

# HPLC 法测定发酵乳中 $\gamma$ -氨基丁酸条件的优化

郭超, 王昌禄, 陈勉华, 李贞景, 王玉荣, 李凤娟

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 本文优化了乳酸菌发酵乳中  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 的 HPLC 检测方法。以三氯乙酸-水溶液为提取液, 通过 60 °C 水浴、10000 r/min 离心 10 min 等方法去除样品中的杂质, 对乳酸菌发酵乳制品中的 GABA 进行提取。通过调整流动相的洗脱方式、流动相比例与 pH、柱温等条件, 使用专用氨基酸分析柱、恒温柱温箱、自动进样器和仪器自动衍生程序, 建立了一种高效快速检测发酵乳制品中 GABA 的方法。该方法对 GABA 的检出限 LOD(S/N=3) 为 0.005  $\mu\text{g/mL}$  (质量浓度), 定量限 LOQ(S/N=10) 为 0.02  $\mu\text{g/mL}$  (质量浓度)。线性范围是 0.005~500  $\mu\text{g/mL}$  (质量浓度), 相关系数  $R^2=1$ 。该方法具有准确度高、快速、环保、经济等特点。采用该方法对功能食品样品、红曲米样品、乳酸菌发酵液样品中的 GABA 进行检测, 均能得到满意的效果, 证明该法具有较广泛的适用性。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸; 乳制品; 乳酸菌; 自动衍生; 梯度洗脱; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2014)1-222-226

## Optimization of $\gamma$ -Aminobutyric Acid Analysis in Fermented Milk by HPLC

GUO Chao, WANG Chang-lu, CHEN Mian-hua, LI Zhen-jing, WANG Yu-rong, LI Feng-juan

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in fermented milk by HPLC was optimized. GABA was extracted from fermented milk with trichloroacetic acid - water solution. Sample solution was heated at 60 °C for 2 h, and centrifugated at 10000 r/min for 10 min. The most efficient and rapid detection method of GABA in fermented milk was established by adjusting the elution mode of mobile phase, mobile phase ratio, pH, and column temperature, as well as using amino acid column, automatic injector and instrument automatically derived procedures. The limit of detection (LOD) (S/N=3) and limit of quantification (LOQ) (S/N=10) for GABA were 0.005  $\mu\text{g/mL}$  and 0.02  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The linear range was 0.0025~500  $\mu\text{g/mL}$  with correlation coefficient ( $R^2$ ) of 1. This method could provide shorter detection time, more accurate results, less reagent waste and wider applicability. Meanwhile the results are satisfying for analysis of GABA in functional food samples, red yeast rice samples, and lactic acid fermentation broths samples.

**Key words:**  $\gamma$ -aminobutyric acid; dairy products; lactic acid bacteria; automatically derived; gradient elution; high performance liquid chromatography

$\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 广泛分布于自然界, 是哺乳动物中枢神经系统中一种重要的抑制性神经递质, 具有非常重要的生理功能, 包括降血压, 改善脑机能, 提高精子活力, 调节自主神经系统功能, 防止皮肤老化, 促进新陈代谢, 改善睡眠等<sup>[1]</sup>。早在上世纪 80 年代, 日本利用植物富集法开发了 GABA 茶功能性食品产品, 并成功投入市场<sup>[1]</sup>。微生物发酵法生产 GABA 是利用微生物自身的谷氨酸脱羧酶 (GAD), 将谷氨酸 (Glu) 脱去一个羧基而

收稿日期: 2013-09-14

作者简介: 郭超 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 王昌禄 (1960-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 食品生物技术

形成谷氨酸的衍生物 GABA<sup>[2]</sup>, 早期的微生物发酵法采用的生产菌为大肠杆菌, 后经研究发现, 乳酸菌也具有较高的 GABA 产量。由于乳酸菌作为一种食品安全级 (GRAS) 的微生物, 在食品工业中具有悠久的历史 and 广泛的应用<sup>[3]</sup>。因此, 将乳酸菌作为 GABA 生产菌, 无论是从发酵周期, 生产成本以及食用安全性方面来讲都具有非常大的潜力。

GABA 的检测方法主要有氨基酸分析仪法<sup>[4]</sup>、比色法<sup>[5]</sup>、纸层析法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>、薄层扫描法<sup>[9]</sup>等。其中氨基酸分析仪法、薄层扫描法仪器价格昂贵且适用范围窄, 而比色法和纸层析法的精密度不高, 不适于大量样品的准确分析。HPLC 具

有应用范围广泛、自动化程度高等优点,可以大大降低检测成本并提高检测效率。据报道,采用 HPLC 法测定氨基酸时大都添加了三乙醇胺(TEA)、四氢呋喃(THF)、乙二胺四乙酸(EDTA)等扫尾剂<sup>[7~10]</sup>,这些试剂不仅污染环境,而且有损检测人员的健康。由于样品种类繁多,检测条件也不同,不能采用一种方法进行检测。发酵乳制品中氨基酸含量高,种类复杂,且性质相近,快速准确分析乳制品中 GABA 含量的 HPLC 法还鲜见报道。本文在前人的基础上<sup>[8]</sup>,优化了一种高效快速精准环保低成本的高效液相色谱检测 GABA 的方法,为乳制品中 GABA 的检测提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳酸菌发酵乳,菌株来源:天津科技大学食品生物技术研究室;乙腈、甲醇(色谱纯),德国 CNW 公司;GABA 标准品,纯度 $\geq 99\%$ ;美国 sigma 公司;三氯乙酸(TCA)(分析纯),天津市福晨化学试剂三厂;邻苯二甲醛(OPA)(生化试剂);Sigma 化学试剂公司;硼酸(分析纯),天津大学科威公司。

### 1.2 主要设备

高速冷冻离心机,贝克曼库尔特(中国)有限公司;Agilent 8453 紫外可见分光光度计,美国安捷伦科技有限公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪,配备在线脱气机、二元泵、自动进样器、紫外检测器及色谱工作站(安捷伦科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品处理

准确量取 5 mL 样品于试管内,加入等体积质量分数为 5% TCA 溶液置于恒温水浴锅中,60 °C 水浴 2 h,转至离心管中,10000 r/min 离心 10 min,取上清,用质量分数 5% TCA 溶液定容至 5 mL,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,待检测用。

#### 1.3.2 溶液的配制

标准品溶液的配制:准确称量 5.0 mg  $\gamma$ -氨基丁酸标准品置 5 mL 容量瓶中,用纯净水定容至 5 mL,使用时稀释成不同浓度过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,待检测用。

TCA 溶液的配制:2.00g TCA,50 mL 水;衍生剂的配制:邻苯二甲醛(OPA)80.0 mg, $\beta$ -巯基乙醇 80  $\mu\text{L}$ ,甲醇 10 mL;硼酸缓冲液的配制:硼酸 2.47

g,水 100 mL,用 NaOH 调 pH 至 10.40。

#### 1.3.3 检测波长的选择

取 1 mg/mL 的标品溶液 400  $\mu\text{L}$ ,加入 1 mL 硼酸缓冲液(pH10.4)和 400  $\mu\text{L}$  衍生剂,振荡反应 5 min,以水为空白,用紫外可见分光光度计进行紫外扫描。

#### 1.3.4 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse-AAA 氨基酸专用分析柱(5  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm $\times$ 150 mm)、Agilent ZORBAX Eclipse-AAA 分析保护柱(5  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm $\times$ 12.5 mm);流动相:A:NaCOOH $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O(质量分数 1.6%),B:NaCOOH $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O(质量分数 1.6%);甲醇:乙腈=1:4.5:4.5,(甲醇与乙腈混合之初流动相温度波动较大,室温过夜静置后会逐渐恢复温度,又因温度变化会影响到 pH,从而影响检测结果,因此,流动相需提前 24 h 配制,使用前再用冰乙酸调整 pH);流速:1 mL/min;检测器:紫外检测器,检测波长: $\lambda=334$  nm;进样量 2  $\mu\text{L}$ ;使用安捷伦自动衍生进样程序:取硼酸缓冲液 10  $\mu\text{L}$ ,样品 2  $\mu\text{L}$ ,混合 3 次,用水洗针,抽取 OPA 衍生剂 2  $\mu\text{L}$ ,用水洗针,共 14  $\mu\text{L}$  衍生液混合 15 次,进样。

#### 1.3.5 流动相梯度的选择

##### 1.3.5.1 等度洗脱

分别使用体积分数为 30%、体积分数为 20% 有机相泵比例等梯度洗脱,确定梯度洗脱程序的初始梯度。

##### 1.3.5.2 梯度洗脱

以 B 泵体积分数为 20% 流动相为初始梯度,设置 3 个中间梯度不同的梯度洗脱程序分别对样品和标品进样。梯度洗脱程序设置为:0 min,体积分数为 20% B 流动相;2 min,体积分数为 20% B 流动相;18 min,体积分数为 50% (梯度 1)、体积分数为 60% (梯度 2)、体积分数为 70% (梯度 3) B 流动相;19 min,体积分数为 20% B 流动相。

#### 1.3.6 柱温的选择

按照梯度 2 的梯度程序分别对样品和标品 GABA 进行洗脱,并设置 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 四个温度,流动相 pH 固定为 7.2。

#### 1.3.7 pH 的选择

按照梯度 2 的梯度程序,25 °C 柱温对样品和标品 GABA 进行洗脱,流动相 A 和流动相 B 的 pH 用冰乙酸分别调整至 7.20、7.15 和 7.10,充分平衡色谱柱之后进样检测。

#### 1.3.8 检测条件确定

色谱条件:柱温为 25 °C;流动相 pH 为 7.2;洗

脱方式为梯度洗脱：0~2 min，体积分数 20%B 泵；2~18 min，体积分数 20%~体积分数 60%B 泵；18~19 min，体积分数 60%~体积分数 20%B 泵；19~25 min，体积分数 20%B 泵。

其它色谱条件与 1.3.4 相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

使用紫外可见分光光度计对衍生后的标品进行全波长扫描，扫描结果见图 1<sup>[11]</sup>。

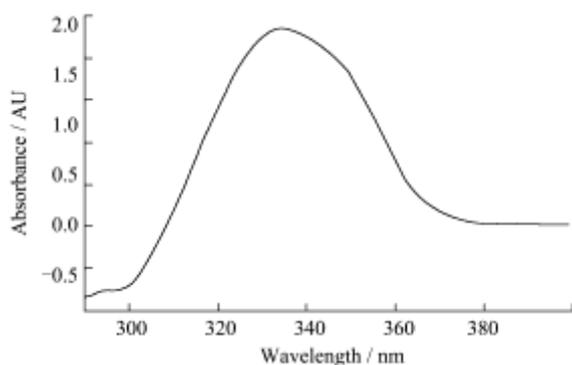


图 1 GABA 标准品的紫外光扫描图

Fig.1 UV-Light scan spectrum of GABA standard

由图 1 可以看出，GABA 标准品衍生之后的物质的最大吸收波长在 334 nm 处，因此，选择 334 nm 为 HPLC 检测时所使用的波长。

### 2.2 流动相梯度的选择

#### 2.2.1 等度洗脱

用含有体积分数为 30%、20% 有机相比比例的流动相对样品和标品进行洗脱，30% 有机相等度洗脱条件下，GABA 洗脱情况并不理想，GABA 的色谱峰与其他物质的出峰相连，不能很好分离，且峰宽较宽，分析其原因是由于该洗脱条件不适合样品中 GABA 的检测，使得样品中各组分不能很好地分离，造成峰形差，检测结果不理想。采用 20% 等度条件进行洗脱时，标准品和样品均未出峰。由以上结果可以看出，等梯度洗脱不适合于检测乳制品中的 GABA，洗脱效果差，不能达到分离的目的，有必要开发针对乳制品样品中 GABA 的梯度洗脱检测条件。体积分数为 20% 有机相比比例时样品中的 GABA 被洗脱的峰形已经达到不能分辨的程度，考虑将其作为梯度洗脱程序的初始梯度。

#### 2.2.2 梯度洗脱

参考文献，按照 1.3.5.2 设置的 3 种不同中间梯度体积分数为 50%（梯度 1）、体积分数为 60%（梯

度 2）、体积分数为 70%（梯度 3）洗脱样品和标准品，检测结果见图 2。

梯度 1、梯度 2、梯度 3 条件下，随着中间梯度有机相比比例的逐步提高，标准品的保留时间逐渐缩短，样品中 GABA 的保留时间也在逐渐缩短。对 3 种梯度条件下的样品色谱图进行比较，梯度 1 峰宽较宽，梯度 2 和梯度 3 峰形优于梯度 1，且出峰时间早，有利于缩短检测时间。在梯度 2 条件下，样品与标准品 GABA 附近组分出峰时间，峰前起始于基线，峰后回归基线，与其他物质的分离度达到要求。采用 HPLC 法，若峰尾还未回归基线即有下一种物质被洗脱出来，说明被检测组分与其他组分的分离度不够，会影响到样品中被检测组分的定量。与梯度 3 条件相比，在梯度 2 条件下，有机溶剂的使用量减少，有利于检测成本的降低。因此，选择中间梯度为体积分数 60% 的 B 泵比例为最终的梯度洗脱程序。

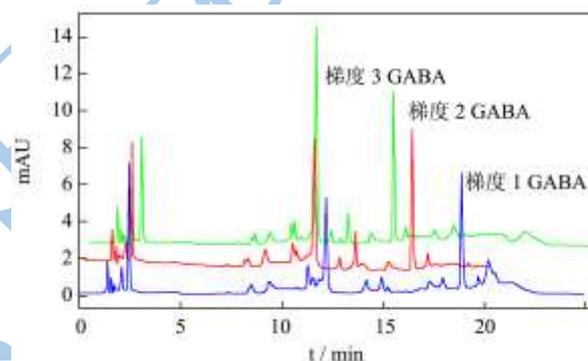


图 2 梯度 1、梯度 2、梯度 3 条件下分别洗脱样品的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC of gradient elute samples with different organic fractions

#### 2.2.3 柱温的选择

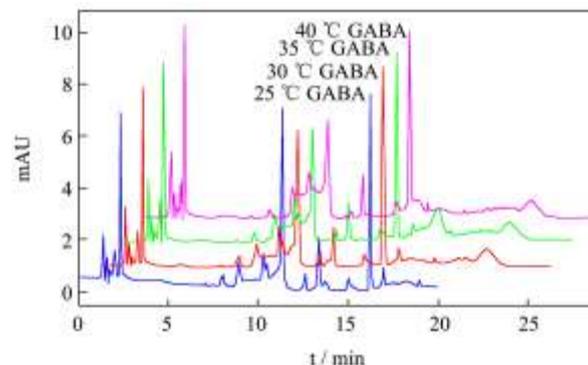


图 3 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 梯度洗脱样品的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC of gradient elute samples with different temperatures

分别设定柱温为 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 为

检测条件,按照梯度 2 设定梯度程序,检测样品及标准品中的 GABA,在相同条件下,GABA 标准品的保留时间随着温度的提高而缩短,样品中 GABA 的保留时间也相应缩短,样品中各种组分的出峰时间有所改变,柱温为 40 °C 时样品中 GABA 与其他组分一同被洗脱出来,达不到分离要求,柱温为 25 °C、30 °C 和 35 °C 条件下,样品中 GABA 组分的分离度都可以达到要求。根据文献报道,在 HPLC 方法中,柱温的提高可以使待测组分提前出峰,同时有可能改变样品中各组分的保留时间,对色谱图稍有影响,与本实验结果一致。由于 25 °C 实验条件容易满足,考虑到要在达到实验目标的条件下尽量节约环保,选择 25 °C 为最终检测柱温。

### 2.2.4 pH 的选择

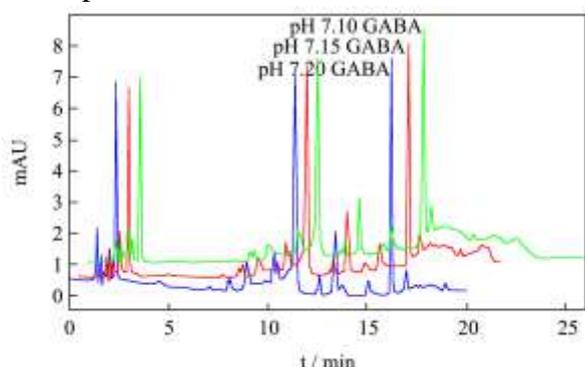


图 4 pH 7.20、pH 7.15、pH 7.10 梯度洗脱样品的 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC of gradient elute samples with different pH

HPLC 法检测时可以通过添加缓冲盐改变离子强度或降低流动相 pH 的方法进行峰形的优化<sup>[12]</sup>;在检测氨基酸及其衍生物时,流动相的 pH 对于样品中待测组分的检测非常重要。分别将流动相 A 和流动相 B 的 pH 用冰醋酸调整至 7.20、7.15 和 7.10,检测样品和标准品中的 GABA,由图 4 可知,随着流动相 pH 的降低,不仅 GABA 标准品的保留时间逐

表 1 日内精密性实验 (n=10)

Table 1 Intra-day accuracy (n=10)

测定浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )										日内精密度/%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RSD/%
9.28	9.39	9.39	9.26	9.39	9.12	9.04	8.40	9.41	9.41	0.31

采用在已知 GABA 浓度的样品中分别加入质量浓度为 0.5、5、50  $\mu\text{g/mL}$  GABA 标准品的方法,进行加标回收率和日间精密性实验,每个浓度水平连续 6d 重复进行操作,将得出的数据进行处理,其结果见表 2。

### 2.5 方法适用性

渐延长,而且样品中 GABA 组分与样品中其他组分的分离度也逐渐降低,其他组分的出峰时间逐渐提前,导致与 GABA 的出峰混在一起,无法达到定量的分离度。只有在 pH 为 7.20 时,样品中的 GABA 与其他组分的分离度可以达到要求,因此,选择最终检测 pH 为 7.20。

### 2.3 标准曲线的绘制及检出限

将 500  $\mu\text{g/mL}$  的 GABA 标准品母液,逐级稀释配制成质量浓度为 0.0010、0.0025、0.0050、0.010、0.1、1、5、10、100、250  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液系列。标准品色谱图见图 5。以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程  $y=5.9101x+2.553$ ,线性范围是质量浓度 0.005~500  $\mu\text{g/mL}$ ,相关系数良好  $R^2=1$ 。该方法的检出限 LOD 为质量浓度 ( $S/N=3$ ) 0.005  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限 LOQ ( $S/N=10$ ) 为质量浓度 0.02  $\mu\text{g/mL}$ 。

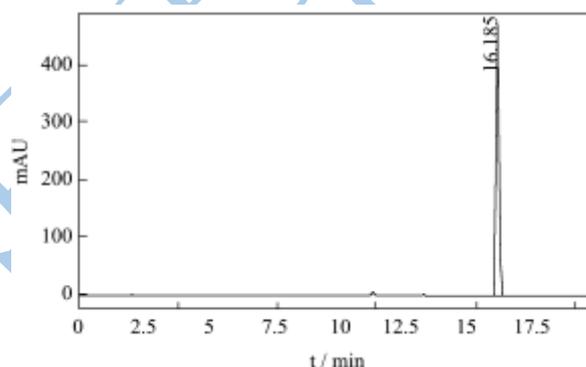


图 5 GABA 标准品的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC of GABA standard

### 2.4 精密度和准确度

重复测定已知浓度的标准溶液 10 次,将其进行计算得到相对标准偏差 (RSD)。见表 1。

该方法适用于氨基酸和蛋白质含量较为复杂的发酵乳制品中 GABA 的检测,对于其它成分较为单一的样品同样适用。为验证这一方法,使用该方法检测了 GABA 功能性食品样品、红曲米样品、乳酸菌发酵液样品,检测结果见图 5、图 6、图 7。

### 3 结论

表2 加标回收率和日间精密度 (n=6)

Table 2 Recovery rate and inter-day accuracy

添加浓度 /( $\mu\text{g/mL}$ )	回收值 /( $\mu\text{g/mL}$ )	回收平均值 /( $\mu\text{g/mL}$ )	回收 率/%	平均回 收率/%	日间精密 度 RSD/%
0.5	0.55		111	101.83	0.054
	0.50		101		
	0.51	0.51	102		
	0.58		116		
	0.43		87		
	0.47		94		
5	5.20		104	116	0.37
	5.66		113		
	5.90	5.80	118		
	6.34		127		
	5.91		118		
5.78		116			
50	39.24		78	99.67	5.43
	51.41		103		
	53.23	49.81	106		
	49.82		100		
	54.31		109		
50.83		102			

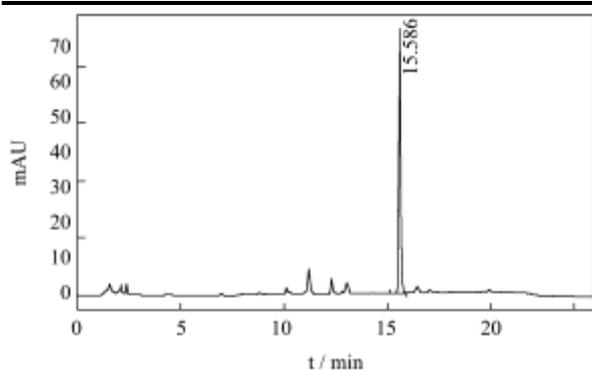


图5 HPLC法检测功能性食品中的GABA色谱图

Fig.5 Analysis of GABA in functional foods by HPLC

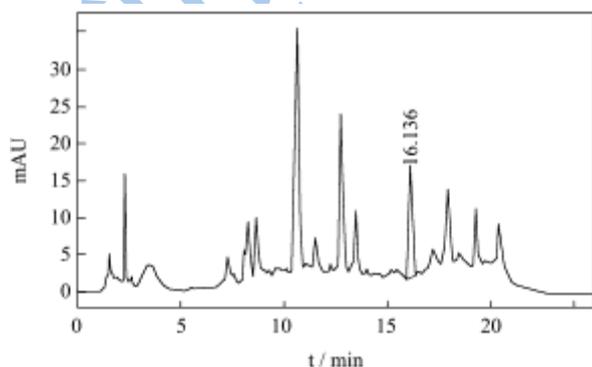


图6 HPLC法检测红曲米中的GABA色谱图

Fig.6 Analysis of GABA in red rice by HPLC

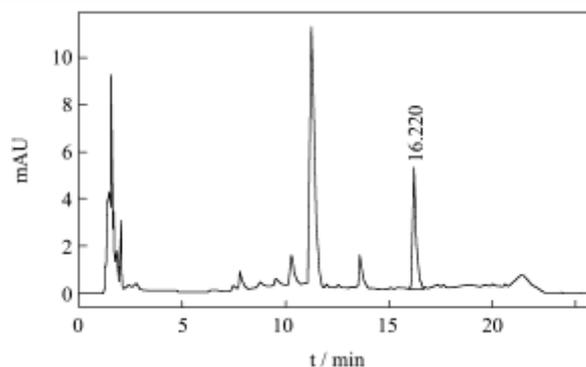


图7 HPLC法检测乳酸菌发酵液中的GABA色谱图

Fig.7 Analysis of GABA in fermentation broth of *Lactobacillus* by HPLC

采用高效液相色谱法对乳制品中GABA的含量进行了检测条件的优化。通过优化流动相梯度比例与pH、柱温等,确定了最佳检测条件,并对该方法检测功能性食品、红曲米、乳酸菌发酵液中GABA的适用性进行了验证,在保证分离度、准确度的前提下,实现了快速、环保、经济地检测样品中GABA含量的目的,对GABA的检测和功能性乳制品的研究具有一定意义。

参考文献

[1] 宋伟, 马霞, 张柏林.  $\gamma$ -氨基丁酸的生理功效及其在乳品中的强化途径[J]. 乳业科学与技术, 2008, 6: 297-302  
SONG Wei, MA Xia, ZHANG Bo-lin. Physiological Benefits and Fortifications of  $\gamma$ -Aminobutyric Acide in Dairy Products [J]. Dairy Science and Technology, 2008, 6: 297-302

[2] E É Kolesnikova. Role of glutamate and GABA in mechanisms underlying respiratory control [J]. Neurophysiology, 2011, 42(4): 394-304

[3] 顾振新, 蒋振晖. 食品原料中  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集技术[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 65-69  
GU Zhen-xin, JIANG Zhen-hui. Formation Mechanism and Accumulation Technique of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid of Food Raw Materials [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(10): 65-69

[4] CHEN Chun-xu, CHEN Fu-sheng. Study on the conditions to brew rice vinegar with high content of  $\gamma$ -aminobutyric acid by response surface methodology [J]. Food and Bioproducts Processing, 2009, 87: 334-340

[5] 刘婷婷, 杨套伟, 张术聪, 等. 高效转化 L-谷氨酸为  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的筛选、鉴定及初步优化[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(5): 742-747  
LIU Ting-ting, YANG Tao-wei, ZHANG Shu-cong, et al.

- Screening, Identification and Primary Optimizing of a Strain Producing  $\gamma$ -aminobutyric Acid from L-Glutamic Acid [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(5): 742-747
- [6] LI Hai-xing, QIU Ting, HUANG Gui-dong, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Lactobacillus Brevis* NCL912 using fed-batch fermentation [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 85(9):1-7
- [7] KOOK Moo-chang, SEO Myung-ji, CHEIGH Chan-ick, et al. Enhanced production of  $\gamma$ -aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4) :763-766
- [8] 王婧,王昌禄,陈勉华,等.红曲霉 M1 发酵糙米代谢产物抗 S180 细胞增殖效应的初步研究[J].*食品科学技术学报*,2013,31(2):31-36
- WANG Jing, WANG Chang-lu, CHEN Mian-hua, et al. Primary Study on Metabolites of *Monascus* M1 Fermented Brown Rice and Antiproliferation Effect to S180 Ascitic Tumor Cell [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 31(2):31-36
- [9] 黄亚辉,曾贞,郑红发,等.GABA 茶中  $\gamma$ -氨基丁酸的 TLC 测定及提纯研究[J].*氨基酸和生物资源*,2008,30(3): 11-15
- HUANG Ya-hui, ZENG Zhen, ZHENG Hong-fa, et al. Studies on the TLC and Extraction and Purification of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid of GABA Tea [J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30(3): 11-15
- [10] SU Yuan-chi, WANG Jyh-jye, LIN Tzu-tsen. Production of the secondary metabolites  $\gamma$ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(1): 41-46
- [11] 林亲录,王婧,陈海军. $\gamma$ -氨基丁酸的研究进展[J].*现代食品科技*,2008,24(5):496-500
- LIN Qin-lu, WANG Jing, CHEN Hai-jun. Research Progress of  $\gamma$ -Amino Butyric Acid [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(5): 496-500
- [12] ZHAO Ming, MA Yan, DAI Lei-li, et al. A high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of 21 free amino acids in tea [J]. *Food Analytical Methods*, 2013, 6: 69-75