

高效毛细管电泳法测定大蒜中蒜氨酸含量

马海乐, 杨恒星, 代春华, 辛志宏

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 建立了一种快速、准确测定蒜氨酸的毛细管电泳方法。CE条件: 熔融石英毛细管 50cm × 50 μm, uncoated; 磷酸缓冲溶液 30mmol/ml, pH6.0; 分离电压 21 kV(+)-(-); 电泳时间 7min; 电泳温度 30℃; 压力进样 0.5psi × 5sec; 柱上检测 UV 196nm(DAD)。结果样品可在 6min 内出峰, 测得蒜氨酸浓度在 10~100 μg/ml 范围内与峰高的线性关系良好, 相关系数 $r=0.998$, 平均回收率为 98.56%, 批内 RSD 为 1.74%, 批间 RSD 为 2.83%。

关键词: 高效毛细管电泳; 蒜氨酸; 测定

Determination of Alliin in Garlic by Capillary Chromatography

MA Hai-le, YANG Heng-xing, DAI Chun-hua, XIN Zhi-hong

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To develop a fast and accurate method for determining the Alliin content in garlic using High Performance Capillary Chromatography. CE method: bare fused-silica capillary 50cm × 50 μm; phosphate buffer 30mmol/l at pH 6.0; running voltage 21KV; polarity from anode (inlet) to cathode (outlet); separate time 7min; temperature 30℃; sampling 0.5psi × 5s; online detection at 196nm (DAD). The sample could be separated in 6min. The linearity relationship of Alliin concentration and peak value was good in the range of 10~100 μg/ml. The related coefficient was $r=0.998$, average recovery rate 98.56%, and the intraday precision 1.74%. The inter-day RSD precision was 2.83%.

Key words: HPCE; Alliin; determination

中图分类号: O657.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0189-04

收稿日期: 2003-11-03

基金项目: 江苏省农业攻关项目(BE2001517)

作者简介: 马海乐(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事食品功能因子的研究。

在确定络合物的有机萃取溶剂时, 文献中多用氯仿, 但在本实验中, 氯仿萃取液吸光值偏小, 因此我们试用其它有机溶剂, 发现二氯甲烷比较理想。

槲樟中生物碱含量比较低, 为 1.4% 左右。符合植物中生物碱含量规律, 味道比较苦涩的植物中生物碱含量较大; 比较香甜的植物中糖含量比较高, 而生物碱含量较低。

本实验中我们对用酸性染料法测定槲樟果实中生物碱的方法进行了比较详细的研究。确定了最佳测定条件, 并且测定出槲樟中生物碱的含量。认为此方法快速简单, 准确易行。

参考文献:

- [1] 茹克娅, 沙德克, 等. 《维吾尔常用药材学》(上册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993. 233.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海人民出版社, 5068-5072.
- [3] 谭仁祥, 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 363.
- [4] 张贵君. 中药鉴定问题解答[M]. 黑龙江中医学院, 1990. 58.
- [5] 张继芝. 中药化学(第2版)[M]. 北京: 人民出版社, 1993. 62, 297.
- [6] 赵烽, 张盟佳, 姚新生. 中草药, 2000, 31(9): 660.

蒜氨酸(Alliin)化学名为: S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷(S-allyl-L-cysteinesulfoxide, SACS)是百合科葱属植物大蒜 *Alliumsativum* L 中独特的含硫氨基酸。蒜氨酸是大蒜中重要的生物活性物质,是大蒜素的前体,在蒜氨酸酶(Alliinase)存在的条件下可转化为大蒜素,转化过程如图1所示^[1]。研究证明,蒜氨酸具有降血脂、抗血小板凝集、抗肿瘤、降血糖、协同降压等功能^[2],近年来对蒜氨酸的研究得到许多学者的关注,已有相关产品问世^[3,4]。蒜氨酸的含量成为评定大蒜及其制品的重要指标,但其检测方法还不成熟。已报道的检测方法有 HPLC^[5~8]、GC^[9]、高效离子色谱(IPC)^[10]及分光光度法^[11,12],但这些方法前处理复杂,多数需要衍生化,检测周期长,在应用中受到限制。因此,本文建立的高效毛细管电泳法测定 Alliin 具有重要的意义。

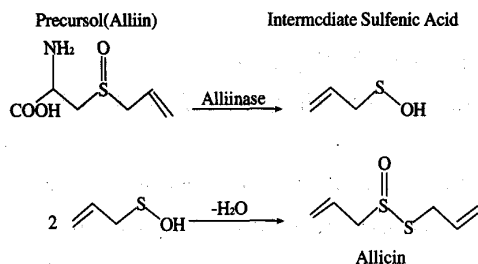


图1 蒜氨酸转化为大蒜素的机制

Fig. 1 Simplified mechanism of allicin formation

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

COULTER P/ACETM 高效毛细管电泳仪 美国 BECKMAN 公司; Karat Software Version 5.0 工作台, DAD 检测器; Pellicon 小型超滤系统 美国 Millipore 公司; CRAY 100 紫外分光光度计 Varian 公司; RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; PHS-3C 型精密酸度计 上海雷磁创盖仪器仪表有限公司。

1.2 试剂及原料

Alliin 标准品 Sigma 公司; SDS FARCO 公司; 其余试剂为普通分析纯; 试验用水均为双蒸水; 原料为当地市售大蒜。

1.3 标准溶液的配制

精密称取 Alliin 标样 10mg 溶于 100ml 容量瓶中, 加双蒸水定容(温度 < 10℃), 得 100 μg/ml 标准溶液。准确移取该溶液 20、15、20、10、5ml 分别加入 25、25、50、50、50ml 容量瓶中, 定容得 80、60、40、20、

10 μg/ml 标准溶液。

1.4 样品的前处理

精确称取去皮大蒜 20.51g, 置于 600ml 沸水中加热 10min 灭酶, 取出后经高速组织破碎机打成匀浆, 转入 150ml 三角瓶中, 加入 100ml 60% 乙醇溶液, 超声浸提 20min, 然后 4000r/min 离心 15min, 取上清液浓缩至 10ml, 加入五倍体积的无水乙醇脱蛋白, 4℃ 静置过夜, 然后二次离心 4000r/min 15min, 上清液稀释至 3000ml, 过 Pellicon 超滤膜(MW 10kD), 收集滤过液得样品。

1.5 紫外扫描

为确定毛细管电泳中的最佳检测波长, 对标样(100 μg/ml)进行紫外扫描, 范围 190~400nm, 扫描图谱如图2所示。

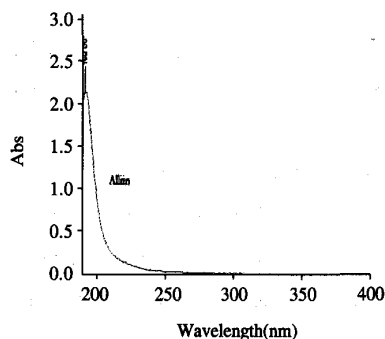


图2 蒜氨酸标准品在 190~400nm 波段的吸光度扫描图谱

Fig.2 UV scan absorption spectra of Alliin in the range of 190~400nm

1.6 电泳条件

未涂层石英毛细管(BECKMAN 公司)50cm × 50 μm; 磷酸缓冲溶液 30mmol/ml, pH6.0; 分离电压 21kV(−)→(+); 电泳时间 7min; 电泳温度 30℃; 压力进样 0.5psi × 5s; 柱上检测 UV 196nm (DAD)。清洗程序: 第一次进样前分别以甲醇、双蒸水、0.1mol/L HCl、双蒸水、0.1mol/L NaOH、双蒸水、缓冲溶液冲洗毛细管 20psi × 2min; 两次进样间用 0.1mol/L NaOH、双蒸水、缓冲溶液冲洗 20psi × 2min。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确立

Alliin 标样(100 μg/ml)紫外扫描如图2所示, 最大吸收波长 λ_{max}=192nm, 考虑到检测器自身的稳定性, 试验中选用 196nm。

2.2 缓冲液 pH 对分离效果的影响

缓冲溶液的 pH 是影响分离效果的首要因素, 本试验中配制了一系列 30mmol/L 的不同 pH 的磷酸缓冲溶液, 用以考察 pH 对分离的影响。测试结果如图 3 所示, 当磷酸缓冲液 pH < 6.0 或 pH > 8.0 时, 保留时间变长, 当 pH 为 6.0、7.0、8.0 时保留时间比较理想。其中 pH=6.0 时, 分离时间最短, 峰形最佳, 故选定缓冲液的 pH 值为 6.0。

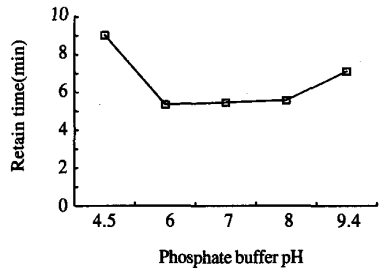


图3 保留时间与缓冲液 pH 的关系
Fig.3 The relation between buffer pH and retain time

2.3 缓冲液浓度及分离电压对分离的影响

在 pH 为 6.0 的条件下, 考察了一系列不同浓度的磷酸缓冲溶液对分离的影响。试验证实, 浓度较小时出峰快, 随着浓度增大, 分离时间延长, 当缓冲液浓度大于 100mmol/L 时峰形变差, 本试验选用 30mmol/L 的磷酸缓冲溶液。另外, 在选定的 pH、浓度下, 又进一步试验了不同电泳电压对分离的影响, 结果显示, 随着电压的增大, 分离时间缩短, 分离效率提高, 但电泳电压过高会产生较多的焦耳热, 影响分离的稳定性, 故试验选定 21kV 为最佳分离电压。

2.4 线性关系

分别对标样的六个浓度梯度进行 CE 检测, 然后对 Alliin 浓度和相应峰高作线性回归。结果表明 Alliin 在

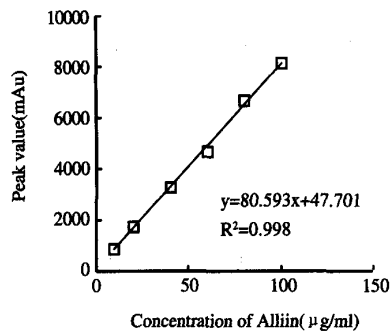


图4 蒜氨酸浓度与峰高响应值的线性关系
Fig. 4 The linearity of Alliin concentration and peak

10~100 μg/ml 范围内呈良好的线性关系, 回归方程 $H_{peak}=80.593 \times C_{Alliin}+47.701$; $r=0.998$ 。

2.5 检测限

取信噪比为 3 时(S/N=3), 则 Alliin 在该 CE 条件下的最低检测限为 1 μg/ml。

2.6 精密度

取经过前处理的样品分别做批内和批间误差测定。批内测定时, 同一样品连续测三次, 测得样品浓度的 RSD%=1.74; 批间测定时, 同一样品在不同时间分别测

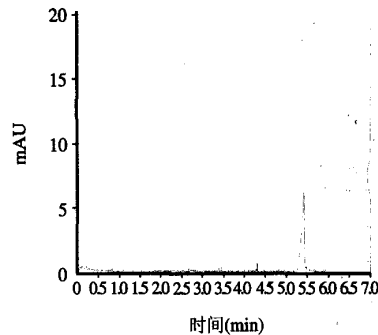


图5 蒜氨酸标准品 CE 图谱
Fig. 5 Electropherograms of standard Alliin

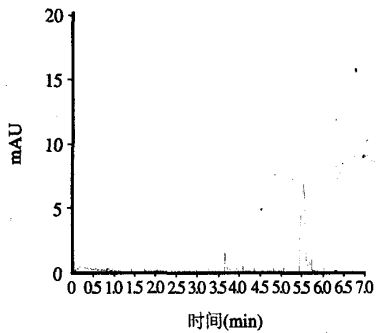


图6 大蒜样品的 CE 图谱
Fig. 6 Electropherograms of garlic sample(MW<10kD)

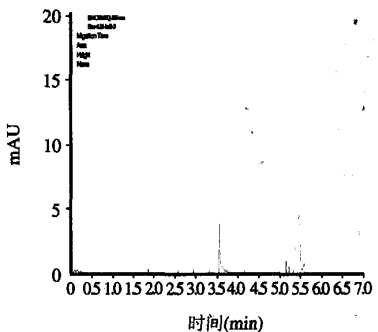


图7 灭酶蒸煮液的 CE 图谱
Fig. 7 Electropherograms of boil-water

三次,测得样品浓度的 RSD%=2.83。

2.7 加样回收率

准确量取一定量的样液三份,分别加入等体积的 60、80、100 μg/ml 的 Alliin 标样,测得平均回收率 98.56%。

3 结 论

3.1 前处理损失

在前处理中有高温灭酶步骤,对灭酶的蒸煮液进行 CE 分析,结果发现有明显的 Alliin 存在。所以,Alliin 的含量应为:

$$\text{Alliin}\% = \frac{C_{\text{sample}} \times 3000 + C_{\text{boilwater}} \times 600}{20.51 \times 10^6} \times 100\%$$

式中: C_{sample} : 样液的 CE 检测浓度平均值;

$C_{\text{boilwater}}$: 蒸煮液 CE 检测浓度平均值;

试验测得原料中 Alliin 含量为 1.64%。

3.2 胶束毛细管电泳检测(MEKC)

本试验还尝试了胶束毛细管电泳法分离的情况,并对缓冲液的 pH 值、浓度、电压、SDS 浓度等条件作了优化,结果表明:磷酸缓冲液浓度为 30 mmol/L; pH=7.0; 分离电压 18kV; SDS 浓度 35 mmol/L 时分离效果最好。与上述的毛细管区带电泳(CZE)相比,MEKC 法具有峰宽窄,理论塔板数高,线性关系好等优点。但其重现性较 CZE 法差,批间连续六次检测,保留时

间变化明显。在前处理充分的条件下,此方法也可用于 Alliin 的定量检测。

参考文献:

- [1] E Bartholomeus Kuettner, Rolf Hilgenfeld, Manfred S Weiss. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 402: 193.
- [2] Staoshi T, Junya M. Biol Chem, 1979, 43(10): 2021-2028.
- [3] <http://www.wholehealthdiscountcenter.com>
- [4] <http://www.galishen.com/jddal1.htm>
- [5] E Mochizuki, A Nakayama, Y Kitado, et al. J Chromatogr, 1989, 455: 271.
- [6] I Krest, J Glodek, M Keusgen, J Agric Food Chem, 2000, 48: 3753.
- [7] J Auger, F Mellouki, A Vannereau, et al. Chromatographia, 1993, 36: 347.
- [8] S J Ziegler, O Sticher. Planta Med, 1989, 55: 372.
- [9] R Kubec, M Svobodova, J Velysek. Chromatogr A, 1999, 862: 85.
- [10] Arnault, J P Christides, N Mandon, et al. Journal of Chromatography A, 2003, 991: 69-75.
- [11] Talia Miron, Aharon Rabinkov, David Mirelman, et al. Analytical Biochemistry, 1998, 265: 317-325.
- [12] Talia Miron, Irina Shin, Guy Feigenblat, et al. Analytical Biochemistry, 2002, 307: 76-83.

《食品科学》撰稿要求

1. 稿件(附软盘或电子邮件)要求论点明确,论据可靠,数据准确,文字通顺,简练。
2. 引用他人成果时,请按《著作权法》有关规定说明出处。内容应未曾发表过或被其他出版物刊载过,且无一稿两投。英文稿件可接收,但应把题目、作者、单位、摘要、关键词译成中文。
3. 稿件要求 6000 字以内,须有中图分类号,文献标识码,第一作者简介,中、英文标题,中英文单位、作者,并做 200 字左右的中、英文摘要和 3~8 个关键词,表题、图例请用中英文对照。
4. 凡属于重大科技获奖的论文和国家级省部级资助项目的研究报告、论文,请来稿注明批准号,我刊将优先刊登。
5. 来稿内容涉及配方时,须写明配料的名称和配比,勿用代号;工艺过程要完整,不要省略;插图、表格需放在正文的相应地方,不要集中;引用图表要有出处,计量要用法定单位。
6. 文稿中的参考文献不得超过 40 条,其格式请按如下规定表达:
[期刊]主要责任者.文献题名[J].刊名,年,卷(期):起止页码.
[书籍]主要责任者.文献题名[文献类型标识].出版地:出版者,出版年.起止页码(任选).
附 文献类型标识
专著[M]、论文集[C]、报纸文章[N]、期刊文章[J]、学位论文[D]、报告[R]、标识[S]、专利[P]
7. 来稿请注明详细地址和电话,便于通知联系。
8. 电子信箱(E-mail):chnfood@chnfood.cn
9. 来稿请寄:100076 北京市南苑西红门路 8 号《食品科学》编辑部
10. 稿件查询电话:010-88389456/57/58/59/60-0