

保健食品中大蒜素色谱检测方法的研究

徐丽红^{1,2}, 王建清^{1,2}, 张巧艳^{1,2}, 李晓敏³, 邱承海³, 袁利文³

(1. 农业部农产品质量监督检验测试中心, 浙江 杭州 310021; 2 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 浙江 杭州 310021; 3 完美(中国)日用品有限公司, 广东 中山 528402)

摘要:以固体类、液体类、半固体类 3 类保健食品为研究对象, 建立了气相色谱法测定保健食品中大蒜素的主要功效成分二烯丙基三硫醚 (DATS)、二烯丙基二硫醚 (DADS) 含量的检测方法。考察了不同提取溶剂、提取方式、提取温度、提取时间的影响, 并对 3 类保健食品样品进行高低两水平的加标回收实验。试样以丙酮水溶液 (体积比 8 : 2) 恒温水浴 (超声) 提取, 经 PEG-20M 色谱柱 (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) 分离, 氢火焰离子化检测器 (FD) 测定, 内标法计算含量。DATS 与 DADS 的检出限分别为 5.0、1.5 mg/kg, 加标回收率分别为 91%~109%、91%~108%。重复性 RSD 为 2.6%~3.1%, 再现性 RSD 为 4.1%~8.4%。将该法与 HPLC 相比较, 结果无显著性差异。该方法简便快速, 结果准确可靠, 适用于多种保健食品中大蒜素含量的检测。

关键词:大蒜素; 气相色谱法; 氢火焰离子化检测器 (FD); 保健食品

中图分类号: O657.71; S633.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2010)08 - 0802 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2010.08.009

Study on the Determination of Allicin in Health Food

XU Li-hong^{1,2}, WANG Jian-qing^{1,2}, ZHANG Qiao-yan^{1,2},

LI Xiao-min³, QIU Cheng-hai³, YUAN Li-wen³

(1. Farm Products Quality Supervision and Inspection Center of China Agriculture Department, Hangzhou 310021, China; 2 Institute of Quality and Standard for Farm Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3 PERFECT(CHINA)CO, LTD, Zhongshan 528402, China)

Abstract: A gas chromatographic method was developed for the determination of main active components diallyl trisulfide (DATS) and diallyl disulfide (DADS) of allicin in three kinds of health food including solid, liquid and semi-solid. Effects of extraction solvent, extraction means, extraction temperature and time on the extraction efficiency of DATS and DADS were investigated. The sample was extracted with 80% acetone solution, and isolated with PEG-20M (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) column, then detected with flame ionization detector (FD) and calculated by internal standard method. The detection limits of DATS and DADS were 5.0 mg/kg and 1.5 mg/kg, respectively. The spiked recoveries from three matrices at high and low levels were in the ranges of 91% - 109% for DATS and 91% - 108% for DADS. The relative standard deviations (RSDs) for repeatability were 2.6% - 3.1% and RSDs for reproducibility were 4.1% - 8.4%. The method was applied in the determination of allicin in real sample, and the results were consistent with those obtained from the HPLC method. The method was suitable for the detection of allicin in health food with its high sensitivity, simplicity and accuracy.

Key words: allicin; gas chromatography; flame ionization detector (FD); health food

大蒜素是大蒜的活性成分, 具有抗菌、消炎、抗病毒、降血压、抗动脉粥样硬化、抗癌、抗氧化、提高机体免疫等功效^[1-3], 其主要成分为有机硫醚类化合物, 其中二烯丙基三硫醚 (DATS)、二烯丙基二硫醚 (DADS) 是最主要的活性成分。我国是大蒜的主要生产国, 年产量约 400 万吨 (约占世界总产量的 1/4), 居世界第一位, 鲜蒜及其加工制品除供国内消费外, 还大量出口到日本、东南亚等国家。大蒜素含量是评价大蒜素保健品功效的重要指标, 但目前国内尚无保健食品中大蒜素等含硫化合物含量

收稿日期: 2010 - 05 - 24; 修回日期: 2010 - 06 - 28

基金项目: 国家标准制定项目资助 (20081270 - T - 469)

第一作者: 徐丽红 (1962 -), 女, 浙江丽水人, 副研究员, Tel: 0571 - 86415207, E-mail: xlh3888@163.com

的统一检测标准。因此制定“保健食品中大蒜素含量测定”的国家标准，可为生产企业和检测机构提供统一的检测依据，有效规范保健食品市场的有序竞争，有利于保障消费者利益和产业健康发展。大蒜素的检测方法主要有重量法、容量法、分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱法^[4-14]。由于大蒜素稳定性差，测定较困难，用 GC-MS 法测定时，方法虽简便快速、准确可靠，但仪器成本较高，不易普及^[12]。气相色谱仪操作简单，成本不高，省时经济。本文应用气相色谱法建立了简便、可靠、科学的保健食品中 DATS 和 DADS 含量的定量分析方法，旨在为制定国家标准提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Trace GC Ultra (美国热电公司) 附带氢焰离子化检测器 (FD)，电子天平 (0.000 1 g)，超声清洗机。DATS 标准品、DADS 标准品 (含量 98%，美国 Fluke 公司)；苯乙酮、丙酮均为分析纯。样品类型：固体类 (片剂)、液体类 (蒜油)、半固体类 (软胶囊)。1 000 mg/L 苯乙酮内标溶液：称取 1.000 g 苯乙酮加丙酮摇匀充分溶解，并定容于 1 000 mL 容量瓶中，静置 4 h 后使用。

称取 DATS 和 DADS 标准品各 0.1 g (以纯度 100% 折算，精确至 0.000 1 g)，用丙酮溶解并定容至 100 mL，配制成 1 000 mg/L 的混合标准储备液 A；称取 DATS 和 DADS 标准品各 0.1 g，用 80% 丙酮水溶液溶解并定容至 100 mL，配制成 1 000 mg/L 的混合标准储备液 B (密封后 -4 °C 保存，保质期 3 个月)。

吸取 1.0 mL 标准储备液 A 于 10 mL 容量瓶中，加苯乙酮内标 (A IS) 溶液 1.0 mL，用丙酮稀释，定容，配制成 100 mg/L 的混合标准工作液 A；吸取 1.0 mL 标准储备液 B 于 10 mL 容量瓶中，加苯乙酮内标溶液 1.0 mL，用 80% 丙酮水溶液稀释，定容，配制成 100 mg/L 的混合标准工作液 B。混标液静置 4 h 后使用，保质期 7 d。

1.2 样品前处理

固体试样：称取研磨均匀的试样约 0.2~2 g (精确至 0.000 1 g)，加丙酮 30 mL 溶解于 100 mL 具塞三角瓶中，摇匀，加塞置 40 °C 水浴锅，水浴提取 40 min，每隔 10 min 摇动 1 次，取出冷却至室温后，转移至 50 mL 容量瓶中，加苯乙酮内标溶液 1.0 mL，用丙酮定容，摇匀，过滤，滤液待测。

对于大蒜素含量较低的固体类样品，称取研磨均匀的试样 0.5~2 g (精确至 0.000 1 g) 于 100 mL 具塞三角瓶中，加 80% 丙酮水溶液 30 mL，摇匀，加塞置 40 °C 超声波仪中提取 20 min，转移至 50 mL 容量瓶中，加苯乙酮内标液 1.0 mL，用 80% 丙酮水溶液定容，摇匀过滤，滤液待测。

液体试样：称取约 0.2~1 g (精确至 0.000 1 g)，加丙酮 30 mL 溶解于 100 mL 具塞三角瓶中，摇匀，密封后置超声波仪中超声提取 10 min，转移至 50 mL 容量瓶中，加苯乙酮内标溶液 1.0 mL，用丙酮定容，摇匀，过滤，滤液待测。

半固体试样：半固体试样 (软胶囊) 介于固体试样和液体试样之间，能与丙酮互溶，提取方法参照液体试样。

1.3 气相色谱法的测定

分别取标准工作液 A (或 B) 和试液进样，以色谱峰保留时间定性、峰面积内标法定量。色谱条件：色谱柱：30 m × 0.32 mm × 0.5 μm，内涂聚乙二醇 (PEG-20M)。进样口温度：230 °C；检测器温度：230 °C；升温程序：90 °C 保持 1 min，以 15 °C/min 升温至 210 °C，保持 5 min；进样方式：分流进样，分流比 20 : 1；进样量 2 μL。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的考察

2.1.1 样品酶解与不酶解处理的比较 完整无损的大蒜无嗅，即不含硫醚类等含硫化合物。当大蒜被切开或粉碎时，释放出的内源酶即蒜酶 (Alliinase) 酶解大蒜中的蒜氨酸 (Alliin, S-Allyl-L-cysteine sulfonoxide) 生成蒜素 (二烯丙基硫代亚磺酸酯, Allicin, Diallyl thiosulfinate)。蒜素极不稳定，尤其是遇热时，

迅速降解或经分子重排生成单、二、三和聚硫醚类等含硫化合物^[15]。根据大蒜素等硫醚类化合物的形成机理，将大蒜素样品水浴酶解 1 h，用 80%乙醇提取，正己烷萃取，测定结果与不酶解处理的测定结果进行比较(结果见表 1)。结果表明，酶解样品的 DATS 含量略低于不酶解的样品，DADS 含量则高于不酶解的样品，相对相差达 21.8%；总和略低于不酶解的样品，但相对相差仅 2.5%，差异不显著。说明保健食品中的大蒜素在加工过程中已完成酶解过程，所以酶解处理对样品的测定影响不大。故无需对样品进行酶解处理。

表 1 酶解与否测定结果的比较
Table 1 Comparison of contents between the allicin with enzyme degradation and that without degradation

Compound	Enzyme	w/(g·kg ⁻¹)							$\bar{w}/(g\cdot kg^{-1})$	RSD s _r /%	Relative discrepancy(%)
		1	2	3	4	5	6	7			
DATS	With	112.3	112.4	110.6	111.8	109.0	121.8	116.5	113.5	3.81	4.7
	Without	120.9	122.7	112.4	121.8	119.4	117.2	118.4	119.0	2.92	
DADS	With	10.94	11.59	12.24	11.88	11.15	12.26	11.37	11.63	4.45	21.8
	Without	9.526	9.254	8.244	9.456	9.112	9.080	10.74	9.345	7.98	
Summation	With	123.2	124.0	122.8	123.7	120.2	134.1	127.9	125.1	3.65	2.5
	Without	130.4	132.0	120.6	131.3	128.5	126.3	129.1	128.3	3.04	

2.1.2 提取溶剂的确定 用常见溶剂丙酮、正己烷、环己烷、石油醚、乙醇、甲醇等分别提取大蒜素粉剂样品(见图 1)，测定结果表明，丙酮的提取效果最好，甲醇、乙醇次之，相对相差在 20%以内，正己烷、环己烷、石油醚的提取效果较差。乙醇、甲醇提取后不利于一般气相毛细管色谱柱的分离，通常不直接进样，选用正己烷等溶剂进行再萃取，步骤较多，且萃取率直接影响大蒜素的回收率；丙酮直接提取不仅效果好，且可以直接进样，便于操作。因此选用丙酮为提取溶剂，直接进样的方式。

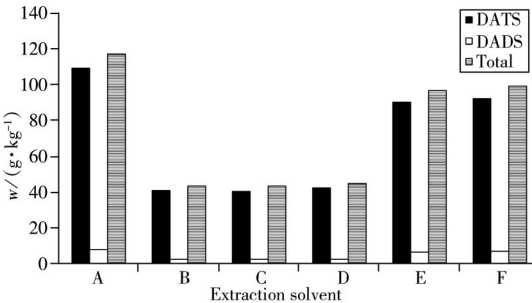


图 1 提取溶剂的选择

Fig. 1 Effect of different extraction solvent on extraction efficiency

A. acetone, B. hexane, C. cyclohexane
D. petroleum ether, E. ethanol, F. methanol

2.1.3 提取方式的确定 采用恒温水浴(50℃)、超声波、恒温振荡仪(50℃、150 r/min)3种提取方式分别对含量较高的样品进行提取。结果表明，3种提取方法的差异不明显。由于水浴提取比较容易，一般大蒜素样品(含量较高的粉剂、蒜油、软胶囊等)选择用恒温水浴进行提取。

对于含量较低的固体类样品(含量少于 10 g/kg)，采用不同的提取方法进行实验。提取方法包括：①用丙酮 40℃水浴提取 40 min；②用丙酮超声提取 40 min；③用丙酮超声提取 40 min，静置过夜；④用丙酮超声提取 1.5 h；⑤用丙酮 40℃恒温摇床振荡提取 2.5 h；⑥用 80%丙酮超声提取 1 h；⑦用乙醇超声提取 40 min。测定结果见表 2。结果表明，超声提取效果略优于水浴提取。乙醇提取效果显著优于 100%丙酮，而采用 80%丙酮水溶液的提取效果则与乙醇相当，分析原因可能是由于大蒜素被包埋于辅料中，乙醇极性较强，更容易透过屏障将大蒜素提取出来。当用 80%丙酮水溶液提取时，可能大蒜素表层的包埋物被水分子溶解，从而有效地提取出大蒜素，测定结果与乙醇提取液相法的结果相当。对于含量较低的固体类样品，用 80%丙酮超声提取。

2.1.4 提取温度的确定 固定提取时间 1 h，考察不同提取温度对测定结果的影响。实验结果表明，当提取温度为 40℃时，DATS 与 DADS 的萃取效率较好。因此，确定提取温度为 40℃。

2.1.5 提取时间的确定 固定提取温度为 40℃，考察不同提取时间对固体类样品测定结果的影响。

表 2 不同提取方法对含量较低的固体类样品的测定结果
Table 2 Contents of allicin in low content solid samples detected by different extraction methods

Extraction method	w/(g·kg ⁻¹)		
	DATS	DADS	Total
1	2.37	0.68	3.06
2	2.71	0.80	3.51
3	2.82	0.76	3.58
4	3.02	0.77	3.79
5	2.62	0.68	3.30
6	5.10	1.17	6.27
7	4.74	1.11	5.85

结果表明, 0~10 min 时, DATS 的提取率迅速升高; 10~40 min, 提取率继续升高, 但升高速率变缓; 提取 40 min 达到最大; 继续延长提取时间对 DATS 的提取效率影响不大。DADS 的变化趋势与 DATS 类似。因此实验确定固体类样品的水浴提取时间为 40 min。

含量较低的固体类样品采用 80% 丙酮水溶液超声提取, 实验结果表明, 0~10 min, DATS 的提取率迅速升高; 10~20 min, 提取率继续升高, 但升高速率变缓; 20 min 达到最大; 20 min 以后基本保持不变。DADS 的变化趋势与 DATS 类似。确定含量较低的固体类样品超声提取时间为 20 min。

液体类样品 (通常为蒜油或其软胶囊) 与丙酮互溶, 可用超声波提取。由实验结果可知, DATS、DADS 随超声时间变化不显著。可见, 超声时间对液体类样品的提取率影响不大。丙酮为极性有机溶剂, 对大蒜素等有机硫醚类化合物具有良好的溶解性。为加快溶解、节省分析时间, 液体类样品选用超声 10 min。

在上述优化实验条件下, 大蒜素标准溶液、大蒜素片剂、大蒜素胶囊、蒜油样品的色谱图见图 2。

2.2 方法的精密度与准确度

2.2.1 本实验室的重复性

在本实验室, 由同一操作人员使用相同的仪器设备, 按相同的测定方法, 在短时间内分别平行测定固体类样品和液体类样品 11 次。固体类和液体类样品中 DADS 的 RSD 分别为 4.2%、5.0%; DATS 的 RSD 分别为 4.0%、4.8%, 均小于 5%。

由同一操作人员使用相同的仪器设备, 按相同的测定方法, 在一段时间内, 分别重复测定固体类样品和液体类样品 8 次。固体类样品、液体类样品 DADS 的 RSD 分别为 5.6%、5.7%; DATS 的 RSD 分别为 5.2%、5.9%, 均小于 10%。由不同操作人员使用相同的仪器设备, 按相同的测定方法, 在短时间内分别对同一固体类样品和液体类样品各平行测定 7 次。两类样品的 RSD 为 0.64%~3.0%。

2.2.2 实验室间的再现性 根据 GB/T 5009.1 - 2003 《食品卫生检验方法 理化部分 总则》的规定, 参照 GB/T 6379.2 - 2004 《测试方法与结果的准确度 (正确度与精密度) 第 2 部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法, 邀请 6 家单位参加验证试验工作, 对方法的精密度 (重复性和再现性) 进行了试验。结果表明, 固体类、液体类、半固体类样品实验室间的重复性 RSD 分别为 3.1%、3.1%、2.6%, 再现性 RSD 分别为 4.8%、4.1%、8.4%; 均低于 10%。

2.2.3 方法的准确度 分别对固体类、液体类、半固体类样品进行两水平 (15%、90%) 5 次重复加标回收实验, 固体类样品 (蒜片) 中 DATS、DADS 的回收率分别为 96%~104%、91%~108%; 液体类样品 (蒜油) 中 DATS、DADS 的回收率分别为 91%~107%、91%~103%; 半固体类样品 (大蒜软胶囊) 中

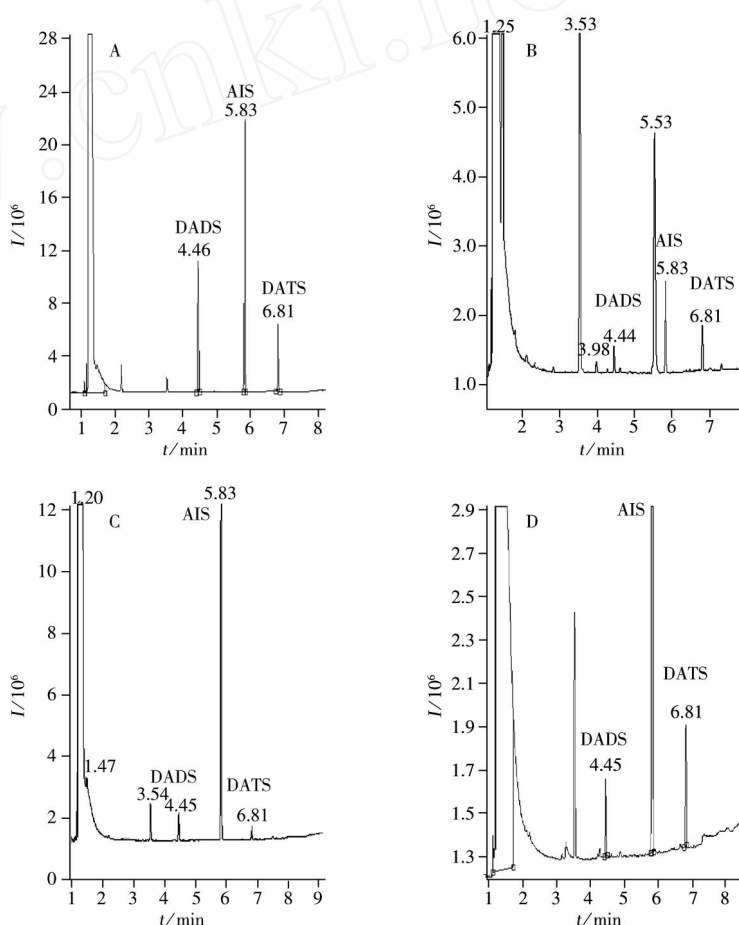


图 2 大蒜素标准溶液 (A)、大蒜素片剂 (B)、大蒜素胶囊 (C) 与蒜油样品 (D) 的色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of allicin standard (A), allicin troche (B), allicin capsule (C), allicin oil (D) sample

DATS、DADS的回收率分别为 91%~109%、94%~106%。方法的准确度符合 GB/T27404 - 2008要求。

2.3 线性范围与检出限

在优化条件下，DATS的线性范围分别为 1.1~428、214~3 207 mg/L，DADS的线性范围分别为 1.0~310、103~3 099 mg/L。本方法标准工作曲线在低浓度和高浓度范围内均呈良好的线性关系，相关系数达 0.999以上。

以 3倍信噪比测得 DATS、DADS的检出限分别为 0.4、0.3 ng，进样体积为 2 μL，则该仪器检出限为：DATS 0.2 mg/L，DADS 0.15 mg/L；方法的检出限为：DATS 5.0 mg/kg，DADS 1.5 mg/kg。

2.4 标准工作液的稳定性

将标准工作溶液用封口膜封口，于 4 °C冷藏保存，考察其稳定性。结果表明，标准工作液在冷藏 1周之内，DATS和 DADS各点浓度的峰面积无明显变化，从第 8 d开始，DATS和 DADS各浓度点的峰面积逐渐升高，其中 DATS升高相对较明显。因此确定标准工作液保质期为 7 d。

2.5 实际样品测定

用本方法对 3种类型保健食品样品中的大蒜素含量进行检测，实验结果见表 3。测得值和高效液相色谱法的测得结果较一致，经成组数据双样本等方差 t检测，结果无显著性差异。

表 3 实际样品的测定
Table 3 Determination of real samples

Sample	Marking value	This method	HPLC method
		w/(g·kg ⁻¹)	w/(g·kg ⁻¹)
Allicin capsule	- *	2.53, 2.34, 2.77	2.65, 2.82, 2.76
Allicin troche	6.25	5.89, 6.01, 5.88, 5.82, 5.98	6.02, 5.85, 5.95, 5.94, 5.93
Allicin oil	-	18.4, 19.23, 19.73	18.9, 18.74, 18.85

* no marked

参考文献：

[1] 王宁, 史岩眉, 朱军, 张勤枢. 大蒜的化学成分及检测方法研究 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2003, 18 (5): 192 - 194

[2] 徐巍, 苏乐群, 李宏建. 大蒜素的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27 (6): 805 - 806

[3] 谭尉. 不同地区大蒜中大蒜油组分分析 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (6): 343 - 344

[4] 马往校, 段敏, 孙新涛, 李岚. 定硫法测定大蒜中大蒜素含量及影响因素 [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14 (16): 22 - 23

[5] GB 8862 - 1988 脱水大蒜中挥发性有机硫化化合物的测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社.

[6] 中华人民共和国农业部. NY/T 1497 - 2007. 饲料添加剂 大蒜素 (粉剂) [S].

[7] 周桦, 孙海燕, 曹忠波. 保健食品中大蒜素含量气相色谱法测定 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22 (11): 1397

[8] 赖珊, 魏雪芳. GC法测定大蒜 β₂ 环糊精包合物中大蒜素的含量 [J]. 广东药学, 2004, 14 (2): 5 - 7

[9] 宋光林, 杨鸿波, 谢峰, 陆洋, 谭红, 何锦林. 高效液相色谱法测定蒜油中大蒜素的含量 [J]. 食品科技, 2007, 32 (4): 181 - 182

[10] 王国强, 陈爱瑛. 毛细管气相色谱法测定大蒜油软胶囊中大蒜素的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25 (7): 659 - 660

[11] 姚军, 张明月, 张培. 保健食品中大蒜素含量的测定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (5): 924 - 925

[12] 付松, 谢碧俊. GC/MS法检测保健食品——大蒜油中大蒜素 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (12): 1461 - 1462

[13] 陈能煜, 陈丽, 伍睿. 大蒜的检测方法进展 [J]. 食品技术, 1998, 6: 16 - 19

[14] 李叙勇, 史玉宝. 高效液相色谱法测定大蒜及其制品中的大蒜素 [J]. 分析测试学报, 1997, 16 (6): 50 - 51

[15] 贾江滨, 刘静, 谭亚非. 大蒜化学成分研究进展 [J]. 广东药学, 1999, 9 (1): 1 - 5