

大蒜药材 HPLC 特征图谱研究(二)

常军民¹, 李燕菊², 于鲁海², 陈坚¹

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054 2. 新疆维吾尔自治区临床药学研究所, 乌鲁木齐 830001)

摘要 目的: 建立大蒜酶解产物的高效液相色谱特征图谱, 为大蒜的质控提供依据。方法: 采用 HYPERSIL ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水 (60:40) 洗脱; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 在 214 nm 波长下检测。测定 12 批药材的特征图谱。结果: 不同产地的大蒜酶解产物的相似度在 0.9 以上。结论: 建立的大蒜酶解后的特征图谱检测标准, 可以作为大蒜质量评价和品种鉴别的主要依据。

关键词: 大蒜; 大蒜辣素; 高效液相色谱; 特征图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0205-04

HPLC specific chromatogram analysis of *Allium sativum* Linn.

CHANG Jun-mi¹, LI Yan-ju², YU Lu-hai², CHEN Jian¹

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China 2. Xinjiang Institute of Clinical Pharmacy, Urumqi 830001, China)

Abstract Objective To establish the HPLC specific chromatograms of the enzymolysis products of *Allium sativum* Linn. for the quality control. **Methods** HPLC was performed on a HYPERSIL ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase was methanol-water (60:40); the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, while the detection wavelength was set at 214 nm. **Results** The HPLC specific chromatograms of 12 batches of *A. sativum* were obtained. The similarities were all above 0.9. **Conclusion** The established specific chromatograms can be used for the quality control of *Allium sativum* Linn.

Key words *Allium sativum* Linn.; allicin; specific chromatograms; RP-HPLC

大蒜是百合科 *Liliaceae* 葱属植物大蒜 (*Allium sativum* L.) 的鳞茎, 有丰富的氨基酸、维生素、微量元素等。作为药食同源的植物, 大蒜在我国有着悠久的历史。众所周知, 大蒜的功效成分是蒜氨酸 (allin)、蒜酶 (allinase) 及催化裂解产生的大蒜辣素 (allicin) 和阿霍烯 (*cis*-ajoene, *trans*-ajoene) 等化合物^[1]。为了控制大蒜的质量, 作者建立了蒜酶灭活后的大蒜药材特征图谱^[2]。大蒜的酶解过程主要是蒜氨酸和蒜酶转化成大蒜辣素等一系列的含硫化合物。研究表明, 大蒜辣素有明显的抗菌功效, 具有疗效好、副作用小等特点。因此选择大蒜辣素作为大蒜酶解物的参照物, 本文根据特征图谱的技术要求^[3], 采用 HPLC 法建立了大蒜酶解产物的特征图谱, 为大蒜质量的全面控制提供有效的方法。

1 仪器与试剂

安捷伦 1100 系列高效液相色谱仪 (美国); HHS 型电热恒温水浴锅 (上海博讯实业有限公司);

西贝乐 SQ2119C 型多功能食品加工机 (上海帅佳电子科技有限公司); pH213 型酸度离子测定仪 (意大利哈纳仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为纯水, 磷酸二氢钾、氢氧化钠为分析纯。

对照品蒜氨酸 (99.4%, 采用 HPLC 法测定), 由新疆医科大学药学院提供, 经紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振确证结构; 蒜酶 (活力: 1.12 μmol·min⁻¹·mg⁻¹, 采用 HPLC 法测定)。山东蒜为收购, 新疆各地大蒜均为采集, 由新疆医科大学药学院生药学教授帕丽达鉴定。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: HYPERSIL ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 甲醇-水 (60:40); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 214 nm; 分析时间: 20 min; 进样量: 5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 蒜酶溶液 称取蒜酶约 0.1 g 精密称定, 置

100 mL量瓶中,加纯水 50 mL,超声使溶解,加水至刻度摇匀,即得。

2.2.2 蒜氨酸底物溶液 精密称取蒜氨酸对照品 0.02 g置 10 mL量瓶中,加纯水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 大蒜辣素溶液 精密吸取蒜氨酸底物溶液及蒜酶溶液各 1 mL,混匀,立即置(35±0.5)℃水浴中准确反应 15 min精密加入甲醇 3 mL,混匀,微孔滤膜(0.45 μm)过滤,即得。大蒜辣素为单体化合物,不稳定,易分解。在此条件下所得大蒜辣素在 13 h内含量维持在较高水平。这一体系获得的大蒜辣素可以作为对照物^[4]。

2.2.4 供试品溶液 精密称取不同产地的去皮大蒜 10 g加磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.8 g加 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 152 mL,用水稀释至 1000 mL, pH= 6.5),即得) 50 mL,在食品加工机中破碎 15 s,转移至 250 mL三角烧瓶中,再加入磷酸盐缓冲液 50 mL在(35±0.5)℃水浴中,准确反应 10 min,精密吸取 1.0 mL,置 10 mL量瓶中,加甲醇 5 mL,以水定容至刻度,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验 按“2.2.4”项下方法,制备同一批样品的供试品溶液,分别在 0,1,2,4,6,8,10,12,24,36,48 h进样测定。结果表明,各共有峰的保留时间基本一致,保留时间比值的 RSD为 2.2%,峰面积比值的 RSD为 6.8%。

2.3.2 精密度试验 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,连续进样 5次,进行日内精密度考察。结果表明,各共有峰的保留时间基本一致,保留时间比值的 RSD为 1.7%,峰面积比值的 RSD为 4.8%。

2.3.3 重复性试验 取同一批次样品按“2.2.4”项下方法,平行制备 5份溶液,进行测定。结果表明,各共有峰的保留时间基本一致,保留时间比值的 RSD为 1.5%,峰面积比值的 RSD为 2.4%。

2.4 样品测定 取 12批大蒜药材,分别按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液并检测,根据检测结果制定大蒜药材特征图谱及技术参数。

2.5 结果

2.5.1 12批不同产地[1号,吉木萨尔(编号 200501);2号,吉木萨尔(编号 200502);3号,吉木萨尔独头蒜(编号 200601);4号,山东白皮蒜(编号 200602);5号,山东红皮蒜 1(编号 200603);6号,山东红皮蒜 2(编号 200604);7号,喀什沙门乡蒜(编号 200605),8号,玛纳斯蒜(编号 200606),9号,英吉沙芒辛乡蒜(编号 200607);10号,新地蒜(编号 200608);11号,老泉子街蒜(编号 200609);12号,半截沟蒜(编号 200610)]。

大蒜特征图谱相似度比较见表 1。结果表明,12批不同产地的大蒜酶解后特征图谱之间的相似度在 0.9 以上,具有较好的相关性,且峰形基本一致。

表 1 特征图谱的相似度结果比较见表 1

Tab 1 The similarities of 12 batches of the enzymolysis products of *A. Sativum*

药材编号 (sample No)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	对照特征图谱 (control)
1													
2	0.977												
3	0.992	0.961											
4	0.988	0.973	0.979										
5	0.979	0.959	0.971	0.996									
6	0.991	0.968	0.983	0.998	0.997								
7	0.988	0.962	0.981	0.994	0.997	0.998							
8	0.98	0.958	0.972	0.996	1	0.997	0.998						
9	0.95	0.935	0.933	0.983	0.991	0.981	0.981	0.991					
10	0.973	0.954	0.959	0.994	0.997	0.993	0.993	0.998	0.996				
11	0.974	0.953	0.968	0.994	0.999	0.995	0.995	0.999	0.991	0.997			
12	0.986	0.96	0.977	0.997	0.997	0.998	0.997	0.998	0.986	0.997	0.995		
对照特征图谱(control)	0.988	0.97	0.979	0.999	0.998	0.999	0.998	0.999	0.985	0.996	0.996	0.999	1

2. 5. 2 新鲜大蒜的特征图谱及各项技术参数 在 12批大蒜中以喀什沙门乡 (编号 200605)的大蒜辣素含量为最高, 选择它作为参照图谱; 以大蒜辣素为参照物, 其相对保留时间为 1. 0 大蒜酶解产物的色谱图经标示, 共有 14个共有峰。相对保留时间见表 2。特征图谱共有峰相对峰面积见表 3。

表 2 12批大蒜样品各共有峰的相对保留时间

Tab 2 The relative t_R of the common peaks of 12 batches

药材编号 (sample No)	各色谱峰编号 (number of peaks)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(S)	13	14
1	0.198	0.254	0.282	0.310	0.348	0.382	0.437	0.488	0.560	0.683	0.794	1.000	1.312	1.369
2	0.198	0.255	0.283	0.312	0.349	0.384	0.440	0.488	0.561	0.683	0.795	1.000	1.312	1.368
3	0.198	0.252	0.284	0.312	0.350	0.385	0.442	0.495	0.561	0.682	0.787	1.000	1.312	1.369
4	0.198	0.253	0.284	0.313	0.350	0.385	0.444	0.495	0.561	0.683	0.788	1.000	1.311	1.368
5	0.200	0.254	0.284	0.314	0.351	0.385	0.446	0.496	0.563	0.683	0.789	1.000	1.311	1.368
6	0.199	0.255	0.284	0.313	0.350	0.386	0.445	0.496	0.562	0.683	0.789	1.000	1.311	1.368
7	0.201	0.255	0.284	0.313	0.350	0.383	0.444	0.496	0.563	0.683	0.790	1.000	1.310	1.368
8	0.200	0.254	0.283	0.313	0.350	0.383	0.442	0.496	0.563	0.683	0.790	1.000	1.311	1.368
9	0.200	0.254	0.283	0.312	0.350	0.383	0.442	0.496	0.561	0.683	0.790	1.000	1.310	1.367
10	0.200	0.253	0.283	0.313	0.350	0.384	0.442	0.497	0.561	0.684	0.791	1.000	1.309	1.368
11	0.199	0.252	0.284	0.312	0.350	0.384	0.441	0.497	0.561	0.684	0.790	1.000	1.308	1.368
12	0.200	0.253	0.284	0.313	0.350	0.384	0.441	0.497	0.562	0.684	0.791	1.000	1.310	1.368
均值 (average)	0.199	0.254	0.283	0.312	0.350	0.384	0.442	0.495	0.562	0.683	0.790	1.000	1.310	1.368
RSD %	0.57	0.46	0.25	0.28	0.20	0.28	0.53	0.69	0.16	0.08	0.30	0.00	0.09	0.04

表 3 12批大蒜药材各共有峰相对峰面积比值

Tab 3 The relative area of the common peaks of 12 batches

药材编号 (sample No)	各色谱峰编号 (number of peaks)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(S)	13	14
1	1.798	0.077	0.066	0.108	0.027	0.093	0.115	0.020	0.229	0.040	0.000	1.000	0.031	0.1555
2	2.093	0.091	0.100	0.267	0.065	0.155	0.587	0.045	0.158	0.046	0.004	1.000	0.039	0.2249
3	1.559	0.021	0.035	0.046	0.022	0.033	0.048	0.152	0.123	0.009	0.041	1.000	0.041	0.1435
4	2.592	0.067	0.097	0.115	0.045	0.080	0.147	0.174	0.275	0.045	0.050	1.000	0.098	0.2212
5	2.895	0.035	0.054	0.052	0.022	0.031	0.057	0.194	0.177	0.016	0.040	1.000	0.041	0.1124
6	2.415	0.057	0.058	0.051	0.030	0.047	0.067	0.105	0.190	0.027	0.018	1.000	0.057	0.1477
7	2.377	0.026	0.034	0.048	0.021	0.031	0.036	0.077	0.168	0.007	0.016	1.000	0.017	0.0246
8	2.837	0.043	0.051	0.049	0.019	0.036	0.040	0.169	0.234	0.012	0.048	1.000	0.028	0.0739
9	4.729	0.057	0.052	0.075	0.016	0.062	0.093	0.312	0.486	0.026	0.121	1.000	0.007	0.0471
10	3.285	0.022	0.042	0.061	0.033	0.079	0.072	0.157	0.396	0.024	0.071	1.000	0.051	0.0639
11	2.946	0.016	0.045	0.023	0.032	0.042	0.048	0.261	0.178	0.010	0.086	1.000	0.039	0.0452
12	2.585	0.023	0.046	0.043	0.027	0.056	0.030	0.106	0.317	0.021	0.047	1.000	0.062	0.1162

2. 5. 3 特征图谱及共有峰标定 按国家药品监督管理局“中药注射液指纹图谱技术研究的技术要求 (试行)”研究, 采用国家药典委员会组织编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件对特征图谱进行评价, 测定了 12 批大蒜酶解产物的特征图谱, 并制定了以大蒜辣素为参照物的大蒜酶解物的标准特征图谱见图 1。12 批大蒜酶解后的特征图谱的相似性见图 2。大蒜酶解物特征图谱共有峰的峰号 (相对保留时间): 1(2. 550), 2(3. 246), 3(3. 621), 4(3. 997), 5(4. 473), 6(4. 913), 7(5. 657), 8(6. 329), 9(7. 178), 10(8. 740), 11(10. 11), 12(12. 792)大蒜辣素, 13(16. 764), 14(17. 502)。

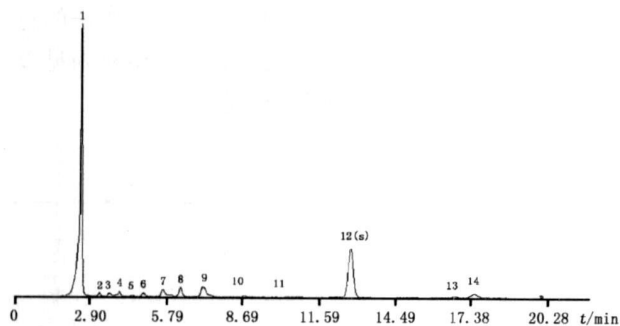


图1 大蒜酶解物的 HPLC 特征图谱

Fig 1 HPLC specific chromatogram of the enzymolysis products of *A. sativum*

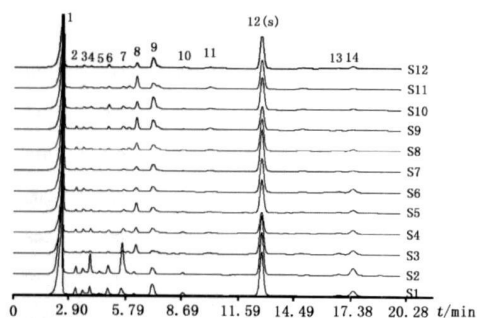


图2 12批大蒜酶解物的 HPLC 特征图谱

Fig 2 HPLC specific chromatograms of 12 batches of the enzymolysis products of *A. sativum*

S1 ~ S2. 1 ~ 12 号样品 (sample No. 1 ~ 12)

3 讨论

3.1 本文采用 HPLC 法测定了 12 批不同产地的大蒜特征图谱, 建立了大蒜的特征图谱。结果表明, 分析方法可靠, 重现性好。在给定条件下所得到的大蒜酶解后化学成分的特征。

3.2 在 12 批大蒜中有 2 批 (1 号及 2 号) 大蒜样品为 2005 年产, 其余 10 批为 2006 年鲜蒜。2005 年产大蒜 (陈蒜) 的特征图谱中保留时间为 14.875 min 的色谱峰未出现, 而在 2006 年产大蒜 (鲜蒜, 当年测定) 的特征图谱中均出现, 鲜蒜与陈蒜在此存在的差异是否具有鉴别价值, 有待进一步验证。

3.3 本文大蒜辣素的溶液的制备方法是课题组研究蒜酶催化蒜氨酸反应体系确定蒜酶与蒜氨酸的配比及生成大蒜辣素的稳定性时确定的方法, 已撰文发表^[4]。通过比较和考察, 采用该色谱条件, 分离效果较好, 可以反映大蒜药材的特征性。

参考文献

- 1 YAN Chang-kai (严常开), ZENG Fan-dian (曾繁典). Recent advances in research of garlic's chemical constituents and their pharmacological effects (大蒜的主要化学成分及药理作用的研究进展). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004 13(8): 688
- 2 LI Yan-ju (李燕菊), YU Lu-hai (于鲁海), CHANG Jun-min (常军民). HPLC fingerprint analysis of *Allium sativum* Linn. (大蒜的高效液相指纹图谱初探). *Xinjiang J Tradit Chin Med* (新疆中医药), 2007 25(1): 18
- 3 Chinese Pharmacopoeial Committee (国家药典委员会). The Technique Requirement of Fingerprint of Traditional Chinese Medical injections (Tentative) [中药注射剂指纹图谱的技术要求 (试行)]. 2000
- 4 WANG Wei-ping (王伟萍), CHANG Jun-min (常军民), CHEN Jian (陈坚). Study of the proportion with alliin and alliinase and the stability in alliin by HPLC (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 Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26(6): 534

(本文于 2007 年 12 月 3 日收到)