

大蒜素和有机溶剂对蒜氨酸酶活性及大蒜油组成的影响

李文清, 周华, 胡兴鹏, 晏日安, 黄雪松, 欧仕益, 邱瑞霞

(暨南大学理工学院, 广东广州 510632)

摘要: 大蒜油具有重要的生物活性和调味功能。本文以化学合成的蒜氨酸为原料在蒜酶的催化下制备大蒜油, 研究中间产物大蒜素、萃取溶剂对蒜酶活性的影响, 以及溶剂对大蒜油组成成分的影响。结果显示: 大蒜素在一定程度上会抑制蒜酶的活性, 但不会导致蒜酶的完全失活; 有机溶剂对蒜酶的影响比较复杂, 其中氯仿、二氯甲烷使蒜酶活性完全丧失, 而正己烷、正戊烷对蒜酶的活性影响则不明显。采用气质联用、核磁共振二维谱表征了不同溶剂下大蒜油的组成。用氯仿、正己烷等非极性溶剂萃取大蒜素, 得到的大蒜油以 3-乙烯基-1, 2-二硫环己-4-烯(4X)和 3-乙烯基-1, 2-二硫环己-5-烯(5X)为主; 而用乙酸等质子溶剂萃取, 则大蒜油成分以二烯丙基三硫醚 (DATS)、二烯丙基二硫醚 (DADS) 为主。

关键词: 大蒜油; 蒜氨酸; 蒜氨酸酶; 大蒜素

文章编号: 1673-9078(2014)11-79-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.015

Effects of Allicin and Organic Solvents on the Alliinase Activity and Composition of Garlic Oil

LI Wen-qing, ZHOU Hua, HU Xing-peng, YAN Ri-an, HUANG Xue-song, OU Shi-yi, QIU Rui-xia

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

Abstract: Garlic oil has important biological activities and flavoring functions. In this study, garlic oil was prepared by using alliinase as catalyzer and allicin which was chemically synthesized as a raw material; meanwhile, how the intermediate product, allicin, and extraction solvents affect alliinase activity were investigated and the effect of solvents on the composition of garlic oil was explored. The results indicated that allicin partially inhibited alliinase activity, but did not lead to complete inactivation of alliinase. Further, organic solvents had a complicated effect on alliinase activity. Chloroform and methylene chloride caused complete inactivation of alliinase, whereas no obvious effects were observed with n-hexane and n-pentane. Gas chromatography-mass spectrometry and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy were employed to characterize the components of garlic oil in different solvents. Extracting allicin with non-polar solvents, such as chloroform and hexane, resulted in garlic oil that primarily contained 3-vinyl-1,2-disulfide cyclohex-4-ene (4x) and 3-vinyl-1,2-disulfide cyclohex-5-ene (5x), whereas extracting allicin using polar solvents, such as acetic acid, resulted in garlic oil composed primarily of diallyl sulfide (DATS) and diallyl disulfide (DADS).

Key words: garlic oil; alliin; alliinase; allicin

大蒜油是从大蒜中提取得到的有着重要生物活性的混合物, 具有广泛的抗菌、抗病毒、防衰老、防金属中毒、防癌抗癌、抗氧化等作用, 可用于治疗感染性疾病、消化系统疾病、口腔疾病、心脑血管疾病等^[1-2]。

目前, 大蒜油的来源和制备主要有两种方式: 第一种方法是将大蒜中的蒜酶和蒜氨酸转化生成大蒜素后, 再提取得到大蒜油。提取方法包括超临界法、水

蒸气法、溶剂法, 因提取方法不同, 大蒜油的收率存在显著差异^[3]。该方法的最大优点在于产物为纯天然产品, 缺点是大蒜中大蒜油的折合含量仅有 0.3%, 因此应用上受到很大限制。第二种方法是化学合成法^[4], 该法得到的产物与天然的大蒜油并非完全一致, 所以难免会引起人们对安全性的担忧, 因此目前化学合成的大蒜油主要用作饲料的添加剂。

利用蒜氨酸酶转化蒜氨酸制备大蒜素, 已有许多文献报道, 主要是对蒜氨酸酶的影响因素研究, 如温度等^[5], 还有提高蒜氨酸酶转化效率的方法研究^[6-9], 例如酶固定化、超声或微波的使用等。这些理论研究

收稿日期: 2014-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101323)

作者简介: 李文清 (1989-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品化学

通讯作者: 周华 (1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学

的目的都是为改善从大蒜中提取大蒜油的效率问题,但大蒜中蒜氨酸含量较低的问题依然没有解决。针对这一困境,本文提出一种以消旋体蒜氨酸(化学半合成)为原料,在蒜氨酸酶作用下,转化生成大蒜油的前体物质—大蒜素,然后通过有机溶剂连续萃取,得到成分可以调控的大蒜油。该方法可以解决两方面的问题:第一,蒜氨酸酶在转化蒜氨酸形成大蒜素的过程中,蒜氨酸酶的活性随时间的延长,酶活下降。本文借助适合的有机溶剂边反应边萃取,改善蒜酶的活性。第二,通过有机溶剂的萃取,利用溶剂效应调节大蒜素的分解产物,得到成分可控的大蒜油。

1 实验部分

1.1 实验材料及仪器

高效液相色谱,美国安捷伦公司;UV3600紫外-可见分光光度计,日本SHIMADZU公司;电子天平Acculab ALC210,德国Sartorius公司;二烯丙基二硫醚、双氧水、乙醇、正戊烷、蒜氨酸酶等试剂均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.2 大蒜素的合成

大蒜素按参考文献合成^[10]。将1.46 g二烯丙基二硫醚溶于30 mL氯仿,间氯过氧苯甲酸溶于5 mL氯仿中。在0 °C下将间氯过氧苯甲酸溶液缓慢滴入到二烯丙基二硫醚溶液中,0 °C下搅拌1 h。然后在剧烈搅拌下分多次加入碳酸钠共8 g,0 °C下继续搅拌1 h。滤去残渣,减压蒸发滤液,除去氯仿,得到粗制大蒜素。将其用柱层析法(洗脱液为石油醚:乙酸乙酯=20:1)纯化,纯化得到的大蒜素置于冰箱中保存。经核磁测定产物结构,其氢谱和碳谱数据为¹HNMR (400 MHz, CD₃COOD): δ 3.72~3.92 (m,4H), 5.20~5.56 (m, 4H), 5.88~5.99 (m, 2H) ppm; ¹³CNMR (75MHz, CD₃COOD): δ 35.02、59.90、119.10、124.00、125.80、132.90 ppm。与文献数据一致^[10]。

1.3 蒜氨酸的合成^[11]

蒜氨酸按文献方法合成。L-半胱氨酸盐酸盐7.9 g溶于200 mL水中,在0 °C下不断搅拌加入10 mL 30%的浓氨水。然后滴加10 mL烯丙基溴,搅拌24 h,浓缩溶液,用水重结晶得到白色固体S-烯丙基-L-半胱氨酸。而后将上述物质溶于100 mL水中,在0 °C下加入10 mL 30%的双氧水,反应24 h,浓缩溶液,重结晶即可得到蒜氨酸。经核磁测定产物结构,其氢谱和碳谱数据为¹HNMR (400 MHz, D₂O): δ 3.23-3.45 (m, 2H), 3.60~3.90

(m, 2H), 4.22 (m, 1H), 5.50~5.56 (m, 2H), 5.90 (m, 1H) ppm; ¹³CNMR (75 MHz, H₂O): δ 52.0、53.1、57.0、127.2、125.8、138.2、174.2 ppm。与文献数据一致^[11]。

1.4 大蒜油的生物合成

取1 mL 1 mol/L蒜氨酸的磷酸缓冲液(pH 6.5)在30 °C下预保温5 min,与0.05 mL浓度为1.0 g/L蒜氨酸酶液反应一定时间,立即加入10% (m/V)三氯乙酸1.5 mL终止反应。反应后用有机溶剂萃取反应产物。

1.5 大蒜素对蒜酶的影响研究

分别加入1、2、3、4、5 μL大蒜素到0.05 mL浓度为1.0 g/L蒜氨酸酶溶液中,然后再加入1 mL浓度为1 mol/L的蒜氨酸溶液,在30 °C下开始反应,反应20 min后,测定蒜氨酸酶酶活。

1.6 蒜氨酸酶酶活的测定

采用丙酮酸法测定。反应液与0.5 mL 2,4-二硝基苯肼(100 mg 2,4-二硝基苯肼溶于100 mL 2 mol/L的盐酸)25 °C保温5 min,加入5 mL 0.5 mol/L的NaOH溶液,25 °C保温10 min后于520 nm下比色,测定其吸光度。

1.7 大蒜油的含量与分布分析

Aglient GC-MS7890A/5975E气质联用仪。毛细管柱(HP-5MS): 30 m×0.25 mm;膜厚度0.25 μm,以7 °C/min升温至250 °C,保持5 min。进样口温度:200 °C,载气:氦气,流速:5.8 mL/min,质谱条件:电子轰击离子源,电子能量为70 eV,离子源温度250 °C,传导线温度250 °C,四级杆温度180 °C,质量扫描范围35~400 (m/z)。

1.8 计算方法

采用B₃LYP方法,在6-31+G基组下,用能量梯度法分别对几何构型进行了全参数优化。所有单点能的计算在6-311++G(d,p)基组下计算得到(加入零点能校正),单位为kJ/mol。

2 结果与讨论

2.1 大蒜素对蒜酶活性的影响

2.1.1 蒜氨酸酶酶活随反应时间的变化

蒜氨酸酶的活力随时间变化的关系如图1所示。随着时间的延长,蒜氨酸酶的活力从开始500 U减少到300 U,时间仅需要30 min,而后基本保持不变,

此结果与文献报道的基本吻合^[12],说明反应时间是影响蒜氨酸酶活力的重要因素。蒜氨酸酶活力为什么会先逐渐减少,而后保持不变?是否与蒜氨酸的生成产物(大蒜素)对蒜氨酸酶的影响有关?

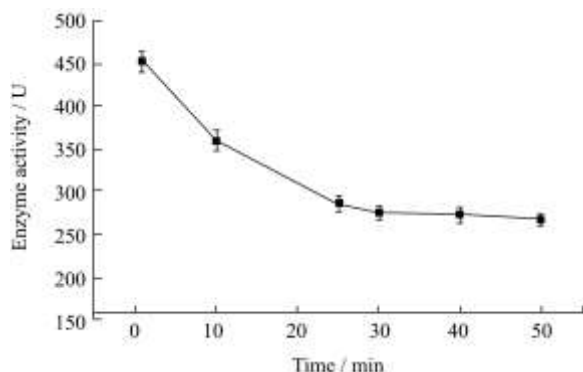


图1 时间对蒜氨酸酶活的影响

Fig.1 The effect of reaction time on alliinase activity

2.1.2 大蒜素的添加量对酶活性的影响

为了评估蒜氨酸生成产物大蒜素对蒜氨酸酶活性的影响,将一定量的大蒜素提前加入到0.05 mL 蒜氨酸酶溶液中,然后与蒜氨酸开始反应,并测定其酶活力,结果如图2所示。

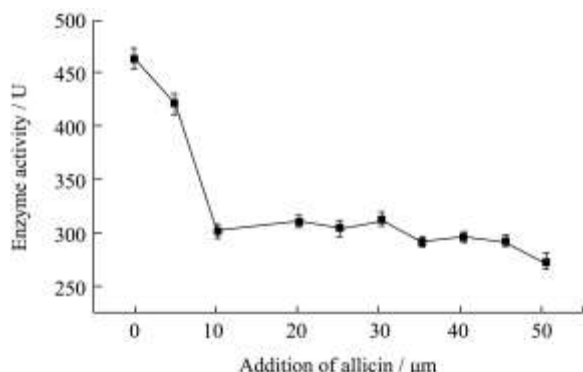


图2 大蒜素加入量(μm)对蒜酶活性影响

Fig.2 The effect of alliin addition on alliinase activity

从图2可以看出,当大蒜素的加入量低于2 μL时,随着添加量的增加,蒜氨酸酶的活力迅速下降;而当大蒜素的加入量大于2 μL时,蒜氨酸酶活力基本维持280 U左右。这一趋势与蒜氨酸酶活力随反应时间变化的趋势基本一致。大蒜素导致蒜酶部分失活与蒜酶活力随反应时间延长而衰减,其可能的原因在于:大蒜素容易与蛋白质分子中的巯基发生反应,从而改变蛋白质分子的亲水性,导致蒜酶的反应效率降低。

2.2 有机溶剂对蒜酶活性的影响

前文提到大蒜素对蒜氨酸酶的酶活有重要的影响,考虑如果把大蒜素及时萃取出反应体系,则可能避免大蒜素对蒜氨酸酶的负面作用。为了评价有机溶剂对蒜氨酸酶的影响,把50 μL的有机溶剂预先加入

到50 μL 蒜氨酸酶溶液中,20 min后测定其蒜酶活性,结果如图3所示。

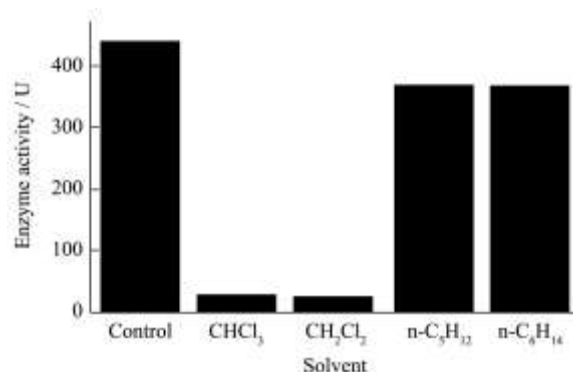


图3 溶剂对蒜氨酸酶活的影响

Fig.3 The effect of extraction solvent on alliinase activity

从图3可以看出,在蒜酶溶液中加入不同的有机溶剂后,蒜氨酸酶的活力均有所下降,但程度存在显著区别。加入氯仿、二氯甲烷后,蒜氨酸酶的酶活几乎完全丧失,而加入正己烷、正戊烷,则对蒜氨酸酶的影响较小,酶活仅损失了10%左右。对比图1与图3,不难得出结论:用正己烷、正戊烷将反应体系中的大蒜素及时地从反应体系中萃取出来,则更有利于保持蒜酶活力。

2.3 后续处理方式对产物分布的影响

2.3.1 不同萃取溶剂得到的大蒜油 GC-MS 分析

将用正己烷、氯仿等有机溶剂萃取得到的大蒜油进行气相色谱分析,结果如图4所示。

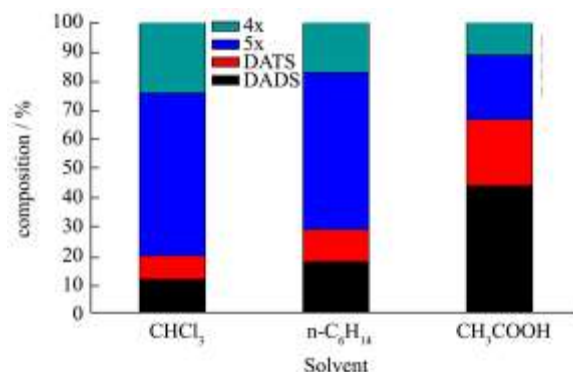


图4 溶剂对大蒜油组成的影响

Fig.4 The effect of extraction solvent on garlic oil composition

从图4可以看出有机溶剂对大蒜精油成分的影响显著。当溶剂为氯仿、正己烷时,产物中的主要成分为3-乙烷基-1,2-二硫环己-4-烯(4X)和3-乙烷基-1,2-二硫环己-5-烯(5X);当在正己烷萃取物中迅速加入乙酸,则得到大蒜油的主要成分为二烯丙基三硫醚(DATS)、二烯丙基二硫醚(DADS)。最终产品成分因溶剂不同而出现显著的区别。

2.3.2 大蒜油组成的二维核磁分析

对用氯仿萃取得到的大蒜油用二维核磁 HMBC 谱进行混合物分析, 结果如图 5 所示。

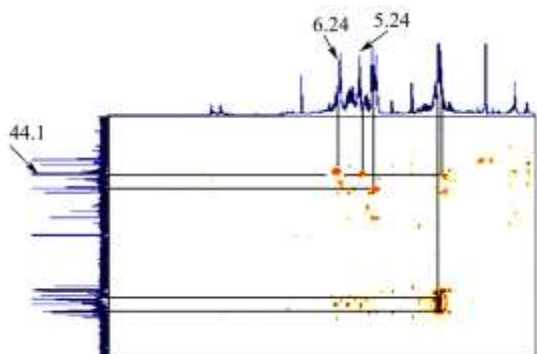


图 5 大蒜精油 HMBC 谱

Fig.5 The HMBC spectrum of garlic oil

从图 5 可以看出化学位移为 44.1 ppm 的叔碳与化学位移为 6.24 ppm 叔碳氢以及 5.24 ppm 的伯碳氢相关, 可以分析得到大蒜油中含有主要成分 3-乙炔基-1, 2-二硫环己-4-烯(4X)。此与采用高温分析的气相色谱得到的结果相吻合, 进一步确证了氯仿萃取大蒜油的组成。

2.3.3 大蒜素在不同溶剂中的可能转化过程

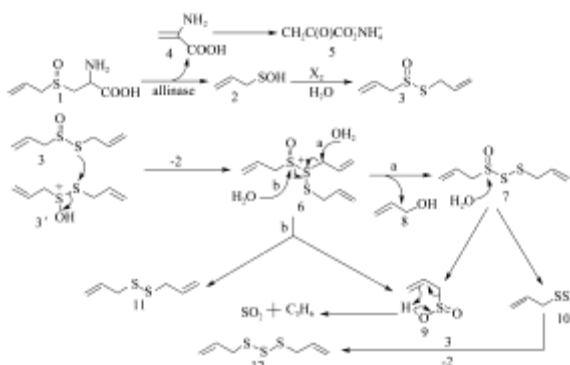


图 6 大蒜素在水中的转化过程

Fig.6 The transformation of alliin in water

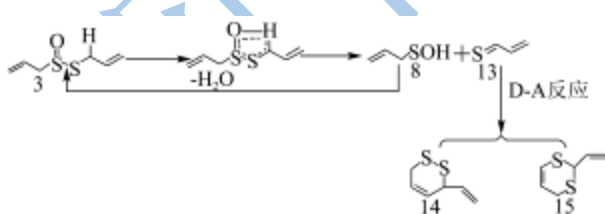


图 7 大蒜素在高温下的转化过程

Fig.7 The transformation of alliin at high temperatures

大蒜素在不同溶剂中, 生成不同的产物。原因并不非常清楚。文献报道大蒜素在水中可能发生如图 6 所示的转化^[13]。在水作用下, 最终会转化生成 11 (二烯丙基二硫醚)、12 (大蒜新素) 等物质 (见图 6 中的 a 和 b)。而大蒜素在高温下会发生如图 7 所示的反应

[10,14], 3 (大蒜素) 经 Cope 反应生成 8 与 13 (烯丙基硫醛), 而后者不稳定, 容易发生两分子间的 D-A 反应, 生成 14 (3-乙炔基-1, 2-二硫环己-4-烯(4X)) 和 15 (3-乙炔基-1, 2-二硫环己-5-烯(5X))。根据上述文献和本文的实验结果, 作者推断大蒜素在质子溶剂中可能发生类似于大蒜素在水溶液中的反应, 而在非极性溶剂中发生的反应过程则类似于大蒜素的高温分解反应 (见图 7)。

2.3.4 在不同溶剂中大蒜素转化的机理探讨

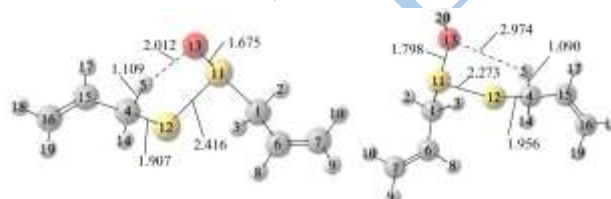


图 8 大蒜素质子化前后的优化构型、重要键长、原子编号

Fig.8 Optimized geometries, important bond lengths, and atomic numbers of alliin before and after protonation

在质子化和非质子溶剂中, 大蒜素呈现出最大的不同点在于质子溶剂中其容易形成氢键。本文采用理论计算探讨大蒜素质子化前后, 电荷、键长的变化。

采用 B₃LYP 方法, 在 6-311++G 基组下对大蒜素质子化前后的结构进行逐步优化, 获得大蒜素质子化的优化结构如图 8 所示, 计算了大蒜素质子化前后的电荷与键长以及能量的变化。从图 8 可以看出, 大蒜素质子化前后键长发生了显著的变化, 其中 O(13)与 H(5)之间的距离由 2.012 Å 变成 2.974 Å, 此意味着大蒜素质子化后难以发生分子内 Cope 反应。

表 1 大蒜素部分原子在质子化前后的自然电荷分布

Table 1 Natural electronic charge distribution around different atoms in alliin before and after protonation

体系	原子编号				
	4(C)	5(H)	11(S)	12(S)	13(O)
a	-1.160	0.328	0.545	0.235	-0.614
b	-0.897	0.295	0.497	0.393	-0.637

注: a: 质子化前; b: 质子化后。

表 1 列入了大蒜素分子质子化前后部分原子上的净电荷变化。从表 1 中可以看出, 质子对大蒜素原子中的电荷转移存在影响。质子化后, 大蒜素中 O (13) 因为有部分负电荷转移给质子, 所以 O (13) 上的自然负电荷增加了约 4%, 而 H(5) 的自然正电荷减少了约 11%, 这也从另一侧面反映了大蒜素质子化后 O(13) 与 H(5) 之间静电作用有所减弱, 说明大蒜素质子化后, 发生 Cope 消除反应的难度增大。相反, 在 S (12) 上带的正电荷增加了大约 67%, 说明其更容易接受水作为强电试剂的进攻, 最终断裂碳硫键, 发生如图 6 所示的转化。

3 结论

3.1 研究了大蒜素对蒜氨酸酶活性的影响。发现在蒜氨酸酶溶液中加入一定量大蒜素后,酶活显著下降,但达到一定量后,蒜酶活性保持不变,说明大蒜素是影响蒜氨酸酶活性的重要因素。

3.2 研究了有机溶剂对蒜氨酸酶活性有影响。其中氯仿、二氯甲烷可以导致蒜氨酸酶几乎完全失活,而正己烷、正戊烷对蒜酶活性的影响相对较小,仅下降10%左右。

3.3 研究了有机溶剂对大蒜油组成的影响,其组成因有机溶剂的不同而差别很大。其中以氯仿、正己烷等非极性有机溶剂萃取时,大蒜油的组成以3-乙炔基-1,2-二硫环己-4-烯(4X)和(3-乙炔基-1,2-二硫环己-5-烯(5X)为主;而以乙酸等质子溶剂萃取时,大蒜油的成分以二烯丙基二硫醚和二烯丙基三硫醚为主。

3.4 对大蒜素在不同溶剂中的转化机理进行了探讨。在非极性溶剂中,大蒜素O(13)与H(5)之间的键长更短,更有利于发生分子内的Cope消除;而在质子溶剂中,大蒜素中的S(12)上带的正电荷增加了大约67%,更容易接受亲电试剂的进攻,发生碳硫键断裂。

参考文献

- [1] Zeng T, Li Y, Zhang CL, et al. Garlic oil suppressed the hematological disorders induced by chemotherapy and radiotherapy in tumor-bearing mice [J]. Food Sci., 2013, 78(6): H936-H942
- [2] Cheng YC, Chang MH, Tsai CC, et al. Garlic oil attenuates the cardiac apoptosis in hamster-fed with hypercholesterol diet [J]. Food Chemistry, 2012, 136(3): 1296-1302
- [3] 罗兰,刘佳佳,何舒澜.不同提取方法的大蒜挥发油 GC-MS 比较分析[J].中成药,2008,30(1):139-141
LUO Lan, LIU Jia-jia, HE Shu-lan. Comparative analysis of garlic volatile oil GC-MS of different extraction methods [J]. China Tradion Medicine, 2008, 30(1): 139-141
- [4] 楚勇,赵敏政,徐鸣夏.二烯丙基硫醚化合物的合成[J].合成化学,2001,9:541-542
CHU Yong, ZHAO Min-zheng, XU Ming-xia. Synthesis of diallyl mono-and polysulfides [J]. Synthesis Chemical, 2001, 9: 541-542
- [5] Lagunas L L M, Castaigne F. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic [J]. Food Chemistry, 2008, 111(1):56-60
- [6] Wang J, Cao Y, Sun B, et al. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic [J]. Ultrason Sonochem, 2010, 18(2): 534-540
- [7] Wang J, Cao Y, Wang C, et al. Low-frequency and low-intensity ultrasound accelerates alliinase-catalysed synthesis of allicin in freshly crushed garlic [J]. Sci. Food Agr., 2011, 91(10): 1766-1772
- [8] Zhou J. Immobilization of alliinase and its application: Flow-injection enzymatic analysis for alliin [J]. Afr. J. Biotechnol., 2009, 8(7): 1337-1342
- [9] Miron T, SivaRaman H, Rabinkov A, et al. A method for continuous production of allicin using immobilized alliinase [J]. Anal. Biochem., 2006, 351(1): 152-154
- [10] Vaidya V, Ungold K U, Pratt D A. Garlic: source of the ultimate antioxidants-sulfenic acids [J]. Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48(1): 157-160
- [11] Abbehausen C, Sucena Suelen F, Lancellotti M, et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies, and antibacterial and antitumor activities of a novel water soluble Pd(II) complex with L-alliin [J]. Mol. Struct., 2013, 1035: 421-426
- [12] 莫英杰.超声波对蒜氨酸酶性质和结构的影响研究[M].北京:北京工商大学,2010
MO Ying-jie. The effect of ultrasound on the properties and conformation of alliinase [M]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2010
- [13] Kubec R, Cody R B, Dane A J, et al. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in allium chemistry.(Z)-butanethial S-oxide and 1-butenyl thiosulfonates and their S-(E)-1-butenylcysteine S-oxide precursor from Allium sicutum [J]. Agric. Food Chem., 2010, 58(2): 1121-1128
- [14] Block E. The organosulfur chemistry of the genus Allium and its importance to the organic chemistry of sulfur [J]. Angew. Chem., 1992, 104(9): 1158-20