

HPLC 法测定大蒜中蒜氨酸和大蒜素的含量*

张民, 陈倩娟, 刘玉柱, 秦培军

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津, 300457)

摘 要 建立了大蒜中大蒜素和蒜氨酸含量测定的 HPLC 法。结果表明: 蒜氨酸的测定条件为, YMC-Pack ODS-A C_{18} (25 cm \times 4.6 mm) 色谱柱, 流动相为 20% 甲醇, 流速 0.7 mL/min, 检测波长 214 nm; 大蒜素的测定条件为, YMC-Pack ODS-A C_{18} (25 cm \times 4.6 mm) 色谱柱, 流动相为 85% 甲醇, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 214 nm; 蒜氨酸和大蒜素的平均回收率分别为, 89.9% \pm 1.6% 和 87.2% \pm 1.3%, 精密度 (RSD) 分别为 1.02% 和 1.46%; 大蒜中蒜氨酸和大蒜素的含量分别为, 1.67% 和 0.93%。

关键词 高效液相色谱, 蒜氨酸, 大蒜素

大蒜为百合科葱属植物生蒜的鳞茎, 是 1 种重要的药食两用植物, 有“天然抗生素”之称。中国是世界大蒜的主要产区之一, 年产量 400 万 t, 居世界首位, 约占世界总产量的 40%^[1]。据统计, 日本和东南亚市场上 80% 的大蒜由我国生产。

蒜氨酸是大蒜中的主要生物活性物质之一^[2,3], 是大蒜中独特的非蛋白类含硫氨基酸, 具有清除自由基、降血糖、抗肿瘤、保肝、抑制亚硝氮合成与吸收、抗血小板聚集等多方面的生物活性, 用于食品保鲜可延长食品防腐保鲜期, 且无毒性反应^[4]。新鲜大蒜中蒜氨酸和蒜酶处于大蒜细胞的不同部位, 蒜氨酸以稳定的形式存在于细胞质中, 而蒜酶则存在于液泡中, 当大蒜受外力作用, 细胞被破坏, 蒜酶则同蒜氨酸接触, 发生酶解反应, 产生大蒜素。大蒜素同样具有多种生物活性, 并得到了广泛应用。本文旨在建立 1 种快速方便的蒜氨酸和大蒜素的高效液相检测方法。

1 材料与 方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜大蒜: 购于天津乐购超市; 蒜氨酸 (纯度 90%); Fluka 公司; 大蒜素 (纯度 90%); 中国药品生物制品检定所; 甲醇: 色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

LabAlliance 525 高效液相色谱仪 (美国兰博公司); LWMC-205 可调功率微波化学反应器 (南京陵

江科技开发有限责任公司); MR23i 高速冷冻离心机 (法国 Jouan 公司); CJ-5002A 型榨汁机 (佛山市顺德区亿龙电器科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蒜氨酸和大蒜素标准溶液的配制

精确称取一定量的蒜氨酸标准品, 溶于流动相, 定容, 制成 4.24 mg/mL 的标准储备液。再分别配制成浓度为 203.5、407.0、678.4、1017.6、1 500.0、212.0 μ g/mL 的标准溶液。

精确称取一定量的大蒜素标准品, 溶于体积分数 85% 的甲醇溶液, 定容, 配成 1200 μ g/mL 的标准储备液, 再分别配制成 24、96、120、144、168、192、216、240 μ g/mL 的标准溶液。

1.2.2 色谱条件

色谱柱: YMC-Pack ODS-A C_{18} (25 cm \times 4.6 mm); 蒜氨酸流动相为 V(甲醇): V(水)=20: 80, 流速 0.7 mL/min, 检测波长 214 nm, 进样量 20 μ L; 大蒜素流动相为 V(甲醇): V(水)=85: 15, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 214 nm, 进样量 20 μ L。

1.2.3 大蒜供试液的制备

(1) 蒜氨酸。称取去皮的新鲜大蒜 20 g, 加 200 mL 的蒸馏水, 90 $^{\circ}$ C 水浴加热灭酶 30 min, 粉碎, 静置 20 min, 100 $^{\circ}$ C 水浴灭酶 40 min, 冷冻离心 40 min, 取上清液 1 mL, 加 1 mL 流动相, 混匀过膜, 得样品 1, 待测。

(2) 大蒜素。称取 20 g 大蒜, 将其在甲醇中破碎, 用细胞粉碎机粉碎, 甲醇定容到 100 mL, 4 $^{\circ}$ C, 9 000 r/min 冷冻离心, 取上清液 1 mL 加 2.5 mL 流动相, 混匀过膜, 得样品 2, 待测。

第一作者: 博士, 副教授。

* 天津市科技计划项目课题 (07ZCKFNC01800)

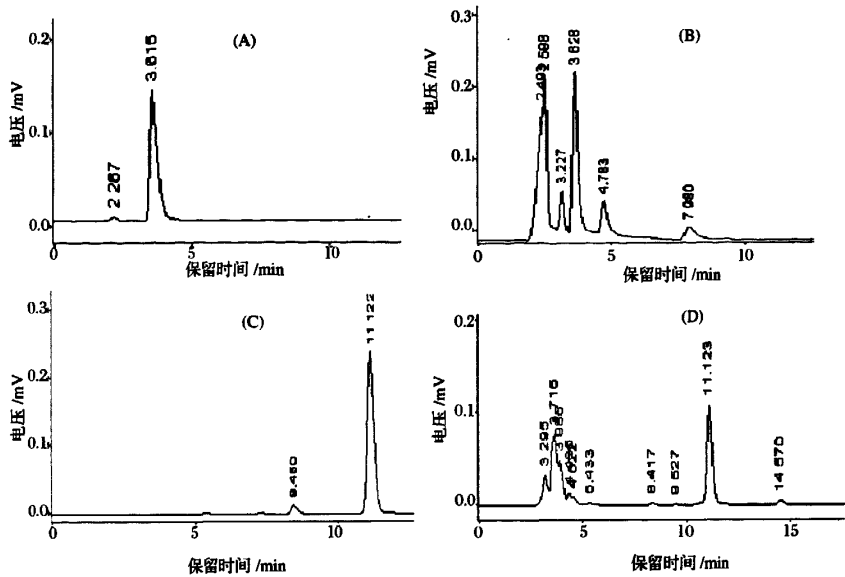
收稿日期: 2008-10-22, 改回日期: 2009-01-13

2 结果

2.1 蒜氨酸、大蒜素标准品和样品的 HPLC 图

蒜氨酸和大蒜素色谱图见图 1。蒜氨酸的保留

时间为 3.653 min,大蒜素的保留时间为 11.122 min。样品 1 为测定大蒜中蒜氨酸的色谱图,样品 2 为测定大蒜中大蒜素的色谱图。



A—蒜氨酸标样;B—样品 1;C—大蒜素标样;D—样品 2

图 1 蒜氨酸、大蒜素标样及样品 HPLC 图

2.2 蒜氨酸和大蒜素的标准曲线

取 1.2.1 蒜氨酸标准溶液分别进样,记录峰面积。以峰面积积分值 A 为横坐标,蒜氨酸浓度 C 为纵坐标,得回归方程: $C=9.000\ 0\times 10^{-5}A-31.309\ 0,r=0.998\ 8$ 。

取上述大蒜素标准溶液分别进样,记录峰面积。以峰面积积分值 A 为横坐标,大蒜素浓度 C 为纵坐标,得方程: $C=2.000\ 0\times 10A^{-5}+3.191\ 1,r=0.998\ 9$ 。

2.3 精密度试验

取 643 $\mu\text{g/mL}$ 的蒜氨酸标准品连续进样 5 次,蒜氨酸峰面积积分值为:942 375 5、910 663 4、930 166 4、935 567 0、927 489 3,RSD 为 1.02%。

取 72 $\mu\text{g/mL}$ 的大蒜素标准品连续进样 5 次,大蒜素峰面积积分值为:350 765 6、340 165 6、340 178 4、339 305 2、339 102 9,RSD 为 1.46%。

2.4 回收率试验

精确量取已知含量的样品,加入不同浓度的对照品,按 1.2.1 色谱条件测得的回收率见表 1、表 2。

表 1 蒜氨酸回收率测定结果

样品中蒜氨酸浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加标后测定值 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率 /%	平均回收率 /%	SD /%
835.8	643	1351.92	91.4	89.9	1.6
835.8	643	1363.31	92.2		
835.8	321.5	1042.84	90.1		
835.8	321.5	1032.43	89.2		
835.8	160.75	882.94	88.6		
835.8	160.75	878.26	88.1		

表 2 大蒜素回收率测定结果

样品中大蒜素浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加标后测定值 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率 /%	平均回收率 /%	SD /%
530.5	72	525.26	87.2	87.2	1.3
530.5	72	524.36	87.0		
530.5	36	504.47	89.0		
530.5	36	500.05	88.3		
530.5	18	467.87	85.3		
530.5	18	472.97	86.2		

2.5 大蒜中蒜氨酸和大蒜素的含量

采用上述方法测定的大蒜中蒜氨酸和大蒜素的

含量分别为 1.67% 和 0.93%。

3 讨论

本实验最终确定测定蒜氨酸的流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 20 : 80$, $\text{RSD} = 1.02\%$, 回收率 89.9%。样品测定时可以看出色谱图上在蒜氨酸峰后有一杂质峰, 但该峰与蒜氨酸峰之间的分离度大于 1.5, 所以不影响蒜氨酸峰的计算。

蒜氨酸为大蒜中的主要活性物质之一, 在蒜酶的作用下发生反应产生大蒜素, 并可进一步产生一系列含硫化合物。为了测定蒜氨酸, 必须先灭酶, 本文在提取测定大蒜素之前采用水浴加热的方法灭酶, 很好的保护了蒜氨酸。

大蒜素在水中溶解度很低, 故本实验最终确定测

定大蒜素的流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 85 : 15$, 出峰时间合适, $\text{RSD} = 1.46\%$, 回收率为 87.2%。

参考文献

- 1 葛毅强, 倪元颖, 张振华, 等. 生姜、大蒜、洋葱 3 种传统香辛调味料的研究开发[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(7): 59~64
- 2 西山信好. 大蒜对衰老并发记忆障碍小鼠的预防作用[J]. 新药与临床, 1996, 45(3): 467
- 3 Rietz B, Belagyi J, Torok B, et al. The radical scavenging ability of garlic examined in various models [J], Boll Chim Farm, 1995, 134(2): 69~76
- 4 杨文婕, 杨晓光, 夏奕明. 大蒜和富硒大蒜的防癌抗癌活性化合物[J]. 中华预防医学杂志, 1997(5): 304~306
- 5 孙君社, 高孔荣. 蒜酶及其动力学研究[J]. 食品科学, 1995, 16(9): 13~15

Determining of Alliin and Allicin in Garlic With HPLC

Zhang Min, Chen Qianjuan, Liu Yuzhu, Qing Peijun

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT The purpose of the paper was to establish a HPLC method to determine the content of allicin and alliin in garlic. The results showed that the analysis of allicin could be performed on a YMC-Pack ODS C_{18} (25 cm \times 4.6 mm) chromatography column with methanol-water (2 : 8 by volume) as mobile phase at 0.7 mL/min of flow rate. And the alliin could be analyzed on a YMC-Pack ODS C_{18} (25 cm \times 4.6 mm) chromatography column with a mobile phase of methanol-water (85 : 15 by volume) at 0.8 mL/min of flow rate. Both alliin and allicin were detected with a wavelength of 214nm. The average recovery of allicin and alliin were $89.9\% \pm 1.6\%$ and $87.2\% \pm 1.3\%$, respectively. The RSD were 1.02% and 1.46%, respectively. The content of alliin and allicin in garlic were 1.67% and 0.93%, respectively.

Key words HPLC, alliin, allicin

信
息
窗

“GC-MS 联用技术培训班”即将举办

近年来, 有机质谱技术有了长足的发展, 在分析检测和研究的许多领域中起着越来越重要的作用, 特别是在许多有机化合物常规检测工作中成为一种必备的工具。随着有机质谱技术在各领域的广泛使用, 人们对有机质谱技术掌握的需求也日益强烈, 应广大用户的要求, 信立方质谱培训中心联合业内著名专家, 在 2009 年推出有机质谱系列培训 GC-MS 联用技术培训班。

● 培训时间: 2009 年 4 月 20-24 日, 19 日北京报到。

● 课程特色: 实例解析, 以应用技术为主; 每天均设置答疑和讨论时间; 学员在培训后可免费加入专设的 GC-MS 学员圈子, 免费下载资料, 参加不定期的专家答疑活动。

● 培训内容: (1) GCMS 仪器结构、功能和主要性能指标; (2) EI, CI 离子化技术; (3) GCMS 联用操作技术和常规维护; (4) GCMS 联用技术的定性、定量方法及其应用; (5) 答疑与讨论。

● 主讲专家: 苏焕华、王光辉、李重九、金幼菊。

● 培训费用: 2 000 元/人

● 报名方式: 电话: 010-51299927-101、13269178446 传真: 010-51299927-108 张老师, Email: training@instrument.com.cn。网上报名享有更多优惠。

信立方质谱培训中心还将陆续推出有机质谱谱图解析技术专题培训班、LC-MS 联用技术培训班及 NIST 谱图库检索实用技术培训等, 更多内容及详细课程设置请查阅 <http://www.instrument.com.cn/training/> (仪器信息网供稿)。