

HPLC 法测定发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量

房克敏¹, 李再贵^{1,*}, 袁汉成², 孟颖²

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2. Waters 中国有限公司北京实验室, 北京 100027)

摘要: 建立一种发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的高效液相色谱测定法。采用 AQC (6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯) 为柱前衍生试剂, 色谱柱为 Waters AccQ•Tag 氨基酸分析柱, 梯度洗脱, 紫外检测波长 248.0nm。 γ -氨基丁酸的线性范围在 0.10~1.0 $\mu\text{mol/ml}$, 线性关系良好, 线性方程为 $Y=3.0 \times 10^6 X - 7877.6$, $r=0.9999$, 回收率为 99.0%~100.5%。该方法易于操作、稳定、灵敏、准确。用该方法测定了 16 种发芽糙米, 结果显示其发芽后的含量均显著高于未发芽糙米中的 γ -氨基丁酸含量。

关键词: γ -氨基丁酸; AccQ•Tag 衍生; HPLC; 发芽糙米

Determination of γ -Aminobutyric Acid in Germinated Brown Rice by HPLC

FANG Ke-min¹, LI Zai-gui^{1,*}, YUAN Han-cheng², MENG Ying²

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Waters China Limited—Beijing Laboratory, Beijing 100027, China)

Abstract: A method for analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) in germinated brown rice by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. A gradient elution was used for the separation and quantification of GABA pre-column derivatization with AQC. The column was Waters AccQ•Tag for free amino acids. GABA was determined with UV detector at 248.0nm. Good linearities were observed within the ranges from 0.10 to 1.0 with equation of $Y=3.0 \times 10^6 X - 7877.6$ ($r=0.9999$). And the recoveries were 99.0%~100.5% for GABA. The method is simple, steady, sensitive, accurate. GABAs in sixteen types of germinated brown rice were determined by the method. The results showed that the content of GABA in germinated brown rice is significantly higher than that in normal brown rice.

Key words: γ -aminobutyric acid; AccQ•Tag-derivation; HPLC; germinated brown rice

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0208-04

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸, 广泛存在于动植物体内, 是高等动物神经系统内主要抑制性传递物质, 作为神经递质或神经递质的前体直接参与神经活动, 具有降血压, 抗动脉硬化, 促使脑血液流量活跃、增加脑供氧量、促进脑细胞代谢、改善脑中风后遗症以及动脉硬化造成的头痛、耳鸣、记忆力减退、情绪低落等症状, 有改善肝脏、肾脏功能, 促进乙醇代谢, 降血脂、防止肥胖、消除体臭的作用^[1~3]。糙米经发芽培养后可大大增加 γ -氨基丁酸的含量。

发芽糙米是一种完美的功能性食品, 是具有多种功能疗效的“药食同源”产品, 营养成分大大超过精白

米和糙米, 含有丰富的抗脂质氧化的物质, 如阿魏酸、植酸、谷维素、三烯生育酚等, 这些抗氧化成分能在体内有效捕捉活性氧, 清除其毒性, 并能促进皮肤的新陈代谢, 预防和减轻老人斑的出现。糙米发芽后富含较多的生育酚(VE)、三烯生育酚, 生育酚可防止皮肤氧化损伤, 保持皮肤细胞中 VE 的正常水平, 抗血管硬化; 三烯生育酚可抑制癌的增殖, 将生育酚与它莫西芬合用, 对抑制癌细胞增殖有协同作用, 可用于治疗乳癌。米芽中所含食物纤维有很强排毒效果, 食物纤维摄入量的增加能增加肠胃的蠕动, 并改善消化道有益菌群的环境, 加大体内毒素的排出与排泄量, 对改善便秘有效。发芽糙米中还含有白米中很少或几乎不含的许

收稿日期: 2005-06-24

*通讯作者

作者简介: 房克敏(1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂与谷物蛋白。

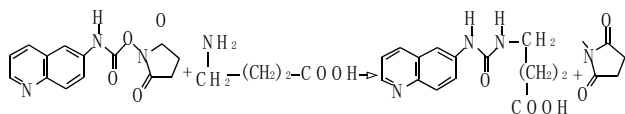
多物质, 已知的有: 肌醇、植物甾醇、二十四醇、二十六醇、二十八醇等。越来越多的研究资料证明, 这些物质含量虽少, 但却有着不可低估的生物活性作用^[4]。发芽糙米的食用性接近于精白米, 可直接与精白米进行搭配作为主食产品; 也可作为食品基料, 用作米制品、方便食品、饮料、糕点、食品添加剂的配料。

发芽糙米的生产实质上是糙米的活性化过程, 糙米芽体是具有旺盛生命力的活体, 在浸泡的过程中, 由于温度和 pH 的影响, 各种酶被活化, 谷氨酸经谷氨酰胺转氨酶催化转化生成 GABA, 发芽后其 γ -氨基丁酸含量有显著提高, GABA 含量的增加也与糙米品种有关, 多的可达到发芽前原糙米中 GABA 含量的 4~5 倍以上^[2]。1995 年富含 GABA 的发芽糙米在日本实现了商品化^[3], 2001 年日本发芽糙米产值约 70 亿日元^[5], 2002 年发芽糙米的产值约 100 亿日元^[6], 并且呈稳步增加的趋势。发芽糙米被称为 21 世纪的主食产品, 国内外正在掀起发芽糙米的热潮, 进而也带动了对发芽工艺和发芽设备的开发, 但是测定发芽糙米中 γ -氨基丁酸方法的研究目前还鲜有报道。

由于 γ -氨基丁酸对电化学和紫外-可见光的不灵敏性, 因此用直接方法进行测定比较困难。目前, 国内外测定 γ -氨基丁酸的高效液相色谱 (HPLC) 方法多采用邻苯二甲醛 (OPA) 和异硫氰酸苯酯 (PITC), 苄甲氧羰酰氯 (FMOC-Cl) 与氨基酸发生衍生化反应^[7~13], 衍生物经过 HPLC 分离, 紫外或者荧光检测, 并且分析对象多为 γ -氨基丁酸含量较高的脑脊液和血清, 应用上述方法测定发芽糙米中 γ -氨基丁酸时, 未能很好的检测 γ -氨基丁酸的含量。

本文用AQC(6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯)作衍生剂与 γ -氨基丁酸反应。AQC中,带有羧基琥珀酰亚胺反应活性基团的氨基甲酸酯是迅速定量衍生氨基化合物的关键,由于其能迅速水解生成6-氨基喹啉而失活,故可限制非期望的副反应的发生。衍生产物中的喹啉基团是提高检测灵敏度的关键,生成在室温下可稳定一周的高稳定性的脲,衍生物经HPLC分离后经紫外检测器检测,可得到理想的结果。本文建立的高效液相色谱方法已应用于发芽糙米生产中 γ -氨基丁酸的定量检测。

AQC 与 GABA 的反应方程式如下:



1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 分离单元; 2996 二极管矩阵检测器; Empower 色谱管理软件 美国Waters公司; 超声波清洗器; XW-800 型涡旋混合器; 旋转蒸发仪; 索氏抽提器; 6 × 50 mm 样品管。

γ -氨基丁酸标准样品 美国 Sigma 公司; AccQ·Flour™ 衍生试剂包 Waters 公司; 超纯水 (18 M Ω); 无水乙醇 北京化学试剂厂。

1.2 色谱条件

色谱柱: Waters AccQ·Tag™ 氨基酸分析柱(3.9mm × 150mm, 4μm)。流动相: 流动相 A 为 140mmol/L 醋酸钠加 17mmol/L 三乙胺, 用稀 H₃PO₄ 调整 pH 到 5.02; 流动相 B 为乙腈; 流动相 C 为水。流速为 1ml/min, 梯度洗脱条件如表 1 所示, 紫外检测波长 248.0nm, 柱温 37℃, 进样量 10μl。

表1 梯度洗脱程序表
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流速(ml/min)	A (%)	B (%)	C (%)	曲线
0	1.0	100	0	0	*
0.5	1.0	99	1	0	11
18	1.0	95	5	0	6
19	1.0	91	9	0	6
29	1.0	82	18	0	6
33	1.0	0	60	40	11
36	1.0	100	0	0	11
45	1.0	100	0	0	11

1.3 标准溶液及样品制备

1.3.1 标准溶液配制

准确称取 γ -氨基丁酸标准品，用超纯水溶解配成 $1.0 \mu\text{mol/ml}$ 的 γ -氨基丁酸标准溶液，摇匀备用。

1.3.2 样品制备

将发芽糙米用粉碎机充分粉碎后全部过 80 目筛, 然后准确称取 3g 发芽糙米粉于叠好的滤纸包内, 放入索氏抽提器内, 加入乙醇-水(3:2, V/V) 溶液 200ml, 在 98℃ 电子调温电热套上加热回流 4 次, 用旋转蒸发仪将提取液浓缩至 25ml, 经 0.2 μ m 滤膜过滤后备用。

1.4 样品衍生化

取 10 μ l 滤液至干净的 6 \times 50mm 样品管底部，吸取 70 μ l 硼酸盐缓冲液 (pH8.8) 至样品管中，短暂涡旋混合，再吸取 20 μ l AQC 衍生试剂至样品管中，立即旋涡混匀 15s，室温放置 1min；用石蜡膜封口，置 55 $^{\circ}$ C 烘箱内加热 10min，取出转移置样品管中，10 μ l 进样。。此衍生产物可在室温下保存 1 周。

2 结果与分析

21 色谱行为

在上述色谱条件下, 标准液和样品液在 $A_{CCQ} \cdot$

TagTM 色谱柱上得到了良好的洗脱和分离, γ -氨基丁酸在柱上的保留时间是 23.05min。图 1 为 GABA 的标准色谱图, 图 2 为发芽糙米样品的色谱图。从色谱图可以看出, 其他杂质对测定没有干扰, 该方法能很好地对 GABA 进行分离。

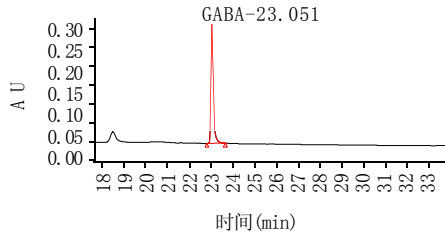


图 1 GABA 标准品色谱图
Fig.1 Chromatogram of γ -aminobutyric acid standard

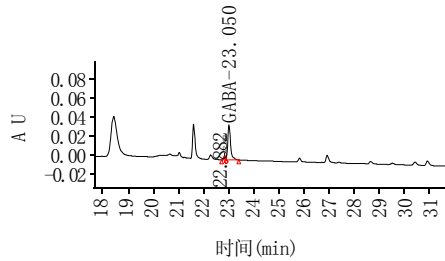


图 2 发芽糙米色谱图
Fig.2 Chromatogram of the germinated brown rice powder sample

2.2 标准曲线

精密量取上述配制好的 1.0 μ mol/ml γ -氨基丁酸标准液配制成 0.10、0.25、0.50、0.75、1.0 μ mol/ml 的系列标准液, 按照样品衍生步骤衍生并用 HPLC 测定, 以峰面积 A 对浓度 C (μ mol/ml) 绘制标准曲线, 回归方程为: $Y=3.0 \times 10^6 X - 7877.6$, 相关系数为 0.9999 (n=5), 最小检测浓度为 0.01 μ mol/ml。

2.3 精密度试验

精确吸取某一样品的超滤液 3 份, 按上述衍生法处理测定, γ -氨基丁酸测定结果的相对标准偏差小于 1.1%。

2.4 回收率试验

精确称取 γ -氨基丁酸标准品, 加入发芽糙米粉中, 按样品制备方法处理后, 进行 HPLC 测定, 其平均回收率为 99.7%。结果如表 2 所示。

2.5 样品测定结果

收集了全国不同地区的 16 种稻米品种, 将稻谷脱壳后于 20℃ 水浴中浸泡 6h, 然后在 40℃ 条件下发芽培养 36h, 按上述条件制备样品, 所测结果如表 3 所示。从表 3 可以看出, 糙米经发芽培养后所含 GABA 的量远远高于未发芽糙米中所含 GABA 的量, 糙米品种对发芽后 GABA 的含量变化有很大影响, 其中外引 7 号所含

表 2 γ -氨基丁酸的回收率
Table 2 The recoveries of GABA

样品	原有量(mg)	实际添加量(mg)	加标后测得量(mg)	回收率(%)
1	0.84	2.0	2.85	100.5
		5.0	5.83	99.8
2	0.57	1.5	2.06	99.3
		1.0	1.56	99.0

表 3 不同稻谷 γ -氨基丁酸测定结果
Table 3 The γ -aminobutyric acid content of different rice sample

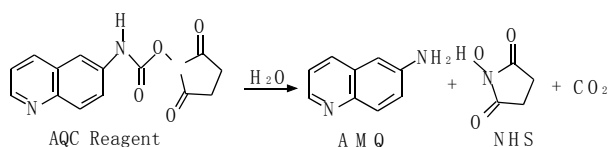
稻谷品种	发芽前 GABA 含量 (mg/100g)	发芽后 GABA 含量 (mg/100g)	增加倍数
外引 7 号	0.82	18.37	22.4
安徽早籼	2.60	12.58	4.8
桂林金优	3.68	24.31	6.6
武育梗 3 号	4.62	6.15	1.3
粤杂 448	2.52	40.84	16.2
矮秀占	2.88	30.63	10.6
294 水稻	3.52	34.55	9.8
粤 215	2.90	30.13	10.4
粤丰占 2 号	1.98	24.92	12.6
籼优 63	3.91	24.92	6.4
二优 725	3.83	42.94	11.2
博优 122	5.84	25.75	4.4
吉五龙	4.77	31.21	6.5
吉 8945	1.60	17.08	10.7
香稻	4.37	31.22	7.1
粘稻	3.18	31.67	10.0

GABA 由发芽前的 0.82mg/100g 提高到 18.37mg/100g, 增加了 22.4 倍; 而二优 725 由发芽前的 3.83mg/100g 提高到 42.94mg/100g, 是所有 16 种稻米发芽后 GABA 含量最高的一种稻米。

3 讨论

AQC (6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯) 是具有反应活性的杂环氨基甲酸酯, 是一种新型的氨基酸衍生化试剂, 能与氨基酸迅速反应, 生成高稳定性的脲, 生成的衍生物在室温下可稳定一周。这与其它方法形成了鲜明的对比, 例如用 PITC 衍生, 某些氨基酸衍生物在 24h 内即降解; OPA 衍生的某些氨基酸也只能稳定几分钟。而在使用 AQC 衍生氨基酸的反应中, 过量的试剂可在一步慢反应中完全水解, 生成不干扰测定的副产物: AMQ (6-Aminoquinoline, 6-氨基喹啉), NHS (N-Hydroxy Succinimide, N-羟基琥珀酰亚胺) 和二氧化碳。

主要的水解产物 AMQ 产生微弱的荧光, 在色谱图上只产生一个易于辨认的峰; 而 NHS 和二氧化碳对分析没有干扰。当用 UV 检测时, 可通过色谱梯度的调整使 AMQ 峰与衍生后的氨基酸充分分离, 因而不会干扰氨基酸的定量分析。稳定的 AQC 衍生样品可批量处理,



保存和重复测试。在样品量很低时, AQC 衍生物的定量仍有很高的重现性, Cohen 和 Michaud 报告了 50pmol 氨基酸标样十次进样的分离重现性, 峰相应的平均偏差 (CV) 为 0.86%^[14]。由于 AQC 衍生后的氨基酸的 UV 最大吸收值在 248nm, 故设置在 250nm 的固定波长检测器以及可调 UV 检测器都适宜于分析。

参考文献:

- [1] 茅原 纮, 杉浦 友美. 近年の生理機能研究——脳機能改善作用、高血圧作用を中心に[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 4-6.
- [2] 編集部. 注目される GABA 富化素材の開発[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 17-18.
- [3] 岡田忠司. Physiological Function of Rice Germ Enriched with GABA [J]. 食品工業, 2001, 36(6): 7-8.
- [4] 安藤干夫. 発芽玄米が日本丸を救う[J]. 食の科学, 2001, 23(4): 66-73.
- [5] 石渡健一. 健康ご飯「発芽玄米」の製品化[J]. 食品工業, 2002, (7): 58-65.
- [6] 杨春华. 发芽糙米产业化开发[J]. 粮油食品科技, 2003, 11(2): 12-13.
- [7] 刘惠文. 高效液相色谱法测定南瓜粉中的 4-氨基丁酸[J]. 色谱, 2001, 19(6): 532-533.
- [8] Naini A B, Vontzalidou E, Cote L J. THPLC assay with electrochemical detection of free γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid[J]. Clin Chem, 1996, 39(2): 247-250.
- [9] 许彦芳, 许新民, 王永利. 高效液相色谱柱前自动衍生法测定氨基酸含量[J]. 河北医科大学学报, 1996, 17(3): 132-134.
- [10] 谭少云, 余伟鸣, 叶放. HPLC 法测定脑复清胶囊中 γ -氨基丁酸的含量[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(11): 865-867.
- [11] 赵刚, 张嘉麟, 李树清. HPLC-PITC 衍生法测定灌流液中氨基酸变化的研究[J]. 昆明医学院学报, 2004, (1): 26-28.
- [12] 谭力, 刘放南, 张旭松. 人胃粘膜中 γ -氨基丁酸和谷氨酸含量的高效液相色谱法测定[J]. 色谱, 2004, 22(2): 131-133.
- [13] 沈佐君, 王治国, 李小鹏, 等. 反相高效液相色谱法测定血清中 γ -氨基丁酸[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(6): 543-547.
- [14] Steven Cohen, Dennis Michaud. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via High Performance Liquid Chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1993, 211: 279-287.

信息

《食品科学》撰稿要求

1. 稿件(附软盘或电子邮件)要求论点明确, 论据可靠, 数据准确, 文字通顺、简练。
2. 引用他人成果时, 请按《著作权法》有关规定说明出处。内容应未曾发表过或被其他出版物刊载过, 且无一稿两投。英文稿件可接收, 但应把题目、作者、单位、摘要、关键词译成中文。
3. 稿件要求 6000 字以内, 须有中图分类号, 文献标识码, 第一作者简介, 中、英文标题, 中英文单位、作者, 并做 200 字左右的中、英文摘要和 3~8 个关键词, 表题、图题请用中英文对照。
4. 凡属于重大科技获奖的论文和国家级省部级资助项目的研究报告、论文, 请来稿注明批准号, 本刊将优先刊登。
5. 来稿内容涉及配方时, 须写明配料的名称和配比, 勿用代号; 工艺过程要完整, 不要省略; 插图、表格需放在正文的相应地方, 不要集中; 引用图表要有出处, 计量要用法定单位。
6. 文稿中的参考文献不得超过 40 条, 其格式请按如下规定表达:

[期刊] 主要责任者. 文献题名[J]. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.

[书籍] 主要责任者. 文献题名[文献类型标识]. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页码(任选).

附 文献类型标识

专著[M]、论文集[C]、报纸文章[N]、期刊文章[J]、学位论文[D]、报告[R]、标准[S]、专利[P]
7. 来稿请注明详细地址和电话, 便于通知联系。
8. 电子信箱(E-mail): chnfood@chnfood.cn
9. 来稿请寄: 100076 北京市大兴区西红门路 8 号《食品科学》编辑部
10. 审稿结果在 6 个月内公布于本刊网站 www.chnfood.cn, 查询方式: 点击我刊网站→食品科学→来稿查询→输入第一作者姓名或文章题目
11. 由于本刊被《中国期刊网》、《万方数据库》、《台湾华艺思博网》全文收录, 故向本刊投稿者若未声明, 均视为其文稿刊登后可供以上数据库收录、转载并上网发行; 其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清, 本刊不再另付其他报酬。若作者不同意自己的文章在以上数据库刊载, 请投稿时在稿件中注明。
12. 联系电话 010-60256914/24/34/44/54-0