

马玉玲,牛丽影,李大婧,等.甜玉米中游离糖及游离氨基酸的HPLC测定[J].江苏农业科学,2016,44(3):300-302.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.086

甜玉米中游离糖及游离氨基酸的HPLC测定

马玉玲¹,牛丽影²,李大婧²,刘春泉²,陈计峦¹

(1.新疆石河子大学食品学院,新疆石河子 823000;2.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:采用高效液相色谱法(HPLC)对乳熟期甜玉米晶甜5号中的游离糖、氨基酸进行测定,检测到4种游离糖、18种游离氨基酸。游离糖为果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖,含量分别为18.54、28.36、56.13、0.09 mg/g。游离氨基酸中,甜味氨基酸丙氨酸的含量(9.70 mg/g)最高,其次为鲜味氨基酸谷氨酸(3.19 mg/g)、天冬酰胺(2.62 mg/g),功能性氨基酸 γ -氨基丁酸的含量为0.18 mg/g。本研究结果将为甜玉米的风味及营养评价提供依据。

关键词:甜玉米;游离糖;游离氨基酸;测定

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0300-03

甜玉米因其味甜、口感鲜嫩、营养丰富而深受消费者喜爱,被称为果蔬玉米^[1]。游离糖、游离氨基酸是果蔬中重要的呈味成分和风味前体物^[2],也是贮藏加工过程中易损失变化的成分。目前,我国对玉米中糖的研究大多关于还原糖或总糖量计^[3];对氨基酸的测定多为水解氨基酸,即总氨基酸或蛋白氨基酸^[4],尚无游离氨基酸的报道。

本研究以超甜玉米晶甜5号^[5]为材料,采用高效液相色谱法(HPLC)定性定量测定玉米籽粒中游离糖、游离氨基酸的含量,为鲜食玉米的风味及营养评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

晶甜5号甜玉米采自江苏省南京市六合区农业科学院种植基地,于吐丝后22 d采摘。采收当日手工去苞皮,分离籽粒,混合后于液氮中速冻,置于-20℃冰箱中冻藏待测。

1.2 试剂

氨基酸混合标样、3-巯基丙酸、邻苯二甲醛(OPA)购自

美国Sigma公司。考马斯亮蓝-G250、氯仿、甲醇、硼酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、无水乙醇、磷酸均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。色谱级乙腈、甲醇购自美国天地公司。

1.3 仪器与设备

HPLC1200型高效液相色谱仪(美国Agilent科技有限公司),主要包括在线真空脱气机、四元梯度洗脱泵、柱温箱、二级管阵列检测器(diode array detector, DAD)、示差折光检测器(refractive index detector, RID)。RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(上海东玺制冷仪器设备有限公司),B-220型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂)等。

1.4 试验方法

1.4.1 可溶性糖的测定 参照Giannoccaro等人的方法^[6]进行可溶性糖的测定。取2.0 g冷冻玉米粒,加入20 mL 80%的乙醇并研磨成匀浆,于10 000 g(4℃)离心15 min,用10 mL 80%的乙醇提取2次滤渣,合并溶液,于60℃真空条件下旋转蒸发浓缩至低于2 mL左右,补蒸馏水至6 mL,混匀后于10 000 g(4℃)离心10 min,取上清液1 mL并加入1 mL乙腈,过0.45 μ m的滤膜,供HPLC进样分析。HPLC分析色谱柱为Carbohydrate色谱柱(150.0 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),示差(RID)检测器,流动相为乙腈-水(体积比75:25)、流速1.0 mL/min、检测器温度(30.0 \pm 0.8)℃、柱温(30.0 \pm 0.8)℃、运行时间10 min,进样量20 μ L。通过与标准样品保

收稿日期:2015-04-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301533)。

作者简介:马玉玲(1987—),女,硕士研究生,主要从事食品加工与食品安全研究。E-mail:mayuling5213@163.com。

通信作者:牛丽影,副研究员,主要从事果蔬加工中品质变化研究。

E-mail:liyong_niu@hotmail.com。

[6]范树国,赵朝英,邱璐,等.不同提取方法对葛根总黄酮得率的影响[J].江苏农业科学,2012,40(1):233-235.

[7]Cherdshewasart W, Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers[J]. Phytomedicine, 2008, 15(1/2): 38-43.

[8]丁鼎,颜继忠.大豆异黄酮纯化研究现状[J].化工时刊,2011(4):35-38.

[9]张蕊,姜义宝,杨玉荣,等.大豆异黄酮的特性及其应用研究进展[J].动物营养学报,2011,23(11):1884-1890.

[10]崔九成,蒙跃龙,杨钧.大孔树脂分离葛根总黄酮研究[J].西北药学杂志,1999,14(4):154-155.

[11]米靖宇,宋纯清.大孔吸附树脂在中草药研究中的应用进展[J].中成药,2001,23(12):914-917.

[12]刘慧敏,杜守颖,陆洋,等.大孔树脂纯化葛根的使用次数和再生方法[J].天津中医药,2014(3):177-180.

[13]Wang S Y, Gao J, Chen Y L, et al. Optimisation of the ethanol-based heat reflux extraction of isoflavones from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi root[J]. Advanced Materials Research, 2014, 955: 180-186.

[14]杨红红,符悦冠,肖烽,等.中药茜草根乙酸乙酯萃取物的分离及抗氧化活性研究[J].武汉工程大学学报,2010,32(12):1-5.

[15]王利亚,万惠杰,陈连喜,等.茯苓乙醚萃取物化学成分研究[J].中国中药杂志,1993,18(10):613-614,639.

留时间的比对、外标法分别进行定性定量。

1.4.2 游离氨基酸的测定 采用 OPA 衍生法^[7] 进行游离氨基酸的测定。取 2.0 g 冷冻玉米粒,加入氯仿-甲醇(15:35)溶液 10 mL,在液氮条件下研磨成匀浆,用 8 mL 水提取游离氨基酸,提取 3 次后合并水层,在冰上静置 30 min 后取上层清液 10 μ L,加入 50 μ L(0.4 mol/L、pH 值 10.2)硼酸缓冲液,并加入 10 μ L OPA 衍生,混匀后静置 30 s,加入 640 μ L 蒸馏水并混匀,过 0.45 μ m 有机微孔滤膜,进样量为 20 μ L。HPLC 色谱检测条件如下,色谱柱为 ZORBAX Eclipse-AAA 色谱柱(150.0 mm \times 4.6 mm,3.5 μ m),检测器为 DAD;流动相 A 为 0.040 mol/L、pH 值 7.8 的 NaH₂PO₄ 溶液,流动相 B 为乙腈-甲醇-水(体积比 45:45:10);流速为 2 mL/min;洗脱梯度为 0% B(0 min)、0% B(1.9 min)、57% B(18.1 min)、100% B(18.6 min)、100% B(22.3 min)、0% B(23.2 min)、0% B(26.0 min,保持至 26.0 min);柱温为(40.0 \pm 0.8) $^{\circ}$ C;UV 灯波长为(338 \pm 10) nm,参比波长为(390 \pm 20) nm;峰宽 $>$ 0.03 min(0.5 s);狭缝为 4 nm;进样量为 20 μ L。

1.5 统计与分析

采用 Excel 2003、OriginPro 8.6、SAS 软件对试验数据进行整理、作图、组间差异的 Duncan 氏多重比较,每个样品重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 游离糖

晶甜 5 号超甜玉米中共检出果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖 4 种游离糖(图 1)。蔗糖含量最高,葡萄糖、果糖次之,麦芽糖含量最少,蔗糖含量分别是果糖、葡萄糖含量的 3.03、1.98 倍(表 1)。本结果与国外学者对超甜玉米中糖含量的测定结果相似,均以蔗糖含量最高,果糖与葡萄糖含量接近,但因品种和测定方法的不同存在一定差异。Jubilee 品种中果糖与葡萄糖的比值为 0.85,蔗糖:果糖、蔗糖:葡萄糖则分别为 6.89、4.78^[8]。Bunker Hill 品种中果糖与葡萄糖的比值为 0.88,蔗糖:果糖、蔗糖:葡萄糖则分别为 11.47、10.14^[9]。目前,关于我国鲜食玉米中游离糖组成的研究较少。赵福成等对扬甜 2 号、超甜 135 玉米籽粒发育的糖分积累变化进行研究,检测到甘露醇和山梨醇^[10],而本研究并未检出,可能与检测方法的不同有关。糯玉米(垦糯 1 号)中糖的组成与甜玉米差别很大,果糖、葡萄糖的含量远高于蔗糖^[11]。

2.2 游离氨基酸

目前对玉米中氨基酸的研究,多采用盐酸水解法测定干基中蛋白氨基酸或氨基酸的总量。白宝璋测定的几个甜玉米品种中,必需氨基酸约占总氨基酸的 50%,且含量最高的为谷氨酸^[4]。水解氨基酸常用于蛋白的营养评价^[12],游离氨基酸则更多作为滋味成分^[13-14],是果蔬产品的重要特征指标。

由图 2、表 2 可知,本研究检测的 19 种游离氨基酸中,晶甜 5 号甜玉米未测定到半胱氨酸。其中,亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、蛋氨酸、组氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸 7 种必需氨基酸共占总氨基酸的 13.88%。本研究中检测到的 18 种游离氨基酸中,含量最高的为丙氨酸(9.70 mg/g),其次为谷氨酸(3.19 mg/g)、天冬酰胺(2.62 mg/g)。据报道,天冬氨酸、谷

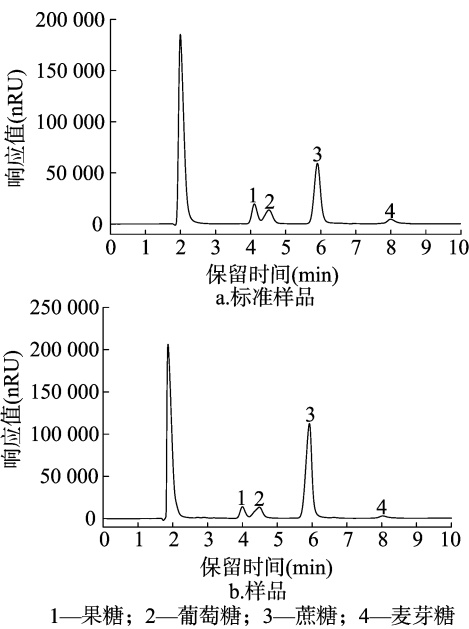


图1 游离糖的 HPLC 色谱

表 1 晶甜 5 号甜玉米中游离糖的组成与含量

游离糖类别	含量 (mg/g)	糖比	比值
果糖	18.54 \pm 0.71c	蔗糖/果糖	3.03
葡萄糖	28.36 \pm 0.19b	蔗糖/葡萄糖	1.98
蔗糖	56.13 \pm 0.47a	果糖/葡萄糖	0.65
麦芽糖	0.09 \pm 0.01d		
总含量	103.11 \pm 0.43e		

注:数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺为鲜味氨基酸;甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸为甜味氨基酸;亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、组氨酸、蛋(甲硫)氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸为苦味氨基酸;赖氨酸、酪氨酸对口味贡献很低^[13]。以各种呈味氨基酸的总量计算,晶甜 5 号甜玉米中甜味氨基酸含量最高,占氨基酸总量的 54.91%;其次为鲜味氨基酸,占氨基酸总量的 24.54%;苦味氨基酸在总氨基酸中的含量相对较低,仅为 13.90%。蔬菜的呈味氨基酸研究中,以蘑菇和番茄的研究最多。Li 等对 7 个品种的蘑菇进行测定,其游离氨基酸总量在 4.09 ~ 22.73 mg/g,必需氨基酸的含量在 19.16% ~ 35.58%,含量最高的为谷氨酸(0.67 ~ 3.97 mg/g)或丙氨酸(0.96 ~ 3.46 mg/g)^[13]。在番茄中,随着番茄成熟度和鲜味强度的增加,谷氨酸、谷氨酰胺含量呈明显上升趋势,从绿熟期至红熟期至完全成熟,其含量分别为 3.85 ~ 41.10、33.50 ~ 80.23 mg/100 g 鲜质量^[14]。晶甜 5 号甜玉米中,甜味氨基酸和鲜味氨基酸在总氨基酸中的比例最高,并具有较高的含量,由此推测游离氨基酸对晶甜 5 号甜玉米的口味具有重要作用。

另外, γ -氨基丁酸也是值得关注的氨基酸之一。GABA 作为一种非蛋白氨基酸,近年来因其生理功能而受到关注。据报道,植物组织中 GABA 的含量通常在 0.3 ~ 32.5 μ mol/g,即 0.03 ~ 3.36 mg/g,在通过发芽富集的京甜紫花糯玉米中可达到 0.65 mg/g^[15],而晶甜 5 号甜玉米中 GABA 的含量为 0.18 mg/g。

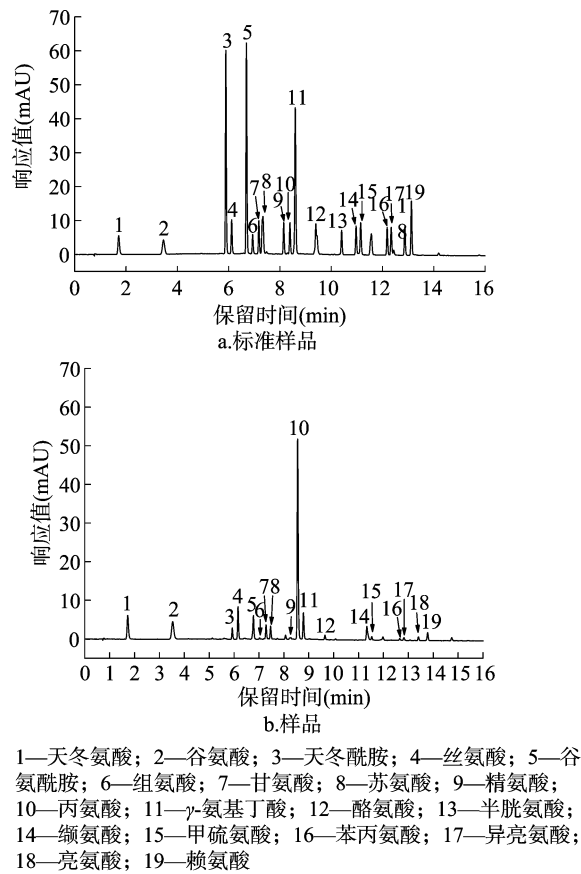


图2 游离氨基酸的 HPLC 色谱

表 2 晶甜 5 号甜玉米中游离氨基酸的种类与含量

编号	氨基酸	含量 (mg/g)	口味/其他特性
1	天冬氨酸 Asp	2.62 ± 0.07d	鲜味
2	谷氨酸 Glu	3.19 ± 0.15c	鲜味
3	天门冬酰胺 Asn	0.11 ± 0.01h	鲜味
4	丝氨酸 Ser	1.79 ± 0.07e	甜味
5	谷氨酰胺 Gln	0.31 ± 0.01h	鲜味
6	组氨酸 His	0.33 ± 0.03h	苦味
7	甘氨酸 Gly	0.61 ± 0.02gh	甜味
8	苏氨酸 * Thr	0.90 ± 0.03gh	甜味
9	精氨酸 Arg	0.34 ± 0.00h	苦味
10	丙氨酸 Ala	9.70 ± 0.32b	甜味
11	γ-氨基丁酸 GABA	0.18 ± 0.01h	功能性氨基酸
12	酪氨酸 Tyr	0.57 ± 0.02gh	无味
13	半胱氨酸 Cys	—	其他
14	缬氨酸 * Val	1.17 ± 0.01f	苦味
15	蛋氨酸 * Met	0.44 ± 0.02gh	苦味
16	苯丙氨酸 * Phe	0.31 ± 0.01h	苦味
17	异亮氨酸 * Ile	0.35 ± 0.02h	苦味
18	亮氨酸 * Leu	0.37 ± 0.02h	苦味
19	赖氨酸 * Lys	0.44 ± 0.02h	无味
总含量		23.70 ± 0.82a	

注：“*”表示必需氨基酸，“—”表示未检出。

3 结论

晶甜 5 号甜玉米中的游离糖主要有果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖,其中蔗糖含量最高,葡萄糖、果糖次之,麦芽糖含量最低。检测到 18 种游离氨基酸中含量最高的为甜味氨基酸丙氨酸,其次为鲜味氨基酸谷氨酸、天冬酰胺,且甜味氨基酸甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸之和为氨基酸总含量的 54.9%,鲜味氨基酸天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺之和为氨基酸总含量的 24.5%;另外检测到较高含量的 GABA。

参考文献:

[1] 赵久然,滕海涛,张丽萍,等. 国内外甜玉米产业现状及发展前景[J]. 农民科技培训,2004,专刊(9):6-7.

[2] Ninomiya K. Umami: a universal taste [J]. Food Reviews International,2002,18(1):23-38.

[3] 刘 萍,陆卫平,王风格,等. 超甜玉米品质差异及适宜采收指标的研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2007,28(1):72-76.

[4] 白宝璋. 甜玉米籽粒氨基酸含量变化的研究[J]. 辽宁农业科学,1990,31(2):13-16.

[5] 熊元忠,陈沁滨,戴惠学,等. 超甜鲜食水果玉米晶甜 5 号的特性与栽培要点[J]. 江苏农业科学,2011,40(1):118-119.

[6] Giannoccaro E, Wang Y J, Chen P. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean[J]. Journal of Food Science, 2006,71(1):C59-C64.

[7] Kim J S, Lee Y S. Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction [J]. Food Chemistry,2008,108(2):582-592.

[8] Reyes F R, Varseveld G W, Kuhn M C. Sugar composition and flavor quality of high sugar (shrunk) and normal sweet corn[J]. Journal of Food Science,1982,47(3):753-755.

[9] Wong A D, Juvik J A, Breeden D C, et al. Shrunk2 sweet corn yield and the chemical components of quality[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,1994,119(4):747-755.

[10] 赵福成,景立权,陆大雷,等. 超甜玉米籽粒糖分积累和蔗糖代谢酶活性动态变化[J]. 核农学报,2014,28(12):2230-2237.

[11] 修 琳,刘景圣,蔡 丹,等. 鲜玉米中可溶性糖含量的测定[J]. 食品科学,2011,32(4):174-176.

[12] 李予霞,靳万贵,王少珩,等. 六种甜玉米的氨基酸营养分析[J]. 石河子农学院学报,1996,14(增刊1):5-8.

[13] Li W, Gu Z, Yang Y, et al. Non-volatile taste components of several cultivated mushrooms[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 427-431.

[14] Sorrequieta A, Ferraro G, Boggio S B, et al. Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate [J]. Amino Acids,2010,38(5):1523-1532.

[15] 尹永祺,吴进贤,刘春泉,等. 低氧胁迫下发芽玉米淀粉特性及高 γ-氨基丁酸玉米饮料开发[J]. 食品科学,2014,35(6):234-239.