

## 反相高压液相色谱法测定鲜蒜中的蒜氨酸\*

黄雪松 温丽儿 宴日安

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广州, 510632)

**摘要** 为准确、快速、方便的测定大蒜中的蒜氨酸, 采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC), Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm) 色谱柱, 检测波长 200 nm, 5% 甲醇+95% pH=5 磷酸缓冲液为流动相, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 20℃ 等条件下进行测定。测定结果为: 蒜氨酸浓度与峰面积呈良好的线性关系, 线性范围为 10~350 μg/mL; 利用蒜氨酸酶反应样品的 HPLC 行为差异或纯蒜氨酸均可对蒜氨酸进行定性测定。测定结果表明, 该方法经济、简便、快速、重现性好。

**关键词** 大蒜 (*Allium sativum* L.), 高效液相色谱, 蒜氨酸

蒜氨酸(alliin)化学名称为 S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砜(S-allyl-cysteine sulfoxide), 是百合科葱属植物大蒜 (*Allium. sativum* L.) 中的主要含硫氨基酸。具有清除自由基、降血糖、抗肿瘤、保肝、抑制强致癌物亚硝胺的合成与吸收、抗血小板聚集、降血脂、与香菇嘌呤协同降血压等多方面的生物活性<sup>[1]</sup>。因此, 快速、方便、准确地测定大蒜及其制品中的蒜氨酸含量, 对于评价大蒜及其制品的质量与开发大蒜保健食品等有重要作用<sup>[2]</sup>。

已报道的蒜氨酸测定方法有: 定硫法、硝酸汞沉淀法、苯胺法<sup>[3]</sup>、茚三酮反应法<sup>[4]</sup>、4-巯基吡啶反应法<sup>[5]</sup>, 这些测定方法专一性差, 结果准确度差; 还报道有气相色谱法<sup>[6]</sup>和生物传感器法测定蒜氨酸<sup>[7,8]</sup>, 气相色谱法需要使蒜氨酸衍生化反应后进行测定, 操作比较麻烦, 生物传感器测定时, 需要专门的测定设备, 目前还难以推广使用。常军民等人报道采用 HPLC 法测定大鼠、小鼠、纯蒜氨酸与蒜氨酸酶反应液中的蒜氨酸含量<sup>[9~13]</sup>, 以对蒜氨酸药代动力学和体外酶解进行研究, 但这些体系与新鲜大蒜样品不同, 新鲜大蒜原料成分复杂, 蒜氨酸测定的难度比较大。Arnaut 等人采用液质连用(HPLC-MS)与离子对分离技术测定大蒜及其制品中的蒜氨酸<sup>[14]</sup>, 但这需要的仪器比较复杂, 色谱柱的使用寿命也受到限制。王岩利用薄层扫描测定鲜蒜中的蒜氨酸时, 以鲜蒜的冻干粉的有机溶剂渗漉液作为样品, 测得大蒜中的蒜氨酸为 3.1%~3.4%, 但该法制作样品处理麻烦, 方法的精密度不及 HPLC 法高<sup>[15]</sup>。本文报道另外一种

适用于鲜蒜中蒜氨酸的 HPLC 测定方法。

## 1 材料与方法

## 1.1 原料

购于广东石牌蔬菜市场新鲜山东大蒜。

## 1.2 仪器

Agilent 1100, HP 化学工作站, 高速台式离心机, 旋涡混合器等。

## 1.3 试剂及其配制

## 1.3.1 试剂

结晶蒜氨酸(纯度 97%), 自制<sup>[16]</sup>; 无水乙醇、磷酸、磷酸氢二钾等, 均为分析纯; 双蒸水。

## 1.3.2 标准蒜氨酸溶液的配制

称取 17.5 mg 蒜氨酸, 用体积分数 20% 乙醇定容至 25 mL, 使之成为 700 μg/mL 的蒜氨酸母液, 以此溶液倍比稀释, 配制成 350、175、87.5、43.75、21.87、10.94、5.469、2.734、1.367 2 μL/mL 的系列标准溶液, 用于 HPLC 测定。

## 1.4 大蒜样品液的制备

## 1.4.1 灭酶大蒜样品测定液(A液)

称取鲜蒜 2 g, 加少量水煮沸 10 min 以使蒜氨酸酶失去活性, 然后研碎, 加水定容到 25 mL(容量瓶中预先加入 5 mL 无水乙醇), 使成为体积分数 20% 乙醇蒜氨酸混合液, 摇匀后放置 2 h, 然后过滤, 将滤液用体积分数 20% 乙醇稀释 10 倍, 即取此溶液 5 mL, 用 20% 乙醇定容至 50 mL, 取此液测定其蒜氨酸含量。

## 1.4.2 未灭酶大蒜样品测定液(B液)

称取鲜蒜 2 g, 加少量水研碎, 在室温下放置 1 h, 再用 20% 乙醇定容到 25 mL, 然后放置、过滤, 将滤液按照上述 A 液的方法稀释 10 倍。

第一作者: 博士, 教授。

\* 国家高新技术发展计划专项资助(No. 2001AA248021)。

收稿日期: 2004-12-29, 改回日期: 2005-03-25

## 1.5 HPLC 测定

色谱柱 Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm), 二极管点阵检测器, 检测波长 220 nm; 流动相为 5% 甲醇 + 95%、pH = 5 磷酸缓冲液, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 20℃, 进样量 2 μL。

## 1.6 蒜氨酸的保留值测定

按照 1.5 色谱条件测定 1.4 制作的 A 液、B 液, 通过比较其色谱图推断蒜氨酸的保留值。

利用标准蒜氨酸测定蒜氨酸的保留值。

## 1.7 精密度试验

吸取同一浓度的蒜氨酸标准溶液 2 μL, 按 1.5 色谱条件, 重复进样 5 次。

## 1.8 回收率试验

取标准蒜氨酸溶, 按高 (200 μg/mL)、中 (100 μg/mL)、低 (10 μg/mL) 3 个浓度分别加入到 1.4.1 项 A 液中, 得供试样品溶液。吸取该溶液 2 μL, 进样测定, 重复 3 次。

# 2 结果与分析

## 2.1 蒜氨酸最大吸收波长的确定

根据参考文献[9~15]介绍, 蒜氨酸水(或乙醇)溶液最大吸收波长为 214、220 或 226 nm。本试验中采用二极管点阵检测器测定表明, 所用流动相条件 (5% 甲醇 + 95%、pH = 5 磷酸缓冲液) 下, 蒜氨酸的最大吸收波长为 200 nm。蒜氨酸吸收波长变化的原因可能是磷酸与蒜氨酸中的硫原子结合而导致蒜氨酸吸收光谱的蓝移。

## 2.2 蒜氨酸的保留值

### 2.2.1 利用蒜氨酸酶反应测定蒜氨酸的保留值

根据 1.4 样品的处理, 制取 A 液时, 通过加热已经使蒜氨酸酶失去活性, 其 HPLC 色谱图 (见图 1) 上应该有蒜氨酸的色谱峰, 但因为峰比较多, 在没有蒜氨酸标准样品的情况下, 不能确定那一个是蒜氨酸峰; 但制取 B 液时, 放置了 1 h, 其中的蒜氨酸酶会使蒜氨酸反应, 如果反应彻底, 则在 HPLC 色谱峰 (见图 2) 中应不显示蒜氨酸峰。

通过比较图 1 与 2 可以看出, 图 1 上有 5.311、7.687、15.452 min 的保留时间峰, 而图 2 没有这些色谱峰, 但多了 1 个 4.948 的色谱峰。该现象的原因是蒜氨酸酶解使得蒜氨酸分解成为大蒜油, 即 5.311、7.687、15.452 min 这些色谱峰为蒜氨酸类物质的峰, 考虑到蒜氨酸是这类成分的主要成分, 可以认为峰面积比较大的色谱峰, 即 5.331 min 的色谱峰为蒜

氨酸峰。由图 3 可知, 标准蒜氨酸的保留时间是 5.234 min, 与图 1 中的蒜氨酸保留值相差约 0.077 min, 该差异是由于两者蒜氨酸绝对量不同而造成的, 说明利用 A、B 液的差异对蒜氨酸进行定量是可行的。图 2 中无 5.311、7.687、15.452 min 峰, 据此认为制取 B 液时, 放置 1 h, 蒜氨酸已被完全反应掉。另外, 图 2 在 4.948 min 多了一个色谱峰, 该峰应当属于蒜氨酸分解转化形成的大蒜油吸收峰, 但有待了进一步的研究确定。如果该峰属于大蒜油, 测有可能利用 A、B 液的 HPLC 色谱峰差异, 在测定蒜氨酸的同时测定大蒜油。

另外, 由图 1、图 2 可知, 制备待测蒜氨酸样品溶液时, 必须及时杀灭蒜氨酸酶活性, 负责, 测定结果将因蒜氨酸酶的作用而大大降低。

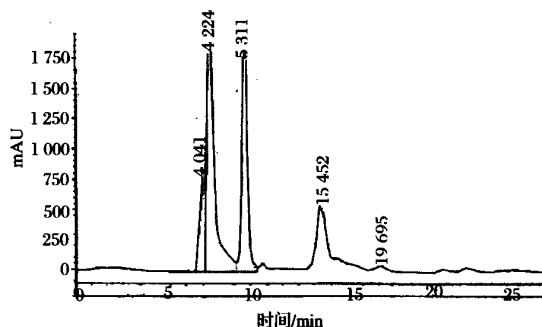


图 1 含有蒜氨酸的样品

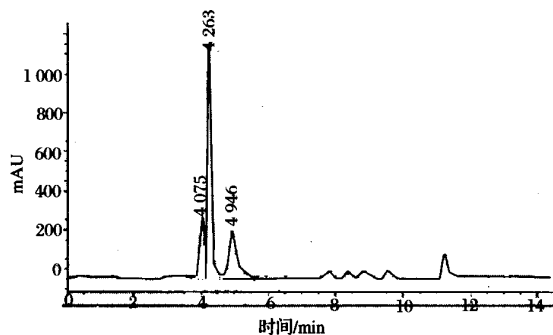


图 2 不含蒜氨酸的样品

### 2.2.2 利用标准蒜氨酸测定保留值

标准蒜氨酸的保留值见图 3, 其保留时间为 5.234 min。与图 1 中的蒜氨酸峰一致 (5.33 min)。2 个保留时间之间的微小差异可能是因为 2 个样品中蒜氨酸的绝对量不同造成的。

比较 2 种测定蒜氨酸保留时间的方法, 各有缺点。利用标准蒜氨酸直接测定蒜氨酸的保留时间, 简单、准确。但在没有蒜氨酸标准品的情况下, 可以利用 A、B 液 HPLC 色谱峰的差异定性确定蒜氨酸的保

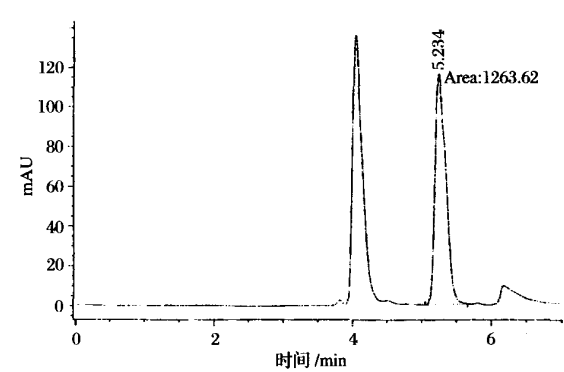


图3 标准蒜氨酸的保留值和吸收峰留时间。

2.3 蒜氨酸标准曲线的测定  
测定结果见表1。

表1 蒜氨酸的吸收峰和浓度				
系列1	系列2	平均值(X)	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Y
5.143 67	5.969 25	5.556 46	1.367 187 5	0.256 1
9.941 13	9.448 53	9.694 83	2.734 375	1.401 6
22.276 3	21.052 2	21.664 25	5.468 75	4.714 8
44.143 6	41.989 9	43.066 75	10.937 5	10.638 9
88.815 3	84.700 8	86.758 05	21.875	22.732 8
165.7	161.616	163.658	43.75	44.018 6
324.09	330.76	327.425	87.5	89.349 3
642.716	646.051	644.383 5	175	177.083 4
1 263.62	1 262.52	1 263.06	350	348.333 1

由表1得出蒜氨酸与峰面积的工作曲线为：  
 $Y = 0.276\ 8\ X - 1.281\ 9$  (1)

式中：Y，蒜氨酸含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )；X，测得的峰面积。

该回归方程的相关系数为0.999 931，可见相关程度甚高。从表1中可以看出，当浓度较低时，样品实际蒜氨酸含量与估计含量的误差较多( $1.367\ 0 - 0.256\ 1 = 1.110\ 9\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )；但样品浓度高时，误差较小，如样品中蒜氨酸浓度高于 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时，误差则很小( $10.937\ 5 - 10.602\ 3 = 0.345\ 2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，即相对误约为3%)。因此，采用工作曲线测定蒜氨酸时，样品中的蒜氨酸含量应该大于 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 测定方法的精密度和回收率(结果见表2、表3)

表2 蒜氨酸标样测度的精密度			
序 号	保留时间 /min	面积(Y)	蒜氨酸的量 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	5.321	39.815 1	9.888 0
2	5.320	42.943 6	10.836 7
3	5.323	40.125 1	10.391 0
4	5.325	43.000 1	10.136 0
5	5.330	41.989 9	10.346 9
平均±标准差	5.324	41.574 8±1.523	10.319 7±0.35
变异系数	—	—	3.39%

由表2、表3可以看出，该测定方法的精密度与回收率均较高。

表3 蒜氨酸加标回收测定结果					
样品中的蒜氨酸浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定次数	加标后测得值 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回收蒜氨酸值 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率 /%
25	200	3	220.5±7.28	195.5±6.06	98
25	100	3	123.8±3.96	98.8±3.06	99
25	10	3	34.48±1.32	9.48±.30	95
平均	—	—	—	—	97

2.5 鲜蒜中的蒜氨酸含量

表4 蒜氨酸吸收峰含量				
测定 序号	保留时间 /min	面积 (Y)	蒜氨酸的量	百分含量 /%
1	5.339	39.715 1	9.711 2	1.213 9
2	5.340	43.949 6	10.883 5	1.360 4
3	5.338	40.725 7	9.861 2	1.232 7
4	5.335	42.753 7	10.552 3	1.319 0
平均			10.252 1±0.558	1.281 5±0.069 7

表4中蒜氨酸保留时间较图3中的蒜氨酸保留时间(5.234) min 略长，这可能是柱效降低造成的。由表4结果知蒜氨酸的平均百分含量为1.28% (鲜重)，该数据低于文献<sup>[15]</sup>的报道结果，这是因为两者使用的含水量不同的样品造成的。

3 结 论

- (1) 测定新鲜大蒜原料中的蒜氨酸时，必须及时进行杀灭蒜氨酸活性的处理，否则，测定结果可能偏低。
- (2) 测定蒜氨酸酶作用前后的大蒜样品的HPLC差异，可以判断蒜氨酸的保留值，进而对蒜氨酸进行定性判断。
- (3) 蒜氨酸的最大吸收波长，因溶剂及其溶剂性质而不同。在5%甲醇+95%，pH=5磷酸缓冲液中的最大吸收波长为200nm。
- (4) 本测定方法的线性范围为10~350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 参 考 文 献

- 1 贾江滨,许重远,罗景慧,等.大蒜中含硫氨基酸研究进展[J].中草药 2000,31(6):468~469
- 2 GB16740—1997,保健(功能)食品通用标准[S].北京:中国标准出版社,1997
- 3 张维勤.大蒜及制剂中大蒜辣素的含量测定[J].中草药,16(10):17,1985
- 4 何照范,张迪青.保健食品化学及其检测技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999.141~142
- 5 Talia M, Irina S, Guy F, et al. A spectrophotometric assay for alliin, alliinase, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 307(1): 76~83
- 6 Roman K, Marketa S, Jan V. Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 862(1): 85~94
- 7 Michael K, Martina J, Ingo K et al. Development of a biosensor specific for cysteine sulfoxides[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2003, 18(5~6): 805~812
- 8 Michael K, Martina J, Ingo K et al. Biosensor detection of the cysteine sulphoxide alliin[J]. Sensors & Actuators B, 2003, 95(1~3): 297~302
- 9 常军民,向阳,美丽万,等.蒜氨酸在大鼠的药代动力学研究[J].中成药 2004,26(3):184~186
- 10 常军民,向阳,张丽静,等.HPLC-MS法测定小鼠血浆中蒜氨酸的浓度[J].新疆医科大学学报 2003,26(6):532~533,536
- 11 王伟萍,常军民,陈坚.HPLC法测定蒜酶催化蒜氨酸生成大蒜辣素的配比及稳定性研究[J].新疆医科大学学报,2003,26(6):534~536
- 12 王晓明,陈坚.HPLC法测定蒜氨酸含量[J].新疆医科大学学报,2003,26(6):602
- 13 常军民,陈坚,张丽静.HPLC法测定小鼠血浆中蒜氨酸的浓度[J].中成药,2003,25(3):230~231
- 14 Arnaut I, Christides J P, Mandon N, et al. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, alliinase and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 991(1): 69~75
- 15 王岩,李新霞,陈坚.薄层扫描法测定大蒜中蒜氨酸的含量[J].中国药学杂志,2003(3):217~218
- 16 黄雪松,宴日安.利用新鲜大蒜生产结晶蒜氨酸[J].食品科学,2004(11):200~203

## Determination of Alliin from Fresh Garlic by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography

Huang Xuesong Wen Lier Yan Rian

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

**ABSTRACT** The aim of the paper is to fast, conveniently, accurately determine the alliin in the fresh garlic (*Allium sativum* L.). The conditions by the reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) were: Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm) column, UV detector at 200 nm, 5% methanol and 95% phosphatic buffer (pH=5) as mobile phase at the flow rate of 0.5 mL/min, column temperature at 20℃. The calibration graphs were linear in the range of 10~350 μg/mL alliin. The retention time were determined based on both pure alliin and the peak difference between samples with the alliinase reaction and without alliinase reaction. The variation coefficient was 3.39%. The recovery rate was 97 ± 2.0%. Alliin in the fresh garlic was 1.2815 ± 0.0697%. We concluded that this is a sensitive, specific, simple and accurate method.

**Key words** garlic (*Allium sativum* L.), alliin, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

信  
息  
窗

### 仪器信息网“学术会议”栏目正式开通

仪器信息网(<http://www.instrument.com.cn>)于2005年3月15日正式开通了“学术会议”栏目。该栏目是广大科技人员科学研究与学术交流的信息服务平台,为科技人员以快速、简便的方式发表科研新思想和研究论文提供了一个专门的途径。我们利用现代信息技术手段,为用户提供学术会议信息预报、分类搜索、在线报名、在线投稿、各种会议信息发布等服务,旨在及时传递分析行业学术会议信息,共同促进学术交流,更广泛地宣传学术会议信息,进一步加强广大科技人员的交流与联系。

目前该栏目根据学术会议与分析行业的相关程度、会议规模以及与本网合作程度分了重点推荐学术会议、推荐学术会议、推荐学术会议三个类别,同时为扩大宣传效果,我们还为重点推荐、推荐的学术会议在本网做强大的网上广告宣传,提供免费网址,在本网网刊《仪器快讯》印刷版上发布相关信息,在本网“业界要闻”栏目及时为学术会议报道该会议的最新进展、相关通知及后续报导。

欢迎访问:<http://www.instrument.com.cn/conference>