

(3): 265-270.

[10] Zhou J S, Zhang T T, Chen J J, *et al.* Chemical constituents from the roots of *Streptocaulong riffithii*[J]. *Chin J Nat Med*, 2009, 7(2): 108-110.

[11] 严永旺, 肖 兰, 周 旭, 等. 绿原酸的药理作用及药用研发对策[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2729-2732

[12] 彭 霞, 王志杰, 林艳芳. 倭药藤苦参质量标准研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2009, 18(1): 30-31.

[13] 罗宇东, 谭安蕾, 陆施衡, 等. 壮药藤苦参中强心苷的含量测定及不同产地采收季节对药材含量的影响[J]. 中国当代医药, 2018, 25(12): 14-17.

[14] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.

[15] 秦昆明, 杨 冰, 胡 静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考[J]. 中草药, 2018, 49

(3): 725-731.

[16] 朱粉霞, 张亚丽, 汪 晶, 等. 一测多评法测定金银花复方制剂中新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2666-2671.

[17] 张 倩, 张加余, 董鲁艳, 等. 一测多评法测定清开灵注射液中的绿原酸类成分[J]. 中成药, 2014, 36(4): 768-772.

[18] 杨 菲, 王智民, 张启伟, 等. “一测多评”法测定丹酚酸类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2372-2379.

[19] 王 欣, 覃 瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.

[20] 杨 洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用[J]. 中南药学. 2017, 15(12): 1738-1741.

基于 UPLC 替代对照品法测定大蒜中大蒜辣素

杨 亮^{1,4}, 罗春霞¹, 刘钟山¹, 贺俊妮², 杨光勇³, 关 明^{1*}
(1. 新疆师范大学化学化工学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 陕西师范大学化学化工学院, 陕西 西安 710062; 3. 新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 4. 新疆警察学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 基于 UPLC 建立替代对照品法测定大蒜中的大蒜辣素。**方法** 新鲜蒜泥甲醇提取物的分析采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 242 nm。**结果** 大蒜辣素、羟苯乙酯在 36.02~564.74、12.93~206.80 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 8$), 加样回收率 98.8%~100.9%, 定量下限 1.73~2.03 mg/kg。外标法与替代对照品法测定结果无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于大蒜的质量控制。
关键词: 大蒜; 大蒜辣素; 羟苯乙酯; UPLC; 替代对照品法
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2367-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.023

Determination of allicin in *Allium stantivum* by replacement method of chemical reference substance based on UPLC

YANG Liang^{1,4}, LUO Chun-xia¹, LIU Zhong-shan¹, HE Jun-ni², YANG Guang-yong³, GUAN Ming^{1*}
(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 3. Product Quality Supervision and Inspection Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011, China; 4. Xinjiang Police College, Urumqi 830011, China)

KEY WORDS: *Allium stantivum* L.; allicin; hydroxyphenylethyl ester; UPLC; replacement method of

收稿日期: 2019-08-02
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21465023, 31040007)
作者简介: 杨 亮 (1991—), 男, 硕士, 从事天然产物分离分析及质量控制方法研究。Tel: 13109910604, E-mail: 1710291282@qq.com
* 通信作者: 关 明 (1974—), 博士生导师, 从事仪器分析新方法研究。Tel: 13579901303, E-mail: 635880760@qq.com

chemical reference substance

大蒜为百合科植物蒜 *Allium stantivum* L. 的地下鳞茎，是人们日常生活中常见的药食两用的葱属植物^[1]，在当今回归自然，高度重视食品和药品质量安全的潮流中，大蒜由于具有抑菌^[2-3]、杀菌^[4]、防癌抗癌^[5-8]、防治心脑血管疾病^[9-10]、提高免疫力等功效^[11-13]，成为争相研究的热题。

大蒜中有机硫化化合物的存在，是其和其他葱属植物的特征，且不同的葱属植物含有不同的有机硫化化合物^[14]。完整的大蒜鳞茎中含有蒜氨酸和蒜酶，当大蒜组织被破坏时，蒜氨酸被位于细胞质中的蒜氨酸酶酶解后形成硫代亚磺酸酯。大蒜辣素是大蒜中主要的硫代亚磺酸酯，占大蒜总硫代亚磺酸酯的70%~80%。大蒜辣素等硫代亚磺酸酯是活性分子，根据温度、pH和溶剂的不同会发生一定数量的转换，生成二烯丙基硫醚、二烯丙基二硫醚、二烯丙基三硫醚、阿霍烯等不同的有机硫化化合物。

目前公认的大蒜的主要功效成分是大蒜辣素。有关大蒜辣素含有量测定的方法有很多，如定硫法、电化学方法、生物检定方法、薄层扫描法、紫外法、气相色谱法^[15]等，但都由于各自的缺陷问题而无法得到广泛应用。HPLC法较为常用，能够准确地测定大蒜辣素的含有量。但是，该法需使用大蒜辣素对照品进行检测，由于大蒜辣素对照品或标准品价格昂贵，需在零下80℃储存、运输，且检测时易降解，因而限制了该方法的应用。面对这一问题，目前所报道的最好的解决方式是采用替代对照品法或一测多评法。主要采用性质稳定、廉价易得的化合物作为替代对照品，利用其与供试品溶液中一个待测物或多个待测物之间的恒定响应关系，实现含有量测定。

《欧洲药典》^[16]《英国药典》^[17]以羟苯丁酯为替代对照品，采用HPLC法测定了大蒜粉中大蒜辣素的含有量。袁耀佐等^[18]参考《欧洲药典》方法，建立以羟苯乙酯为替代对照品的HPLC法，用于测定鲜蒜中大蒜辣素的含有量，该方法与《欧洲药典》中以羟苯丁酯为替代对照品的方法相比，分析时间明显缩短。

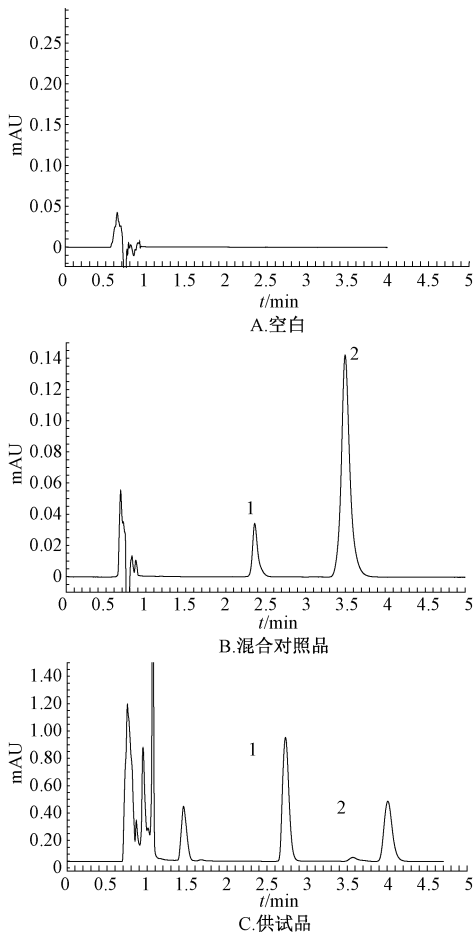
UPLC法具有分离效率更高、选择性更好、检测灵敏度更高的优势。本实验借鉴前人的研究成果，以羟苯乙酯为替代对照品，建立UPLC法快速测定大蒜辣素，以期完善大蒜质量分析方法提供

技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 蒜氨酸对照品（质量分数93.68%，新疆埃乐欣药业有限公司）；羟苯乙酯（质量分数99%，中国食品药品检定研究院）；蒜酶（1 000 U/g，新疆埃乐欣药业有限公司）；甲酸（色谱纯，天津市福晨化学试剂厂）；甲醇、乙腈（色谱纯，美国Sigma-Aldrich公司）；新鲜大蒜委托乌鲁木齐西八家户路生鲜传奇超市购买，经新疆师范大学关明教授鉴定为葱属植物大蒜 *Allium stantivum* L. 的地下鳞茎。

1.2 仪器 Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、PDA检测器（美国Waters公司）；Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm，美国Waters公司）。色谱图见图1。



1. 大蒜辣素 2. 羟苯乙酯
1. allicin 2. hydroxyphenylethyl ester

图1 各成分UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

1.3 对照品溶液制备

1.3.1 羟苯乙酯对照溶液 参考文献 [19], 精密称取一定量的羟苯乙酯溶解于 50% 甲醇水溶液中, 制备成 0.217 6 mg/mL 的羟苯乙酯贮备液。

1.3.2 大蒜辣素对照溶液 参考文献 [19], 制备得到 564.74 μg/mL 的大蒜辣素溶液。

1.4 色谱条件 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸水; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 242 nm; 进样量 1 μL。

1.5 供试品溶液制备 称取 2 g 新鲜蒜泥, 35 ℃ 水浴锅放置 30 min, 先加入 10 mL 超纯水低温超声提取 15 min, 随后加 10 mL 甲醇再低温超声提取 15 min, 将超声后的溶液和 0.5 mL 的羟苯乙酯定容于 5 mL 量瓶中待测。

1.6 色谱条件优化

1.6.1 检测波长 分别对大蒜辣素、羟苯乙酯对照品溶液进行 PDA 光谱扫描, 得到光谱图。在波长为 210 nm 左右时, 2 种化合物的紫外吸收都较大, 但波长较低时同样会使样品中杂质的紫外吸收变大, 鉴于羟苯乙酯浓度可控, 因此以大蒜辣素有较优响应为目的, 选择大蒜辣素的特征肩峰 242 nm 为检测波长。

1.6.2 流动相 分别选用乙腈与水、甲醇与水、乙腈与甲酸水溶液为流动相, 进行测试。结果表明, 当以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相时, 分离效果相对较好, 且分析时间较短。在该色谱条件下, 大蒜辣素和羟苯乙酯在 4 min 内实现基线分离, 分离度均大于 1.5。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系考察 将“1.3”项下对照品贮备液逐级稀释, 按浓度由低到高, 在“1.4”项色谱条件下依次进样, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 结果见表 1, 表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	定量限/ (μg·mL ⁻¹)
大蒜辣素	<i>Y</i> = 2 243.3 <i>X</i> - 8 520.2	0.999 9	36.02~564.74	2.03
羟苯乙酯	<i>Y</i> = 1×10 ⁷ <i>X</i> + 28 898	0.999 8	12.93~206.80	1.73

2.1.2 重复性试验 取供试品 6 份, 按“1.5”项下方法制备供试品溶液, 在“1.4”项色谱条件

下进样, 测得大蒜辣素、羟苯乙酯峰面积 RSD 均不大于 1.00%, 表明该方法重复性良好。

2.1.3 稳定性试验 取同一混合供试品溶液, 在“1.4”项色谱条件下, 分别于第 0、2、4、6、8、10、12 h 进样, 记录峰面积。结果表明样品溶液中大蒜辣素不稳定, 其在 0~4 h 内峰面积 RSD 小于 2.00%, 之后出现明显降解, 羟苯乙酯稳定性较好, 12 h 内峰面积 RSD 0.65%。

2.1.4 加样回收率试验 取供试品按“1.5”项下方法制备供试品溶液, 分别向鲜蒜供试品溶液中添加低、中、高 3 个浓度水平的大蒜辣素对照溶液, 在“1.4”项色谱条件下进样测定, 计算得大蒜辣素加样回收率 98.83%~100.88%, RSD 远小于 15%。

2.2 相对校正因子测定 以羟苯乙酯为内标, 按公式 $f_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{A_s/C_s}{A_i/C_i}$ 计算羟苯乙酯对大蒜辣素的相对校正因子, 其中, *A_s* 指羟苯乙酯峰面积, *C_s* 指羟苯乙酯浓度; *A_i* 指大蒜辣素峰面积, *C_i* 指大蒜辣素浓度。结果表明, 羟苯乙酯对大蒜辣素的相对校正因子为 5.256, 结果见表 2。

表 2 各成分相对校正因子 (n=5)

Tab. 2 Relative correction factors of various constituents (n=5)					
成分	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	峰面积	响应因子	平均响应 因子	相对校正 因子
大蒜辣素	69.62	147 649	2 120.91	2 171.70	5.256
	138.83	302 921	2 181.93		
	274.48	607 228	2 212.26		
羟苯乙酯	25.85	296 191	11 458.07	11 415.43	
	51.70	592 336	11 457.18		
	103.40	1 171 629	11 331.03		

2.3 相对校正因子耐用性考察 考察色谱条件的轻微变动对 2 种化合物相对校正因子的影响, 见表 3。结果表明, 除检测波长外, 其余考察因素的轻微变动对相对校正因子的 RSD<5%。

2.4 相对保留时间校正因子测定 考察色谱条件的轻微变动对相对保留时间校正因子的影响, 见表 4。结果表明羟苯乙酯对大蒜辣素的相对保留时间为 1.49, RSD 为 2.27%, 故本研究选用相对保留时间作为目标色谱峰的定位指标。

2.5 样品含有量测定 分别以外标法和替代对照品法测定 15 个不同产地的新鲜大蒜中大蒜辣素的含有量, 结果见表 5, 将 2 种方法的测定结果进行单因素方差分析, 分析结果表明, 2 种方法测定结

表 3 相对校正因子耐用性考察结果 (n=5)

Tab.3 Durability results of relative correction factor (n=5)

因素	不同值	相对校正因子	RSD/%
色谱柱	安捷伦	5.302	1.18
	依利特	5.251	
	岛津	5.179	
检测波长/nm	240	4.503	15.09
	242	5.256	
	244	6.096	
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.25	5.288	0.30
	0.30	5.256	
	0.35	5.274	
pH	2.86	5.242	1.17
	2.58	5.193	
	2.43	5.121	
柱温/℃	25	5.292	0.63
	30	5.256	
	35	5.323	
流动相比例	28	5.322	1.05
	30	5.256	
	32	5.367	

表 4 不同色谱柱、检测波长、体积流量、pH、柱温下相对保留时间 (n=5)

Tab.4 Relative retention time under different columns, detection wavelength, flow rate, pH and column temperature (n=5)

因素	不同值	相对校正因子
色谱柱	安捷伦	1.481
	依利特	1.483
	岛津	1.479
检测波长/nm	240	1.480
	242	1.481
	244	1.480
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.25	1.487
	0.3	1.481
	0.35	1.480
pH	2.86	1.481
	2.58	1.481
	2.43	1.481
柱温/℃	25	1.540
	30	1.480
	35	1.445
流动相比例	28	1.598
	30	1.481
	32	1.405
平均值	—	1.490
RSD/%	—	2.270

表 5 不同产地样品中大蒜辣素含量测定结果 (n=3)

Tab.5 Results of content determination of allicin in samples from different growing areas (n=3)

产地	大蒜辣素/(mg·g ⁻¹)	
	外标法	替代对照品法
山东菏泽	2.16	2.26
青海西宁	2.92	3.01
青海海东	3.07	3.17
甘肃民乐县	2.96	3.05
甘肃酒泉	2.18	2.24
新疆阿克苏拜城	2.74	2.82
新疆巴里坤板房沟	3.32	3.42
新疆巴里坤市引种山东	3.57	3.71
新疆巴里坤农丰园	3.44	3.55
塔城 787 基地	3.10	3.20
新疆塔城市裕民县	3.23	3.33
新疆巴州	2.89	2.98
新疆伊犁昭苏	3.16	3.26
新疆玛纳斯县兰州湾镇	3.17	3.34
新疆且末	3.56	3.67

果无统计学差异 ($P>0.05$), 且新疆产的大蒜中大蒜辣素含量普遍高于内地大蒜, 其中新疆且末、巴里坤地区的大蒜中大蒜辣素含量最高。

3 结论

本实验首次建立了一种 UPLC 替代对照品法测定鲜蒜中大蒜辣素的方法。该方法样品前处理简单, 结果准确可靠, 与已报道的 HPLC 法相比, 极大缩短了样品测定时间, 能在 4 min 内完成样品测定, 有利于对不稳定的大蒜辣素快速检测, 与文献[20]报道的 UPLC 法相比, 该方法不需要大蒜辣素对照品, 解决了因大蒜辣素对照品不稳定而测定困难的问题。分别采用外标法和替代对照品法测定了 15 个不同产地的鲜蒜中大蒜辣素的含量, 结果表明, 2 种方法测得结果无统计学差异 ($P>0.05$), 且新疆产的大蒜中大蒜辣素含量普遍高于内地大蒜, 其中新疆且末、巴里坤的大蒜中大蒜辣素含量最高。

参考文献:

[1] 马丽娜, 李峰杰, 陈 坚, 等. 大蒜主要活性成分及药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(6): 760-763.

[2] 孙 艳, 李 娜, 陆 颖, 等. 大蒜素与盐酸小檗碱联用体外抗菌试验[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2589-2595.

[3] 王 军, 何大敏, 陈廷智, 等. 大蒜与 3 种药用作物对烟草炭疽病菌的抑菌效果[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(2): 1-7.

[4] Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke M C H, *et al.* Allicin; chemistry and biological properties [J]. *Molecules*, 2014, 19 (8): 12591-12618.

[5] Lawson L, Hunsaker S. Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods [J]. *Nutrients*, 2018, 10 (7): 812.

[6] Custers D, Van Praag N, Courselle P, *et al.* Chromatographic fingerprinting as a strategy to identify regulated plants in illegal herbal supplements [J]. *Talanta*, 2017, 164: 490-502.

[7] 刘 玮, 王京雅, 陈海霞. 绿变大蒜的色素成分及抗肝癌活性 [J]. *食品科学*, 2018, 39 (21): 135-141.

[8] Nicastro H L, Ross S A, Milner J A. Garlic and onions: their cancer prevention properties [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8 (3): 181-189.

[9] Hawry ł A, Ziobro A, Świeboda R, *et al.* TLC profiles of selected cirsium species with chemometrics in construction of their fingerprints [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54 (7): 1096-1104.

[10] Yousefi K, Hamedeyazdan S, Torbati M, *et al.* Chromatographic fingerprint analysis of marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC technique [J]. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6 (1): 131-136.

[11] 彭 敏. 大蒜素药理学作用机制及研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27 (14): 1593-1596.

[12] 程银平, 林朝展, 刘启德, 等. 青天葵高效薄层色谱指纹图谱的鉴别研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28 (1): 69-72.

[13] 关 明, 王凤琳, 陈 坚. 不同地理居群大蒜药材高效薄层色谱指纹图谱研究 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31 (10): 1924-1929.

[14] Charu K, Yogita S, Sonali S. Neutraceutical potential of organo-sulfur compounds in fresh garlic and garlic preparations [J]. *Int J Pharm Bio Sci*, 2014, 5 (1): 112-26.

[15] 张剑宁, 丛 瑜, 关 鑫, 等. 气相色谱法测定辅助降血脂软胶囊中大蒜素含量 [J]. *特产研究*, 2017, 39 (4): 32-35.

[16] EP 8 [S]. 2013: 1254.

[17] BP. Vol IV [S]. 2010: 1216.

[18] 袁耀佐, 顾 洁, 杭太俊, 等. 用替代对照品羟苯乙酯高效液相色谱方法测定大蒜辣素 [J]. *分析化学*, 2008, 36 (8): 1083-1088.

[19] 杨 亮, 李贝贝, 刘棋玮, 等. HPLC 用于大蒜及其制品中三种重要功效成分的同时测定 [J]. *分析试验室*, 2019, 38 (3): 284-289.

[20] 王海平, 李锡香, 刘新艳, 等. 大蒜辣素 UPLC 检测体系优化及其在大蒜资源评价中的应用 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13 (6): 936-945.