

应用技术

利用¹H-NMR技术鉴别合成法和 发酵法生产的 γ -氨基丁酸

王 磊¹, 李赫宇^{1,2}

(1.天津市康世生物技术有限公司 天津 300457; 2.天津益倍元天然产物技术有限公司 天津 300457)

摘要: γ -氨基丁酸具有广泛的生理活性, 2009年批准为新食品原料, 并规定制备工艺是以L-谷氨酸钠为原料发酵法生产。在经济利益的驱使下, 市场上存在以化学合成的产品作为食品原料使用的情况。合成法生产的 γ -氨基丁酸由于存在一定的安全风险, 禁止在食品中应用。目前还没有统一的标准和方法鉴别生物发酵法和合成法生产的 γ -氨基丁酸。研究利用¹H-NMR技术对该原料进行分析, 建立了一种有效和快速的鉴别方法。

关键词: γ -氨基丁酸 NMR技术 鉴别

中图分类号: TQ922

文献标志码: A

文章编号: 1006-8945(2017)07-0093-02

Identification of γ -Aminobutyric Acid Produced by Chemical Synthesis and Fermentation Using ¹H-NMR

WANG Lei¹, LI Heyu^{1,2}

(1. Tianjin Kings Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Ubasic-Ingredient Natural Products Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: γ -Aminobutyric acid (GABA) possesses a wide range of physiological activities. In 2009, the GABA which derived from fermented sodium glutamate by *Lactobacillus hilgardii* was approved as a new food ingredient. Due to potential safety risk, the synthesized GABA was prohibited from use in food. However, driven by economic interests, chemical synthesized GABA was illegally used as food materials in the market. To our best knowledge, there is no uniform approach for the identification of this two originated GABAs. In this study, a feasible method based on ¹H-NMR technology was established.

Key words: γ -aminobutyric acid; NMR; identification

0 引 言

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)又称氨基酪酸,是一种非蛋白质组成的天然氨基酸。在动物、植物和微生物中均有它的存在。GABA为哺乳动物中枢神经系统一种主要的抑制性神经递质,具有广泛的生理活性,如:降低血压、促进睡眠、增强记忆力、抗焦虑等。^[1-2]GABA的制备方法主要有化学合成法和生物合成法两种。生物合成法相对来说是一种安全的方法。根据最新的研究报道和专利文献,乳酸菌、酵母菌、曲霉菌等一些安全性高的微生物在GABA类食品的制备中已有应用。2009年我国卫生部门批准 γ -氨基丁酸为新食品原料,规定其来源为以

L-谷氨酸钠为原料经希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*)发酵等步骤生产而成。化学合成GABA技术成熟,难度较低,价格相较于生物合成法低很多。由于化学合成法所用原料为2-吡咯烷酮,在碱性条件下发生开环反应生成,因此,不可避免会残留一定量的2-吡咯烷酮。^[3]该成分人体摄入后,长期蓄积损害肝肾功能。化工合成的GABA应用于兽药和饲料领域,FDA明确禁止食品中添加。然而,在经济利益的驱动下,市场上存在非法化学合成GABA用于食品的情况。目前,还没有统一的方法鉴别化学合成和生物合成来源的GABA。本研究利用¹H-NMR分析技术期望建立一种可行的方法鉴别其来源。

1 实验条件

1.1 试剂

GABA 分别从 3 家公司购买,两家声称发酵产品,一家为合成产品。谷氨酸钠和 2-吡咯烷酮购自阿拉丁试剂公司。

1.2 测试条件

精密称取样本 15 mg(GABA, 谷氨酸钠, 2-吡咯烷酮),置于直径为 5 mm 样品管中,用移液器精密加入 0.6 mL 的 D₂O 溶解(北京化工厂生产,氘代度为 99.8%)。仪器为 Mercury-400 MHz 核磁共振仪,¹H 的共振频率为 400.13 MHz。测试温度为 295 K,以 D₂O 作为化学位移内标(δ_H 4.80)。谱宽为 4 854.369 Hz; NS 为 64。

2 结果与讨论

2.1 GABA 的 ¹H-NMR 数据

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) : δ_H 3.02 (2 H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4), 2.30(2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 1.89 (2 H, m, H-3), 见图 1。与文献报道值一致,确定 3 个厂家提供的产品都为 GABA。^[4]

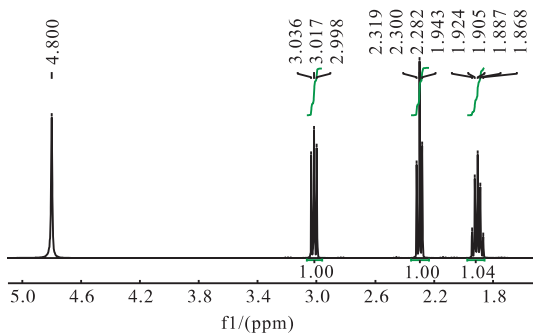


图 1 GABA 的氢谱

Fig.1 The ¹H-NMR spectrum of GABA

2.2 杂质的 ¹H-NMR 数据分析

根据文献报道,推测其中可能的杂质主要为 2-吡咯烷酮和谷氨酸钠,分别测试二者的氢谱,可以看到 2-吡咯烷酮的谱图中 δ_H 3.44(2 H, m)为不与 GABA 重叠的特征峰,同样可以看到谷氨酸钠的谱图中 δ_H 3.72(2H, m)为特征峰,见图 2~3。

将所测试的 GABA 的 ¹H-NMR 谱图纵轴放大同样的倍数,比较残留的杂质峰,并与谷氨酸钠和 2-吡咯烷酮的谱图比较,判断杂质的种类,进而分析 GABA 来源。详述如下:A 厂家样本在 δ_H 3.72 时有很弱的信号,在 δ_H 3.45 时没有信号,判断为发酵的产

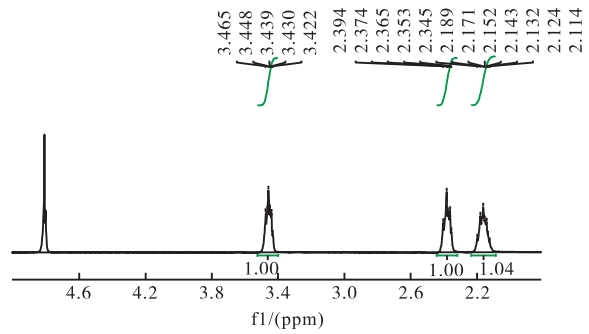


图 2 2-吡咯烷酮的氢谱

Fig.2 The ¹H-NMR spectrum of 2-pyrrolidone

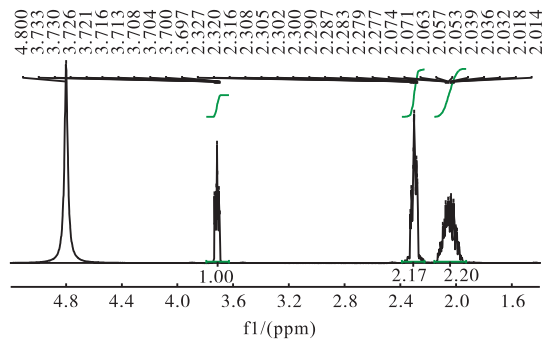


图 3 谷氨酸钠的氢谱

Fig.3 The ¹H-NMR spectrum of sodium glutamate

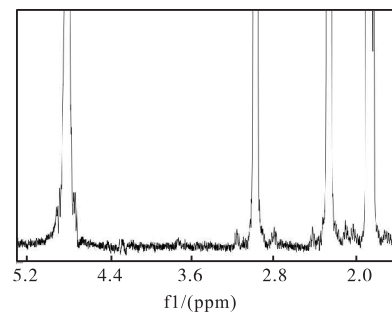


图 4 GABA 的氢谱放大图(A)

Fig.4 The larger image of ¹H-NMR spectrum of GABA (A)

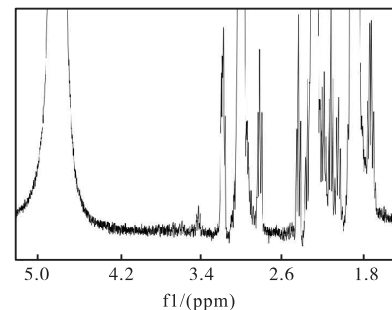


图 5 GABA 的氢谱放大图(B)

品,与厂家声称一致(见图 4)。B 厂家样本在 δ_H 3.45 时有较强的残留信号,但在 δ_H 3.71 时无残留信号,判

3 结 论

本文选取滦河水作为研究对象,经一年多的数据积累及分析得出总有机碳(TOC)与化学需氧量(COD_{Cr})的一元线性回归方程: $y = 2.7802x + 1.0973$,相关系数: $R = 0.9292$ 。对二者的一元线性回归效果进行检验。F检验得出的F值为234.483,远大于 $F_{0.01}(1, 40) = 7.31$ 。因此总有机碳(TOC)与化学需氧量(COD_{Cr})之间存在着十分显著的线性关系,可以通过测得的总有机碳(TOC)的值经计算快速得出化学需氧量(COD_{Cr})的值。■

上接第94页

断为合成产品,与厂家声称一致(见图5)。C厂家声称发酵产品,但是在 δ_H 3.71和 δ_H 3.45时均有明显信号,判断是合成样本和发酵样本的混合物,与厂家声称的发酵样本不一致。

3 结 语

随着GABA被许可用于食品,以它作为主要功能成分开发的产品越来越多。目前有的生产厂家通过采用气相色谱的方法分析是否残留2-吡咯烷酮,来判断是否为合法的GABA原料。该方法需要对样本进行提取,进样分析,每次都需要进样2-吡咯烷酮用于对比保留时间。同样对仪器设备的要求也较高,需要气相色谱等精密分析仪器。本研究建立的方法,有如下优点:①样本用量少,只需要15mg样本;②速度快,每个样本测试时间只需要几分钟;③不需要每次使用对照品,只需要看化学位移 δ_H 3.71和 δ_H 3.45处是否有残留峰即可。当然该方法需

参考文献

- [1] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 210.
- [2] 陈光, 刘廷良, 孙宗光. 水中TOC与COD相关性研究[J]. 中国环境监测, 2005, 21(5): 10-12.
- [3] 汪志国, 李国刚. 浅谈TOC与COD_{Cr}的关系[J]. 中国环境监测, 2001, 15(1): 1-3.
- [4] 孙立岩, 姚志鹏, 张军, 等. 地表水中TOC与COD换算关系研究[J]. 中国环境监测, 2013, 29(2): 125-126.

要利用核磁共振仪这一高端的精密仪器。总之,本文建立的方法可用于对该原料的分析鉴别,有利于保障相关产品的合法性和安全性。■

参考文献

- [1] 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): 546-551.
- [2] 许建军, 江波, 许时婴. GABA(γ -氨基丁酸)——一种新型的功能食品因子[J]. 食品工业科技, 2003, 24(1): 109-110.
- [3] 赵炳超, 石波, 李秀波, 等. 新型饲料添加剂—— γ -氨基丁酸的制备及应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(12): 13-14.
- [4] 刘梓晗, 李春, 晏仁义. 玉竹水溶性成分分离及其糖苷酶抑制活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 51-55.