

## 丙酮酸差量法测定大蒜中大蒜辣素含量方法的建立\*

朱君芳,许建,高杰

(新疆农业大学 林学与园艺学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要** 通过测定经酶促反应后大蒜鳞茎中的丙酮酸含量,以灭酶组大蒜鳞茎中丙酮酸含量为本底,应用丙酮酸差量法计算得出大蒜鳞茎中大蒜辣素含量,并对测定条件进行优化。结果表明:大蒜本底灭酶条件为 100 ℃ 水浴加热 30 min,酶促反应温度为 30 ℃,酶促反应时间为 10 min,在 520 nm 下测定吸光度值,丙酮酸含量浓度在 10~50 μg/mL 内与吸光度呈良好的线性关系,大蒜辣素测定精密性相对标准偏差为 0.88%,重现性相对标准偏差为 1.05%。该方法操作简单、稳定、重复性好,对于测定大蒜中大蒜辣素切实可行。

**关键词** 大蒜;丙酮酸;差量法;大蒜辣素含量

大蒜(*Allium sativum* L.)是百合科(Liliaceae)葱属(*Allium*)草本植物,是一种葱蒜类蔬菜,以鳞茎、嫩叶和花茎为食用器官,是一种重要的调味蔬菜<sup>[1]</sup>。原产于欧洲南部、西亚和中亚,西汉时期传入我国<sup>[2]</sup>。目前大蒜在我国已广泛栽培,主要产地有河南、山东、河北、甘肃、江苏及新疆等地<sup>[3-4]</sup>。

大蒜有消炎、杀菌、降低胆固醇、抗癌、以及增强免疫力等多种功效。大蒜的药用价值主要来源于大蒜辣素(allicin)。大蒜辣素极易挥发,是一种具有特殊气味的无色油状物质<sup>[5-9]</sup>。大蒜辣素以前体物质蒜氨酸存在于大蒜中,在完整的细胞中,蒜氨酸存在于细胞质中,而蒜氨酸酶存在于液泡中,细胞破碎后二者接触,继而蒜氨酸发生转化,生成大蒜辣素<sup>[10-11]</sup>。大蒜辣素药用价值大,可加工为保健品和药品等,应用前景较广阔。

目前,大蒜辣素含量的测定方法主要有气相色谱(GC)、气相色谱-质谱连用(GC-MS)、液相色谱(LC)、高效液相色谱(HPLC)、硝酸汞滴定法、定硫法和分光光度计法等。其中分光光度计法不需大蒜辣素标准样品,操

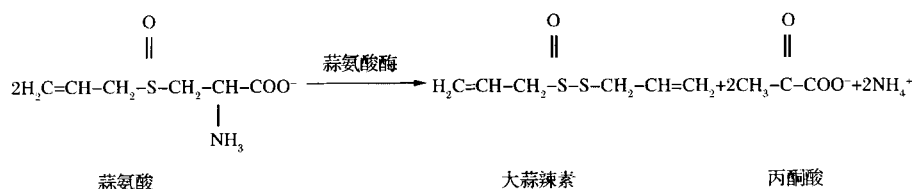
作简单、快速、成本低,较为实用,因此该方法的应用最为广泛<sup>[12-16]</sup>。目前,虽然关于分光光度计法测定大蒜辣素的研究很多,但相关报道却不一致,如待测指标、药品试剂、提取方法和提取条件等有所不同。由于大蒜辣素稳定性差,因此测定较为困难<sup>[14-15]</sup>。本文采用丙酮酸差量法测定大蒜鳞茎中的大蒜辣素,不需大蒜辣素标准样品,操作简单、快捷、准确性高,较为实用。

## 1 试验原理及材料方法

## 1.1 试验原理

应用曹建康<sup>[17]</sup>等测定果蔬组织中丙酮酸含量的方法,大蒜鳞茎组织提取液中所含的丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼发生反应,生成丙酮酸-2,4-二硝基苯腙,此产物在碱性环境中呈樱桃红色,并且在 520 nm 处有显著光吸收。该反应所呈现的颜色深浅程度与溶液中的丙酮酸含量呈正相关。

本试验中,2 分子蒜氨酸在蒜氨酸酶的作用下,分解产生 1 分子大蒜辣素,同时产生 2 分子丙酮酸,反应式如下:



第一作者:硕士研究生(高杰教授为通讯作者,E-mail:13999803260@163.com)。

\*新疆研究生科研创新项目(XJGR2014075);国家公益性行业(农业)科技专项(200903018-7)

收稿日期:2015-05-25,改回日期:2015-07-08

由于未经受损的大蒜鳞茎组织中含有丙酮酸,故应将大蒜鳞茎经灭酶处理,去除本底的影响,再计算出鳞茎组织中的大蒜辣素含量。计算方法如下:

经灭酶后测得灭酶组的吸光度值分别为  $A_1$ 、 $A_2$ 、

$A_3$ , 测定组的吸光度值分别为  $A_1'$ 、 $A_2'$ 、 $A_3'$ 。可由标准曲线查得丙酮酸的质量, 从而计算出丙酮酸的含量。灭酶组丙酮酸含量(即本底)为  $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ , 测定组丙酮酸含量为  $m_1'$ 、 $m_2'$ 、 $m_3'$ 。计算大蒜辣素生成过程中产生丙酮酸的量为  $M = (m_1' + m_2' + m_3')/3 - (m_1 + m_2 + m_3)/3$ ; 由此得:

$$\text{大蒜辣素的含量} / [\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}] = \frac{M \times 162}{2 \times 88}$$

## 1.2 试验材料与试剂

市购新疆吉木萨尔县的白皮大蒜, 置于  $(0 \pm 1)$  °C 冷库中保存。

三氯乙酸、2,4-二硝基苯肼、氢氧化钠、丙酮酸、浓盐酸: 分析纯, 天津盛奥化学试剂有限公司。

## 1.3 试验仪器与设备

电子天平, AR2130/C 型, Pine Brook, NJ, USA; 打浆机, 飞利浦 HR2860/60/A 型, 珠海飞利浦家庭电器有限公司; 电热恒温水箱, -600 型, 上海一恒科学仪器有限公司; 离心机, XYJ80-2 型, 江苏姜堰市医疗器械有限公司; 可见光分光光度计, 721 型, 上海菁华科技仪器有限公司。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 丙酮酸标准曲线的制作

取 6 支试管, 分别编号, 按表 1 加入各种试剂。

表 1 绘制丙酮酸标准曲线时各试剂加入量  
Table 1 The amount of each reagent drawing pyruvic acid standard curve

项目	管号					
	0	1	2	3	4	5
50 $\mu\text{g}$ / mL 丙酮酸标准液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
80 g/L 三氯乙酸溶液/mL	3.0	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0
相当于丙酮酸质量/ $\mu\text{g}$	0	10	20	30	40	50

在上述各试管中分别加入 1.0 mL 1 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液, 摇匀, 再加入 5.0 mL 1.5 mol/L 的 NaOH 溶液, 摇匀, 进行显色反应 10 min。然后以 0 号试管为空白参比, 在波长 520 nm 处进行比色测定, 并以吸光度值为纵坐标, 丙酮酸的质量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标, 制作标准曲线, 求得线性回归方程。

### 1.4.2 丙酮酸差量法测定大蒜辣素条件的优化

#### 1.4.2.1 大蒜本底中丙酮酸含量的测定及灭酶时间的优化

取完整无损伤的大蒜鳞茎鲜样约 20 g, 去皮, 在 100 °C 水浴条件下分别加热 0、10、20、30、40 min 进行灭酶。然后打浆, 分别取样 3 份, 各 2 g, 并用 80 g/L

的三氯乙酸溶液定容至 25 mL, 摇匀。4 000  $\times$  g 离心 10 min 后可收集上清液, 即为提取液。

取 0.5 mL 提取液于试管中, 加入 80 g/L 的三氯乙酸溶液 2.5 mL、1 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液 1.0 mL, 摇匀。再加入 1.5 mol/L 的 NaOH 溶液 5.0 mL, 摇匀, 进行显色反应 10 min 后, 按照与制作标准曲线相同的方法, 以 0 号试管为空白参比, 在波长 520 nm 处进行比色测定, 并记录吸光度值。

#### 1.4.2.2 大蒜辣素最佳酶促反应时间的优化

取鲜样约 40 g, 打浆, 将样品置于 30 °C 水浴锅内水浴加热, 进行酶促反应。分别在反应 0、10、20、30、40、50、60 min 时各取样 3 份, 每份 2 g, 用 80 g/L 的三氯乙酸溶液定容至 25 mL, 摇匀。4 000  $\times$  g 离心 10 min 后, 收集上清液即为提取液。

取 0.1 mL 提取液于试管中, 分别加入 80 g/L 的三氯乙酸溶液 2.9 mL、1 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液 1.0 mL, 摇匀。再加入 1.5 mol/L 的 NaOH 溶液 5.0 mL, 摇匀, 进行显色反应 10 min, 然后在波长 520 nm 处进行比色测定, 并记录吸光度值。

#### 1.4.2.3 大蒜辣素最佳酶促反应温度的优化

取鲜样约 20 g, 重复 6 次, 打浆均匀后分别置于 20、25、30、35、40、45 °C 水浴锅内进行酶促反应 10 min, 各取样 3 份, 每份 2 g, 用 80 g/L 的三氯乙酸溶液定容至 25 mL, 摇匀。4 000  $\times$  g 离心 10 min 后, 收集上清液即为提取液。

取 0.1 mL 提取液于试管中, 加入 80 g/L 的三氯乙酸溶液 2.9 mL、1 g/L 的 2,4-二硝基苯肼溶液 1.0 mL, 摇匀。再加入 1.5 mol/L 的 NaOH 溶液 5.0 mL, 摇匀, 进行显色反应 10 min, 在波长 520 nm 处进行比色测定, 并记录其吸光度值。

### 1.4.3 丙酮酸差量法测定大蒜辣素方法的评价

#### 1.4.3.1 稳定性试验

称取无损伤的大蒜鳞茎 20 g 并打浆, 按照试验所确定的最佳反应条件制备样品提取液。取样品提取液, 按照测定条件反应完全后, 分别静置 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 后测定并记录吸光度值, 分析吸光度值的变化情况, 以评价该测定方法在一定时间段内的稳定性。

#### 1.4.3.2 精密度试验

应用本试验所确定的最佳酶促反应条件制备样品提取液, 并重复 10 次取该提取液, 按照测定条件反应完全后, 进行吸光度测定, 计算出各自大蒜辣素的含量, 然后计算相对标准偏差, 以评价该测定方法的精密度。

## 1.4.3.3 重现性试验

按照最佳酶促反应条件制备大蒜鳞茎组织样品,取5份该样品,每份2 g,并制备样品提取液,分别取样品提取液并按照测定条件反应完全,然后测定吸光度,计算它们的相对标准偏差,以评价该测定方法的重现性。

## 2 结果与分析

## 2.1 标准曲线的建立

按照1.4.1的方法,以丙酮酸的质量为横坐标,以吸光度值为纵坐标,建立丙酮酸测定标准曲线。丙酮酸浓度在10~50  $\mu\text{g/mL}$ 内与吸光度呈良好的线性关系, $y=0.0135x-0.0004$  ( $R^2=0.9999$ )

## 2.2 丙酮酸差量法最佳测定条件的确定

## 2.2.1 最佳灭酶时间的确定

分别对灭酶0,10,20,30,40 min后的提取液进行吸光度测定,计算得出丙酮酸含量依次为354.25、72.14、68.42、69.51、69.38 mg/100g(图1)。灭酶0 min时丙酮酸含量最高,灭酶10 min后丙酮酸含量逐渐降低,灭酶时间为20,30,40 min时丙酮酸含量趋于稳定,因此,水浴加热30 min可彻底灭酶,故本试验灭酶时间选择30 min。

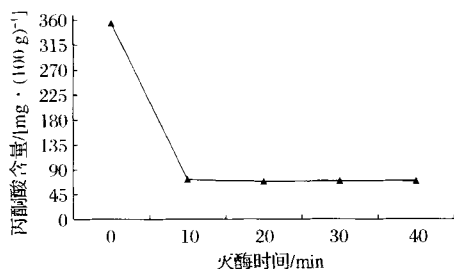


图1 丙酮酸含量随灭酶时间的变化

Fig.1 The effect of enzyme inactivation time on content of pyruvic acid

## 2.2.2 最佳酶促反应时间的确定

分别在0,10,20,30,40,50,60 min后取样并测定吸光度值,计算可得大蒜辣素含量分别为355.56,378.11,348.98,301.00,268.14,233.82,181.01 mg/100g(图2)。大蒜鳞茎打浆10 min内,大蒜辣素含量逐渐增大,10~60 min内,大蒜辣素含量逐渐下降,由此可知,丙酮酸差量法测定大蒜辣素含量的最佳酶促反应时间为10 min。

## 2.2.3 最佳酶促反应温度的确定

将样品分别置于20,25,30,35,40,45  $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内进行酶促反应,10 min后取样,经测定、计算可得大蒜辣素含量分别为322.43,324.43,354.92,322.95,271.62,204.81 mg/100g(图3)。温度在20~30  $^{\circ}\text{C}$ 内,

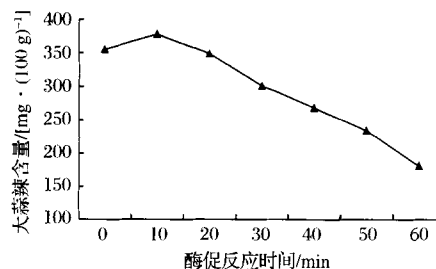


图2 大蒜辣素含量随酶促反应时间的变化

Fig.2 Effect of enzymatic reaction time on content of allicin

大蒜辣素含量随温度的升高而增大,30~45  $^{\circ}\text{C}$ 内,大蒜辣素含量随温度的升高而减小,30  $^{\circ}\text{C}$ 时进行酶促反应使得大蒜辣素含量最高,由此可知,丙酮酸差量法测定大蒜辣素含量的最佳酶促反应温度为30  $^{\circ}\text{C}$ 。该方法与朱平华<sup>[18]</sup>等在正交试验优化大蒜素的提取试验中的研究结果一致。

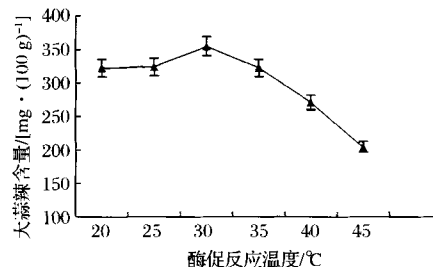


图3 大蒜辣素含量随酶促反应温度对的变化

Fig.3 Effect of enzymatic reaction temperature on content of allicin

## 2.3 丙酮酸差量法测定大蒜辣素方法的评价

## 2.3.1 稳定性试验

同一样品的提取液经显色反应后在不同时间段测定其吸光度,如表2所示,计算得相对标准偏差为3.409%。吸光度值减少量约0.01/0.5 h,故样品反应液的吸光度需在0.5 h内测定,即可将误差控制在0.01内,3 h后吸光度值减少0.05。因此,该试验的样品提取液经显色反应后需尽快测定吸光度值,以减少误差。

表2 稳定性试验

Table 2 Results of stability experiment

放置时间/h	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
吸光度值	0.561	0.550	0.540	0.533	0.524	0.517	0.510

## 2.3.2 精密度试验

对同一大蒜鳞茎组织的提取液测定10次吸光度,计算得大蒜辣素含量分别为380.17,385.47,392.74,387.25,385.61,383.22,386.79,383.69,389.09,385.74 mg/100g,计算得出平均大蒜辣素含量为385.98 mg/100g,相对标准偏差为0.88%,由此

可知,该测定方法的精密度较好。

### 2.3.3 重现性试验

测定5份经同样处理的样品提取液的吸光度值,分别为0.457、0.446、0.458、0.452、0.453,其相对标准偏差为1.05%,由此可知此方法具有较好的重现性。

### 3 结论

该方法借鉴2,4-二硝基苯肼法测定丙酮酸含量的方法,通过测定灭酶后和经酶促反应后大蒜鳞茎中丙酮酸的含量,由丙酮酸的差量计算出大蒜鳞茎中大蒜辣素的含量。

试验优化测定条件为,100℃水浴加热灭酶30 min,酶促反应温度为30℃,酶促反应时间为10 min,在520 nm处测定吸光度值,丙酮酸含量浓度在10~50 μg/mL内与吸光度呈良好的线性关系( $R^2=0.9999$ ),精密度相对标准偏差为0.88%,重现性相对标准偏差为1.05%。由此可见,此方法耗材少,操作简单,精密度较高,重现性好,适宜测定大蒜鳞茎中大蒜辣素含量。

### 参 考 文 献

- [1] 蔬菜栽培学各论.北方本[M].北京:农业出版社,2004:171-172.
- [2] 韭菜葱蒜栽培技术[M].北京:金盾出版社,2013:164.
- [3] 樊治成,高兆波,李建友.我国葱蒜类蔬菜种质资源和育种研究现状[J].中国蔬菜,2004(6):38-41.
- [4] 徐培文.我国大蒜产业化与品种改良[J].长江蔬菜,2003(3):10-11.
- [5] 李晓亮,崔金玮.天然大蒜的药用潜力探讨[J].中国农学通报,2008,24(5):136-139.
- [6] Bakri I M, Douglas C W. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria[J]. Arch Oral Biol, 2005,50(7):645.
- [7] 邓中国,余晟,魏金凤.大蒜素的研制及其药用价值[J].泰山医学院学报,2004,25(3):325.
- [8] J. A. Milner. A historical perspective on garlic and cancer[J]. The Journal of Nutrition,2001,131(3):1 027-1 031.
- [9] 周黎黎.大蒜素的提取工艺及其降血脂产品的开发[D].西华大学,2006.
- [10] 方圆.大蒜素的生成与降解控制条件及抗氧化活性研究[D].江苏大学,2007.
- [11] 林守峰.大蒜辣素生物合成、稳定性研究及相关物质分析[D].新疆医科大学,2010.
- [12] 张丽霞,张国强.大蒜素含量的测定方法研究[J].湖北农业科学,2009,48(3):713-714.
- [13] 熊伟.大蒜素的提取工艺研究[D].南昌:南昌大学,2006.
- [14] 吴刘健.大蒜素测定及膜分离纯化工艺研究[D].南昌:南昌大学,2006.
- [15] 马茜.硫酸钡吸光比浊法测定大蒜中大蒜素含量[J].光谱实验室,2007,34(3):10-12.
- [16] 王婕.大蒜素提取工艺的研究[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2013,29(6):86-89.
- [17] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007:137-139.
- [18] 朱平华,王勇.正交试验优化大蒜素的提取工艺[J].食品研究与开发,2011,32(3):10-12.

## The establishment of determination of allicin in garlic by pyruvic acid dispersion

ZHU Jun-fang, XU Jian, GAO Jie

(College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agriculture University Urumqi, Urumqi 830052, China)

**ABSTRACT** Determine the pyruvic acid content in garlic bulb after the enzymatic reaction. The pyruvic acid content in garlic bulb with enzyme killing group as the background, the pyruvic acid content in garlic bulb was calculated by pyruvic acid dispersion method. And the determining conditions were optimized. The results show that the enzyme killing should be done in boiling water bath for 30 minutes. The best temperature and time of enzymatic reaction are 30℃ and 10 minutes. Pyruvic acid content detected at 520 nm was 10~50 μg/mL and showed a good linearity relationship with absorbance values. The RSD of accuracy is 0.88%, The RSD of reproducibility is 1.05%. This method operates simple, has high stability and good repeatability. Therefore, it is feasible for determining the content of allicin in garlic.

**Key words** garlic; pyruvic acid; difference method; content of allicin