

高效液相色谱法测定乳酸菌中的 L- 氨基丁酸

葛菁萍, 蔡柏岩, 宋明明, 凌宏志, 宋 刚, 平文祥*

(微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘 要: 建立了邻苯二甲酰柱前衍生高效液相色谱法。定量测定短乳杆菌中 L- 氨基丁酸的方法, 为进一步研究乳酸菌中的 L- 氨基丁酸奠定了方法基础。在对浓缩发酵上清液柱前衍生后, 利用 Nova2pakC₁₈ 色谱柱, 以 50mmol/L 的乙酸钠(pH6.8)- 甲醇 - 四氢呋喃(A 相, 82:17:1; B 相, 22:77:1, V/V)为流动相进行梯度洗脱, 可以检测到痕量 L- 氨基丁酸(2.2mg/100g)。精确度和回收率实验表明, 该方法可以用于痕量 L- 氨基丁酸的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 邻苯二甲酰; L- 氨基丁酸; 乳酸菌

Determination of L-Amino Butyric Acid in *Lactobacillus brevis* Fermentation Liquid by HPLC

GE Jing-ping, CAI Bai-yan, SONG Ming-ming, LING Hong-zhi, SONG Gang, PING Wen-xiang*

(Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: High performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde pre-column derivatization was used to determine the content of L-amino butyric acid (GABA) in *Lactobacillus brevis*. After pre-column derivatization of concentrated fermentation supernatant, separation of GABA was carried out on Nova2pakC₁₈ column with the gradient elution of 50 mmol/L acetate sodium (pH 6.8), methanol and THF (solution A 82:17:1; solution B 22:77:1, V/V). The results of accuracy and recovery rate showed that this method can be used to detect trace content of GABA.

Key words: HPLC; o-phthalaldehyde; GABA; lactic acid bacteria

中图分类号: O657.72; TQ922.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0324-03

L- 氨基丁酸(L-amino butyric acid, 简称 GABA, 也称氨酪酸)是一种重要的功能性非蛋白质氨基酸, 作为中枢神经系统重要的抑制性神经递质, 能通过突触后膜超极化、减少离子内流和降低细胞代谢等机制, 使得神经元处于保护抑制状态。大量的研究已经表明, GABA 具有增进脑活力和长期记忆、安神抗抑郁、调节激素分泌、改善脂质代谢、降血压、治疗癫痫和改善更年期综合症等重要的生理功能^[1-2], 以 GABA 为主要成分的功能性食品和以 GABA 为中间体的药物, 也相继被开发并得到了广泛的应用。GABA 存在的范围很广, 植物^[3]、动物^[4]、微生物代谢产物中^[4]、均有 GABA 的存在、但含量不一。近年来益生菌乳酸菌发酵液中存在 GABA 的报道也屡见不鲜^[5]。目前测定 GABA 的方法有^[6]: 放射受体法、薄层扫描法、高效液相色谱法、氨基酸分析仪和气相色谱 - 质谱连用法。其中高效液相色谱法是最常用的方法, 但因 GABA 直接检测灵敏度

低, 故常采用衍生后再测定的方法。

本课题组从乳酸酸菜发酵液中分离出一株短乳杆菌, 其发酵液经氨基酸分析仪检测, 可产生 GABA, 但含量较低(2.2mg/100g)。因此, 本研究利用 GABA 与衍生试剂邻苯二甲酰(OPA)反应生成具有较强荧光活性衍生化产物的原理, 采用柱前衍生高效液相色谱法来检测该乳酸菌发酵液中的痕量 GABA, 为进一步通过育种来提升该菌产 GABA 的能力奠定方法基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

L- 氨基丁酸标准品 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇为色谱纯试剂; 邻苯二甲酰(OPA)为化学纯; 其他试剂均为分析纯; 所有用水均为 MillinQ 超纯水。

Waters 高效液相色谱仪(包括 WATERS 510 HPLC PUMP、柱温箱、WATERS 470 荧光检测器和数据处理

收稿日期: 2007-04-06

基金项目: 黑龙江省科技攻关重大项目(GB05B401)

作者简介: 葛菁萍(1972-), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物学。E-mail: gejingping512@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 平文祥(1959-), 男, 教授, 研究方向为微生物学的研究。E-mail: wenxiangp@yahoo.com.cn

器)、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、旋转蒸发仪及超声波清洗器等。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Nova2pakC₁₈ 柱; 流动相为 50mmol/L 的乙酸钠(pH6.8)- 甲醇- 四氢呋喃(THF)(A 相 82:17:1; B 相 22:77:1, V/V), 使用前超声脱气, 各成分均用 0.2 μm 滤膜过滤并经脱气处理; 柱温: 27℃, 流量: 1.0ml/min, 进样量: 20 μl; 荧光检测波长中的激发波长为 338nm, 发射波长为 425nm。本实验采用的梯度程序见表 1。

表 1 分离 GABA 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program for separation of OPA -GABA derivatives

步骤	时间(min)	乙酸钠(pH6.8):甲醇:THF	
		(82:17:1, V/V)	(22:77:1, V/V)
1	0	95	5
2	6	88	12
3	16	66	34
4	25	30	70
5	29	0	100
6	32	0	100
7	35	95	5

1.3 样品制备

1.3.1 菌种

乳酸菌 HDRS8, 从酸菜发酵液中自行分离得到, 经 16SrDNA 序列分析及 API 试剂条(API50CHL)鉴定为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)(数据未给出)。

1.3.2 培养基^[9]

MRS 培养基(固体培养基中加约 2% 琼脂): 酪蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、酵母提取物 0.5%、葡萄糖 0.5%、乙酸钠 0.5%、吐温-80 0.1%、柠檬酸胺 0.2%、磷酸氢二钾 0.2%、硫酸镁 0.02%、硫酸锰 0.005%、调 pH6.6~6.8。用于菌种的培养。

TYG 液体培养基: 胰蛋白胨 0.5%、酵母提取物 0.5%、葡萄糖 1.0%、丁二酸钠 0.5%, 调 pH6.6~6.8。用于发酵培养。

1.3.3 产 L- 氨基丁酸乳酸菌发酵液的制备及处理

种子培养液制备: 在 250ml 三角瓶中装入 100ml MRS 液体培养基, 从活化的 MRS 固体斜面培养基上挑取适量菌株接入 MRS 液体培养基中, 30℃ 静置培养 16h。

发酵培养液制备: 在 100ml 三角瓶中装入 50ml TYG 液体培养基(另加 1% 谷氨酸), 按 3% 接种量接入培养 16h 的种子培养液, 30℃ 静置培养 24h。备用。

将发酵液离心后取上清液, 旋转蒸发将发酵液浓缩 20 倍, 用 0.2 μm 滤膜过滤后进行柱前衍生反应。

1.4 标准溶液的配制与曲线绘制

用 0.1mol/L HCl 配制 50mmol/L 的 GABA 标准贮备液

并保存在 4℃ 冰箱内, 以 0.1mol/L HCl 稀释标准贮备液, 得到系列浓度标准液, 按照样品衍生步骤进行柱前衍生, 并用 HPLC 测定, 以峰面积对浓度绘制标准曲线。

1.5 样品和标准样柱前衍生反应

称取 10mg OPA, 加 0.5ml 甲醇溶解后, 加入 2ml 0.4mol/L 硼酸盐缓冲液(pH9.40)和 30 μl 2- 巯基乙醇, 此衍生剂溶液可保持 2d。取浓缩的样品或标准溶液 10 μl, 加入上述溶液 100 μl, 混匀, 反应 1min 后进样。

1.6 精密度实验

以 HDRS8 浓缩液进行精密度实验, 量取其浓缩液 3 份, 按照上述方法进行柱前衍生并进行 HPLC 测定, 比较同一样品 3 次测定结果的差别。

1.7 回收率实验

精确称取 GABA 标准品, 和 HDRS8 发酵浓缩液混合后, 按照上述方法进行柱前衍生并进行 HPLC 测定, 通过比较样品和标准品的回收情况, 确定其回收率。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

以乙酸钠(pH6.8)- 甲醇- THF 为流动相, 用 Nova2pakC₁₈ 柱可使 L- 氨基丁酸得到良好分离。流动相中 THF 的浓度对于 GABA 的分离特别重要^[7]。当 THF 低于 1% 时, GABA 达不到完全分离; 而当 THF 大于 1% 时, 各次分析的保留时间变化较大。图 1 是 GABA 标准样在所选色谱条件下的色谱图, 其在柱上的保留时间为 14.075min。可见, GABA 与其它物质达到了基线分离, 不受其它峰的干扰。图 2 为 HDRS8 发酵浓缩液的色谱图, 其中 GABA 在柱上的保留时间与标准样品一致, 为 14.070min。

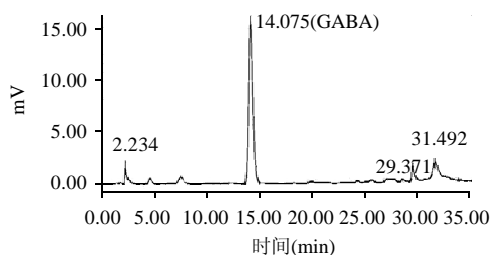


图 1 GABA 标准品 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of standard GABA

2.2 测定波长的选择

L- 氨基丁酸与 OPA 反应后, 接上了荧光基团而产生荧光, 其激发波长为 338nm, 发射波长为 425nm 时, 可以使 GABA 得到良好的分离^[8]。

2.3 标准曲线

按照 1.4 的方法, 得到的回归方程为 $y=0.82x+0.02$, 相关系数为 0.985。

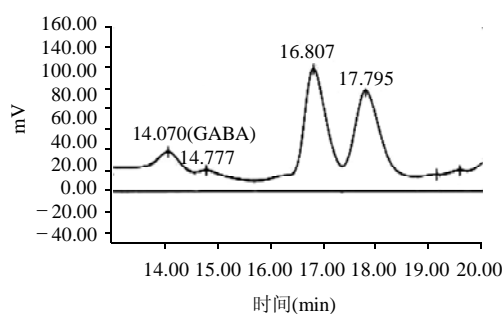


图2 HDRS8 发酵浓缩液 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of HDRS8 concentrated fermentation liquid

2.4 精密度实验结果

按照 1.6 的方法, GABA 测定结果的相对标准差小于 1.5%。

2.5 回收率实验结果

按照 1.7 的方法, GABA 的回收率平均可达到 98%。

3 讨论

GABA 虽然广泛存在, 但其含量差别较大。本实

验所采用的短乳杆菌(HDRS8)中 GABA 含量很低, 经氨基酸分析仪测定, 仅为 2.2mg/100g, 这给检测带来了很大麻烦。因此, 本实验将样品进行浓缩, 以达到 HPLC 的最低检测线。这也说明, 采用本实验中的 HPLC 体系, 可以检测出较低量的 GABA, 这为后期通过育种方法提升该菌株 GABA 产量奠定了方法基础。

参考文献:

- [1] 许建军. *Lactococcus lactis* 生物合成 L-氨基丁酸及谷氨酸脱梭酶的性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [2] 郑红发, 黄亚辉, 刘霞林. L-氨基丁酸的药理作用[J]. 茶叶通讯, 2004 (4): 14-17.
- [3] 白松, 林向阳, 阮榕生. L-氨基丁酸的分布和制备[J]. 现代食品科技, 2005(2): 202-205.
- [4] 崔晓俊, 江波, 马磊. 乳酸 SK005 发酵产 GABA(L-氨基丁酸)的条件优化[J]. 食品研究与开发, 2005(6): 64-69.
- [5] 夏江, 梅乐和, 黄俊. 产 L-氨基丁酸的短乳杆菌菌株筛选及诱变[J]. 核农学报, 2006(5): 46-50.
- [6] 郭晓娜, 朱永义, 朱科学. 生物体内 L-氨基丁酸的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 70-72.
- [7] 刘清, 姚惠源, 张晖. 生产 L-氨基丁酸乳酸菌的选育及发酵条件优化[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 40-43.
- [8] 黄熠, 黄兰芳, 郭方遒, 等. 高效液相色谱法测定生物体液中 L-氨基丁酸[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 13-16.