

# 以 LC/MS/MS 分析 $\gamma$ -胺基丁酸 (GABA) 之方法確效及發芽糙米之含量分析

李芷欣 李詩穎 簡亦翎 駱錫能\*

國立宜蘭大學食品科學系

## 摘要

$\gamma$ -胺基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 是一種非蛋白質胺基酸，常用之檢驗方法是以 HPLC/螢光偵測器執行，其缺點為樣品需進行衍生，基質干擾易影響其分析專一性，因此，本實驗擬建立高效液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 分析 GABA 的方法，並進行方法確效。實驗以米糠粉為基質，於超音波震盪萃取後，以 LC/MS/MS 進行分析。發現 GABA 的滯留時間為 2.01 分鐘，與  $\alpha$ -aminobutyric acid 滯留時間重疊，經確立 MS/MS 之偵測條件，以  $m/z$  104 >  $m/z$  69 為其定性離子對， $m/z$  104 >  $m/z$  87 為定量離子對，可以明確有效地加以分離和定量。標準曲線的線性方程式為  $y=1910.8x+6005.9$ ， $R^2=0.9993$ ，線性範圍在 25–200 ppb。準確度評估以添加試驗進行，於米糠粉中添加 97 ppb 及 388 ppb 之 GABA 標準品，其回收率分別為 80.74% 及 93.81%。重複性之變異係數 (CV) 分別在 2.69% 和 4.15%。97 ppb 添加試驗中，三天的中間精密度之變異係數分別為 7.48%、8.93% 和 2.69%；388 ppb 添加試驗則為 0.45%、3.41% 和 4.15%。偵測極限 (LOD) 為 2.0 ppb，定量極限 (LOQ) 為 6.6 ppb，顯示所建立之 LC/MS/MS 分析方法可以穩定有效的分析糙米樣品中的 GABA 成分。以建立之方法分析七種糙米樣品的 GABA 含量，其值約在 4.78–15.67 mg/100g dry rice 之間，其中以台梗 2 號、9 號和 4 號為較高，而台中秈 10 號則最低。經發芽 0.3 cm–0.5 cm 後的糙米所含 GABA 含量有顯著的增加，台梗 2 號和台中秈 10 號的 GABA 含量分別增加至 31.44 mg/100g dry rice 和 30.52 mg/100g dry rice，增加約 2–6 倍。

**關鍵字：** $\gamma$ -胺基丁酸、糙米、發芽糙米、液相層析串聯質譜儀、方法確效

\*通訊作者。E-mail: snlou@niu.edu.tw

# Development and Validation of a Quantitative Method for $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) in Germinated Rice Using High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC/MS/MS)

Zhi-xin Li, Shi-ying Li, Yi-ling Jian, Shyi-Neng Lou\*

Department of Food Science, National Ilan University

## Abstract

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices. Determination of GABA by HPLC with fluorescence detector has been mainly used. However, the sample needs to be derivated with orthophthalaldehyde (OPA) and the specificity is affected by the matrix interference. Therefore, the purpose of this study was to establish a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC/MS/MS) method for analyzing GABA. The method validation will be also evaluated. The results indicated that the retention time of GABA was at 2.01 minutes, which overlapped with the  $\alpha$ -aminobutyric acid in the chromatogram. Thereafter, the effective separation and quantitation detection conditions by MS/MS, with  $m/z$  104 >  $m/z$  69 as the qualitative ion pair and  $m/z$  104 >  $m/z$  87 as quantitative ion pair, were established. The linear equation of the standard curve is  $y = 1910.8x + 6005.9$ ,  $R^2 = 0.9993$ , and the linear range is 25-200 ppb. Accuracy evaluation was conducted by standard addition method. When 97 ppb and 388 ppb of GABA standard were added to rice bran powder, the recoveries were 80.74% and 93.81%, respectively. For the repeatability, the coefficient of variation (CV) was at range of 2.69% to 4.15%. The coefficient of variation of 3 days intermediate precision were 7.48%, 8.93%, and 2.69% in the 97 ppb added group, while there were 0.45%, 3.41%, and 4.15% in the 388 ppb added group. The limit of detection (LOD) is 2.0 ppb and the limit of quantification (LOQ) is 6.6 ppb. Collectively, the established LC/MS/MS analysis method can determine the GABA content in brown rice effectively. Then, the GABA content of seven brown rice was determined. The contents were at range of 4.78-15.67 mg/100g dry rice, while Taigen brown rice No. 2, 9, and 4 had higher content, and Taichung Indica brown rice No. 10 had the lowest content. The GABA content of brown rice increased significantly after germinated in 0.3 cm-0.5 cm. The GABA contents of germinated Taigen brown rice No. 2 and Taichung Indica brown rice No. 10 increased to 31.44 mg/100g dry rice and 30.52 mg/100g dry rice, respectively, which was about 2-6 times of ungerminated

brown rice.

Keywords:  $\gamma$ -aminobutyric acid, brown rice, germinated brown rice, high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometer, method validation

\*Corresponding author. E-mail: snlou@niu.edu.tw

## 壹、前言

$\gamma$ -胺基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 為一種神經傳導抑制物質，具有安定神經的效果可幫助改善睡眠、憂鬱症等症狀 (Okada *et al.*, 2000)，同時對於高血壓的舒緩亦有功效 (Kajimoto *et al.*, 2004)，因此近年來對於富含 GABA 品的開發廣泛地被研究。然而，有關 GABA 的檢驗方法尚無標準一致的方法，由於 GABA 在紫外光及可見光檢出器中不具有吸收波長，因此目前常用管柱前 o-phthalaldehyde (OPA) 衍生後，再以 HPLC 逆相層析管柱分離，螢光檢出器加以偵測，但柱前衍生的缺點除了在於前處理複雜，並容易引入過多衍生副產物，干擾衍生產物的測定 (Iwaki *et al.*, 2007) 之外，與 GABA 分子結構類似之胺基酸異構物(例如  $\alpha$ -aminobutyric acid 及  $\beta$ -aminobutyric acid 等)於 HPLC 逆相層析分析時，可能會有波峰重疊分離效果不佳的問題，致使方法的專一性和準確性受影響。因此本研究擬建立以 LC/MS/MS 測定 GABA 含量的方法，並進行分析方法之確效，以為後續分析 GABA 含量確認有效之可行方法。此外，臺灣為稻米主要生產國之一，2016 年統計年種植面積 273,866 公頃，年產量高達 1,264,128 公噸，產出稻米品種繁多。而糙米的米糠層含有高活性的麩胺酸脫羧酶 (glutamate decarboxylase)，可以作用麩胺酸產生 GABA，且已知糙米經過發芽處理後，其 GABA 含量會大幅增加，因此，本實驗將利用所建立之確效 GABA 分析方法，分析了解台灣各種不同稻米品種之糙米，經發芽試驗後所含 GABA 含量的變化，從而篩檢出高 GABA 含量的稻米品種，進一步作為未來開發為健康食品之應用基礎。

## 貳、材料與方法

## 一、實驗材料

### (一) 米糠粉

米糠採購自宜蘭新南地區之田董米公司 (宜蘭, 台灣), 為混合多種稻米品種 (高雄 147、台南 11 號、台中秈 10 號) 之米糠, 收集後立即凍藏於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱備用, 實驗前進行磨粉過篩 (60 mesh), 以粉末進行試驗。

### (二) 糙米樣品

台梗 2 號、台梗 4 號、台梗 9 號、台梗 16 號、高雄 139 號、花蓮 215 號、台中秈 10 號購自於行政農業委員會農糧署。採購後, 置於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱備用。

## 二、藥品與器材

### (一) 化學藥品

乙腈 (Acetonitrile) (MS 級和 LC 級) 購自於 Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA, USA)。100% 甲酸 (Formic acid) 購自於美國 Sigma 公司 (St. Louis, Mo, USA)。

### (二) 胺基酸標準品

GABA、AABA ( $\alpha$ -aminobutyric acid)、麩胺酸購自於美國購自於美國 Sigma 公司 (St. Louis, Mo, USA), 天門冬胺酸購自於日本試藥工業。

### (三) 器材

1. 減壓濃縮機: (Buchi-WaterbathB-480, Sweden)。
2. 桌上型離心機: Z-300 (Hermle, Wehingen, Germany)。
3. 超音波震蕩機: 3510R-DTH (Branson, Banbury, CT, USA)。
4. 高效能液相層析儀: LC-10Atvp (Shimadzu, Kyoto, Japan)。
5. 電子天平: Praxum 224-1S (Sartorius, Goettingen, Germany)。
6. 串聯質譜儀: API 3200 (Applied Biosystem, MDS SCIEX, USA)。

## 三、米穀粉之製備

將米糠、糙米等樣品以粉碎機磨成粉末狀後進行凍乾, 並以 60 mesh (0.25mm/mesh) 篩網過篩, 放入玻璃瓶中, 放置於防潮箱中備用。

## 四、不同胚芽長度之發芽糙米製備

選取 30 g 完整糙米，以超純水沖洗後加 60 mL 超純水浸泡 4 小時，平鋪於 PE-9 培養皿，放置於 25°C 定溫培養箱，直至糙米胚芽生長至 0.1-0.5 cm；將各品種發芽米分為胚芽長 0.1-0.2 cm 及 0.3-0.5 cm，不同胚芽長度之樣品經凍乾後，以粉碎機磨成粉末並用篩網 (60 mesh) 過篩，裝罐，放置於防潮箱中備用。所得的米穀粉樣品進行 GABA 含量測定。

## 五、GABA 萃取與 LC/MS/MS 分析方法

### (一) GABA 萃取

稱取 1 g 米穀粉樣品於離心管中，加入 10 mL 超純水，以超音波震盪 10 分鐘後，於 4°C 離心 (10,000 x g, 10 分鐘)，取上清液置於圓底燒瓶中，將殘留物再重複萃取兩次，集合總計三次的上清液於圓底燒瓶中，於 40°C 下減壓濃縮至乾後，以二次蒸餾水復溶後定容至 10mL，以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾後，置入褐色樣品瓶中於 -20°C 凍藏，作為分析 GABA 之樣品溶液，分析時取適量樣品溶液，以超純水稀釋至適當濃度於檢量線範圍內，計算時再乘上稀釋倍數。

### (二) LC/MS/MS 移動相之配製

移動相 A：取 100% 乙腈溶液，以濾膜過濾，取濾液供做移動相溶液 A。

移動相 B：取 100% 甲酸溶液 1 mL，隨後加入 DI 水再定量至 1000 mL，配製成 0.1% 甲酸水溶液，以濾膜過濾，取濾液供做移動相溶液 B。

### (三) LC/MS/MS 分析方法

參考實驗室先前預備試驗初步建立之方法，採用高效能液相層析 (LC-10Atpv, Shimadzu, Kyoto, Japan)，串聯質譜儀 (API 3200, Applied Biosystem, MDS SCIEX, USA)。移動相為 (A) 乙腈 (B) 0.1% 甲酸水溶液，流速 0.35 mL/min；管柱為 ZIC-HILIC (2.1 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m, PEEK HPLC column (Merck))；質譜儀設定參數：以電噴灑游離源 (ESI) 在正離子模式下分析，以多反應監測 (MRM) 模式下監控，電噴霧源氣體的溫度和電壓分別為 500°C 和 5.5 千伏，碰撞室 (CAD) 的氣體設定為 3 磅，而幕氣氣體 (CUR) 設定在 20 磅，Entrance Potential (EP): 10, Collision Cell Exit Potential (CXP): 10, 去聚電勢 (DP): 17 和碰撞能量 (CE) 分別為 15 和 21，化合物在多反應監測 (MRM)

模式下監控，偵測離子對為： $m/z$  104 > 87 (定量離子對) 和  $m/z$  104 > 69 (定性離子對)，進行監測目標化合物。

移動相梯度表如下：

Time (min)	Mobile phase A(%)	Mobile phase B(%)
0	5	95
2.5	5	95
4	10	90
5.5	30	70
6.5	30	70
7	5	95
10	5	95

## 六、方法確效

### (一) 專一性

取類似樣品基質之空白樣品、米糠粉、糙米粉等樣品和標準品 (包括 GABA、 $\alpha$ -aminobutyric acid、天門冬胺酸及麩胺酸)，分別注入 LC/MS/MS 分析，觀察有否干擾 GABA 分析之情形。

### (二) 檢量線

取 GABA 標準品約 10 mg，精確稱定，以超純水溶解並定容至 100 mL，作為標準原液，冷凍儲存。臨用時，精確量取適量標準原液，以超純水稀釋至 25、50、100、150 和 200 ppb，供作標準溶液。注入 LC MS/MS 分析，計算相關係數、回歸方程式及線性範圍。

### (三) 精密度

於糙米基質中添加 10  $\mu$ L 及 40  $\mu$ L 的 GABA 標準原液，再依樣品前處理、分析步驟分析之 (此時樣品液中 GABA 濃度增加 97 ppb 及 388 ppb)。若樣品溶液 GABA 濃度高於線性範圍的最高濃度時，取適量樣品溶液，以超純水稀釋至適當濃度於檢量線內，計算時再乘上稀釋倍數。實驗進行 5 重複之檢測，作為重複性測試。另外進行中間精密度測試，以上述方法相同之測試，分三個不同日期進行評估。

#### (四) 準確度

於糙米基質中添加 10  $\mu\text{L}$  及 40  $\mu\text{L}$  的 GABA 標準原液，再依樣品前處理、分析步驟分析之（此時樣品液中 GABA 濃度增加 97 ppb 及 388 ppb）。若樣品溶液 GABA 濃度高於線性範圍的最高濃度時，取適量樣品溶液，以超純水稀釋至適當濃度於檢量線內，計算時再乘上稀釋倍數。實驗進行 5 重複之檢測，計算回收率（%）。

#### (五) 偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ)

含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析圖中待測物波峰之訊號/雜訊比 (signal-to-noise ratio, S/N ratio)  $\geq 10$ 。

$$\text{LOD} = \text{S/N ratio} \geq 3, \text{LOQ} = \text{S/N ratio} \geq 10$$

#### 七、統計分析

實驗均採三重複，所得之數據以平均值 (mean)  $\pm$  標準差 (standard deviation; S.D.) 表示，使用 SAS (Statistical Analysis System) 統計軟體對實驗數據進行統計分析與相關性分析，數據以單因數變異數分析 (One-way ANOVA) 比較各數據的差異，再以鄧肯式多變域分析法 (Duncan's multiple range method) 測定各組之間的差異顯著水準為  $p < 0.05$ 。

## 參、結果與討論

### 一、LC/MS/MS 分析 $\gamma$ -胺基丁酸之方法確效

#### (一) 專一性

為了研究建立 LC/MS/MS 分析方法之專一性，故將四種標準品： $\gamma$ -胺基丁酸 (GABA)、 $\alpha$ -胺基丁酸 (AABA)、天門冬胺酸及麩胺酸進行分析比對。結果如圖 1 所示，圖 1 (A) 中可見  $\gamma$ -胺基丁酸與  $\alpha$ -胺基丁酸、天門冬胺酸及麩胺酸於層析圖譜中其波峰具有重疊的現象，尤其是其異構物  $\alpha$ -胺基丁酸的滯留時間與 GABA 完全重疊，以一般常用之偵測器無法加以分離和定量。

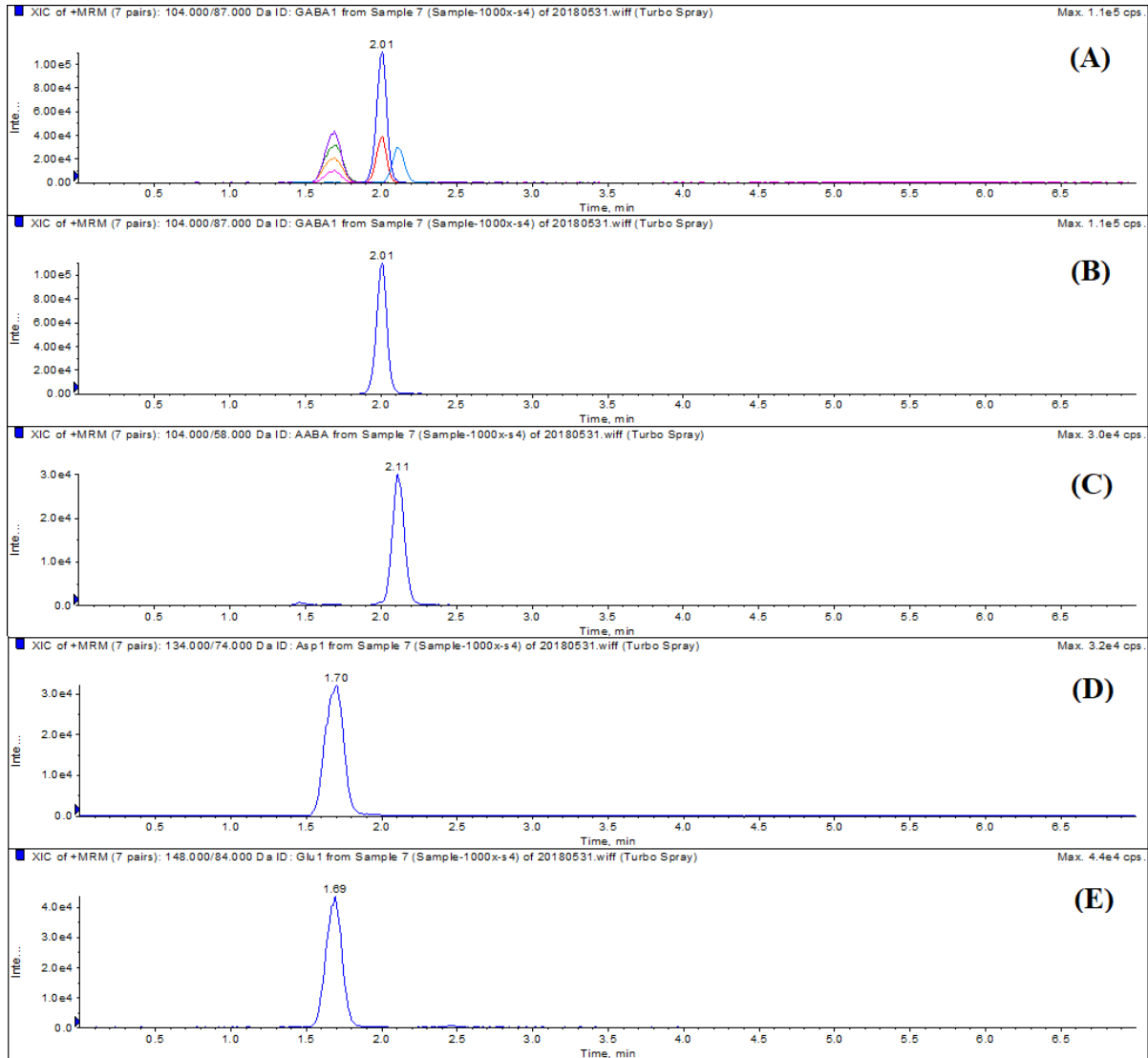


圖 1. LC/MS/MS 層析圖譜 (A) 混合標準品 (B)  $\gamma$ -胺基丁酸 (C)  $\alpha$ -胺基丁酸 (D) 天門冬胺酸 (E) 麩胺酸。

Fig. 1. LC/MS/MS Chromatograms of (A) mixture of standards, (B)  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), (C)  $\alpha$ -aminobutyric acid (AABA), (D) aspartic acid, (E) lutamate.

然而，利用本試驗所建立之 LC/MS/MS 分析方法， $\gamma$ -胺基丁酸滯留時間為 2.01 分鐘，於 MS/MS 選定定性離子對為  $m/z 104 > m/z 69$ ，定量離子對為  $m/z 104 > m/z 87$  時可將  $\gamma$ -胺基丁酸與  $\alpha$ -胺基丁酸、天門冬胺酸及麩胺酸等明確區分和定量（圖 2）；而  $\alpha$ -胺基丁酸（AABA）的滯留時間為 2.11，其定量離子對則為  $m/z 104 > m/z 58$ ，本方法亦可針對其含量加以定量（圖 2）。綜合以上，以定性離子對為  $m/z 104 > m/z 69$  及定量離子對為  $m/z 104 > m/z 87$ ，可有效定性和定量 GABA，不會受到其他物質的干擾，顯示本方法良好的專一性。



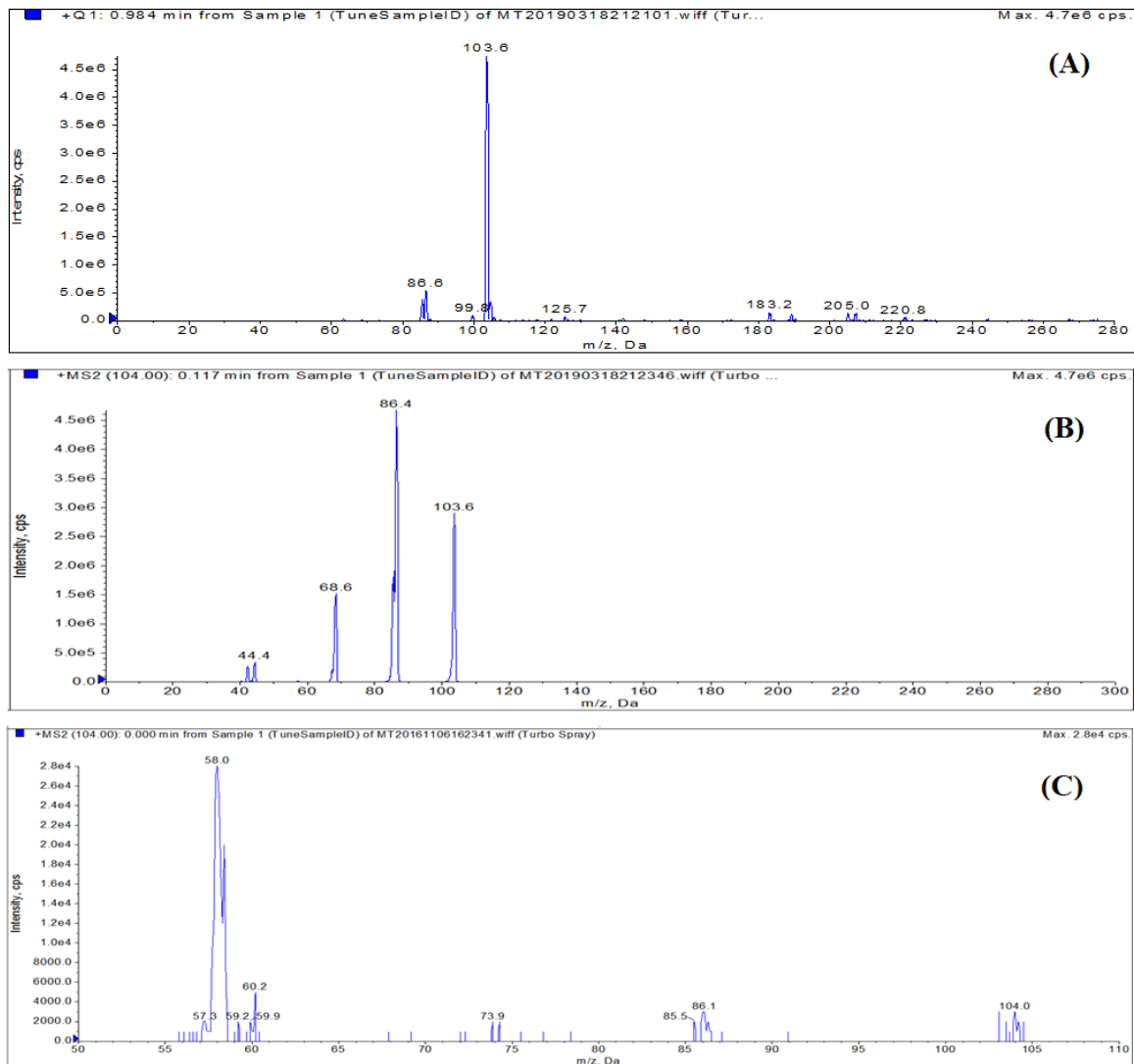


圖 2.  $\gamma$ -胺基丁酸標準品 (A)  $MS^1$ 、(B)  $MS^2$  和 (C)  $\alpha$ -胺基丁酸( $MS^2$ )之正離子質譜圖。  
 Fig. 2. Positive mode mass spectra of  $\gamma$ -aminobutyric acid (A)  $MS^1$ , (B)  $MS^2$  and (C)  $\alpha$ -aminobutyric acid.

## (二) 標準曲線

配製五種不同濃度之 GABA 標準溶液以所建立之 LC/MS/MS 分析方法進行分析，以評估標準曲線的線性關係，結果顯示如表 1，GABA 標準品之標準曲線方程式為  $y$  (Area) =  $1910.8 \times$  (Conc.) +  $6005.9$ ，其決定係數為  $R^2 = 0.9993$ ，顯示 GABA 標準品的濃度與對應之波峰面積有良好的正相關，其線性範圍則介於 25-200 ppb 之間，其相關回歸曲線圖列於圖 3。

表 1.  $\gamma$ -胺基丁酸之標準曲線的迴歸方程式、決定係數和線性範圍以及其最低偵測極限和最低定量極限

Table 1. Regression equation, coefficient of determination (R<sup>2</sup>) and linear range for standard curve of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as well as its limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)

Regression equation*	R <sup>2</sup>	Linear range (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
$y=1910.8x+6005.9$	0.9993	25-200	2.0	6.6

\*y: Area, x: Concentration

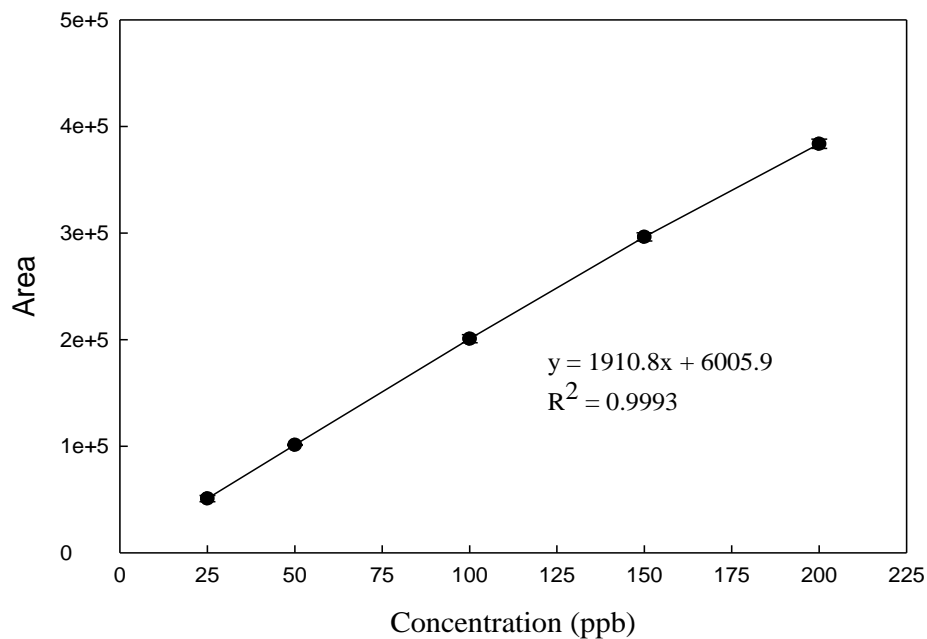


圖 3. 以 LC/MS/MS 分析  $\gamma$ -胺基丁酸之標準曲線。

Fig. 3. Standard curve of GABA analyzed by LC/MS/MS (linear range : 25-200 ppb).

### (三) 準確度

添加 97 ppb 及 388 ppb 兩種不同濃度的 GABA 標準品於糙米粉中進行準確度的測定，結果如表 2，顯示添加 97 ppb 及 388 ppb GABA 標準品所得的回收率分別為  $80.74 \pm 3.48\%$  及  $93.81 \pm 4.40\%$ ，而其 RSD 則分別為 4.31 和 4.69%，均小於 5%。根據衛福部食品化學檢驗方法之確效規範中，準確度計算回收率需在 75-120% 之間，顯示本方法的準確度在可接受之範圍。

## (四) 精密度

實驗分別添加 97 ppb 及 388 ppb GABA 標準品進行精密度評估測定 (表 3)，首先進行重複性評估試驗，添加 97 ppb GABA 標準品所得 5 重複結果的變異係數 (Ann. Neurol. CV%) 為 2.69%，而添加 388 ppb GABA 標準品重複性試驗所得結果的變異係數 (Ann. Neurol. CV%) 為 4.15%，兩者的變異係數均小於 5%，顯示方法具有良好的重複性。

表 2. 分析糙米基質中  $\gamma$ -胺基丁酸的回收率Table 2. Recovery for  $\gamma$ -aminobutyric acid determination of brown rice matrix

Spike (ppb)	Determined concentration (ppb)	Recovery (%)	Mean $\pm$ SD (%)	RSD (%)
97	80.44	82.93	80.74 $\pm$ 3.48	4.31
	77.73	80.19		
	82.01	84.55		
	73.12	75.38		
	78.25	80.67		
388	339.38	87.47	93.81 $\pm$ 4.40	4.69
	365.66	94.24		
	360.14	92.82		
	386.98	99.74		
	367.84	94.80		

進一步執行不同日中間精密度評估 (表 4)，分為第一、二和三天分別測試，添加 97 ppb GABA 標準品其中間精密度的變異係數 (CV%) 為 7.48%、8.93%、和 2.69%；而添加 388 ppb GABA 標準品其中間精密度的變異係數 (CV%) 則為 0.45%、3.41%和 4.15%，顯示均小於 10%的範圍，其分析方法的穩定性應可接受。依據衛福部食品化學檢驗方法之確效規範，重複性和中間精密度的容許範圍應在 15%和 18%，本分析方法則分別落於 5%和 10%之下，已符合官方單位之正式規範。

表 3. 分析糙米基質中  $\gamma$ -胺基丁酸的重複性Table 3. Repeatability for  $\gamma$ -aminobutyric acid determination of brown rice matrix

Spike (ppb)	Original concentration (ppb)	Determined concentration (ppb)	Mean $\pm$ SD (ppb)	CV (%)
97	47.1	127.54	125.41 $\pm$ 3.37	2.69
		124.83		
		129.11		
		120.22		
		125.35		
388	47.1	386.48	411.1 $\pm$ 17.08	4.15
		412.76		
		407.24		
		434.08		
		414.94		

表 4. 分析糙米基質中  $\gamma$ -胺基丁酸的中間精密度Table 4. Intermediate precision for  $\gamma$ -aminobutyric acid determination of brown rice matrix

Spike (ppb)	day	Determined concentration (ppb)					Mean $\pm$ SD (ppb)	CV (%)
97	1	90.72	77.31	66.18	86.44	77.61	79.65 $\pm$ 9.48	7.48
	2	73.11	76.34	88.58	73.47	58.24	73.95 $\pm$ 10.81	8.93
	3	80.44	77.73	82.01	73.12	78.25	78.31 $\pm$ 3.37	2.69
388	1	382.24	378.48	382.54	380.00	381.6	380.97 $\pm$ 1.70	0.45
	2	394.65	388.05	379.36	376.26	409.5	389.56 $\pm$ 13.29	3.41
	3	386.48	412.76	407.24	434.08	414.94	411.10 $\pm$ 17.08	4.15

## (五) 偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ)

所建立之分析方法經評估其偵測極限和定量極限結果，分別為偵測極限 (LOD) 2.0 ppb；而定量極限 (LOQ) 則為 6.6 ppb (表 1)。本方法之偵測極限遠低於一般食品中 GABA 含量的檢測範圍，其靈敏度極佳，未來如有微量問題須釐清時，本方法亦可進行分析鑑定。

綜合以上，本試驗所建立之 LC/MS/MS 分析糙米中所含 GABA 含量的方法以符合衛福部規範之食品化學檢驗方法的確效標準，是一個具有良好專一性、準確度、精密度

和靈敏偵測極限以及定量極限的方法，未來可直接應用於食品中 GABA 含量的測定。實驗後續以建立之方法進行糙米和發芽糙米中 GABA 含量的分析。

## 二、不同品種稻米之發芽後 GABA 含量的變化

利用所建立之確效 GABA 分析方法，分析了解台灣七種不同稻米品種之糙米，經發芽試驗後所含 GABA 含量的變化，從而篩檢出高 GABA 含量的稻米品種，進一步作為未來開發為健康食品之應用基礎。

### (一) 糙米初始 GABA 含量

以七種不同品種的糙米進行 GABA 含量的分析，結果顯示如表 5，台梗 2 號的 GABA 含量為 15.67 mg/100g dry rice，是七種糙米中 GABA 含量最高者；其次為台梗 9 號，其 GABA 含量為 13.18 mg/100g dry rice；接著為台梗 4 號，其 GABA 含量亦有 12.33 mg/100g dry rice；然而高雄 139 號、花蓮 215 號及台梗 16 號的 GABA 含量皆低於 10 mg/100g dry rice 以下，分別為 9.29、7.72 及 7.12 mg/100g dry rice。所有糙米中以台中秈 10 號的 GABA 含量為最低，僅達 4.78 mg/100g dry rice，約僅為台梗 2 號的三分之一含量。姚等人 2008 年報告指出糙米的 GABA 含量約為 56.84 mg/100g，且以台中秈 10 號、台秈 2 號和高雄 141 號的含量為較高。然而本實驗發現糙米的 GABA 含量僅在 4.78-15.67 mg/100g dry rice 之間，且以台中秈 10 號為最低。推測其原因可能為不同季節樣品差異所造成，或是本分析方法可完全排除其他干擾物的分析，因此可能或獲取較為低的 GABA 含量，其切確的原因尚有待進一步地釐清。

### (二) 發芽糙米之 GABA 含量

選取三種初始 GABA 含量較高的糙米以及含量最低者進行發芽試驗，樣品分別為台梗 2 號、台梗 4 號、台梗 9 號及台中秈 10 號，並以發芽長度分為 0.1-0.2 cm 及 0.3-0.5 cm 等兩範圍作為評估發芽的效應。結果如表 6 所示，於發芽長度 0.1-0.2 cm 時，台梗 2 號及台梗 9 號之 GABA 含量相比於發芽前的含量有明顯下降的現象，約下降了 5 倍，在過去的研究報告並未提及有發芽後含量下降之情形，其原因尚待進一步研究。然而台梗 4 號之 GABA 含量比未發芽前則約提升了 1 倍；而台中秈 10 號之 GABA 含量則比未發芽前約提升了 3 倍。進一步觀察發芽長度達到 0.3-0.5 cm 時，所有的發芽糙米中 GABA

含量均有明顯的增加，其中台梗 2 號、台梗 4 號及台梗 9 號比未發芽前均提升了 2 倍；特別是台中秈 10 號有非常顯著的提升，其含量比未發芽前提升了 6 倍之多。所有糙米於發芽長度 0.3-0.5 cm 時，GABA 含量約為 26.44-31.44 mg/100g dry rice，其中發芽台梗 2 號和台中秈 10 號的 GABA 含量較高分別增加至 31.44 mg/100g dry rice 和 30.52 mg/100g dry rice，發芽長度超過 0.5 cm 以上時已有部分糙米長霉之現象，因此實驗僅評估至此條件。

表 5. 以建立之 LC/MS/MS 方法分析糙米中  $\gamma$ -胺基丁酸的含量

Table 5. Content of  $\gamma$ -aminobutyric acid of seven brown rice determined by proposed LC/MS/MS method

Brown rice	GABA (mg/100g dry rice)*	RSD (%)
Taiken 2	15.67 ± 0.61 <sup>e</sup>	3.87
Taiken 9	13.18 ± 0.77 <sup>d</sup>	5.82
Taiken 4	12.33 ± 1.53 <sup>d</sup>	12.37
Kaohsiung 139	9.29 ± 0.45 <sup>c</sup>	4.81
Hualien 215	7.72 ± 1.21 <sup>bc</sup>	15.74
Taiken 16	7.12 ± 0.93 <sup>b</sup>	13.1
Taichung sen 10	4.78 ± 1.08 <sup>a</sup>	22.59

\*Values (Mean ± S.D., n=3) in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表 6. 四種糙米經發芽後  $\gamma$ -胺基丁酸含量的變化

Table 6. Changes in content of  $\gamma$ -aminobutyric acid of four different brown rice after germination

Brown rice	Length of sprout (cm)		
	0	0.1-0.2	0.3-0.5
	(mg/100g dry rice)		
Taiken 2	15.67 ± 0.61 <sup>e</sup>	2.99 ± 0.08 <sup>a</sup>	31.44 ± 2.04 <sup>b</sup>
Taiken 9	13.18 ± 0.77 <sup>d</sup>	2.81 ± 0.03 <sup>a</sup>	27.21 ± 1.36 <sup>a</sup>
Taiken 4	12.33 ± 1.53 <sup>d</sup>	13.76 ± 0.90 <sup>b</sup>	26.44 ± 1.09 <sup>a</sup>
Taichung sen 10	4.78 ± 1.08 <sup>a</sup>	13.10 ± 0.37 <sup>b</sup>	30.52 ± 1.39 <sup>b</sup>

\*Values (Mean±S.D., n=3) in the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

前人研究顯示睡眠不佳、壓力及焦慮可攝取 100-200 mg 的 GABA 加以改善；另外如每日攝取 10-20 mg 的 GABA 則具有降低高血壓的功效 (Abdou *et al.*, 2006; Koga *et al.*, 2012)。本實驗發現發芽糙米的 GABA 含量可達 31.44 mg/100g dry rice，因此如欲攝取 100 mg GABA，則需要攝取 300 g 以上的發芽糙米，實際上不易執行，意義不大。惟若是 10-20 mg GABA 則僅需攝食約 50 g 糙米，顯示平日多攝食糙米可能具有降低血壓的保健功能，未來應可進一步深入探討，或可加以推廣糙米的營養價值。

## 肆、結論

以超音波震盪水萃 10 分鐘和建立之 LC/MS/MS 分析方法，可完整分析稻米類產品之 GABA 含量，回收率達 80.7-93.8%之間，精密度皆小於 10%，本方法符合衛福部食品化學檢驗方法的確效規範。七種糙米中，以台梗 2 號所含 GABA 含量為最高 (15.67 mg/100 g dry rice)；台中秈 10 號所含 GABA 含量為最低 (4.78 mg/100 g dry rice)。糙米經發芽至長度 0.3cm-0.5cm 之範圍，可提升其 GABA 含量，台梗 2 號發芽糙米提至 31.44 mg/100g dry rice，而提升效果最好的發芽糙米則為台中秈 10 號，含量比未發芽前提升了 6 倍之多。發芽台梗 2 號和台中秈 10 號的 GABA 含量均約在 30 mg/100g dry rice 左右，每日攝取 50 g 糙米即可攝入約 15mg 的 GABA，具有提供保健功能之潛力，值得進一步研究以推廣糙米的營養價值。

## 謝誌

本研究承蒙行政院國家科學委員會補助經費，計劃編號: 107-2813-C-197-021-B，特申謝忱。

## 參考文獻

- 林少琴、吳若紅、鄒開煌、程開。2004。米胚芽中  $\gamma$ -胺基丁酸的分離提取及鑒定。食品科學 25：76-78。
- 姚森、楊特武、趙莉君、熊善柏。2008。中國農業科學 41：3974-3982。

- 孫園園、孫永健、王明田、李旭毅、郭翔、胡蓉、馬均。2010。種子引發對水分脅迫下水稻發芽及幼苗生理性狀的影響。作物學報 36: 1931-1940。
- 張雅琪、林素汝、吳志文。2013。不同稻種發芽米  $\gamma$ -胺基丁酸與 DPPH 自由基清除能力之變異。作物、環境與生物資訊 10: 44-59。
- Abdou, A. M., S. Higashiguchi, K. Horie, M. Kim, H. Hatta, and H. Yokogoshi. 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors* 26: 201-208.
- DeFeudis, B. 1981. Muscimol binding and GABA receptors. *Drug Dev. Res.* 1: 93-105.
- Dhakal, R., V. K. Bajpai, and K. H. Baek. 2012. Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1230-1241.
- Diana, M., J. Quílez, and M. Rafecas. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods. *J. Funct. Foods* 10: 407-420.
- Finch-Savage, W. E., and G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- Hu, W., J. H. Wells, T. S. Shin, and J. S. Godber. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1653-1656.
- Iwaki, K., and Y. Kitada. 2007. Availability of Partially Milled Rice as a Daily Source of GAMMA.-Aminobutyric Acid. *Food Sci. Technol. Res.* 13: 41-44.
- Jariwalla, R. J. 2001. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp. Clin. Res.* 27: 17-26.
- Kajimoto, O., H. Hirata, S. Nakagawa, Y. Kajimoto, K. Hayakawa, and M. Kimura. 2004. Hypotensive effect of fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in subjects with high normal blood pressure. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 51: 79-86.



- Karladee, D., and S. Suriyong. 2012.  $\gamma$ -Aminobutyric acid content in different varieties of brown rice during germination. *Sci. Asia* 38: 13-17.
- Kayahara, H., K. Tsukahara, and T. Tatai. 2000. Flavor, health and nutritional quality of pre-germinated brown rice. In *Food flavors and chemistry: advances of the new millennium. Proceedings of the 10th International Flavor Conference, Paros, Greece, 4-7 July 2000* (pp. 546-551). Royal Society of Chemistry.
- Kim, H. S., E. J. Lee, S. T. Lim, and J. A. Han. 2015. Self-enhancement of GABA in rice bran using various stress treatments. *Food Chem.* 172: 657-662.
- Kleinrok, Z., M. Matuszek, J. Jesipowicz, A. Opolski, and C. Radzikowski. 1998. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as S.C. tumors in a thymic nu/nu mice. *J. Physiol. Pharmacol.* 49: 303-310.
- Lee, B. J., J. S. Kim, Y. M. Kang, J. H. Lim, Y. M. Kim, M. S. Lee, and J. Y. Je. 2010. Antioxidant activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chem.* 122: 271-276.
- Li, H., and Y. Cao. 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39: 1107-1116.
- Limon, A., J. L. Gallegos-Perez, J. M. Reyes-Ruiz, M. A. Aljohi, S. Alshanteeti, and R. Miledi. 2014. The endogenous GABA bioactivity of camel, bovine, goat and human milks. *Food Chem.* 145: 481-487.
- Mullins, P. G., D. J. McGonigle, R. L. O'gorman, N. A. Puts, R., V idyasagar, C. J. Evans, and R. A. Edden, 2014. Current practice in the use of MEGA- PRESS spectroscopy for the detection of GABA. *Neuroimage* 86: 43-52.
- Muthayya, S., J. D. Sugimoto, S. Montgomery, and G. F. Maberly. 2014. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1324: 7-14.

- Nishimura, M., S. I. Yoshida, M. Haramoto, H. Mizuno, T. Fukuda, H. Kagami-Katsuyama, and J. Nishihira. 2016. Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure. *J. Tradit. Complement. Med.* 6: 66-71.
- Oh, C. H., and S. H. Oh. 2004. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J. Med. Food* 7: 19-23.
- Oh, S. H., J. R. Soh, and Y. S. Cha. 2003b. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J. Med. Food* 6: 115-121
- Okada, T., T. Sugishita, T. Murakami, H. Murai, T. Saikusa, T. Horino, A. Onoda, O. Kajmoto, R. Takahashi, and T. Takahashi. 2000. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness depression, autonomic disorder by oral administration. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 47: 596-603.
- Perucho, J., R. Gonzalo-Gobernado, E. Bazan, M. J. Casarejos, A. Jiménez- Escrig, M. J. Asensio, and A. S. Herranz. 2015. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids* 47: 963-973.
- Plante, D. T., J. E. Jensen, and J. W. Winkelman. 2012. The role of GABA in primary insomnia. *Sleep* 35: 741-742.
- Zhang, Q., J. Xiang, L. Zhang, X. Zhu, J. Evers, W. van der Werf, and L. Duan. 2014. Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice. *J. Funct. Foods* 10: 283-291.
- Ratanaburee, A., D. Kantachote, W. Charernjiratrakul, and A. Sukhoom. 2013. Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *Int. J. Food Microbiol.* 167: 170-176.
- Satya Narayan, V., and P. M. Nair. 1990. Metabolism, enzyaology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367-375.

- Schramm, R., A. Abadie, N., Xu, Z. Hua, and M. Lima. 2007. Fractionation of the rice bran layer and quantification of vitamin E, oryzanol, protein, and rice bran saccharide. *J. Biol. Eng.* 1: 1-9.
- Schuller, H. M., H. A. Al-Wadei, and M. Majid. 2008. Gamma-aminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 29: 1979-1985.
- Shelp, B. J., A. W. Bown, and M. D. McLea. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-452.
- Shin, Y. Y., J. I. Byun, S. E. Chung, M. J. Seong, H. A. Cho, H. K. Cha, and W. C. Shin. 2016. Effect of low and high-dose GABA from unpolished rice-germ on timing and quality of sleep: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *J. Sleep Med.* 13: 60-66.
- Villegas, J. M., L. Brown, G. S. de Giori, and E. M. Hebert. 2016. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Sci. Technol.* 67: 22-26.
- Wang, Z., Y. Xiao, W. Wang, and Z. Wang. 2017. The optimization of the production conditions of gamma aminobutyric acid by *Absidia* fermentation. *Biomed. Res.* 28: 9139-9143.
- Wong, C. G. T., T. Bottiglieri, and O. C. Snead III. 2003. GABA,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* 54: S3-S12.

109 年 12 月 04 日 投稿

110 年 03 月 18 日 接受

以 LC/MS/MS 分析  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 之方法確效及發芽稻米之含量分析