处理简单, 过程损失较少, 回收率稳定, GABA 的回收率为 109%, 精密度实验相对标准偏差为 0.55%, 检出限可达到 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对实际样品进行测试时发现, 目标峰分离度好, 杂质影响小, 且对 3 种不同品种的板栗种子进行测试时, 均能达到很好的重现性。表明该方法具有较高的测量精密度和准确度, 能够满足对板栗种子中 GABA 含量的检测要求。

## 参考文献

- [1] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等.  $\gamma$ -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.  
Yang SY, Lu ZX, Lv FX, *et al.* Research progress on microbial glutamate decarboxylase [J]. Food Sci, 2005, 26(9): 546-550.
- [2] 赵宏飞, 宋伟, 裴家伟, 等. 食品中三种  $\gamma$ -氨基丁酸检测方法比较[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(11): 51-55.  
Zhao HF, Song W, Pei JW, *et al.* Comparisons of three methods available for the analysis of  $\gamma$ -Aminobutyric acid from food environments [J]. China Dairy Ind, 2008, 36(11): 51-55.
- [3] GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].  
GB 2760 - 2011 National food safety standard-Standard for uses of food additives [S].
- [4] 许建军, 江波, 许时婴, 等.  $\gamma$ -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.  
Xu JJ, Jiang B, Xu SY, *et al.*  $\gamma$ -aminobutyric acid - a new type of functional food factor [J]. Food Ind Technol, 2003, 24(1): 109-110.
- [5] 徐自奥, 张军忠, 赵成仕. HPLC-ELSD 法测定食品中  $\gamma$ -氨基丁酸含量[J]. 化学分析计量, 2012, 21(5): 49-51.  
Xu ZO, Zhang JZ, Zhao CS. Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in food

- by HPLC-ELSD [J]. *Chem Anal Meterage*, 2012, 21(5): 49-51.
- [6] Bouché N, Fait A, Bouchez D, *et al.* Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6843-6848.
- [7] Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, *et al.* GABA signaling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters [J]. *Nature Commun*, 2015, 6: 7879.
- [8] 黄美娥, 彭胜, 陈阳波, 等. 南瓜叶中  $\gamma$ -氨基丁酸的提取及薄层扫描测定[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, (24): 1284-1287.  
Huang ME, Peng S, Chen YB, *et al.* Determination and extraction of  $\gamma$ -aminobutyric acid from pumpkin (*cucurbita mosehata*) leaves [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2012, (24): 1284-1287.
- [9] 胡红焱, 杨树德. 细菌荧光法酶生物发光分析法测定血清中  $\gamma$ -氨基丁酸[J]. *临床检验杂志*, 1998, 16(2): 67-69.  
Hu HY, Yang SD. The bioluminescence assay for  $\gamma$ -aminobutyric acid in serum [J]. *Chin J Clinic Lab Sci*, 1998, 16(2): 67-69.
- [10] 孔令瑶, 汪云, 曹玉华. 毛细管电泳-电化学法对发芽黑米胚芽中  $\gamma$ -氨基丁酸含量的检测[J]. *分析测试学报*, 2008, (5): 527-530.  
Kong LY, Wang Y, Cao YH. Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in germinated black rice germ by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. *J Instrum Anal*, 2008, (5): 527-530.
- [11] 张静, 李东辉.  $\gamma$ -氨基丁酸碳糊电极电位法测定  $\gamma$ -氨基丁酸含量[J]. *理化检测-化学分册*, 2013, 49(4): 458-460.  
Zhang J, Li DH. Potentiometric determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid with  $\gamma$ -aminobutyric acid modified carbon paste electrode [J]. *Ptca (Part B: Chem Anal)*, 2013, 49(4): 458-460.
- [12] 黄柳舒, 沈莲清, 王向阳. 改良比色法测桑叶中  $\gamma$ -氨基丁酸含量及其热稳定性研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(8): 328-335.  
Huang LS, Shen LQ, Wang XY. Spectrophotometry improvement determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in mulberry leaf and study on its thermal stability [J]. *Food Sci Technol*, 2010, 35(8): 328-335.
- [13] 徐小平. 脑内  $\gamma$ -氨基丁酸的毛细管气相色谱测定法[J]. *华西药理学杂志*, 1990, 5(2): 107-109.  
Xu XP. Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain by capillary gas chromatography [J]. *J Huaxi Pharm*, 1990, 5(2): 107-109.
- [14] 刘玲君, 凌森, 陈亮, 等. 高效液相色谱法检测含乳饮料中  $\gamma$ -氨基丁酸的含量[J]. *食品工业*, 2016, 37(9): 262-264.  
Liu LJ, Ling S, Chen L, *et al.* Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in milk beverages by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2016, 37(9): 262-264.
- [15] Wang L, Wang J, Yang L, *et al.* Effect of prauertorin C on 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease-like symptoms in mice [J]. *Biomed Pharm*, 2017, 86: 81-87.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介

高 茜, 工程师, 主要研究方向为环境污染与控制化学研究。

E-mail: gq8778@caf.ac.cn

韩振泰, 高级实验师, 主要研究方向为液相色谱分析。

E-mail: fenxizx@caf.ac.cn