

技术与方法

一种方便快速检测蒜素的方法

赫 坚^{1*} 赵 静^{1,2}

(中国科学院视觉信息加工重点实验室中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心 北京 100101)¹
(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)²

摘要: 基于硝基硫代苯甲酸 (2-nitro-5-thiobenzoate, NTB) 与硫代亚磺酸脂 (Thiosulfonates) 反应, 对蒜素 (allicin) 进行检测。一分子 allicin 与两分子 NTB 进行反应, 形成 NTB 二硫键衍生物, 通过吸光值 (A_{412}) 的测定来计算蒜素 (allicin) 含量。

关键词: 蒜素, NTB, 吸光值

中图分类号: Q6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 06-0087-03

A Rapid Convenient Assay of Allicin

HE Jian^{1*} ZHAO Jing^{1,2}

(Lab of Visual Information Processing, Center for Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)¹
(School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029)²

Abstract: On the basis of the reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfonates, a convenient assay of allicin is introduced. One mole of allicin reacts with two mole of NTB producing two mole of disulfide derivatives and resulting in decrease at absorbance at 412 nm. By this method, the concentration of allicin can be readily determined.

Key words: Allicin, 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB), Absorbance

蒜素 (allicin, diallylthiosulfinate, 即烯丙基硫代亚磺酸丙酯) 为大蒜所含有的特殊成分, 具有抑制病原微生物、抗肿瘤、抗血小板聚集、提高纤维蛋白溶解活性、降血脂、降血糖和保护脑细胞等作用^[1]。近年来, 对蒜素生物学性质和药理学作用的研究日益受到国内外同行的重视^[2]。而目前蒜素的测定多采用 HPLC (高效液相层析) 方法, 虽然重复性较好, 但是所需时间较长, 并且需要较为昂贵的标准试剂和专用仪器。基于硝基硫代苯甲酸与硫代亚磺酸脂的反应, 本文介绍一种方便、快捷检测蒜素的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

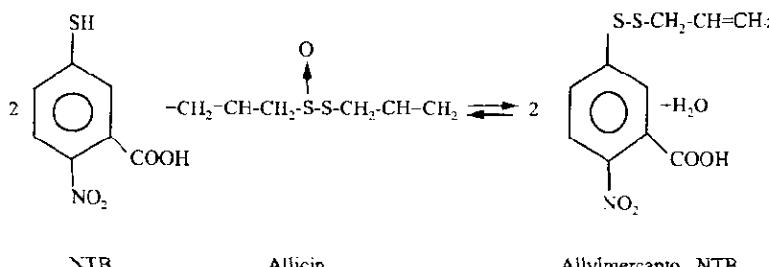
5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid, DTNB) 和巯基乙醇购于 Sigma 公司; 蒜素样品购于 Rolmex 公司, 试样为市售鲜蒜 (四川独蒜和山东瓣蒜)。其它试剂均为国产分析级。吸光值用日立 (HITACHI) U-2010 紫外分光光度计测定。

* 联系人 Tel: 010-6488-8531, E-mail: hesjian@sohu.com

收稿日期: 2004-04-08, 修回日期: 2004-05-17

1.2 方法

1.2.1 原理: Allicin 分子中的 “-S(O)-S-” 键和硝基硫代苯甲酸 (2-nitro-5-thiobenzoate, NTB) 反应, 形成二硫键衍生物, 在波长 412 nm 时出现吸光值下降, 其反应式为:



NTB 溶液在波长为 412 nm 时吸光值的变化与蒜素的摩尔数成正比, 所测吸光值的减少量 ΔA_{412} 除以 E_{412} ($28,300 \text{ mol/L cm}^{-1}$), 可得溶液中的蒜素摩尔数, 根据其分子量就可计算出用 mg/mL 表示的蒜素含量^[3]。

1.2.2 NTB 试剂的制备: 1.0 g DTNB 溶于 50 mL 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 加入 5 mL 疏基乙醇。室温下反应 5 min, 逐渐加入 6 mol/L HCl, 将 pH 值调至 1.5 左右。样品置于 4℃ 过夜, 可见橙黄色结晶形成, 过滤并用稀盐酸洗涤, 干燥后即得到 NTB 试剂粉末, 室温下避光储存^[4]。

1.2.3 鲜蒜样品溶液的制备与测量: 采用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA, pH 7.2), 新鲜配制 0.12 mmol/L NTB 反应试剂。称取鲜蒜 2 g, 加入到 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液 10 mL 中 (pH 6.5), 研磨匀浆, 置于离心机中, 在 4℃ 以 8,000 r/min 离心 20 min, 然后移取 15 μL (约含蒜素 0~3 μg) 加入 NTB 溶液, 定容至 1.0 mL, 室温下反应 30 min, 测定波长为 412 nm 的吸光值, 根据样品反应前后吸光值的差 ΔA_{412} 计算 allicin 的含量, 所测数据用 Microcal Origin 6.0 进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 检测结果

如本试验测得的吸光值光谱 (图 1) 所示, 加入蒜素的 NTB 溶液在 412 nm 的吸光值逐渐下降。从 Rolmex 公司蒜素测定数据 (表 1) 所绘标准曲线 (图 2) 可见, NTB 吸光值的变化量 ΔA_{412} 与蒜素含量 (mg/mL) 呈线性相关 (线性范围为 0.1~10 μg, 相关系数为: 0.9973), 所测样品的蒜素含量为: $C_{\text{allicin}} (\text{mg/g}) = 2.735 \pm 0.140$ 。

按本文 1.2.3 的制备方法, 测定四川独蒜与山东瓣蒜中蒜素 (allicin) 的含量, 结果分别为: $1.23 \pm 0.026 \text{ mg/g}$ 和 $1.19 \pm 0.022 \text{ mg/g}$ (表 2)。

表 1 应用 NTB 法对鲜蒜 allicin 的测定结果

样品来源	样品质量 (mg)	反应溶液 (mL)	ΔA_{412}	Allicin (mg/g garlic)
四川	6.0	1.0	1.298	1.23 ± 0.025
山东	6.0	1.0	1.248	1.19 ± 0.022

表2 Rolmex公司不同浓度样品与吸光值变化量对照表

样品 (mg/mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
ΔA_{412}	0	0.232	0.48	0.78	0.924	1.175

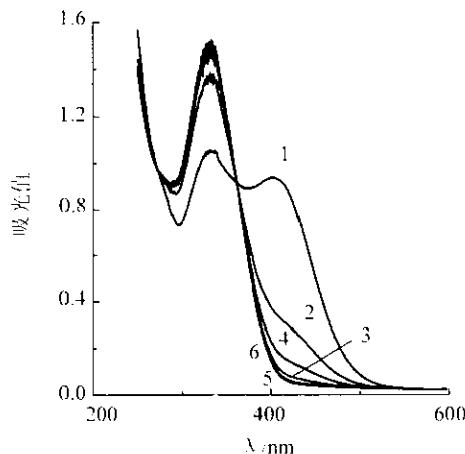


图1 NTB与蒜素反应的曲线

曲线2~6为在1mL NTB溶液中加入15 μL鲜蒜试样在1.5、3、6、12、30 min时的光吸收光谱，曲线1是未加入allicin时NTB的光吸收光谱

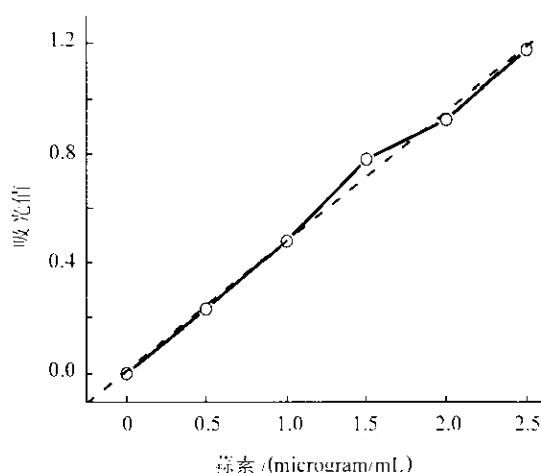


图2 根据表2数据所绘的标准曲线

2.2 讨论

本文所提供的基于NTB与硫代亚磺酸脂(Thiosulfonates)的反应，应用吸光值检测蒜素(allicin)含量的方法，与目前的HPLC(高效液相层析法)和GC(气相层析法)相比，不需要价格昂贵的allicin标准品和专用设备，有一台分光光度计即可操作。测定方法简单、快速，这对于检测化学半衰期很短的allicin具有十分重要的意义，一般半个工作日即可完成所有检测工作。由表1检测结果可见，所测数据具有明显的线性关系(图2)，本实验室已对市售多种大蒜制品进行了测试，具有良好的可重复性。

致谢 本文经赫荣乔博士悉心审校，特此感谢！

参 考 文 献

- [1] Elkayam A, Mirelman D, Peleg E, et al. Am J Hypertens, 2003, **16** (12): 1053~1056.
- [2] Sun L, Wang X. World J Gastroenterol, 2003, **9** (9): 1930~1934.
- [3] Miron T, Robinkov A, Mirelman D, et al. Anal Biochem, 1998, **265** (2): 317~325.
- [4] Degani Y, Patchornik A. J Org Chem, 1971, **36** (18): 2727~2728.