

大蒜辣素 UPLC 检测体系优化及其在大蒜资源评价中的应用

王海平, 李锡香, 刘新艳, 沈 镝, 邱 杨, 宋江萍, 张晓辉

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:大蒜是重要的调味蔬菜,大蒜辣素的含量是评价大蒜品质的最重要的一项指标。本研究通过对样品处理、提取方法和检测方法的研究,建立了完善的大蒜辣素超高效液相色谱(UPLC)检测方法:使用 UPLC BEH C18 色谱柱,流动相为甲醇:水=1:1,检测波长为 254nm,进样体积为 1 μ L,流速为 0.3ml/min。大蒜辣素在 2.04~510mg/L 范围内呈良好线性关系($R^2=0.9991$)。利用建立的方法对 212 份大蒜鳞茎的大蒜辣素含量进行检测,发现资源供试 212 份大蒜资源的大蒜辣素含量差异显著,含量分布在 0.82%~3.01% 之间,最高含量与最低含量之间相差近 4 倍。

关键词:大蒜;大蒜辣素;超高效液相色谱(UPLC)

Allicin UPLC Detection Technology and Tts Utilization in Garlic (*Allium sativum* L.) Genetic Resources

WANG Hai-ping, LI Xi-xiang, LIU Xin-yan, SHEN Di, QIU Yang, SONG Jiang-ping, ZHANG Xiao-hui

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agrucultural Science, Beijing 100081)

Abstract: Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the most important bulb crops. Allicin was proved as the most important composition which has been used for human, animal and plants to fight against kinds of diseases. So, the allicin content was the most important quality trait for garlic. An efficient UPLC method for determination of allicin in garlic bulb were developed and used to detect the allicin content among 212 accessions of garlic germplasm. In the UPLC method, methanol/water (50: 50, v/v) as a mobile phase which ran through at a constant flow rate of 0.3ml/min was performed on UPLC™ BEH C₁₈ column. Allicin content of 212 accessions of garlic were determined by the UPLC. The content of allcin among the germplasm was significantly different. The highest content is 3.01% which was almost four times of the lowest content of 0.82%.

Key words: Garlic; Allicin; UPLC

大蒜是重要的调味蔬菜,同时因含有多种具有抗菌作用的药用成分,所以也是重要的药用植物^[1-2]。大蒜辣素是其中最重要成分之一,大量的植物和动物试验研究^[3-5]表明大蒜辣素对细菌、真菌和病毒具有抵抗作用^[6-12],同时具有防治动脉粥样硬化、肥胖、高血压和调解脂蛋白不平衡等多种药理作用^[13-15]。因此,大蒜辣素的含量是评价大蒜品

质的最重要的一项指标。根据英国药典(1998),为了保证大蒜及相关产品的药用和商品价值,大蒜粉中大蒜辣素含量不应该低于 4.5mg/g,现有研究很少涉及大蒜种质大蒜辣素含量的评价^[16],主要原因是缺乏有效的、高通量的检测方法。国内外学者在大蒜辣素含量的分析方法方面做了一些工作,从定硫法到普通气相色谱和液相色谱^[17-20]。但是,因大

收稿日期:2011-11-03 修回日期:2011-12-06

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903018-3);国家青年科学基金(31000910);国家基础性专项基金(2005DKA21002-33);农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目和教育部留学基金专项奖学金(留金出[2009]3012号)

作者简介:王海平,博士,副研究员,主要从事蔬菜种质资源研究工作。E-mail:haipingping@126.com

通信作者:李锡香,lee0612@gmail.com

蒜辣素稳定性差,检测时易降解,上述方法或是检测速度慢,或是消耗药品多、检测费用高且易造成环境污染等,都不能实现既准确又快速的要求。超高效液相色谱(UPLC)与传统的 HPLC 相比,其在速度、灵敏度及分离度上均有显著的提高,在蛋白质、多肽、代谢组学分析及其他一些生化领域的研究表明,UPLC 技术具有明显的优越性^[21-23]。

中国农业科学院无性繁殖蔬菜资源圃保存大蒜资源 300 多份,采自全国各地,然而其大蒜辣素含量尚不明确。为此,本研究建立了大蒜辣素的超高效液相色谱(UPLC)检测技术,并利用建立的技术对资源圃内的 212 份大蒜进行了大蒜辣素含量检测。

1 材料与方法

1.1 大蒜辣素提取体系的建立

大蒜辣素提取方法分两部分。第 1 部分为不同提取方法,包括提取体积、超声、培养、离心 4 种处理因素,通过正交试验完成。第 2 部分为样品前处理,分为鲜样、冷冻干燥和 55℃ 烘干 3 种处理。

1.1.1 大蒜辣素提取方法评价 提取方法每个处理分 4 个水平共 16 个试验组合。提取体积分为 20、30、40、50ml;超声波处理时间为 0、3、5、7min;离心时间为:0、20、30、45min;培养时间为 0、15、30、40min。试验均在室温下进行。

1.1.2 大蒜辣素前处理方法 大蒜辣素前处理中的鲜样、干样、冷冻干燥具体操作如下。

鲜样:每份资源取有代表性的鳞茎 5 头,每头取 1 个鳞芽,去除保护叶。放入盛有 20ml 冷水的小烧杯中,用锋利剪刀将鳞芽剪成 0.2cm³ 的小块,然后用均浆机进行均浆。期间加入冷水至 50ml,4℃ 离心 8min,过 0.45μm 膜,上机检测。

干样:取样方法同上。鳞芽放于 -20℃ 冰箱中冷冻 4h,然后快速切成 0.2cm 厚的薄片,105℃ 杀青 5min,55℃ 烘干 10h。将烘干片研磨成粉末,过 400 目网筛,准确称取 400mg 大蒜粉,放入 50ml 离心管中。将 15ml 预冷水倒入离心管中,立即盖上离心管盖,强力涡旋 15s。再将 15ml 预冷水倒入离心管中,强力涡旋 30s,4℃ 下 8000rpm 离心 10min。将上清液通过 0.45μm 膜过滤至 UPLC 专用检测瓶中。

冻干样:鳞芽取样方法同上,但采用冷冻烘干机进行真空干燥,提取和测定方法同上。

1.2 大蒜辣素 UPLC 测定方法

1.2.1 药品及试剂 大蒜辣素标准品(1100mg/L)购买于 Chromadex 公司(Chromadex INC, Irvine,

USA)。乙腈、甲醇购自 Merck 公司(Merck, Darmstadt, Germany)。蚁酸购买于 DIMA technology Inc (USA)。试验中所用水均经过 Milli-Q water-purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)进行纯化。

1.2.2 标准品制备及样品提取 大蒜辣素标准品储备液通过 1% 蚁酸分别稀释成 510、255、170、127.5、51、10.2 和 2.04mg/L 的系列浓度。样品提取方法同 1.1.2 干样提取方法。

1.2.3 色谱条件 使用 UPLC BEH C18 色谱柱(2.1×50mm,1.7μm particles),流动相为甲醇:水 = 1:1,检测波长为 254nm,进样体积为 1μl,流速为 0.3ml/min。

1.2.4 标准曲线制作 精确吸取 40μl 浓度为 510mg/L 的标准液 5 份,用 0.1% 的蚁酸分别稀释成 2、3、4、10、50 和 250 倍,即浓度为 510、255、170、127.5、51、10.2、2.04mg/L 的工作液溶液,分别进样 1μl。

1.2.5 系统适应性 分别精确进样 1μl 浓度为 510mg/L 的标准液和未知浓度样品。检测标准品主峰和样品目标峰的符合度及目标峰与相邻峰的分度。

1.2.6 准确性鉴定 方法准确性通过对同一样品添加 0.05、0.55 和 2.64mg 标准品,每个添加水平 5 次重复,进行回收率测定。分别精确称取已知含量的大蒜粉 5 份置 50ml 离心管中,再分别精确加入 45μl、500μl、2.4μl 的大蒜辣素标准品溶液(浓度为 1100mg/L)立即加冰水至 15ml,其他与 1.1.2 样品提取方法相同,进样 1μl 测定。根据公式 $X = 100 \times (Y1 - Y2) / Y3$ 计算回收率,其中 X 为回收率,Y1 为填加后测得样品中的大蒜辣素含量,Y2 为原样品中大蒜辣素含量,Y3 为添加标准品大蒜辣素含量。

1.2.7 重现性、检测限和检出限 通过对 3 种浓度的标准溶液(浓度分别为 2.04、170 和 510mg/L)和同一样品提取液进行 1d 内和 5d 内连续进行测定,考察评价方法的稳定和重现性。检出限(LOD)是检测信号与噪音信号 3:1 时的最小检测浓度,检测限(LOD)为检测信号与噪音信号 10:1 时最小检测浓度。

1.2.8 样品大蒜辣素含量测试性检测 对来自中国不同地区的 10 份大蒜种质资源进行检测。每份资源 3 次重复,每重复选取 10 头大蒜,每头选取 1 个鳞芽,然后将鳞芽切成 0.2cm 的小薄片,用 ModulyoD 冷冻干燥机(Thermo)进行冷冻干燥 48h。磨成粉末,过 400 目筛,通过上述方法进行检测。

1.3 资源圃中大蒜资源大蒜辣素含量检测

试验于 2006-2009 年在中国农业科学院万庄国际高新技术产业园区进行。共 212 份大蒜种质资源材料,采自全国各地,包含 15 份国外资源,资源分布见图 1。每份资源种植在 4.5m² 的小区。每份资

源 30~140 株。每份资源选取有代表性的鳞茎 5 头,每头 1 个鳞芽,3 次重复,进行冷冻干燥后粉碎。利用上述建立的 UPLC 检测体系进行批量检测。通过 SPSS 软件分析大蒜辣素含量在资源中分布情况,并通过 DPS 软件进行聚类分析。

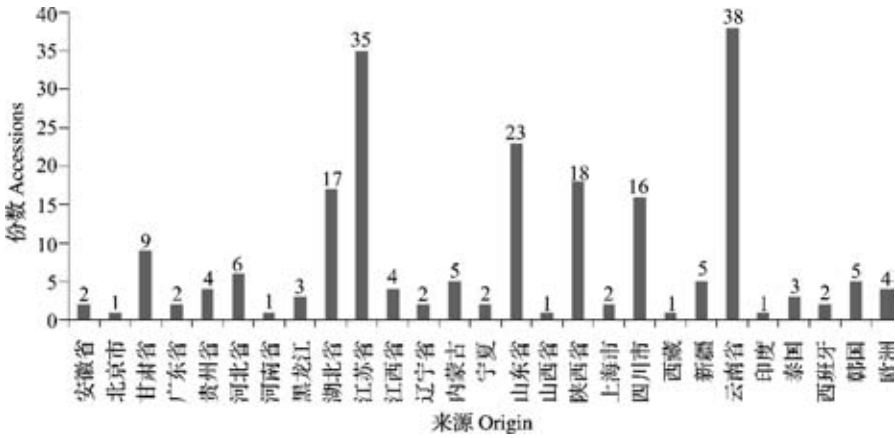


图 1 大蒜种质资源来源分布柱形图
Fig.1 Origin distribution charts of 212 accessions of garlics

2 结果与分析

2.1 大蒜辣素提取方法

从直观分析表(表 1),可以看出 4 种处理的极差从大至小依次为:提取体积>离心>超声>培养时间。其中溶液的体积极差最大,说明其效应最大。其他极差值均较小,说明影响效应不明显。

表 1 大蒜辣素提取方法正交试验直观分析表
Table 1 The intuition table of orthogonal experimental design for allicin extraction

试验号	提取体积	超声 (min)	离心 (min)	空列	培养 (min)
Test No.	(ml) Volume	Ultrasonic	Centrifuge	Blank	Culture
处理水平 1	1. 598	1. 64	1. 625	1. 637	1. 63
处理水平 2	1. 593	1. 663	1. 645	1. 637	1. 65
处理水平 3	1. 685	1. 63	1. 64	1. 65	1. 645
处理水平 4	1. 697	1. 64	1. 663	1. 647	1. 645
极差	0. 104	0. 033	0. 038	0. 013	0. 018

4 种处理的效果从效应曲线(图 2)明显看出,其中提取体积的效应曲线波动最大,其他处理效应曲线波动不明显。提取体积在 30~40ml 之间出现明显拐点,但 20~30ml 及 40~50ml 的处理没有明显区别。说明对 0.4g 的大蒜干粉 40ml 是提取的最佳体积。

方差分析进一步验证,溶液体积间达到了显著水平,而其他处理无显著性区别,处理间交互作用不明显(表 2)。

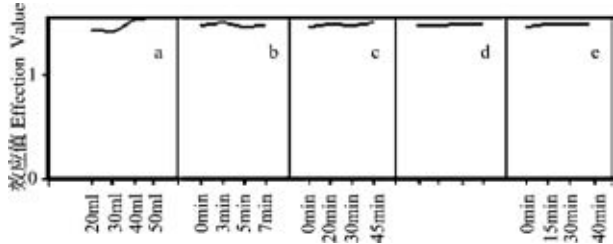


图 2 大蒜辣素提取方法正交试验效应曲线
Fig.2 The effect curve of orthogonal experimental design for allicin extraction
a: 提取体积;b: 超声波处理;c: 离心时间;d: 空列;e: 培养时间
a: Volume;b: Ultrasonic;c: Centrifuge;d: Blank;e: Culture

表 2 大蒜辣素提取方法方差分析
Table 2 The ANOVA analysis of the methods for allicin extraction

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
Origin of variation	Square sum	Df.	Mean square	F value	P value
溶解体积 Volume	0. 0374	3	0. 0125	72. 1325	0. 0027
超声 Ultrasonic	0. 0023	3	0. 0008	4. 3735	0. 1284
离心 Centrifuge	0. 0029	3	0. 001	5. 5301	0. 0969
培养 Culture	0. 0007	3	0. 0002	1. 2892	0. 4198
误差 Error	0. 0005	3	0. 0002		
总和 Total	0. 0437				

综合正交试验、直观分析和方差分析,提取体积对试验的影响显著,其他处理无显著区别。虽然离

心与否并不影响其含量的检测,但提取需要过 0.45μm 膜,离心后明显较容易操作,因此建议在提取过程离心 8~20min。

2.2 样品前处理方法对大蒜辣素含量测定的影响

从表 3 可以看出,3 种处理方法有明显差异,其中烘干处理方法测得大蒜辣素含量最低,冷冻干燥测得的大蒜辣素含量最高,鲜样处理与冷冻干燥测得结果相当。

表 3 前处理对大蒜辣素提取效果的影响

Table 3 The effect of pre-treatment methods on alliin content extraction						
编号 Code	处理方法 Treatment	测定浓度(%) Alliin content			平均值±RSD	
		I	II	III	Mean±RSD	
8N036	烘干 Dehydrating	0.883	0.865	0.889	0.879±1.25	
	鲜样 Fresh	1.834	1.878	1.856	1.856±2.20	
	冷冻干燥	1.991	1.963	1.923	1.959±3.42	
	Freezing drying					
8N043	烘干 Dehydrating	0.806	0.976	0.799	0.860±10.02	
	鲜样 Fresh	1.634	1.653	1.703	1.663±3.56	
	冷冻干燥	1.741	1.757	1.813	1.770±3.78	
	Freezing drying					

2.3 大蒜辣素 UPLC 检测体系的建立

2.3.1 系统适应性 从图 3 可以看出,大蒜辣素的保留时间约为 0.95min,检测 1 个样品时间小于 4min。在空白样品中没有目标峰出现,在标准品和样品色谱中,目标峰附近没有杂峰干扰,表明系统适应性较好。

2.3.2 标准曲线的绘制 标准品稀释倍数、浓度及峰面积见表 4。以标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得回归方程 $y = 874.47x - 408.95$ ($R^2 = 0.9991$)。说明大蒜辣素在 2.04~510mg/L 范围内呈良好线性关系。标准曲线见图 4。

2.3.3 方法准确性鉴定 3 种浓度标准品添加回收试验结果见表 5。从表 5 中可以看出,浓度较高的标准品(2.64mg)平均回收率为 99.66%,其 RSD 也最低(0.65%)。添加水平为 0.055mg 和 0.55mg 的试验,平均回收率分别为 98.98% 和 98.83%,RSD 分别 0.80% 和 0.71% 没有明显区别。说明添加水平较高时,回收率较高,准确性强。但 3 种添加水平 RSD 均远小于 15%,说明大蒜辣素的 UPLC 的检测方法准确可靠。从图 5 中可以看出添加后的目标峰是原样品目标峰高度的 2 倍左右,而填加不影响峰型和迁移率。

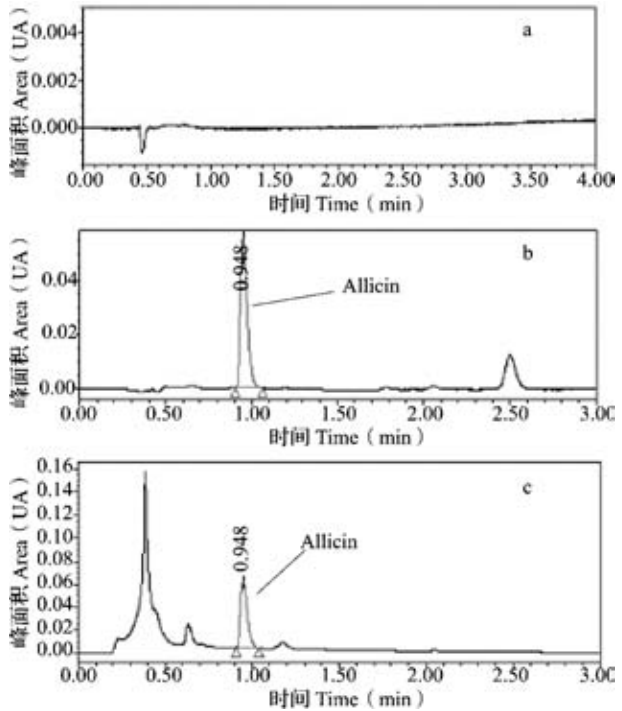


图 3 大蒜辣素 UPLC 检测色谱峰型图

(a. 空白样;b. 大蒜辣素标准品;c. 样品)

Fig.3 Chromatograms of Alliin blank (a), alliin standard (b) and sample (c)

表 4 标准曲线绘制表

Table 4 Equation of standards		
标准品稀释倍数 Dilute times of standards	标样浓度(mg/ L) Concentration.	峰面积(AU) Area
250	2.04	1672
50	10.2	8392
10	51	48492
4	127.5	103730
3	170	153998
2	255	217851
1	510	447433

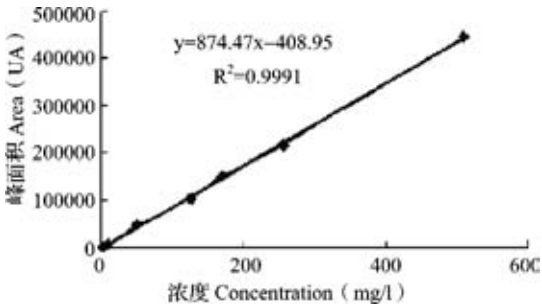


图 4 标准曲线

Fig.4 Linearity quotation of standards

表 5 大蒜辣素回收率试验
Table 5 Recovery of allicin

加入量 (mg) Y3	大蒜辣素含量 (mg) Y2	测量 (mg) Y1	回收率 (%) X	平均回收率 (%) Average	标准差 SD	相对标准差 RSD
2. 64	2. 226	4. 88	100. 66	99. 67	0. 64	0. 65
	2. 226	4. 86	99. 69			
	2. 224	4. 84	98. 91			
	2. 225	4. 86	99. 71			
	2. 224	4. 85	99. 36			
0. 055	2. 224	2. 28	99. 46	98. 98	0. 79	0. 80
	2. 226	2. 28	98. 46			
	2. 226	2. 28	98. 00			
	2. 225	2. 28	100. 00			
	2. 224	2. 28	98. 99			
0. 55	2. 224	2. 77	99. 00	98. 83	0. 70	0. 71
	2. 225	2. 77	99. 23			
	2. 226	2. 77	98. 36			
	2. 22	2. 77	99. 66			
	2. 224	2. 76	97. 90			

Y1:填加后测得样品中的大蒜辣素含量;Y2:原样品中大蒜辣素含量;Y3:添加的标准品大蒜辣素含量;X:回收率;Average;5 次试验回收率平均值;SD:标准差;RSD:相对标准差
Y1: Allicin content detected after adding the standard;Y2: Allicin content of sample without adding the standard;Y3: Allicin content of the standard added in the samples;X:Recovery rate;Average X: Average of recovery of five replicates;SD:Standard definition;RSD:Relative standard definition

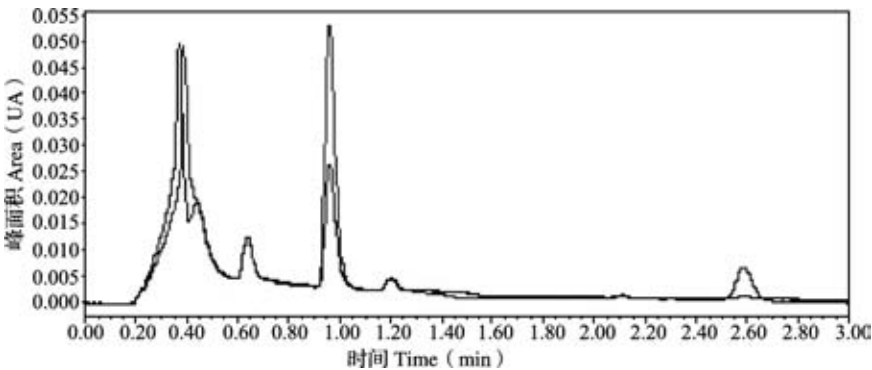


图 5 添加回收图谱
Fig.5 Chromatograms of original sample and samples added standards
a: 添加后目标峰;b:为原样目标峰
a:added sample,b:original sample

2.3.4 重现性、检测限和检出限 在1d 内的连续检测显示,标准品的 RSD 小于 1. 64%,样品的 RSD 为 0. 76%;在5d 内的连续检测中,标准品的 RSD 小于 1. 68%,样品的 RSD 为 1. 07%。这说明,在 1d 内的检测结果比 5d 内的检测结果重现性高,但 5d 内的检测结果仍然在试验可接受的范围内。所以,大蒜辣素的 UPLC 的检测可以在 5d 内对试验样品

进行准确检测。本方法的检测限 (LOD) 和检出限 (LOQ) 分别为 0. 79mg/L 和 2. 63mg/L。
2.3.5 样品大蒜辣素含量测试性检测 对 10 份大蒜品种的检测表明(表 6),大蒜辣素含量最低为 1. 14%,最高为 2. 45%。10 份样品的 3 次重复检测 RSD 从 0. 30% 至 1. 58%。从结果可以看出 UPLC 对大蒜中大蒜辣素的含量检测是准确可靠的。

表 6 10 份大蒜种质大蒜辣素含量(干重)测量结果

Table 6 Allicin content of 10 accessions of garlic germ-plasm(dry weight)

样品名称 Varieties	含量(%)Content			平均值(%) Average	相对标准偏差 RSD
	I	II	III		
金乡 1 号	1.12	1.14	1.14	1.14	0.84
早选红	2.44	2.38	2.45	2.42	1.58
无薹蒜	1.63	1.59	1.63	1.62	1.47
莱芜白皮	1.98	1.96	2.00	1.99	1.40
金乡大蒜	1.98	2.01	2.01	2.00	0.26
白皮红星	2.05	2.04	2.08	2.06	1.54
雪里红	1.92	1.91	1.92	1.92	0.87
金乡红皮	1.93	1.94	1.96	1.94	1.01
三月黄	1.85	1.84	1.84	1.84	0.30
平谷白蒜	1.84	1.88	1.84	1.85	0.79

表 7 212 份大蒜种质大蒜辣素含量

Table 7 The allicin content of 212 accessions of garlic

种质编号 Code	名称 Name	含量(%) Content	种质编号 Code	名称 Name	含量(%) Content	种质编号 Code	名称 Name	含量(%) Content
8N001	冰旱	1.53	8N042	围子独头蒜	1.55	8N094	开源大蒜	1.68
8N002	什邡白蒜	2.03	8N043	莱芜红皮蒜	1.81	8N096	临洮红蒜	1.18
8N003	广汉白蒜	1.82	8N044	莱芜白皮蒜	1.81	8N097	彭县晚熟	1.63
8N004	乐山蒜	2.21	8N045	黄苗	2.06	8N099	江孜大蒜	1.34
8N010	软叶子	1.64	8N046	糙蒜	1.85	8N100	嘉定 2 号	1.83
8N013	成蒜早 2 号	1.46	8N047	青苗	2.21	8N101	金堂早蒜	1.29
8N016	棒子蒜	2.26	8N060	商南黑皮蒜	1.65	8N102	阿城紫皮	2.21
8N017	温江蒜	2.06	8N061	商南笨黑皮	2.00	8N104	早白选	1.47
8N019	三月黄	1.85	8N064	白河白皮	1.49	8N107	彭县中熟	1.63
8N023	四月黄	1.76	8N065	商南白皮	1.37	8N108	新会大蒜	1.34
8N024	三月黄	2.06	8N066	兴平白皮	2.07	8N109	彭县早熟	1.31
8N025	二月黄	1.73	8N067	陇县大蒜	1.37	8N112	襄樊二水早	1.31
8N026	四月尾五月头	1.47	8N069	早红选	2.60	8N113	襄樊红蒜	1.54
8N027	土蒜	2.21	8N070	改良蒜	1.58	8N115	宝鸡大蒜	1.27
8N028	凤阳蒜	2.00	8N071	耀县红皮蒜	1.26	8N116	温州红七星	1.31
8N030	阿城紫皮蒜	1.73	8N072	仓山大蒜	1.44	8N117	毕节大蒜	1.27
8N031	上海青蒲蒜	1.47	8N073	无苔蒜	1.63	8N118	留坝大蒜	1.54
8N032	白皮红星蒜	2.06	8N074	宁强大蒜	1.34	8N120	丹凤大蒜	1.53
8N034	平谷白蒜	1.85	8N076	念乡蒜	1.73	8N121	南丰蒜 1 号	1.83
8N035	四六瓣蒜	2.21	8N078	1B	2.07	8N122	南丰蒜 2 号	1.42
8N036	莱芜白皮	1.99	8N079	清迈 1 号	1.58	8N123	冻冻青	1.33
8N037	河南早熟蒜	1.65	8N084	安康大蒜	1.33	8N124	三月黄	1.99
8N038	金乡白皮	1.51	8N085	清迈 3 号	1.67	8N125	顺河四六瓣	1.48
8N039	金乡红皮	1.94	8N089	临洮白蒜	1.26	8N126	顺河本地蒜	1.58
8N040	嘉祥大蒜	2.00	8N091	宝山大蒜	1.44	8N127	周庄大蒜	1.54
8N041	中牟大蒜	2.38	8N093	紫皮蒜	1.24	8N128	胡庄大蒜	1.53

2.4 资源圃中大蒜资源的大蒜辣素含量检测

212 份大蒜种质的大蒜辣素含量,分布在 0.82%~3.01% 之间,差异显著,最高含量与最低含量之间相差近 4 倍(表 7)。同时,大蒜辣素含量在 212 份资源中呈近正态分布(图 6)。

根据 212 份大蒜种质的大蒜辣素含量的不同,通过聚类分析可将供试资源分为 5 个类群(图 7)。其中,第 II 类为大蒜辣素含量最高的一类资源,含量为 2.21%~3.01%,共 10 份资源;第 III、I 和 V 类资源含量中等,含量在 1.51%~2.07% 之间,分别包含 82、9 和 18 份资源,但其中第 V 类资源含量差异不是十分显著而聚为一类;第 VI 类资源大蒜辣素含量较低(表 8)。

续表

种质编号	名称	含量(%)	种质编号	名称	含量(%)	种质编号	名称	含量(%)
Code	Name	Content	Code	Name	Content	Code	Name	Content
8N129	招仙桥大蒜	1.99	8N205	红皮蒜	1.42	8N269	成蒜早3号	0.83
8N130	合肥大蒜	1.83	8N206	白皮蒜	1.67	8N270	徐蒜3号	1.26
8N139	马鞍山大蒜	1.13	8N207	紫皮蒜	1.53	8N271	中水大蒜	1.26
8N140	大蒜	1.51	8N208	独头蒜	1.47	8N272	安邱大蒜	1.26
8N141	VF648	2.07	8N209	小蒜	0.96	8N273	徐州5号	1.78
8N145	软叶子	2.06	8N211	大蒜	1.78	8N274	邱州红皮	1.48
8N146	紫皮蒜	1.26	8N212	香大蒜	1.61	8N275	VF05	1.61
8N147	玉田蒜	1.26	8N215	加尔各达-1	1.84	8N296	辣蒜	1.57
8N148	山头蒜	1.26	8N217	徐州白蒜	1.51	8N298	大蒜	1.26
8N149	辛加沟蒜	1.29	8N218	徐州紫蒜	1.57	8N302	八一蒜	1.64
8N150	辛加沟蒜2	1.22	8N219	济VF106	1.77	8N303	大蒜	1.84
8N151	石佛蒜	1.08	8N220	济VF05	1.53	8N304	大蒜	1.47
8N152	石佛蒜2	1.09	8N221	苔681	1.42	8N306	大蒜	0.83
8N154	金乡1号	1.13	8N222	苔682	1.52	8N307	紫皮蒜	1.78
8N155	嘉祥紫皮	1.51	8N223	苔868	1.47	8N308	紫皮大蒜	1.61
8N156	济宁蒜	1.48	8N231	大蒜	1.56	8N309	紫皮大蒜	0.89
8N157	南方苔蒜	2.06	8N232	大蒜	0.83	8N310	大蒜	1.82
8N167	大分蒜	1.44	8N233	高阳大蒜	1.22	8N312	大蒜	1.99
8N168	大理蒜	1.66	8N234	大头蒜	1.64	8N313	大蒜	1.84
8N169	小分蒜	1.09	8N236	天蒜	1.68	8N314	大蒜	1.47
8N170	石鼓小蒜	1.48	8N237	崇仁白皮蒜	1.04	8N315	大蒜	2.03
8N172	大紫蒜	1.63	8N238	三月黄	1.73	8N318	挪威白蒜	1.26
8N173	阿城紫蒜	1.21	8N239	雪里青	1.59	8N320	大蒜	1.48
8N175	丫紫蒜	1.71	8N240	青龙大蒜	1.26	8N321	巴东大蒜	0.83
8N178	红蒜	1.44	8N241	红皮蒜	2.28	8N322	独头蒜	1.26
8N179	大蒜	1.33	8N242	任大大蒜	0.90	8N323	拖拉野蒜	1.75
8N180	紫蒜	1.11	8N244	本地蒜	0.45	8N324	大蒜	1.64
8N181	大蒜	1.62	8N245	白皮大蒜	0.93	8N325	大蒜	1.78
8N182	百合蒜	1.09	8N246	崇仁白皮蒜	1.53	8N326	大蒜	0.89
8N183	桐籽蒜	1.48	8N248	贡山	1.99	8N327	大蒜	1.61
8N185	大苔蒜	3.01	8N249	本地大蒜	1.78	8N329	大蒜	1.57
8N186	紫皮苔蒜	1.94	8N254	秤杆大蒜	1.42	8N330	蒜	1.57
8N188	大蒜	1.17	8N255	大蒜	1.48	8N351	野生大蒜	1.23
8N189	大蒜	1.32	8N256	紫皮蒜	1.54	8N352	野生大蒜	1.32
8N190	乐都大蒜	1.17	8N257	鲁优4号	1.53	8N355	野蒜	1.34
8N191	临洮蒜	1.27	8N258	德州红皮	1.61	8N358	Mokpo	1.84
8N192	大蒜	1.33	8N259	德州百蒜	1.84	8N359	Jumbo	1.47
8N193	大蒜	1.95	8N260	早蒜1号	1.47	8N360	Solyeny	1.82
8N194	白衣大蒜	1.26	8N261	徐州4号	0.83	8N361	Deseo	1.64
8N195	大蒜	1.64	8N263	徐蒜4号	1.78	8N362	Namdo	0.83
8N197	大蒜	0.99	8N264	VF684	1.51	8N363	MoradoⅢ	1.48
8N198	大辨红蒜	1.95	8N265	彭州早	1.61	8N364	American Early	1.26
8N200	草塬大蒜	0.89	8N266	正月早	1.84	8N365	Morado Be Quenca	1.64
8N201	紫皮蒜	1.31	8N267	徐蒜2号	1.47	8N367	Thermid Drome	1.61
8N202	紫皮蒜	1.82	8N268	VF选4	1.99			

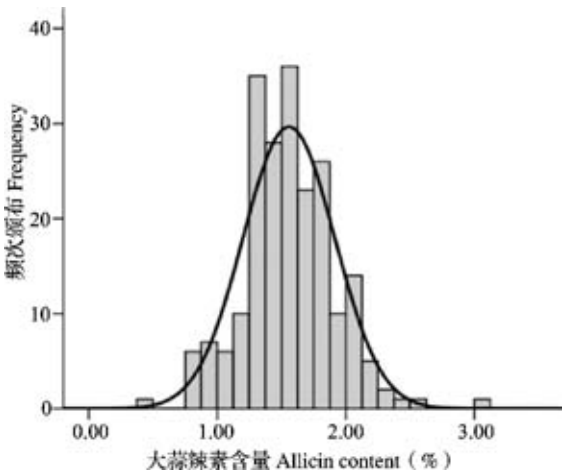


图 6 大蒜资源大蒜辣素含量分布频次
Fig. 6 The distribution histogram of allicin content among 212 accessions of garlic

表 8 212 份大蒜资源在各类群中的分布
Table 8 Allicin content distribution of garlic accessions among categories

类群 Groups	大蒜辣素含量(%) Allicin content range	资源分布份数 Accessions
Ⅱ	2. 21 ~ 3. 01	10
Ⅲ	1. 61 ~ 2. 07	82
I	1. 56 ~ 1. 59	9
V	1. 51 ~ 1. 55	18
Ⅵ	0. 49 ~ 1. 49	93

3 讨论

3.1 大蒜辣素 UPLC 测定体系及其优越性

大蒜辣素是评价大蒜品质的重要指标,但对其含量的检测,传统的定硫法和 HPLC 法^[24-26]不能实现稳定、快速和高通量检测的要求。超高效液相色谱由于大大改进了色谱柱承受高压的能力,从而大大提高了检测的效率,UPLC 技术较传统的 HPLC 技术具有明显的优越性^[27-28]。UPLC 体系在检测过程中,大蒜辣素目标峰出峰时间仅 0. 95min 左右,比过去的 HPLC(出峰时间 7. 5min)检测方法快 7 ~ 8 倍。同时,UPLC 进样只需 1μl,所需要药品大大减少,体现了环境友好型的特点。而且,样品池温度可控,可实现大批量较长时间的自动检测。

尽管超声、培养处理一般被认为是从生物组织中提取化学物质过程中,影响提取效果的主要因素^[24-26]。但在本试验中,超声、培养、离心处理对试验均无明显区别。说明蒜氨酸酶催化蒜氨酸产生大

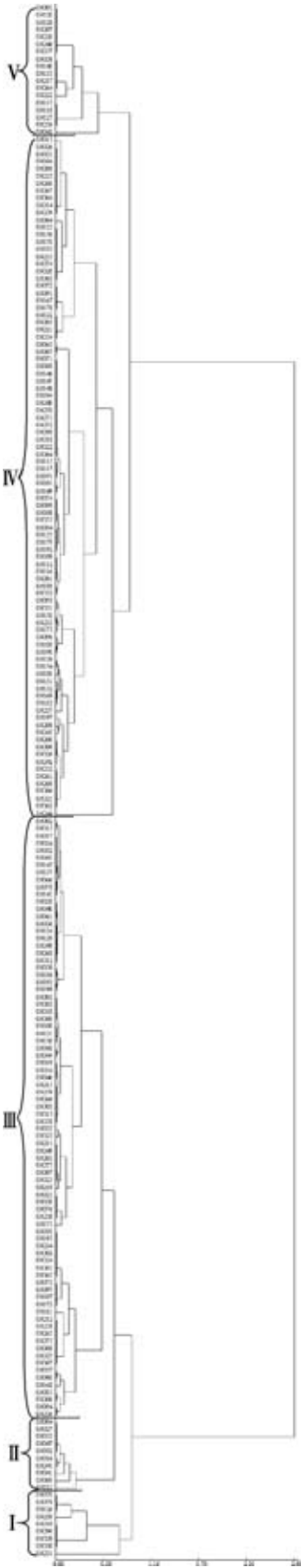


图 7 基于大蒜辣素含量的 212 份大蒜种质资源聚类图
Fig. 7 Cluster tree diagram based on allicin content of 212 accessions of garlic

蒜辣素可能是快速反应,在较短时间内便反应完全。本试验中采用大蒜粉为试验材料,可能是因为干样粉碎过程对细胞的破碎完全,所以超声波处理未起到明显作用。大蒜辣素在水中的溶解度为 2%,本试验称取的蒜粉为 0.4g,如果大蒜粉中大蒜辣素含量在 10%,那么最小溶液体积应为 20ml,所以 40ml 已经能够满足高浓度大蒜辣素含量样品的检测。另外,采用 50ml 离心管进行,在快速摇动过程中,管盖中会滞留一定样品,从而减小其真实含量,提取体积越小,受影响的可能性就越大。所以,提取体积是影响提取效果的主要因素。前处理对大蒜辣素的提取效果影响明显,试验表明:用烘干箱直接烘干的方法提取的大蒜辣素含量最少,此方法不可取,主要原因是在高温情况下大蒜辣素极不稳定,在烘干的过程中降解严重,在大蒜辣素稳定性研究中,也表明大蒜对 55℃ 以上的高温是非常敏感的;鲜样及冷冻干燥的方法提取的大蒜辣素含量相当,鲜样提取虽然要求的设备相对简单,但提取过程相对繁杂、时间长,很难实现大批量样品的检测。冷冻干燥方法最佳,提取效果最好,而且易实现大批量检测,但要求有冷冻干燥设备。所以,建议少量样品的检测可采用鲜样提取,而大批量的检测采用冷冻干燥的办法。

3.2 大蒜资源大蒜辣素含量的差异

大蒜辣素是大蒜中重要功能性成分,大量的植物和动物试验研究表明,大蒜辣素具有杀虫、抗菌等功效^[6-12]。王海平等^[29]对大蒜种质资源大蒜辣素含量与蒜蛆的抗性关系进行了分析,发现大蒜辣素含量越高,大蒜对蒜蛆的抗性越强。大蒜辣素含量与抗虫高度相关,再次证明了大蒜辣素的杀虫杀菌生物活性。因此,对大蒜种质资源进行较全面的检测,对挖掘植物本身的抗性基因源,利用种质资源的抗性基因十分重要。对资源圃 212 份大蒜检测,发现大蒜辣素含量分布在 0.82% ~ 3.01% 之间,最高含量与最低含量之间相差近 4 倍,说明资源圃中保存的大蒜资源大蒜辣素含量变异范围较大。

4 结论

本研究建立了从样品处理、提取到检测较完善的大蒜辣素超高效液相色谱检测技术体系。对少量样品的检测可采用鲜样提取,而大批量的样品检测可采用冷冻干燥的前处理方法,样品以 40ml 提取体积,400mg 干燥样品或 800mg 鲜样进行提取,并进行 4℃ 8000rpm 离心 8min 后,过 0.45μm 的膜上机检测。

大蒜辣素测定的超效液相色谱方法,使用 UP-

LC BEH C18 色谱柱,流动相为甲醇:水 = 1:1,检测波长为 254nm,进样体积为 1μl,流速为 0.3ml/min,浓度在 2.04 ~ 510mg/L 范围内呈现良好线性关系 ($R^2 = 0.9991$)。

对 UPLC 检测体系准确性、精准性和稳定性评价,及对资源圃内的 212 份大蒜资源进行检测表明,大蒜辣素 UPLC 检测体系可实现大蒜辣素的高效准确检测。

参考文献

- [1] Yan L, Meng Q W, Ao X, et al. Effects of fermented garlic powder supplementation on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs fed low-nutrient-density diets [J]. Livestock Sci, 2011, 137 (1-3): 255-259
- [2] Yang H S, Lee E J, Moon S H, et al. Addition of garlic or onion before irradiation on lipid oxidation, volatiles and sensory characteristics of cooked ground beef [J]. Meat Sci, 2011, 88 (2): 286-291
- [3] Aslani M R, Najamezhad V, Mohri M. Individual and combined effect of Meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid and allicin on blood and tissue lead content in mice [J]. Planta Med, 2010, 76 (3): 241-244
- [4] Azadi H G, Riazi G H, Ghaffari S M, et al. Effects of *Allium hirtifolium* (Iranian shallot) and its allicin on microtubule and cancer cell lines [J]. Afr J Biotechnol, 2009, 8 (19): 5030-5037
- [5] Bai B, Chen F, Wang Z, et al. Mechanism of the greening color formation of "Laba" garlic, a traditional homemade Chinese food product [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53 (18): 7103-7107
- [6] Chen C H, Chou T W, Cheng L H, et al. In vitro anti-adenoviral activity of five *Allium* plants [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011, 42 (2): 228-232
- [7] Dugan F M, Hellier B C, Lupien S L. Resistance to *Penicillium allii* in accessions from a National Plant Germplasm System *Allium* collection [J]. Crop Prot, 2011, 30 (4): 483-488
- [8] Fry F H, Okarter N, Baynton-Smith C, et al. Use of asubstrate/alliinase combination to generate antifungal activity in situ [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53 (3): 574-580
- [9] Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, et al. Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays [J]. Biosci, Biotechnol Biochem, 2008, 72 (11): 2877-2883
- [10] Kamkar B, Koocheki A, Mahallati M N, et al. Fungal diseases and inappropriate sowing dates, the most important reducing factors in cumin fields of Iran, a case study in Khorasan provinces [J]. Crop Prot, 2011, 30 (2): 208-215
- [11] Lawson L D. Allicin bioavailability from alliinase-inhibited garlic [J]. Planta Med, 2009, 75 (4): 451
- [12] Lawson L D, Gardner C D. Composition, Stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53 (16): 6254-6261
- [13] Freeman F, Koda Y. Garlic Chemistry; Stability of S-(2-Propenyl)-2-Propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and

simulated physiological fluids [J]. J Agric Food Chem,1995,43 (9) :2332-2338

[14] Freeman F,Kodera Y. Rebuttal on garlic chemistry:stability of S-(2-Propenyl) 2-Propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood,solvents, and simulated physiological fluids [J]. J Agric Food Chem,1997,45 (9) :3709-3710

[15] Kirkplnar F,Ünlü H B,Özdemir G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance,carcase,organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers [J]. Livestock Science, 2011,137 (1-3) :219-225

[16] Khar A,Banerjee K,Jadhav M R,et al. Evaluation of Indian garlic ecotypes for allicin and other allyl thiosulphinates [J]. Food Chem,2011,128(4) :988-996

[17] Housley D J E,Ritzert E,Venta P J. Comparative radiation hybrid map of canine chromosome 1 incorporating SNP and indel polymorphisms [J]. Genomics,2004,84 (2) :248-264

[18] Li C,Zhao S,Zhang S,et al. Genetic polymorphism of 29 highly informative InDel markers for forensic use in the Chinese Han population [J]. Forensic Sci Int:Genet,2011,5 (1) :27-30

[19] Li M-X,Gui H-S,Kwan Johnny S H,et al. GATES:Arapid and powerful gene-based association test using extended simes procedure [J]. Am J Hum Genet,2011,88 (3) :283-293

[20] Pan C-h,Li A-h,Dai Z-y,et al. InDel and SNPmarkers and their applications in map-based cloning of rice genes [J]. Rice Sci, 2008,15 (4) :251-258

[21] Langlois E,Bisson D,Lefebvre M,et al. High-throughput quantification of cotinine in urine,serum and meconium by UPLC-MS-MS with automated SPE [J]. Ther Drug Monitoring, 2009,31 (5) :85

[22] Thomas A,Schanzer W,Delahaut P,et al. Sensitive and fast identification of urinary human,synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry [J]. Drug Testing and Analysis, 2009,1 (5) : 219-227

[23] Wales T E,Fadgen K E,Gerhardt G C,et al. High-speed and high-resolution UPLC separation at zero degrees Celsius [J]. Anal Chem,2008,80 (17) :6815-6820

[24] Janoszka B. HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic [J]. Food Chem,2011,126 (3) :1344-1353

[25] 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 (6) :534-536

[26] 王晓玲,温普红. 大蒜中大蒜辣素含量的测定 [J]. 宝鸡文理学院学报:自然科学版,1999 (4) :23-25

[27] Citova I,Havlikova L,Urbaneck L,et al. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns [J]. Anal Bioanalytical Chem,2007,388 (3) :675-681

[28] Park D J,Phapale P B,Jang I J,et al. An improved UPLC method for rapid analysis of levofloxacin in human plasma [J]. Chromatographia,2008,68 (3) :187-192

[29] 王海平,李锡香,沈镐,等. 大蒜种质资源对蒜蛆的抗性评价 [J]. 植物遗传资源学报,2010,11 (05) :578-582