

比色法测定稻米 γ -氨基丁酸含量的体系优化

韩延丽, 谭学林, 谭亚玲* (云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201)

摘要 [目的]优化比色法测定糙米中 γ -氨基丁酸(GABA)的方法,建立一套简便、快速、准确测定糙米 GABA 的测定体系。[方法]基于 Berthlot 显色反应,从测定波长及测定时间,苯酚、次氯酸钠及糙米用量上优化了比色法测定糙米中 γ -氨基丁酸含量的技术体系。[结果]试验得出,比色法测定 γ -氨基丁酸的最佳波长为 630 nm,5% 苯酚溶液的最佳用量为 3.4 ml,有效氯为 7% 的次氯酸钠溶液的最佳用量为 1.5 ml,建议最佳的测定时间为 60~180 min。以该试验方法处理米样时,米样的最佳用量为 1.2 ml。[结论]该体系能简单、快速、经济、准确地测定糙米中 γ -氨基丁酸的含量,可为以后筛选和选育富含 GABA 的稻米品种提供参考。

关键词 γ -氨基丁酸;比色;糙米

中图分类号 S511 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)10-04629-02

Optimization of Determination γ -Aminobutyric Acid in Brown Rice by Colorimetric Method

HAN Yan-li et al (Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract [Objective] To optimize method for determining γ -aminobutyric acid content in rice by colorimetric method and establish a simple, rapid and accurate brown rice GABA determination system. [Method] Based on Berthlot chromogenic reaction, determination of γ -aminobutyric acid content in rice by colorimetric method was optimized from determination wavelength, time, phenol, sodium hypochlorite and brown rice dosage. [Result] The optimum conditions were: wavelength 630 nm, 5% phenol solution 3.4 ml, available chlorine 7% sodium hypochlorite solution 1.5 ml, determination time 60-180 min. the optimum rice dosage 1.2 ml. [Conclusion] The system is simple, rapid, economy and accurate in determining γ -aminobutyric acid content in rice, which can provide reference for screening and breeding GABA enrichment rice variety.

Key words γ -aminobutyric acid; Colorimetric; Brown rice

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)因其具有独特的化学结构,因此常表现出特殊的生物功效和药用价值。近几年来,GABA 在食品中的应用越来越受到人们的重视。研究发现,作为重要粮食作物的水稻糙米中含有多种促进人体健康和防治疾病的有效成分,如 Fe、Zn、 γ -氨基丁酸、米糠纤维、谷胱甘肽等,其中 γ -氨基丁酸是糙米中最值得关注的一种功能性成分^[1-5]。因此,选育和开发富含 γ -氨基丁酸的水稻品种,并作为药食同源的功能稻是当前水稻育种家们面临的新课题。

就 GABA 测定方法而言,目前国内外比较多见的测定方法有氨基酸分析法、酶法、放射性受体法、毛细管电泳法、液相色谱法等,这些方法大多用于医学领域,前处理过程复杂,且价格昂贵,不适用于大量样品的定量分析^[6-8]。而食品中的 GABA 的测定方法报道尚不多见,尤其是稻米,因此需要寻找并建立一种简便、快速、低成本的稻米 GABA 测定方法。

基于 γ -氨基丁酸(GABA)能与酚在次氯酸钠作用下形成蓝绿色化合物,通过比色法可以鉴定 GABA 的含量,笔者在前人研究的基础上,优化比色法测定糙米 γ -氨基丁酸测定方法,建立一套简便、快速且准确测定糙米 GABA 含量的测定体系,以期筛选和选育富含 GABA 稻米品种提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 供试稻米共 21 个品种,市售。主要试剂:GA-

BA, SIGMA 公司;GABA 标准液(以去离子灭菌水为溶剂,分别配制浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 和 0.15 mg/ml 的 6 种标准液);5% 苯酚溶液(5 g 苯酚,95 g 去离子灭菌水);硼酸-KCl 缓冲溶液(pH=9.0,取硼酸 3.09 g,加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 500 ml 使溶解,再加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 210 ml);次氯酸钠溶液(有效氯为 7%)。主要仪器:Uvmini-1240 分光光度计,日本。

1.2 试验方法 构建体系时,考虑影响测定的各种因素,包括波长、苯酚、次氯酸钠、测定时间及其稳定性,筛选到各种试剂的最适用量和最适波长,并在 Excel 软件绘制比色法测定 γ -氨基丁酸标准曲线。

1.2.1 米样处理。将 21 种不同品种供试水稻用糙米机脱壳并粉碎,准确称取糙米样品(750±1)mg 于 10 ml 带盖离心管中,每管加 5 ml 水摇匀,在 200 次/min 的振荡器上振荡 4 h,9 000 r/min 离心 5 min,取上清液待测。

1.2.2 最适波长的筛选。取 2.0 ml 的 15% GABA 溶液置于 10 ml 离心管内,分别加入硼酸-KCl 缓冲溶液 0.6 ml,5% 苯酚溶液 2.0 ml,有效氯为 7% 的次氯酸钠 2.0 ml。摇匀后放入沸水加热,直到颜色变成黄绿色后取出冰浴 5 min,待温度升至室温。从波长 500 nm 开始,并以 10 nm 为递增,用不同的波长分别测定溶液吸光度,观察吸光度的变化规律。

1.2.3 苯酚用量的筛选。改变 5% 苯酚溶液的添加量,即分别向反应体系中加入 1.0、1.2、1.6、1.8、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.8、4.0 ml 5% 苯酚溶液,其他试剂恒定(2.0 ml 的 15% GABA,硼酸-KCl 缓冲溶液 0.6 ml,有效氯为 7% 的次氯酸钠 2.0 ml),为保证体积一致,分别向体系中加入适量蒸馏水,定容为 8.6 ml。在波长 630 nm 处测定其吸光度,并观察吸光度的变化规律。

1.2.4 次氯酸钠溶液的最佳用量。改变次氯酸钠的添加

基金项目 云南省杂交水稻工程技术研究中心(2011DH016);云南省教育厅项目(2010C249);云南省科技厅水稻产业体系(A3006923)。

作者简介 韩延丽(1988-),女,云南德宏人,本科生,专业:农学,E-mail:776794762@qq.com。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事水稻育种研究,E-mail:yiltan0871@163.com。

收稿日期 2013-03-07

量,即分别向反应体系中加入有效氯为7%次氯酸钠溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml,其他试剂恒定(2.0 ml的15% GABA,硼酸-KCl缓冲溶液0.6 ml,5%苯酚溶液3.4 ml),为保证体积一致,分别向体系中加入适量蒸馏水,定容为10 ml。在波长630 nm处测定其吸光度,并观察吸光度的变化规律。

1.2.5 比色法测定 γ -氨基丁酸颜色稳定性。用测定 γ -氨基丁酸最佳波长及最适试剂用量,观察反应体系的颜色稳定性。

2 结果与分析

2.1 最适波长的确定 由图1可见,在波长500 nm开始的可见光范围内,吸光度与波长呈单峰分布,随着波长的增加,吸光度值逐渐增加,当波长为630 nm时吸光度值最大;当测定波长超过630 nm后,随着波长的增加,吸光度值则逐渐减小。试验结果表明,比色测定 γ -氨基丁酸最佳波长为630 nm。

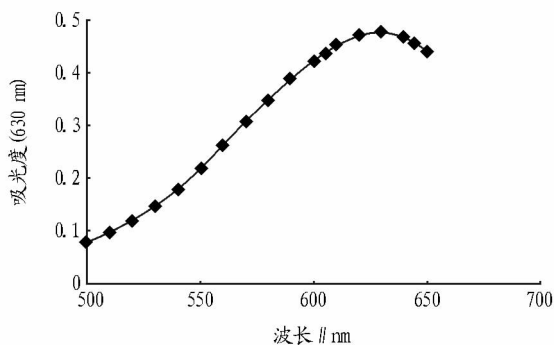


图1 吸光度值与波长变化的关系

2.2 苯酚溶液用量的确定 试验结果表明(图2),随着苯酚溶液加入量的增加,显色反应后溶液的吸光度值逐渐增加,当加入5%苯酚溶液3.4 ml时吸光度值最大,为0.407 0;当苯酚溶液添加量大于3.4 ml后,随着苯酚溶液的增加,吸光度值则开始减小。试验表明,5%苯酚溶液的最佳用量为3.4 ml。

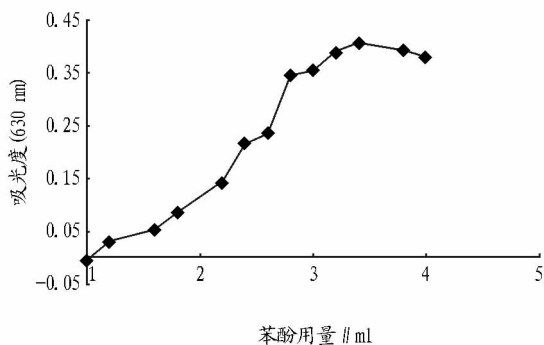


图2 吸光度值与苯酚溶液用量的关系

2.3 次氯酸钠溶液的最佳用量 由图3可见,随着次氯酸钠溶液加入量的增加,显色反应后溶液的吸光度值逐渐增加,当加入1.5 ml时达到最大,继续增加用量,吸光度值开始减小。因此比色法测定 γ -氨基丁酸时,有效氯为7%的次氯酸钠溶液的最佳用量为1.5 ml。

2.4 反应体系的颜色稳定性 反应体系为2.0 ml的15% GABA,硼酸-KCl缓冲溶液0.6 ml,有效氯为7%的次氯酸钠1.5 ml,5%苯酚溶液3.4 ml,在波长630 nm处测定其吸光

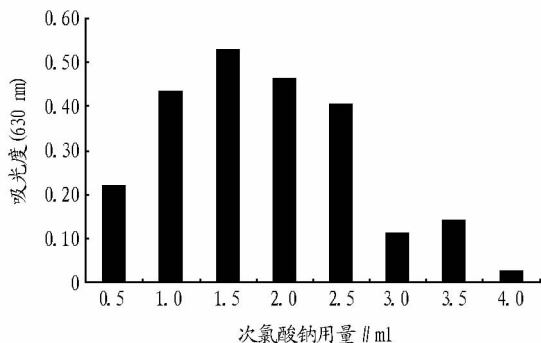


图3 吸光度值与次氯酸钠溶液用量的关系

度,观察反应液室温放置时间与吸光度变化规律。

由图4可知,反应体系吸光度值呈现3个变化阶段:①吸光度值快速增长期,这一时期为反应结束60 min以内,吸光度值表现为随放置时间增加,吸光度值也快速增加。②吸光度值平衡期,即反应结束60~180 min范围内,吸光度值在0.532 3~0.537 1波荡,变化不大。③吸光度值下降期,即反应结束180 min以后时期,表现为在这个时期,反应液放置时间越长,则吸光度值越低。

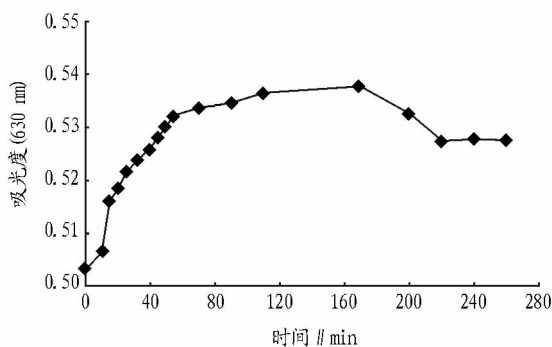


图4 反应液随时间变化的颜色稳定性

2.5 比色法测定 γ -氨基丁酸标准曲线及其线性回归 反应体系为2.0 ml的15% GABA,硼酸-KCl缓冲溶液0.6 ml,有效氯为7%的次氯酸钠1.5 ml,5%苯酚溶液3.4 ml,在波长630 nm处,并在反应结束110 min测定其吸光度值。以浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),绘制标准曲线,结果见图5。

由图5可知,优化后 γ -氨基丁酸测定方法可靠性较高,吸光度值与 γ -氨基丁酸含量高度相关,相关系数 $R^2 = 0.996 3$,二者之间的关系满足回归方程为 $y = 6.296 1x + 0.040 1$ 。

2.6 测定时糙米液的最佳用量 分别设置不同的糙米用量,即分别取不同体积待测米样上清液置于10 ml的离心管种,加 ddH_2O 至2.0 ml,每个管中分别加入硼酸-KCl缓冲溶液0.6 ml,有效氯为7%的次氯酸钠1.5 ml,5%苯酚溶液3.4 ml,在波长630 nm处测定其吸光度。

结果表明,随着米样加入量的增加,显色反应后溶液的吸光度逐渐增加,当加入1.2 ml时达到最大,继续增加用量,吸光度开始减小。因此比色法测定糙米 γ -氨基丁酸时,以该试验方法处理米样时,米样的最佳用量为1.2 ml。

族地区农村消费者的信任和肯定,扩大农村消费市场。

4.3 加强市场监管,确保消费安全 市场监管机构要从城市辐射到民族地区农村市场,加大市场监管力度,防止假冒伪劣产品流入民族地区农村市场,严厉查处不正当交易和竞争行为,打击欺行霸市、强买强卖等不法行为,健全市场投诉受理机制,保护农民合法权益,对农村市场上的商品质量进行跟踪检查;为农民消费创造良好的消费环境。再次,加强对重点行业和主要商品的规范管理跟踪和监控,特别关注涉及农民生产生活安全的食品、农药、种子等的流通管理,以确保农民能够购买到放心的消费品。另一方面,通过法律知识的宣传和普及,提高农村居民自觉参与市场监管并保护自身权益的维权意识和能力,积极探索在农村开展市场监管工作的新思路、新办法,提高对民族地区农村集贸市场的监管水平。

4.4 加强宣传引导,促进民族地区健康消费 针对民族地区农民长期形成的消费习惯和心理,加强舆论宣传引导,利用舆论宣传媒介,引导农村居民改变修墓立碑、婚丧嫁娶等方面的不良消费习惯,摒弃封建迷信、铺张浪费等陋习,并努

力消除不健康的攀比心理^[2];鼓励农民在吃好、穿好、住好的同时,树立科学健康的消费观念,鼓励其增加在耐用消费品、文化娱乐教育、医疗保健等方面的支出,引导尝试信贷的消费方式,逐步改善消费结构,树立正确、合理的消费观念和良好的消费习惯,不断提高生活质量,使民族地区农村居民的消费结构朝着丰富、健康、有益的方向发展^[3]。

参考文献

- [1] 熊正贤,吴黎围.西部贫困山区农村居民消费问题研究——以乌江流域民族地区为例[J].贵州民族研究,2010(6):101-107.
- [2] 杨艳辉.我国民族地区农村居民消费需求特征与制约因素[J].安徽农业科学,2011,39(30):18911-18913.
- [3] 刘兆征.农村消费:扩大消费需求的最大难点[J].理论与实践,2011(8):66-67.
- [4] GUAN L,LI C L,ZHANG B. Comprehensive Evaluation on Consumption Structure of Rural Residents with Principal Component Analysis in China [J]. Asian Agricultural Research,2011,3(3):96-97,100.
- [5] 赵黎明,刘素美.金融支持对农民消费影响的分析[J].内蒙古农业科技,2011(2):29-30.
- [6] 余霜,李光.农村各收入阶层消费行为特征研究[J].宁夏农林科技,2012,53(2):115-116.

(上接第 4630 页)

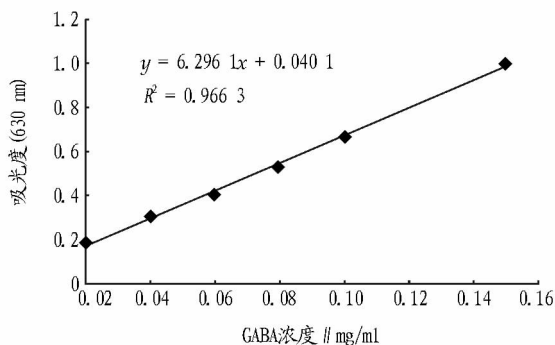


图5 反应体系的吸光度与 γ -氨基丁酸含量的关系

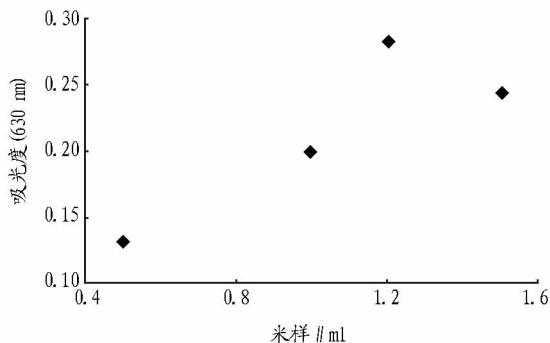


图6 反应体系的吸光度值与糙米用量的关系

3 结论与讨论

虽然目前氨基酸分析法、酶法、放射性受体法、毛细管电泳法、液相色谱法等均可用于药品或食品 γ -氨基丁酸的定量测定,但这些方法有的需要大型仪器,如氨基酸分析法;有的成本高或者不环保,如酶法、放射性受体法等,不适用于大量样品的快速、经济及准确地测定。该试验基于 Berthlot 显色反应,建立和优化了比色法测定糙米中 γ -氨基丁酸含量的技术体系。该体系与其他方法相比,具有以下优点:测定

仪器为通用紫外分光光度仪;测定不仅快速经济,而且准确性较高,经分析比较测定结果相对误差小于5%。这表明目前提供的 Berthlot 比色法可用于糙米 GABA 的测定。

就测定体系而言,陈恩成等认为 645 nm 的波长检测较好^[9],但他的试验并没有对不同的波长来设置试验;而在笔者的试验中,发现 630 nm 比 645 nm 的波长更有利于测定,试验结果与赵宏飞等的结果一致^[10]。

该方法中,苯酚和次氯酸钠的用量是影响精确度的关键因素。试验表明,随着 2 种试剂量的增多,试验开始时吸光度值逐步增加,随试剂用量的增加,吸光度值反而呈下降趋势。这意味就该试验中 GABA 质量浓度在 0.03 mg/ml。苯酚和次氯酸钠添加量过高时,其吸光度值反而很低。

就颜色稳定性而言,前人研究认为反应后的放置时间在 60 min 内反应溶液有较好稳定性^[10],但该研究发现,60 min 以内是反应液吸光度的快速增长期,60~180 min 为吸光度值平衡期。因此如在 60 min 以内测定,试验误差相对较大,建议最佳的测定时间为 60~180 min。

参考文献

- [1] 赵则胜,蒋家云,蔡向忠,等.功能米的研究与利用[J].上海农学院学报,1996,14(4):236-242.
- [2] 陆勤,朱剑琴. γ -氨基丁酸的神经营养作用[J].国际病理科学与临床杂志,1995,15(3):187-188.
- [3] 翁志强,周汉钦,石宇文,等.富硒粤航一号米对阿弗他溃疡患者肠道菌群调节作用研究[J].时珍国医国药,2012,2(11):2883-2885.
- [4] 迟明梅,方伟森.浅谈营养米和功能米[J].粮食加工,2005(5):26-32.
- [5] 康彬彬,陈团伟,陈绍军,等.高 γ -氨基丁酸稻米品种的筛选[J].山地农业生物学报,2007,26(6):471-475.
- [6] 胡红姝,杨树德.细菌荧光法酶生物发光分析法测定血清中 γ -氨基丁酸[J].临床检验杂志,1998,16(2):67-69.
- [7] 朱珠.递质氨基酸的毛细管电泳-安培检测[J].分析测试学报,1999,18(4):36-38.
- [8] 张继红,康绍英.高效液相色谱法测定发芽米胚芽中的 γ -氨基丁酸[J].食品与机械,2011,27(4):82-86.
- [9] 陈恩成,张名,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):125-128.
- [10] 赵宏飞,宋伟,裴家伟,等.食品中三种 γ -氨基丁酸检测方法比较[J].食品科技,2008,36(11):51-55.