

研究报告 Original Papers

Berthelot比色法测定植物叶片中 γ -氨基丁酸(GABA)含量的体系优化万蓝婷[#], 李暄妍[#], 程建峰^{*}, 张芳, 王梦醒, 蒋海燕

江西农业大学农学院, 南昌330045

[#]并列第一作者^{*}通信作者(chjfkarl@163.com)

摘要: Berthelot比色法作为目前一种相对简便、快速、准确和廉价的高通量测定植物叶片中GABA含量的方法仍存在杂质干扰及显色稳定性等问题, 需进一步深度优化。基于Berthelot显色反应, 本研究从测定波长、显色稳定性、显色试剂用量、显色条件、色素杂质去除和提取条件对其进行了系统优化。结果表明, 选用甲醇作溶剂, 50℃水浴进行3次叶绿素去除可最大程度地减少叶绿素杂质对GABA测定的影响; 80℃水浴0.5 h的GABA提取效率最高; 100 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化铝溶液可有效去除水溶性色素; 0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四硼酸钠缓冲液、7%重蒸酚溶液和4%次氯酸钠溶液是最佳的显色剂组合, 80℃水浴20 min的显色效果最佳; 显色后的颜色在10 min后稳定可进行比色, 最佳测定波长为645 nm。优化后的Berthelot比色法测定体系将进一步提高植物叶片中GABA含量测定的精准度和灵敏度。

关键词: 植物; 叶片; γ -氨基丁酸(GABA); Berthelot比色法; 测定优化

Systematic optimization of Berthelot colorimetry for determining γ -aminobutyric acid (GABA) content in plant leavesWAN Lanting[#], LI Xuanyan[#], CHENG Jianfeng^{*}, ZHANG Fang, WANG Mengxing, JIANG Haiyan

College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

[#]Co-first authors^{*}Corresponding author (chjfkarl@163.com)

Abstract: Berthelot colorimetry is regarded as a relatively simple, rapid, accurate and low-cost method for the determination of GABA content in plant leaves, but yet has problems such as impurity interference and chromogenic stability, and needs further optimization. In this experiment, based on Berthelot chromogenic reaction, the measuring wavelength, chromogenic stability, amount of chromogenic reagent, chromogenic conditions, removal of pigment impurities and extraction conditions in Berthelot colorimetry were systematically optimized. The results showed that the influence of chlorophyll impurity on GABA determination could be removed to the greatest extent by removing chlorophyll for three times in 50℃ water bath. The extraction efficiency of GABA in 80℃ water bath for 0.5 h was the highest. 100 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 solution could effec-

收稿 2021-02-04 修定 2021-05-21

资助 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ20295)、国家大学生创新创业训练计划(202010410005X)和江西农业大学大学生创新创业训练计划(202010410103和202010410113)。

tively remove water-soluble pigment. $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium tetraborate buffer, 7% distilled phenol solution and 4% sodium hypochlorite solution were the best combination of chromogenic agents. The best chromogenic effect was achieved by water bath at 80°C for 20 min. Chromogenic color was in a stable state after 10 min, and the optimal determination wavelength was 645 nm. The optimized Berthelot colorimetric determination system will further improve the determination accuracy and sensitivity of GABA content in plant leaves.

Key words: plant; leaf; γ -aminobutyric acid (GABA); Berthelot colorimetry; optimization of determination

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, 缩写GABA) 又称氨酪酸, 是一种四碳非蛋白质氨基酸, 纯品外观为白色结晶状粉末, 在快速加热下分解, 极易溶于水, 微溶于热乙醇, 不溶于冷乙醇、乙醚和苯(Rashmi等2018)。GABA属于天然活性成分, 广泛存在于动植物及微生物体内。高等植物中, GABA主要是由谷氨酸经谷氨酸脱羧酶催化脱羧形成, 参与植物逆境胁迫响应、生长发育和害虫防御等重要生命活动(张海龙等2020)。动物体内, GABA是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 有镇静催眠、降血压、降血糖、抗氧化、保护肝脏等功效, 被誉为“神经营养因子”和“心灵维他命”(Nikmaram等2017; Rashmi等2018)。微生物中, GABA主要作用是提高微生物的耐酸能力及孢子的萌发效率(Sarasa等2020)。若人体每日补充微量GABA, 既利于心脑血管的缓解, 又能促进体内氨基酸代谢的平衡, 调节免疫功能(Diez-Gutiérrez等2020)。因此, GABA已被应用于食品、医药、化妆品和农业等中, 具有广泛的开发和市场前景。

GABA普遍存在于生物体内, 但含量甚微, 动物体内 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 植物体内 $0.003 \sim 3.351 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW), 这给简便快速、准确廉价和高通量的测定带来了诸多困难(Rashmi等2018)。目前, 常用的测定生物体内GABA含量的方法有质谱法(MS) (Park等2018), 色谱法[高效液相色谱法(HPLC) (Lee等2015)、超高效液相色谱法(UPLC) (丁素君和何新蕾2018)、HPLC-串联质谱法(MS/MS) (Chen等2015)、UPLC-MS/MS (付淑军等2017)和气相色谱质谱联用法(GS-MS) (Pearson和Sharman 1975)], 氨基酸分析仪法(李放等2016), 免疫法(酶联免疫吸附法和放射性免疫法) (张敏等2019), 薄层层析法(TLC) (郑红发等2008), 电泳法[纸上电泳法(Li等2009)和毛细管电泳-电化学检测法(CE-ED) (孔令瑶等2008)]

与比色法(赵国群和王维2015)等。不同的方法都有自身的优缺点, HPLC、UPLC、GS及其串联质谱法和氨基酸分析仪法的分离效果理想, 精密度和灵敏度高, 稳定性和重复性好, 结果准确, 但仪器设备昂贵、存在衍生污染、操作过程繁琐、耗时较长、使用费用较高, 适用于少量样品的痕量分析, 大多用于医药领域和科学研究, 不适用生产领域的大量样品检测; 免疫法灵敏度高、特异性强, 但线性范围大、精密度低且有潜在污染; 纸层析法简单易行, 成本低廉, 但精准度不高和耗时较长, 不太适合定量检测; 纸上电泳法和TLC的准确度高, 但精密度和灵敏度不高, 操作较复杂; 比色法虽样品前处理较复杂, 精密度和灵敏度不高, 但操作简便快速, 仪器设备简单, 稳定性和重复性好, 成本较低, 适用于成分相对单一介质的大批量样品常量检测, 已成为适用领域和范围最广的方法。

Berthelot比色法是比色法测定GABA含量中最广泛和最常用的方法, 但易受叶片中的色素、显色液稳定性及游离氨等干扰。因此, 为排除不良因素对测定结果的影响, 更好地扩大其适用领域和范围, 非常有必要对现有的Berthelot比色法进行全面系统地优化。韩延丽等(2013)对测定波长及测定时间, 苯酚、次氯酸钠及样品用量进行了优化, 黄柳舒等(2010)对水溶性色素去除、显色稳定性、显色温度和时间及pH等进行优化, 郑红发等(2008)开展了茶叶中GABA提取条件的研究, 但这些优化分别是在不同条件下的不系统地优化, 彼此间缺少关联性和可比性。本研究基于Berthelot显色反应和以往优化方法, 从测定波长、显色稳定性、显色试剂用量、显色条件、色素杂质去除和提取条件对Berthelot比色法进行较全面系统地优化, 以期建立一套十分简便、快速、准确和廉价的高通量测定植物叶片中GABA含量的技术体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

木姜叶柯 [*Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun] 功能叶片, 为壳斗科 (Fagaceae)、柯属 (*Lithocarpus*) 的常绿乔木, 又名甜茶 (通称)、胖桐 (广东)、甜叶子树 (云南)、多穗柯和多穗石柯 (中国科学院《中国植物志》编辑委员会 1988)。

1.1.2 化学试剂

甲苯、乙醇、乙酸乙酯、甲醇、丙酮、重蒸酚、四硼酸钠、次氯酸钠、氯化铝 (AlCl_3)、氢氧化钾 (KOH)、蒸馏水和 GABA 标品, 试剂均购自于国药集团化学试剂有限公司, 纯度均为分析纯。

1.2 GABA测定方法优化

基于 Berthelot 比色法测定 GABA 含量的原理, 不同浓度的重蒸酚与次氯酸钠能与 GABA 产生深浅不一的蓝绿色吡啶酚类物质 (李无双等 2018), 在 645 nm 处测定光密度 (optical density, O.D.)。为保证测定溶液体积相同配制一系列不同浓度的显色液进行显色反应, 通过 O.D. 大小确定最佳检测 GABA 含量的方法。

1.2.1 测定波长优化

参考范霞等 (2016) 对藤茶中 GABA 含量测定方法的流程进行试验, 在 600~680 nm 间每隔 2 nm 测定 1 次吸光值。

1.2.2 GABA颜色稳定性优化

用测定 GABA 最佳波长的方法进行 GABA 颜色稳定性试验, 在室温 25°C 放置 0~180 min, 每隔 10 min 测定 1 次吸光值。

1.2.3 显色试剂用量优化

对显色试剂用量进行了单因素试验, 探究了四硼酸钠浓度分别为 0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 重蒸酚质量分数分别为 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%, 次氯酸钠质量分数分别为 1%、2%、3%、4%、5% 对显色反应的影响。

在其他条件不变下, 根据上述试验中显色剂的最佳用量进行组合试验。

1.2.4 最佳显色温度和时间选择

对显色反应的温度和时间进行单因素试验,

探究了显色温度分别为 80、85、90、95、100°C, 显色时间分别为 5、10、15、20、25、30 min 对显色反应的影响。

根据上述试验中的最佳显色时间和温度进行两两组合试验。

1.3 色素杂质去除方法的优化

1.3.1 去除叶绿素的有机溶剂选择

在 0.1 g 样品中分别加入 4.0 mL 乙醇、丙酮、乙酸乙酯、甲醇、甲苯, 同时进行 50°C 水浴和室温 (25°C) 浸提 5、10、15 min 处理, 并进行 1、2、3 次去叶绿素的处理。取上清液于 652 nm 处测得总叶绿素 O.D.。

1.3.2 叶绿素去除的有机溶剂混合比例选择

在其他反应条件不变的情况下, 以甲醇:丙酮体积分数为 1:1、1:2、1:3、2:1、3:1 的有机溶剂混合液进行试验。

1.3.3 不同有机溶剂对 GABA 含量测定的影响

对有较好去除总叶绿素的有机溶剂处理后的叶片进行 GABA 含量的测定。

1.3.4 AlCl_3 对去除水溶性色素的影响

向定容至 1.0 mL 的提取液样品中分别加入 0、50、100、150、200 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液, 同时为保证反应体系体积相同, 相应加入 200、150、100、50、0 μL 蒸馏水, 室温震荡离心后加入 KOH 溶液, 在 340 nm 处测得水溶性色素 O.D.。

1.4 GABA提取方法的优化

对提取 GABA 的水浴时间和温度进行单因素试验, 探究了在 50°C 分别水浴 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 以及在 50、60、70、80、90°C 下分别水浴 1.5 h 的条件下对 GABA 提取量和提取效率的影响。

1.5 数据处理

试验数据进行单因素方差分析和 F 检验, 采用 SSR 法对平均数据进行多重比较 ($P < 0.05$)。

2 实验结果

2.1 测定 GABA 方法的优化

2.1.1 GABA测定的最佳波长

图 1 实测值 (实线) 显示, 从波长 600 nm 开始, O.D. 随波长增加而增加, 到 644~646 nm 处达最大, 此后 O.D. 随波长增加而减小; 虚线为趋势线 (开口向

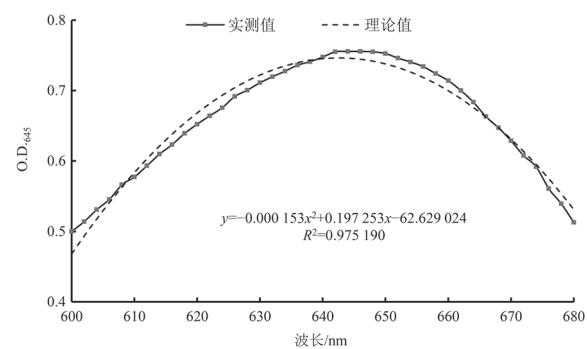


图1 不同测定波长对吸光值的影响

Fig. 1 The influence of different measured wavelength on absorbance value

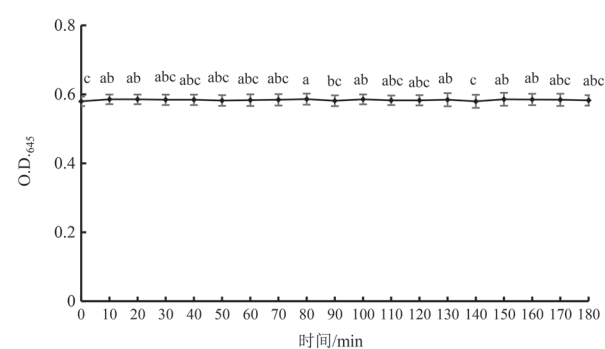


图2 不同显色时间对吸光值的影响

Fig. 2 The influence of different color developing time on absorbance value

不同小写字母表示差异显著性($P < 0.05$), 后图同此。

下的抛物线), 与实测的拟合度极好($R^2 = 0.975190^{**}$), 根据拟合方程计算最佳波长为644.6 nm, 故测定GABA的最佳波长为645 nm。

2.1.2 GABA显色稳定性

比色法测定GABA含量时, GABA浓度越高, 反应液蓝绿色越深, 反应液色泽的稳定性对测定结果有很大影响, 在反应液体系反应完全且处于稳定时测定O.D.能提高结果的准确性。由图2可知,

在0~10 min内, O.D.逐渐增加, 在10 min后无明显差异; 这表明, 反应液在室温25℃放置10 min后就已稳定, 可进行O.D.测定。

2.1.3 显色剂浓度的确定

四硼酸钠缓冲液的浓度对GABA显色反应吸光值产生的影响如图3-A所示, 当添加0.09 mol·L⁻¹与0.10 mol·L⁻¹的四硼酸钠溶液1.0 mL时, GABA的

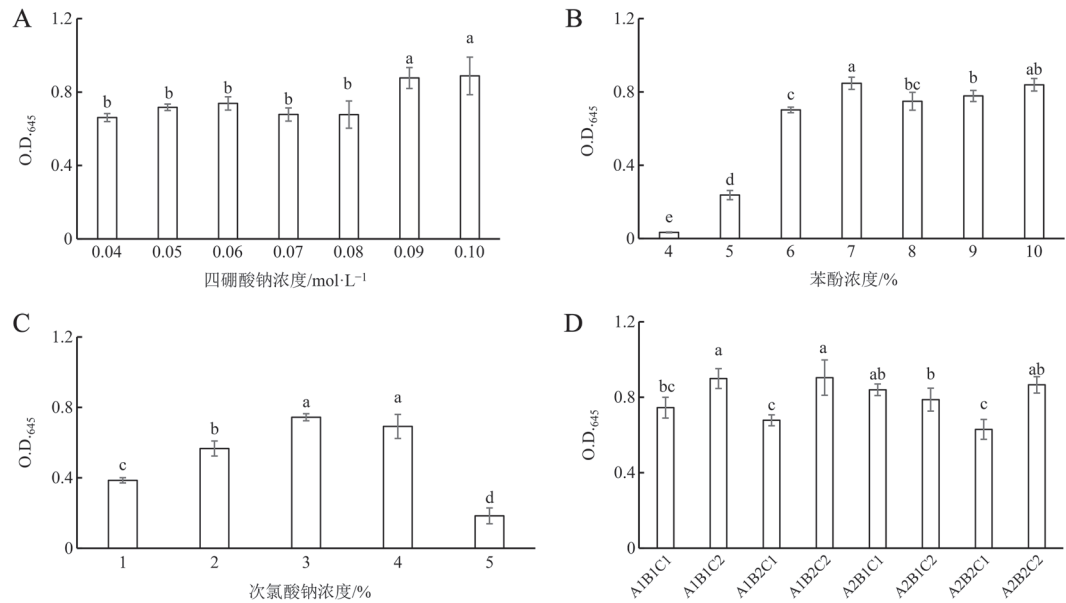


图3 不同显色剂浓度对吸光值的影响

Fig. 3 The influence of different chromogenic concentrations on absorbance value

分图D中各符号代表处理如下, A1: 0.10 mol·L⁻¹四硼酸钠溶液; A2: 0.09 mol·L⁻¹四硼酸钠溶液; B1: 7%苯酚溶液; B2: 10%苯酚溶液; C1: 3%次氯酸钠溶液; C2: 4%次氯酸钠溶液。

O.D.达最大且无显著差异,这可能是由于四硼酸钠添加量已达维持反应发生条件的pH。

比色法测定GABA的原理是基于重蒸酚和次氯酸钠会与游离氨发生反应,生成蓝绿色的吡啶酚类物质,通过测定O.D.来确定GABA的含量。因此,重蒸酚与次氯酸钠的添加量会对GABA的显色反应产生很大的影响。由图3-B可知,重蒸酚体积分数在7%和10%时,O.D.达最大且无显著差异。

由图3-C可知,次氯酸钠的浓度在3%和4%时,O.D.达最大且无明显差异。

基于上述结果,对四硼酸钠浓度 $0.09 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (A2)和 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (A1),重蒸酚质量分数7% (B1)和10% (B2),次氯酸钠质量分数3% (C1)和4% (C2)进行组合试验。由图3-D可知,当试剂组合为A1B1C2、A1B2C2、A2B1C1、A2B2C2时,O.D.达最大且彼此间无显著差异。但当重蒸酚浓度体积分数为10%及次氯酸钠浓度为3%时,反应液易出现白色絮状沉淀,影响反应液O.D.的测定。因此,GABA显色反应试剂的最佳组合是四硼酸钠浓度 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、质量分数为7%的重蒸酚和4%的次氯酸钠。

2.1.4 显色时间与温度对测定的影响

发生显色反应时水浴的温度与时间是影响反应进程的重要因素,当水浴温度为 100°C ,水浴时间在20与30 min时吸光值达最大且无显著性差异(图4-A)。

由图4-B可知,在水浴温度为80、85、 90°C 时,吸光值达最大且无显著差异,当温度继续升高时吸光值下降,这可能是因 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 水浴温度促进了显色反应,但当温度继续上升将破坏GABA的稳定性,造成GABA的损失而导致吸光值降低。

将水浴温度为 80°C (A1)、 85°C (A2)、 90°C (A3)和水浴时间20 min (B1)、30 min (B2)进行组合试验,由图4-C可知,组合间均无显著差异。在考虑时耗和能耗的情况下,选择水浴时间20 min,水浴温度为 80°C 为最佳显色反应条件。

2.2 色素杂质的去除

2.2.1 叶绿素去除的有机溶剂及次数

用5种有机溶剂处理粉碎过筛后的样品,甲醇、丙酮、乙醇处理过后的溶液颜色深,叶绿素去除效果好,而甲苯和乙酸乙酯处理过后的溶液颜色浅,叶绿素去除效果差。对叶绿素的去除效果为甲醇>

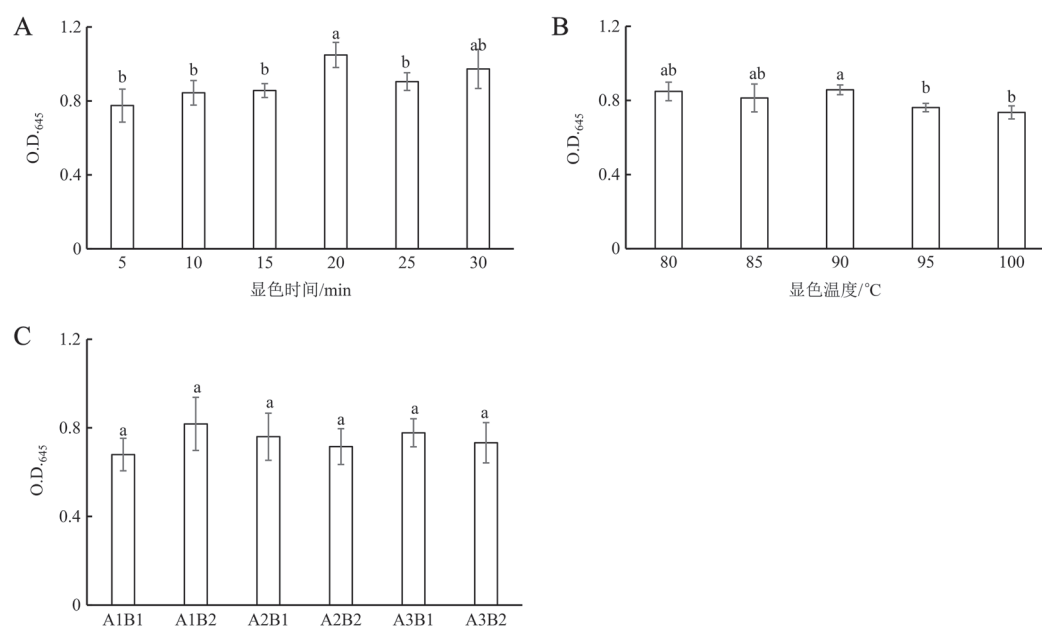


图4 显色时间、温度对吸光值的影响

Fig. 4 The influence of color developing time and temperature on absorbance value

分图C中各符号代表处理如下, A1: 80°C ; A2: 85°C ; A3: 90°C ; B1: 20 min; B2: 30 min。

表1 不同有机溶剂和处理方式对叶绿素去除的影响
Table 1 The influence of different organic solvents and treatment methods on chlorophyll removal

处理方式	处理时间/min	有机溶剂	总叶绿素含量/mg·g ⁻¹		
			1次去叶绿素	2次去叶绿素	3次去叶绿素
室温(25℃)浸提	5	乙醇	27.51±1.75 ^{d,β}	41.17±1.16 ^{c,α}	38.95±0.79 ^{e,α}
		丙酮	31.49±1.77 ^{c,β}	34.01±0.75 ^{c,α}	41.12±1.99 ^{de,α}
		乙酸乙酯	16.30±0.44 ^{f,γ}	21.34±1.46 ^{g,β}	26.84±1.56 ^{g,α}
		甲醇	35.55±0.77 ^{b,β}	45.36±1.99 ^{bc,α}	50.23±0.62 ^{ab,α}
		甲苯	9.54±0.70 ^{g,β}	12.88±0.37 ^{h,α}	14.77±0.41 ^{i,α}
	10	乙醇	25.56±1.74 ^{d,β}	38.01±1.47 ^{d,α}	39.61±1.67 ^{de,α}
		丙酮	28.37±1.33 ^{d,β}	37.22±1.37 ^{de,β}	40.13±1.03 ^{de,α}
		乙酸乙酯	16.72±0.11 ^{f,β}	20.00±0.40 ^{g,α}	30.15±2.00 ^{f,α}
		甲醇	35.09±1.48 ^{b,β}	42.78±1.69 ^{c,β}	47.65±1.28 ^{bc,α}
		甲苯	10.45±1.35 ^{g,γ}	11.23±0.07 ^{h,β}	15.33±0.76 ^{i,α}
	15	乙醇	29.25±1.35 ^{cd,β}	40.26±2.04 ^{c,α}	46.90±2.41 ^{bc,α}
		丙酮	33.24±1.27 ^{bc,β}	34.39±1.64 ^{c,α}	41.14±0.66 ^{de,α}
		乙酸乙酯	17.50±1.07 ^{f,γ}	22.73±0.40 ^{g,β}	31.59±0.64 ^{f,α}
		甲醇	37.29±1.01 ^{ab,γ}	45.57±2.37 ^{bc,β}	47.80±0.31 ^{bc,α}
		甲苯	10.35±0.58 ^{g,γ}	12.57±1.38 ^{h,β}	16.00±1.23 ^{hi,α}
50℃水浴提取	5	乙醇	28.89±0.46 ^{cd,γ}	43.48±2.13 ^{bc,β}	38.30±1.24 ^{c,α}
		丙酮	29.06±0.01 ^{cd,γ}	39.38±2.93 ^{d,β}	44.91±0.51 ^{c,α}
		乙酸乙酯	19.46±0.93 ^{ef,γ}	24.02±0.76 ^{fg,β}	30.99±0.56 ^{f,α}
		甲醇	38.53±0.55 ^{ab,γ}	47.82±2.04 ^{ab,β}	49.27±0.51 ^{b,α}
		甲苯	10.64±0.63 ^{g,γ}	12.90±0.31 ^{h,β}	16.44±1.44 ^{hi,α}
	10	乙醇	28.83±5.62 ^{cd,β}	39.06±1.65 ^{d,α}	42.10±1.57 ^{d,α}
		丙酮	34.60±1.00 ^{b,β}	42.07±0.01 ^{c,α}	43.92±2.01 ^{cd,α}
		乙酸乙酯	20.78±1.11 ^{e,β}	25.73±0.68 ^{f,α}	29.29±1.01 ^{fg,α}
		甲醇	37.83±1.50 ^{ab,β}	48.75±1.48 ^{ab,α}	52.44±2.09 ^{a,α}
		甲苯	10.46±0.52 ^{g,γ}	12.98±0.23 ^{h,β}	17.33±1.50 ^{hi,α}
	15	乙醇	33.21±1.59 ^{bc,β}	45.89±1.79 ^{b,β}	45.32±1.69 ^{c,α}
		丙酮	34.66±2.37 ^{b,β}	50.30±1.95 ^{a,β}	48.97±1.88 ^{b,α}
		乙酸乙酯	20.26±0.75 ^{ef,β}	26.67±1.32 ^{f,β}	30.88±1.90 ^{f,α}
		甲醇	38.82±0.80 ^{a,γ}	49.53±1.65 ^{a,β}	48.28±1.61 ^{b,α}
		甲苯	11.01±0.09 ^{g,γ}	12.78±0.14 ^{h,β}	18.58±0.85 ^{h,α}

同列数值用不同小写英文字母表示显著性差异($P<0.05$),同行数值用不同小写希腊字母表示差异显著性($P<0.05$)。表2同此。

丙酮>乙醇>乙酸乙酯>甲苯。由表1可知,整体而言,1次去叶绿素处理中,甲醇进行浸提、水浴有较好的去除叶绿素效果;2次去叶绿素处理中,甲醇、丙酮进行水浴有较好的去除叶绿素效果;3次去叶绿素处理中,甲醇进行浸提、水浴有较好的去除叶绿素效果,且水浴效果更好。对有更好叶绿素去除效果的甲醇和丙酮而言,甲醇水浴10、15 min,丙酮水浴15 min都能达到较好的去除效果。

2.2.2 去除叶绿素的有机溶剂比例及次数

在5种有机溶剂中,无论是水浴还是浸提处理,甲醇与丙酮去除叶绿素的效果都要明显优于其他3种。由表2可知,1次去叶绿素处理中,除1:2外,其余比例的有机溶剂组合均有较好的去除效果;2次去叶绿素处理中,比例为1:1、1:2、2:1的有机溶剂组合在水浴处理下具有较好的去除效果;3次去叶绿素处理中,比例为1:2的有机溶剂组合在浸提以

表2 不同有机溶剂比例和处理方式对叶绿素去除的影响
Table 2 The influence of different organic solvent proportions and treatment methods on chlorophyll removal

处理方式	处理时间/min	甲醇:丙酮	总叶绿素含量/mg·g ⁻¹				
			1次去叶绿素	2次去叶绿素	3次去叶绿素		
室温(25℃)浸提	5	1:1	37.00±1.05 ^{bc,β}	46.64±1.42 ^{bc,α}	47.37±2.07 ^{c,α}		
		1:2	34.82±3.37 ^{c,β}	39.16±1.61 ^{c,β}	53.86±4.13 ^{ab,α}		
		1:3	36.02±2.93 ^{c,β}	39.43±0.27 ^{c,β}	44.97±2.16 ^{c,α}		
		2:1	42.48±2.24 ^{ab,α}	46.72±2.25 ^{b,α}	42.74±0.89 ^{c,α}		
		3:1	41.41±1.69 ^{b,β}	42.58±1.89 ^{c,αβ}	46.72±1.65 ^{c,α}		
		10	1:1	36.33±2.88 ^{c,β}	46.85±3.64 ^{bc,α}	48.95±0.26 ^{bc,α}	
	10	1:2	36.65±1.81 ^{c,β}	43.00±2.61 ^{c,αβ}	50.77±5.02 ^{bc,α}		
		1:3	36.21±1.20 ^{c,β}	41.97±2.93 ^{c,α}	46.84±2.34 ^{c,α}		
		2:1	40.97±2.38 ^{bc,β}	46.53±3.08 ^{b,αβ}	49.43±0.67 ^{bc,α}		
		3:1	44.90±1.02 ^{ab,α}	43.49±2.34 ^{c,αβ}	47.46±0.75 ^{c,α}		
		15	1:1	41.29±1.34 ^{b,β}	45.63±2.26 ^{bc,α}	48.91±0.49 ^{bc,α}	
		1:2	34.37±2.58 ^{c,β}	39.00±0.11 ^{c,β}	50.57±3.77 ^{bc,α}		
	15	1:3	34.71±1.46 ^{c,β}	43.59±3.62 ^{c,α}	45.71±3.84 ^{c,α}		
		2:1	35.20±0.58 ^{c,β}	47.48±1.93 ^{b,α}	45.88±2.15 ^{c,α}		
		3:1	40.64±2.65 ^{bc,β}	47.15±1.51 ^{bc,α}	49.68±2.38 ^{bc,α}		
		50℃水浴提取	5	1:1	42.74±1.01 ^{ab,γ}	49.33±2.03 ^{a,β}	54.63±2.70 ^{ab,α}
				1:2	40.80±3.14 ^{bc,γ}	48.54±2.82 ^{b,β}	58.25±1.24 ^{a,α}
				1:3	43.64±0.01 ^{ab,β}	43.59±0.54 ^{c,β}	52.76±2.64 ^{b,α}
2:1	34.54±1.41 ^{c,β}			50.00±2.68 ^{ab,α}	46.19±2.50 ^{c,α}		
3:1	41.48±1.56 ^{b,γ}			46.13±0.96 ^{bc,β}	51.77±0.94 ^{bc,α}		
10	1:1			46.74±3.11 ^{a,α}	51.57±2.95 ^{ab,α}	52.12±2.84 ^{bc,α}	
10	1:2		40.94±4.06 ^{bc,γ}	48.45±2.34 ^{bc,β}	56.00±1.07 ^{ab,α}		
	1:3		43.88±1.21 ^{ab,γ}	47.48±0.80 ^{bc,β}	56.23±1.33 ^{ab,α}		
	2:1		42.39±4.31 ^{ab,α}	51.32±4.27 ^{ab,α}	50.19±4.38 ^{bc,α}		
15	3:1	41.30±0.17 ^{b,γ}	46.83±0.15 ^{bc,β}	54.55±1.82 ^{ab,α}			
	1:1	45.93±2.66 ^{ab,β}	53.58±0.71 ^{a,α}	53.95±1.56 ^{ab,α}			
	1:2	40.52±1.17 ^{b,β}	52.92±4.48 ^{ab,α}	55.78±3.25 ^{ab,α}			
	1:3	43.60±2.60 ^{ab,β}	47.33±0.35 ^{bc,β}	55.18±0.42 ^{ab,α}			
	2:1	41.23±1.46 ^{b,β}	52.77±4.71 ^{ab,α}	48.64±4.79 ^{bc,αβ}			
	3:1	43.65±3.25 ^{ab,β}	48.34±0.92 ^{bc,β}	56.37±0.42 ^{ab,α}			

及水浴处理都具有较好的去除效果, 1:1、1:3、3:1的比例在水浴处理下具有较好的去除效果。分析不同次数的叶绿素去除处理可知, 水浴3次去叶绿素的处理都具有较好的去除效果, 其中比例为1:2的有机溶剂组合在水浴和浸提处理中都具有更好的叶绿素去除效果。

2.2.3 最佳有机溶剂对测定的影响

由上述不同去除叶绿素的试验结果可知, 水浴10、15 min 3次去叶绿素处理效果较好, 而甲醇、

丙酮、甲醇:丙酮=1:2三种有机溶剂的叶绿素去除效果较好。由图5-A可知, 就去除叶绿素效果而言, 甲醇、丙酮、甲醇:丙酮=1:2水浴10、15 min无显著差异。

在选择有机溶剂对叶绿素的去除效果的同时还需考虑有机溶剂是否可能去除了GABA, 由图5-B可知, 甲醇、甲醇:丙酮=1:2水浴10 min, 甲醇、丙酮水浴15 min对GABA含量去除的影响小于其他处理且彼此间无显著差异; 因丙酮属于限制性

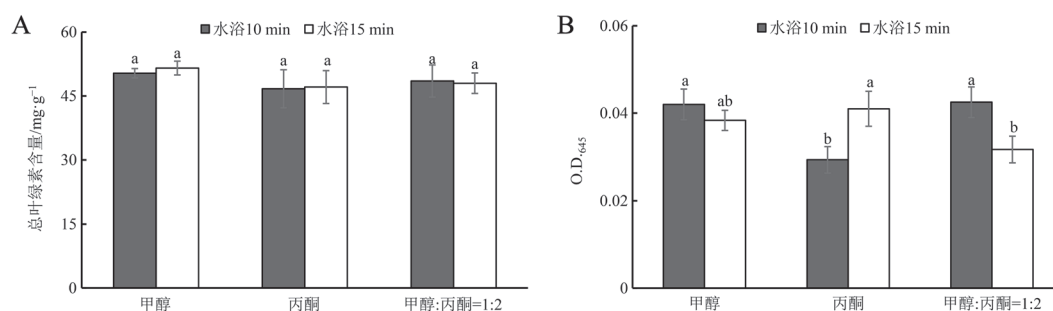


图5 不同去除叶绿素方式对吸光值的影响

Fig. 5 The influence of different chlorophyll removal methods on absorbance value

试剂购买难及考虑到能耗,故选择甲醇水浴10 min 3次去叶绿素处理作为最佳处理。

2.2.4 去除水溶性色素的 AlCl_3 用量

样品经 AlCl_3 溶液处理后可与水溶性色素形成不溶性络合物,减少水溶性色素及杂质对O.D.的影响,由图6可知,在 AlCl_3 溶液的添加量为0~100 μL 时,水溶性色素的O.D.逐渐降低,即水溶性色素在此 AlCl_3 溶液的添加范围内的去除效果逐渐增强,在添加量为100~200 μL 时,水溶性色素O.D.又逐渐增加。因此,在1.0 mL的样品提取液中加入100 μL 的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液时就可有效去除其中的水溶性色素。

2.3 GABA提取条件的优化

样品中GABA的提取含量和提取时间与温度有很大关系,在提取温度为 50°C ,提取时间为1.5、2.0、2.5 h时,GABA提取量最高且无显著差异(图

7-A)。在提取时间为1.5 h时,改变提取温度,在 80°C 时提取量达最高(图7-B)。在 80°C 时,0.5~2.0 h的提取时间对GABA提取无明显差异(图7-C)。因此,在提取GABA时,控制提取温度在 80°C ,时间0.5 h最佳。

3 讨论

Berthelot比色法目前已被广泛应用于植物中GABA含量的测定,但此方法对不同材料仍有局限性,故许多科技人员根据自己的测定目的和意义对Berthelot比色法的所用试剂和步骤进行了优化。对本试验从测定波长、显色稳定性、显色试剂用量、显色条件、色素杂质去除和提取条件得出的较全面系统的优化结果作如下讨论:

3.1 GABA测定中的显色反应

黄柳舒等(2010)和韩延丽等(2013)发现,优化测定方法后的GABA在630~645 nm处有较大O.D.,与本研究的结论相符合。对四硼酸钠的浓度而言,与汤彩云等(2018)的结果相符。在以往的优化方法中,重蒸酚试剂浓度一般在4%~6%,体积400~1 200 μL ;次氯酸钠浓度5%~8%,体积600~1 500 μL (李秀娟等2014;张扬等2015;汤彩云等2018)。本试验优化结果与上述方法相比,在重蒸酚和次氯酸钠添加体积不变的情况下,重蒸酚浓度由4%增至7%,次氯酸钠由8%减至4%,增加了75%的重蒸酚使用量,但同时也降低了50%的次氯酸钠用量,这可能与苯酚、次氯酸钠与游离氨基酸的反应过程及原理有关,根据苯酚、次氯酸钠与游离氨基酸的反应过程(张珺等2014)可知,4%次氯酸钠溶

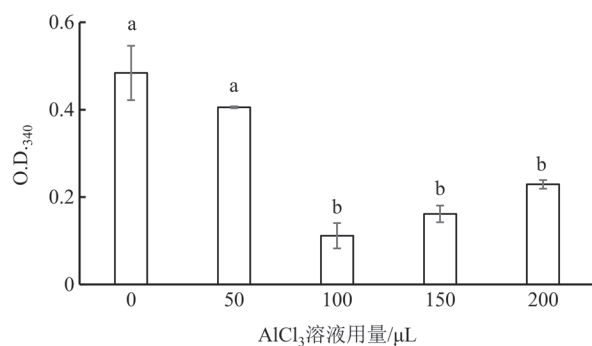
图6 AlCl_3 用量对水溶性色素吸光值的影响

Fig. 6 The influence of the amount of aluminum chloride on absorbance value of water-soluble pigments

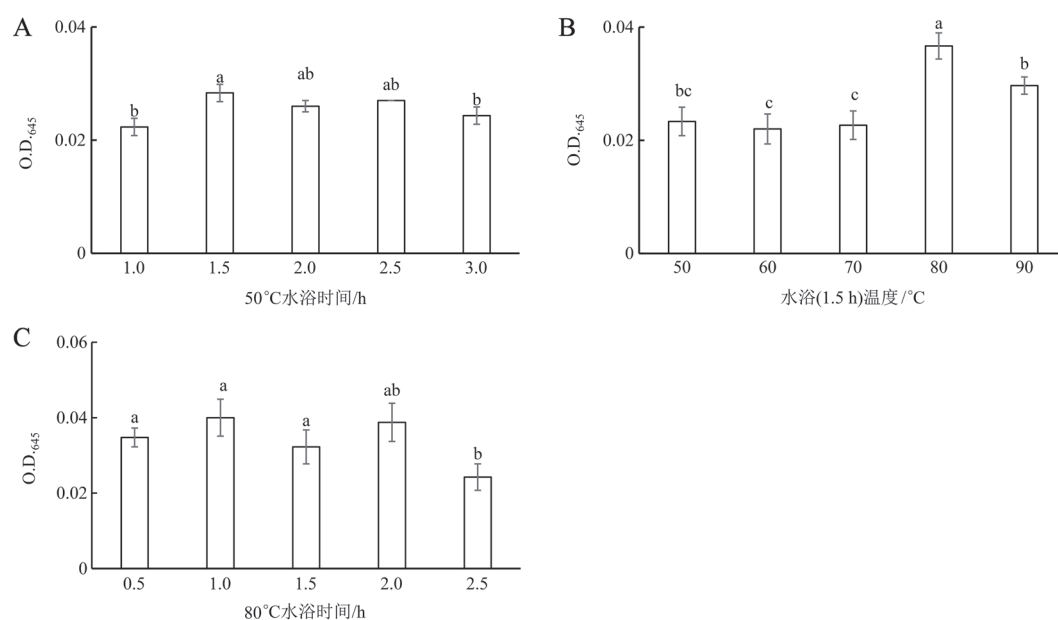


图7 提取时间和温度对吸光值的影响

Fig. 7 The influence of extraction time and temperature on absorbance value

液600 μL 可与样品中的GABA反应完全,而7%重蒸酚溶液400 μL 则可将中间产物 $\text{NH}_2\text{Cl}(\text{CH}_2)_3\text{CHOH}$ 完全转化为蓝绿色物质,两种显色剂用量的物质质量之比接近1:1,且重蒸酚稍微过量,确保该反应完全,最大程度上检测出样品中GABA的含量。前人对显色反应稳定性的优化表明,10~180 min内为测量GABA吸光值的最佳时间段(韩延丽等2013),本研究也证明了这点,但要求环境温度在25°C左右。有些研究对显色反应所需时间和水浴温度进行优化,李秀娟等(2014)和汤彩云等(2018)认为10~15 min的沸水浴为最佳反应条件,黄柳舒等(2010)认为15 min的85~93°C水浴为最佳反应条件,而本研究结论为20 min的80°C水浴是最佳反应条件,本研究虽反应时间较长,但反应所需温度较低,可节约用电量,更可避免沸水浴造成中反应液的挥发及GABA的损失。

3.2 样品色素杂质的去除

甲醇和丙酮是在Berthelot比色法中应用较多的去除叶绿素的有机溶剂,范霞等(2016)采用丙酮去除桑叶中的叶绿素,黄柳舒等(2010)采用甲醇室温振荡10 min去除叶绿素,本试验优化采用易购买且价格低廉的甲醇作为色素去除剂,在50°C水浴

下连续3次去除叶绿素,尽管比前人实验需要多消耗部分电量及实验试剂,但能实现既可最完全地去除叶绿素干扰又能最大程度地减少GABA损失的双重效果,进而提高GABA含量测定的准确度和精确度。对去除提取液中的水溶性色素而言,黄柳舒等(2010)发现,采用150 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液可达最好的去除效果,本研究表明,采用100 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液便能最大程度地去除提取液中的水溶性色素,相比于黄柳舒等减少了1/3的 AlCl_3 试剂用量。

3.3 样品中GABA的提取

本研究表明,在80°C水浴条件下提取30 min就可达最佳的GABA提取效果,比黄柳舒等(2010)采用50°C水浴条件提取2 h的方法来提取桑叶中的GABA可减少75%的水浴时间,节约75%左右的电量,既可提高实验效率又可提高经济效率,同时更适应于大批量样品的测定。

综上,系统优化后的Berthelot比色法(图8)是一个十分简便、快速、准确和廉价的高通量测定植物叶片中GABA含量的技术体系,为高通量检测植物组织中GABA含量提供了一个更为经济、可靠和理想的方法。

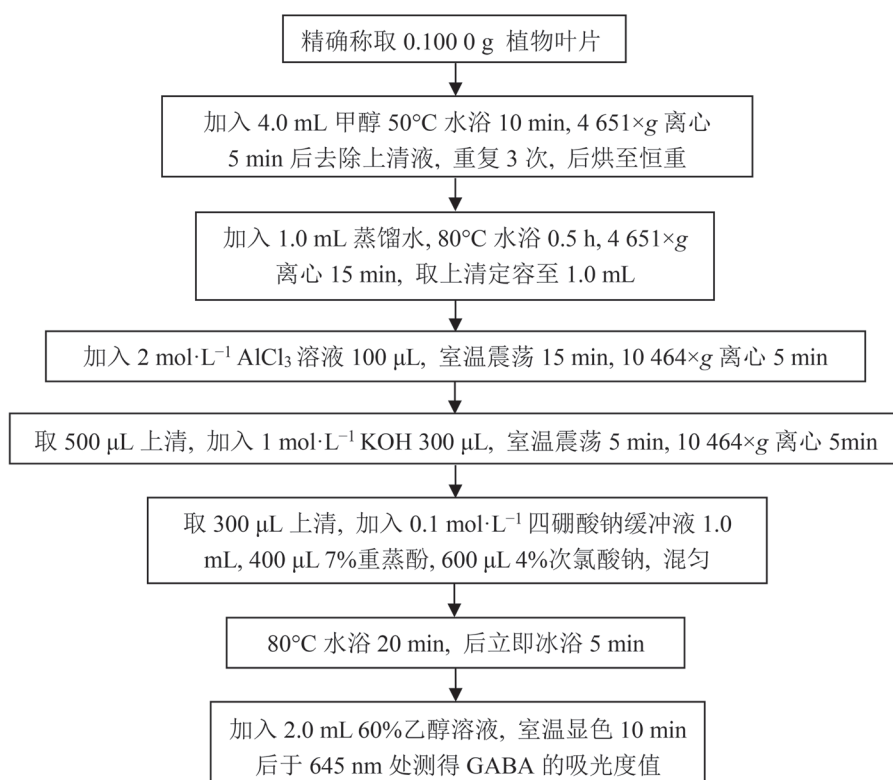


图8 优化的Berthelot比色法

Fig. 8 Optimization system of Berthelot colorimetry

参考文献(References)

- Chen XM, You JM, Suo YR, et al (2015). Sensitive determination of taurine, γ -aminobutyric acid and ornithine in wolfberry fruit and cortex lycii by HPLC with fluorescence detection and online mass spectrometry identification. *J Chromatogr Sci*, 53: 492–497
- Diez-Gutiérrez L, Vicente LS, Barrón LJR, et al (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *J Funct Food*, 64: e103669
- Ding SJ, He XL (2018). Determination of γ -aminobutyric acid in fermented blank bean by DABS-Cl precolumn derivatization-HPLC method. *China Condi*, 43: 144–145, 149 (in Chinese with English abstract) [丁素君, 何新蕾(2018). DABS-Cl柱前衍生-HPLC法测定豆豉中的 γ -氨基丁酸含量. *中国调味品*, 43: 144–145, 149]
- Fan X, Xu T, Liu C, et al (2016). Determination of the γ -aminobutyric acid in *Ampelopsis grossedentata*. *Hubei Agric Sci*, 55: 3453–3455 (in Chinese with English abstract) [范霞, 徐廷, 刘程等(2016). 藤茶 γ -氨基丁酸含量测定方法研究. *湖北农业科学*, 55: 3453–3455]
- Flora of China Editorial Committee of CAS (1988). *Flora of China*: Vol 22. Beijing: Science Press, 201 (in Chinese) [中国科学院《中国植物志》编辑委员会(1988). *中国植物志*: 第22卷. 北京: 科学出版社, 201]
- Fu SJ, Meng LY, Dai W, et al (2017). Establishment and application of UPLC/MS/MS method for determination of γ -aminobutyric acid in tea. *Food Drug*, 19: 387–390 (in Chinese with English abstract) [付淑军, 孟林英, 戴玮等(2017). 茶叶中 γ -氨基丁酸UPLC/MS/MS分析方法的建立及应用. *食品与药品*, 19: 387–390]
- Han YL, Tan XL, Tan YL (2013). Optimization of determination γ -aminobutyric acid in brown rice by colorimetric method. *J Anhui Agric Sci*, 41: 4629–4630, 4635 (in Chinese with English abstract) [韩延丽, 谭学林, 谭亚玲(2013). 比色法测定稻米 γ -氨基丁酸含量的体系优化. *安徽农业科学*, 41: 4629–4630, 4635]
- Huang LS, Shen LQ, Wang XY (2010). Spectrophotometry improvement determination of γ -aminobutyric acid in mulberry leaf and study on its thermal stability. *Food Sci Technol*, 35: 328–331, 335 (in Chinese with English abstract) [黄柳舒, 沈莲清, 王向阳(2010). 改良比色法测桑叶中 γ -氨基丁酸含量及其热稳定性研究. *食品科技*, 35: 328–331, 335]
- Kong LY, Wang Y, Cao YH (2008). Determination of γ -ami-

- nobutyric acid in germinated black rice germ by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Instrum Anal*, 27: 527–530 (in Chinese with English abstract) [孔令瑶, 汪云, 曹玉华(2008). 毛细管电泳-电化学法对发芽黑米胚芽中 γ -氨基丁酸含量的检测. *分析测试学报*, 27: 527–530]
- Lee DG, Cho S, Lee J, et al (2015). Analysis of γ -aminobutyric acid content in fermented plant products by HPLC/UV. *J Appl Biol Chem*, 58: 303–309
- Li F, Cai M, Chen B, et al (2016). Determination of γ -aminobutyric acid in health food by amino acid analyzer. *Chin J Anal Lab*, 35: 1012–1015 (in Chinese with English abstract) [李放, 蔡梅, 陈蓓等(2016). 氨基酸自动分析仪测定保健食品中 γ -氨基丁酸. *分析实验室*, 35: 1012–1015]
- Li HX, Qiu T, Cao YS, et al (2009). Pre-staining paper chromatography method for quantification of γ -aminobutyric acid. *J Chromatogr A*, 1216: 5057–5060
- Li WS, Lang WC, Ma L, et al (2018). Rapid determination of γ -aminobutyric acid content in mulberry leaves using direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS). *Sci Sericul*, 44: 567–572 (in Chinese with English abstract) [李无双, 郎文成, 马琳等(2018). 用实时直接分析质谱法(DART-MS)快速测定桑叶中的 γ -氨基丁酸含量. *蚕业科学*, 44: 567–572]
- Li XJ, Shang CF, Fang ZD (2014). The affecting factors of the determination of gamma aminobutyric acid in brown rice by colorimetry. *Guangzhou Chem Ind*, 42: 78–80 (in Chinese with English abstract) [李秀娟, 商春峰, 房泽栋(2014). 比色法测定 γ -氨基丁酸的影响因素. *广州化工*, 42: 78–80]
- Nikmaram N, Dar BN, Roohineja S, et al (2017). Recent advances in γ -aminobutyric acid (GABA) properties in pulses: an overview. *J Sci Food Agric*, 97: 2681–2689
- Park JY, Park SU, Ha SH, et al (2018). Improved quantification of γ -aminobutyric acid in rice using stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*, 266: 375–380
- Pearson JDM, Sharman DF (1975). A method for the estimation of gamma-aminobutyric acid using gas-liquid chromatography and electron capture detection. *J Neurochem*, 24: 1225–1228
- Rashmi D, Zanan R, John S, et al (2018). γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications. *Stud Nat Prod Chem*, 57: 413–452
- Sarasa SB, Mahendran R, Muthusamy G, et al (2020). A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes. *Curr Microbiol*, 77: 534–544
- Tang CY, Wang T, Tu J, et al (2018). Comparison of colorimetry and HPLC for determination of γ -aminobutyric acid in mulberry leaf tea. *Food Sci*, 39: 256–260 (in Chinese with English abstract) [汤彩云, 王涛, 屠洁等(2018). 比色法与HPLC法对比测定桑叶茶中 γ -氨基丁酸的含量. *食品科学*, 39: 256–260]
- Zhang HL, Chen YY, Yang LX, et al (2020). Regulation of γ -aminobutyric acid on plant growth and development and stress resistance. *Plant Physiol J*, 56: 600–612 (in Chinese with English abstract) [张海龙, 陈迎迎, 杨立新等(2020). γ -氨基丁酸对植物生长发育和抗逆性的调节作用. *植物生理学报*, 56: 600–612]
- Zhang J, He YY, Wu WG (2014). Fast quantification of γ -aminobutyric acid in red rice based on berthelot chromogenic principle. *Cereals Oils*, 27: 40–42 (in Chinese with English abstract) [张珺, 何义雁, 吴卫国(2014). 贝特洛显色法快速测定红米中 γ -氨基丁酸的研究. *粮食与油脂*, 27: 40–42]
- Zhang M, Xue ZL, Yu F, et al (2019). Determination of γ -aminobutyric acid in fermentation broth by paper chromatography-microplate reader. *Food Ferment Ind*, 45: 262–267 (in Chinese with English abstract) [张敏, 薛正莲, 余飞等(2019). 纸层析-酶标仪法测定发酵液中 γ -氨基丁酸. *食品与发酵工业*, 45: 262–267]
- Zhang Y, Xiao WH, Lan XL, et al (2015). Detection of γ -aminobutyric acid in barley seedling by microplate reader. *J Triticeae Crops*, 35: 1462–1466 (in Chinese with English abstract) [张扬, 肖卫洪, 蓝新隆等(2015). 酶标仪法测定麦苗中 γ -氨基丁酸的探讨. *麦类作物学报*, 35: 1462–1466]
- Zhao GQ, Wang W (2015). A rapid colorimetric method for determination of γ -aminobutyric acid. *Food Res Dev*, 36: 85–89 (in Chinese with English abstract) [赵国群, 王维(2015). 比色法快速测定 γ -氨基丁酸含量. *食品研究与开发*, 36: 85–89]
- Zheng HF, Huang YH, Huang HS, et al (2008). Study on extraction and determination of γ -aminobutyric acid in tea. *Food Sci*, 29: 347–351 (in Chinese with English abstract) [郑红发, 黄亚辉, 黄怀生等(2008). 茶叶中 γ -氨基丁酸提取、分离及薄层扫描测定的研究. *食品科学*, 29: 347–351]