

大蒜素的臭氧氧化合成以及 在大蒜精油中的应用研究

李文清,周 华*,晏日安,黄雪松,欧仕益

(暨南大学理工学院食品科学与工程系,广东广州 510632)

摘 要:为了提高大蒜素的产率和大蒜精油中大蒜素的含量,本文以二烯丙基二硫醚为原料,以臭氧为氧化剂化学合成大蒜素,研究反应温度、反应时间、反应物浓度、臭氧流量对大蒜素产率的影响。结果表明:大蒜素产率随着反应时间的增加而不断上升,但在反应进行4h后,有副产物产生;大蒜素产率随着反应温度、二烯丙基二硫醚浓度、臭氧流量的增加呈现先上升后下降的趋势。采用响应面分析法,得到了大蒜素的最优合成条件:反应时间为4.0h,反应温度为8.06℃,臭氧通入量为0.28L/min,二烯丙基二硫醚浓度为0.18mmol/mL,大蒜素产率为59.53%。说明最优条件下,采用臭氧氧化大蒜精油,可以获得富含大蒜素的大蒜精油,大蒜精油的品质得到了提升和改善。

关键词:大蒜素,臭氧,氧化,大蒜精油

Study on the synthesis of allicin by using ozone and the application of the method on garlic oil

LI Wen-qing, ZHOU Hua*, YAN Ri-an, HUANG Xue-song, OU Shi-yi

(Department of Food Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to attain the higher yield of allin and higher content of that in garlic oil, the key effect factors were investigated; as the reaction time was prolonged, the yield of allicin was increased, but the byproduct of reaction was presented after more than four hours. As the reaction temperature and reactant concentration and the ozone flow increased, the yield of allicin was first increasing and then decreasing. The respond surface methodology was used to optimize the synthesis condition of the reaction; the reaction time was 4h, and the reaction temperature was about 8.06℃, and the ozone flow was 0.28L/min, and reactant concentration was 0.18mmol/mL. In the above optimized synthesized condition, the ozone was used to oxidize the garlic oil, the yield of allicin was 59.53%. The garlic oil with high content of allicin could be obtained and the quality of garlic oil could be improved in the above-mentioned optimized condition.

Key words: allicin; ozone; oxidation; garlic oil

中图分类号: TS234.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)01-0202-05

大蒜素(别名:二烯丙基硫代亚磺酸酯;英文名:Allicin)是大蒜中最具代表性的一种含硫化合物,就其风味而言,大蒜素比大蒜中其他含硫化合物更接近新鲜大蒜的味道^[1],其生物活性特别是抗氧化活性更是远远强于大蒜中的其他化学成分^[2-4]。目前制备大蒜素的方法主要有两种:一、从大蒜中直接提取,李瑜等报道用乙醇提取大蒜,可以得到大蒜素含量为75.03%的大蒜精油^[5],但放置一段时间后,大蒜素因为分解而所剩无几^[6]。必须说明的是,目前工业生产中使用的的大蒜精油,基本都采用水蒸气提取法^[7-8]。但是该方法得到的不是大蒜素,而是以二烯丙基二硫醚为主要成分的混合物。二、化学合成法,

采用双氧水^[9]或对氯过氧苯甲酸^[10]为氧化剂,以二烯丙基二硫醚为反应原料,经化学合成得到。这两种方法各有利弊,直接提取法,优点在于纯天然,缺点是成本较高;第二种方法优点在于合成效率高,但是产品非天然。但无论采用上述哪种方法,大蒜素均不能保存太长的时间。为了提高大蒜素的产率和大蒜精油中大蒜素的含量,本文以二烯丙基二硫醚为模型化合物(其为水蒸气提取大蒜精油中的主要成分),采用臭氧(家庭一般具有消毒柜,里面包括臭氧发生器)氧化制备大蒜素,研究合成大蒜素的影响因素和最优工艺条件。并将此最优工艺条件应用于大蒜精油(由水蒸气常压蒸馏法提取得到)的臭氧氧化反应中,得到富含大蒜素的大蒜精油,从而提高其生物活性,保持新鲜大蒜的味道。该方法是提高大蒜精油品质的一种简单有效方法。

1 材料与方法

收稿日期:2013-06-28 * 通讯联系人

作者简介:李文清(1987-),男,硕士研究生,研究方向:大蒜化学。

基金项目:国家自然科学基金(31101323)资助。

1.1 材料与仪器

二烯丙基二硫醚、L-半胱氨酸、DTNB、Tris-Base 缓冲剂 购自阿拉丁试剂公司；氢氧化钠、冰乙酸 购自广州化学试剂厂；石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、硅胶、浓盐酸、二氯甲烷 购自天津市大茂化学试剂厂；大蒜 购自于暨南大学兴安超市。

TU-1900 型双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；Acculab ALC210 型电子分析天平 上海第二天平仪器厂；HJ-5 多功能搅拌器 常州澳华仪器有限公司；101A-1 型电热鼓风干燥箱 上海实验仪器厂有限公司；WFH-203 (ZF-I) 型三用紫外分析仪 上海顾村电光仪器厂；臭氧发生器 上海实验仪器厂有限公司；pH 检测仪 上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 大蒜素的臭氧氧化合成 称取一定质量的二烯丙基二硫醚，将其移至干净的三口烧瓶中，再加入 5mL 无水乙醇。将三口烧瓶置于水浴锅中，保持一定温度，打开臭氧发生器通入臭氧。反应开始后，用 TLC 法跟踪反应进程，待反应结束后使用柱层析分离纯化得到大蒜素。经核磁测定产物结构，其氢谱和碳谱数据为¹HNMR (400MHz, 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、132.90ppm。与文献报道一致^[10]。

1.2.2 大蒜素含量的测定 分别量取 0.5mL 1.0mmol/L 半胱氨酸溶液、1mL 1.0mmol/L DTNB (5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)溶液至 5mL 的容量瓶中，然后用 50mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容，26℃ 保温 15min，412nm 波长测定其吸光值 A₀^[11]。

在 5mL 的容量瓶中的依次加入 1.0mmol/L 半胱氨酸溶液 0.5mL，稀释后的大蒜素样品液 0.5mL，在 26℃ 保温 15min。而后再加入 1mL 1.0mmol/L DTNB 溶液，50mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容，26℃ 下保温 15min，412nm 波长测定其吸光值 A。

大蒜素含量计算方法如下：

$$C_{\text{大蒜素}} = \Delta A_{412} \times d / (2 \times 14150 \text{ml/mm} \text{ol})$$

$$\Delta A_{412} = A_0 - A$$

式中：d 为总稀释倍数；在本实验中稀释倍数为 10000。

1.2.3 大蒜精油的提取 选择颗粒完整、无霉烂的大蒜 200g，大小不限。切去大蒜的鳞茎盘，去掉大蒜干枯鳞片叶备用。用破碎机破碎，在 30℃ 下酶解 1h。将酶解后的大蒜，按固液比 1:2 加入 394.5mL 蒸馏水中，上锅蒸馏。电热套功率保持在 50~75W，时间 1.5h，收集蒸出料液备用。用二氯甲烷提取分离大蒜油，经硅胶脱水和活性炭脱色精制，得到大蒜精油。

1.2.4 大蒜精油的臭氧氧化 将 1.2.3 提取的大蒜精油配成一定浓度的乙醇溶液，按 1.2.1 实验步骤进行臭氧氧化。反应时间为 4h，反应温度为 8℃，臭氧流量为 0.28L/min，臭氧氧化大蒜精油。用 TLC 法监测反应体系中的二烯丙基二硫醚已经反应完全，而后

过柱分离，得到大蒜素粗品，再按步骤 1.2.2 的分析方法，计算大蒜素产率，公式如下：

$$\text{大蒜素产率}(\%) = \frac{146m_{\text{(大蒜素)}}}{162m_{\text{(二烯丙基二硫醚)}}} \times 100$$

式中：m_(大蒜素) 为反应得到的大蒜素质量；m_(二烯丙基二硫醚) 为反应物中所含二烯丙基二硫醚质量。

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 反应温度的影响 控制反应时间为 3h，二烯丙基二硫醚乙醇溶液浓度为 0.4mmol/mL，臭氧流量为 0.15L/min 的情况下，改变反应温度，考察其对大蒜素产率的影响。每个实验点做三次重复。

1.2.5.2 反应时间的影响 在反应温度为 20℃，二烯丙基二硫醚乙醇溶液浓度为 0.4mmol/mL，臭氧流量为 0.15L/min 的条件下，考察反应时间对大蒜素产率的影响。每个实验点做三次重复。

1.2.5.3 臭氧流量的影响 在反应温度为 20℃，二烯丙基二硫醚乙醇溶液浓度为 0.4mmol/mL，反应时间为 3h 的条件下，考察臭氧流量对大蒜素产率的影响。每个实验点做三次重复。

1.2.5.4 原料浓度的影响 在反应温度为 20℃，臭氧流量为 0.15L/min，反应时间为 3h 的条件下，考察二烯丙基二硫醚乙醇溶液浓度对大蒜素产率的影响。每个实验点做三次重复。

1.2.6 Box-Behnken 设计实验 应用 Design Expert 软件，根据 Box-Behnken 中心组合设计原理，以大蒜素的产率为响应值，在单因素实验结果的基础上，对反应温度、反应时间、臭氧浓度、原料浓度四个因素进行响应曲面实验设计。因素水平见表 1。每个实验点做三次重复。

表 1 响应面实验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	+1	0	-1
A 温度(℃)	20	0	20
B 浓度(mm ol/mL)	0.4	0.3	0.2
C 时间(h)	4	3.5	3
D 通气量(L/min)	0.25	0.2	0.15

1.2.7 数据处理 以 SPSS 软件作统计学分析，实验数据以平均数标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 臭氧氧化合成大蒜素的影响因素探讨

2.1.1 反应温度对大蒜素合成产率的影响 由图 1 可知，在保持其他条件不变的情况下，大蒜素的产率先是随着反应温度的升高而增加，在 10℃ 时产率达到最大值(46.99%)，随后温度继续升高，产率下降，温度升到 30℃ 时产率仅为 27.34%。故选取温度 0、10、20℃ 为响应面温度的三水平。

2.1.2 反应时间对大蒜素产率的影响 从图 2 可知，随着反应时间的增加，大蒜素的产率不断提高，反应至 1h，大蒜素的产率为 14.37%，反应进行到 5h，产率达到 40.12%。通过 TLC 法跟踪反应进程，当反应进行到 4h 时，产物中伴随有副产物的出现。故选取时

间 3、3.5、4h 为响应面时间的三水平。

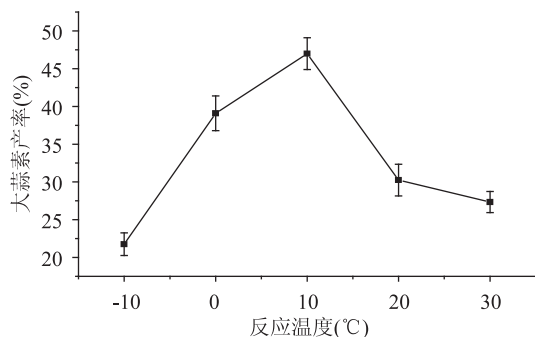


图1 反应温度对大蒜素产率的影响

Fig.1 The effect of reaction temperature on the yield of alliin

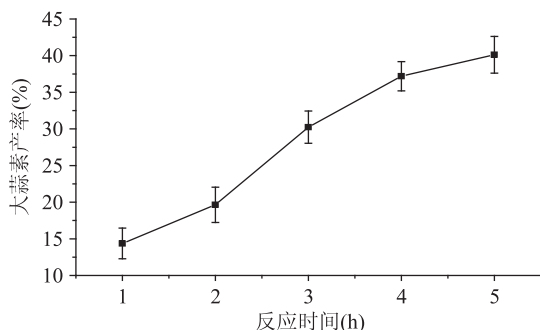


图2 反应时间对大蒜素产率的影响

Fig.2 The effect of reaction time on the yield of alliin

2.1.3 臭氧流量对大蒜素产率的影响 从图 3 可以看出,随着臭氧流量从 0.10L/min 增大到 0.30L/min 的过程中,大蒜素的产率呈现先上升后下降的趋势,当臭氧流量为 0.20L/min 时,大蒜素的产率最高为 38.63%,之后随着臭氧流量的增大,大蒜素的产率反而下降。这可能是由于臭氧量增大到一定程度后,臭氧氧化了二烯丙基二硫醚中的两个双键,产生副产物。故选取臭氧流量 0.15、0.20、0.25L/min 为响应面臭氧流量的三水平。

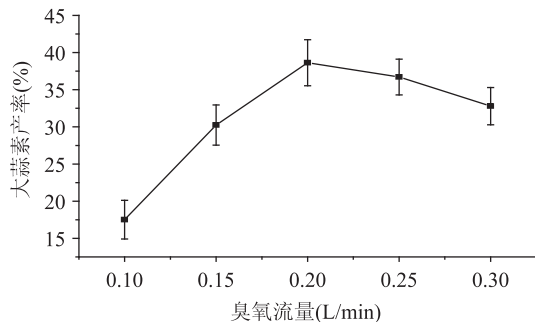


图3 臭氧流量对大蒜素产率影响

Fig.3 The effect of ozone flow on the yield of alliin

2.1.4 原料浓度对大蒜素产率的影响 从图 4 可以看出,随着二烯丙基二硫醚的浓度不断增大,大蒜素的产率表现为先增加后减少,当二烯丙基二硫醚浓度为 0.2mmol/mL 时,大蒜素的产率最高,达到 48.32%。随后,大蒜素的产率不断降低。故选取二烯丙基二硫醚浓度 0.2、0.3、0.4mmol/mL 为响应面二烯丙基二硫醚浓度的三水平。

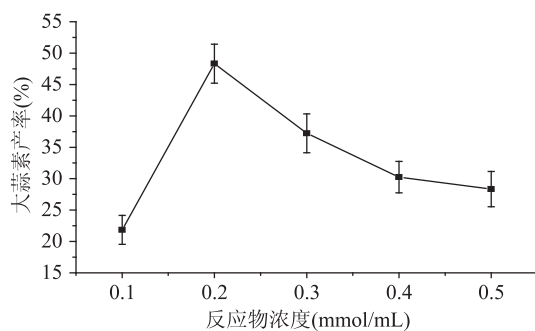


图4 反应物浓度对大蒜素产率的影响

Fig.4 The effect of reaction concentration on the yield of alliin

2.2 运用响应面法分析影响因素并确定最优条件

2.2.1 臭氧氧化合成大蒜素的实验数据分析 以反应温度、反应时间、臭氧流量、原料浓度为四个可控的工艺参数,以大蒜素产率为实验指标,采用 Box-Behnken 设计方法来优化大蒜素合成工艺条件,实验设计方案及结果见表 2。

表2 Box-Behnken 设计实验的结果

Table 2 Results of Box-Behnken design

实验号	A	B	C	D	产率(%)
1	0	-1	0	-1	57.68
2	-1	+1	0	0	38.71
3	+1	0	0	-1	37.89
4	0	+1	0	-1	48.69
5	+1	0	+1	0	38.23
6	0	-1	-1	0	56.46
7	-1	0	+1	0	43.27
8	+1	-1	0	0	40.15
9	-1	0	-1	0	39.25
10	0	0	+1	-1	52.68
11	0	0	0	0	51.65
12	0	0	0	0	51.65
13	+1	0	0	+1	38.69
14	0	+1	-1	0	47.89
15	+1	0	-1	0	38.21
16	0	+1	0	+1	48.52
17	-1	-1	0	0	49.79
18	-1	0	0	-1	38.65
19	0	0	+1	+1	52.07
20	0	0	0	0	51.65
21	+1	+1	0	0	31.76
22	0	0	0	0	51.65
23	0	-1	+1	0	59.01
24	0	0	0	0	51.65
25	-1	0	0	+1	41.98
26	0	+1	+1	0	48.89
27	0	0	-1	-1	49.38
28	0	-1	0	+1	58.32
29	0	0	-1	+1	50.01

通过 Design-Expert 软件,对表 3 实验数据进行

表3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis results of regression and variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1467.56	14	104.83	49.83	<0.0001	**
A	59.50	1	59.50	28.28	0.0001	**
B	270.28	1	270.28	128.48	<0.0001	**
C	13.98	1	13.98	6.64	0.0219	*
D	1.78	1	1.78	0.85	0.3734	
AB	1.81	1	1.81	0.86	0.3695	
AC	4.00	1	4.00	1.90	0.1896	
AD	1.60	1	1.60	0.76	0.3978	
BC	0.60	1	0.60	0.29	0.6015	
BD	0.16	1	0.16	0.078	0.7842	
CD	0.38	1	0.38	0.18	0.6755	
A ²	988.27	1	988.27	469.78	<0.0001	**
B ²	11.27	1	11.27	5.36	0.0364	*
C ²	5.51 E-005	1	5.51 E-005	2.62 E-005	0.9960	
D ²	0.060	1	0.060	0.028	0.8688	
残差	29.45	14	2.10			
失拟项	29.45	10	2.95			
纯误差	0.00	4	0.000			
总和	1497.01	26		R ² = 0.9803		

注：* : $p < 0.05$,表示显著；** : $p < 0.01$,表示极显著。

多元回归拟合,获得了大蒜素产率对编码自变量反应温度、反应时间、臭氧流量、原料浓度的二次多元回归方程: $Y(\%) = 30.38750 + 2.99725 \times A - 98.03333 \times B + 8.88167 \times C + 91.23333 \times D + 0.67250 \times A \times B - 0.20000A \times C - 1.26500 \times A \times D - 7.75000 \times B \times C - 40.50000 \times B \times D - 12.40000 \times C \times D - 0.12343 \times A^2 + 131.79167 \times B^2 + 0.011667 \times C^2 - 38.33333 \times D^2$ 。该方程回归显著, $R^2 = 0.9803$,说明回归方程的拟合程度良好,失拟较小,可以用该方程代替真实实验点进行分析。方程中 A、B、C 对吸光值的影响达显著水平,方程中 A²、B² 对吸光值的影响也达极显著水平。表明实验因子对响应值不是简单的线性关系。精密度 >4.0 是令人满意的,而本模型的精密度为 23.83,说明模型适当。

2.1.5 响应面分析及反应的最优条件 采用 Design-Expert 软件分析了反应的最优化条件,得到臭氧氧化合成大蒜素的最佳条件为反应时间为 4.0h,反应温度为 8.06℃,臭氧通入量为 0.28L/min,二烯丙基二硫醚浓度为 0.18mmol/mL。为检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述优化条件下合成大蒜素,测得大蒜素产率为 59.53%,与理论预测值 59.77% 相比,其相对误差较小。因此,基于响应面分析法所得的臭氧氧化合成大蒜素的反应条件参数准确可靠,具有实用价值。

2.3 大蒜精油的臭氧氧化

采用 2.1.5 提到的反应条件对大蒜精油进行臭氧氧化,大蒜素的综合产率为 63.61%。该值比理论预测值 59.77% 要略高一些,原因可能是:大蒜精油包含二烯丙基二硫醚、二烯丙基三硫醚、二烯丙基硫醚等混合物,这些化合物之间可以相互转化,并存在

一定的化学平衡,在二烯丙基二硫醚氧化生成大蒜素的过程中,使上述平衡发生移动,生成了比理论值更多的大蒜素。我们将氧化后的大蒜精油进行抗氧化活性研究,与氧化前的大蒜精油相比,其抗氧化性得到显著提高,相关内容将另文发表。

3 结论

3.1 以单一的模型化合物二烯丙基二硫醚为反应原料,以臭氧为氧化剂,合成了大蒜素纯品。研究反应温度、反应时间、反应物浓度、臭氧流量对大蒜素产率的影响:大蒜素的产率随着反应时间的增加而提高,但是在反应时间超过 4h 后,有副产物二烯丙基三硫醚等产生;大蒜素产率随着反应温度、二烯丙基二硫醚浓度、臭氧流量的增加产率表现为先上升而后下降。

3.2 针对单因素反应温度、反应时间、反应物浓度、臭氧流量对大蒜素产率的影响,采用响应面法得到优化后的臭氧氧化合成大蒜素的反应条件:反应时间为 4h,反应温度约为 8℃,臭氧通入量为 0.25L/min,二烯丙基二硫醚乙醇溶液浓度为 0.20mmol/mL。

3.3 采用最优条件下,用臭氧氧化大蒜精油,测定大蒜精油中大蒜素反应前后的含量,大蒜素产率达到 63.96%,说明最优条件下,采用臭氧氧化大蒜精油,可以获得富含大蒜素的大蒜精油,使大蒜精油的品质得到提升。

参考文献

[1]孙君社,高孔荣.大蒜和洋葱风味物及其萃取[J].中国调味品,1995,10:9-13.

(下转第 269 页)

- [18] 刘清, 林土胜. 数学形态学的边缘检测算法研究[J]. 计算机工程与应用, 2008, 44(35): 138-141.
- [19] 杨振亚, 王淑仙, 王成道. 自适应图像边缘检测算法[J]. 计算机应用, 2003, 23(5): 15-17.
- [20] 章毓晋, 黄翔宇, 李睿. 自动检测精细印刷品缺陷的初步方案[J]. 中国电视学与图像分析, 2001(6): 109-116.
- [21] 林睿. 共焦扫描成像系统中串口通信的 C + 实现[J]. 重

(上接第 205 页)

- [2] Ilic D P, Nikolic V D, Nikolic L B, *et al.* Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin and allicin incorporated in gel [J]. *Hem Ind*, 2010, 64 (2): 85-91.
- [3] Kubec R, Cody R B, Dane A J, *et al.* Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry in allium chemistry. (Z)-butanethial S-oxide and 1-butenyl thiosulfonates and their S-(E)-1-butenyl cysteine S-oxide precursor from *Allium sicutum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(2): 1121-1128.
- [4] Okada Y, Tanaka K, Sato E, *et al.* Antioxidant activity of the new thiosulfonate derivative, S-benzyl phenylmethanethiosulfonate, from *Petiveria alliacea* L [J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6 (6): 1097-1102.
- [5] 李瑜, 许时婴. 大蒜中硫代亚磺酸酯的提取工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23: 76-81.
- [6] Okada Y, Tanaka K, Sato E, *et al.* Antioxidant activity of the

(上接第 209 页)

- 炎的治疗作用[J]. 中医正骨, 2012, 24(2): 6-8.
- [5] Chou SY, Hsu CS, Wang KT, *et al.* Antitumor effects of *Osthole* from *Cnidium monnieri*: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(3): 226-230.
- [6] 刘爽, 吴东媛, 徐建华, 等. 蛇床子素的抗焦虑作用研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(29): 19-21.
- [7] 苏晓乾, 杨建宏. 蛇床子素提取工艺优化研究[J]. 天津药学, 2009, 21(6): 3-4.
- [8] 汪财生, 孙安吉, 王忠华, 等. 紫山药多糖酶法提取工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 266-271.
- [9] 戴清源, 朱秀灵, 顾蓉, 等. 酶法提取脱脂米糠中阿魏酸的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 269-272.
- [10] 黄山, 公衍玲, 金宏. 酶法提取绞股总皂苷工艺条件的优化[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 178-180.
- [11] 余洪波, 张晓昱. 酶法在中药提取中的研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(5): 591-593.

(上接第 282 页)

- [12] 苏健裕, 石磊, 杨连生. 临床大肠埃希菌第 I 类整合子检测及耐药基因盒分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(7): 385-387.
- [13] Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, *et al.* Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(5): 1315-1321.
- [14] 张霖, 薛盛东, 周宗爱, 等. 铜绿假单胞菌第 I 类整合子遗传标记及耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 496-498.

- 庆工商大学学报: 自然科学版, 2011, 28(2): 168-171.
- [22] 李庆中, 汪懋华. 基于计算机视觉的水果实时分级技术发展及展望[J]. 农业机械学报, 1999, 30(6): 1-7.
- [23] 李庆中, 汪懋华. 基于分形特征的水果缺陷快速识别方法[J]. 中国图象图形学报, 2000, 5(2): 144-148.
- [24] 籍保平, 吴文才. 计算机视觉苹果分级系统[J]. 农业机械学报, 2000, 31(6): 118-121.

- new thiosulfonate derivative, S-benzyl phenylmethane thiosulfonate, from *Petiveria alliacea* L [J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6(6): 1097-1102.
- [7] 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.
- [8] 王摇风, 孙芸, 熊晓辉, 等. 大蒜油提取技术的研究进展[J]. 中国调味品, 2010, 35(3): 31-33.
- [9] Fillmore F, Huang B G. Garlic Chemistry nitric oxide oxidation of (2-propenyl) cysteine and S-(2-Propenyl)-Cystein Sulfoxide [J]. *J Org Chem*, 1994, 59: 3227-3229.
- [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] Lawson L H, Han P A. spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfonates [J]. *Anal Biochem*, 1995, 225(1): 157-160.

- [12] 邹继红, 娜日苏, 杨慧明, 等. 反相高效液相色谱法测定独活中蛇床子素与异欧前胡素的含量[J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2010, 26(2): 63-65.
- [13] Zhou J, Zeng P, Cheng Z H, *et al.* Application of hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the study of the osthole pharmacokinetics in cerebral ischemia hypoperfusion rat plasma [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879: 2304-2310.
- [14] 黄良永, 郑江萍, 甘春英. 独活药材及其配方颗粒中蛇床子素的含量比较[J]. 医药导报, 2010, 29(1): 90-92.
- [15] Zhou X, Zhao MR, Liang JP, *et al.* High efficiency degradation crude oil by anovel mutant irradiated from *Dietzia* strain by $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion using response surface methodology [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 386-393.
- [16] 刘芳, 刘虹, 姜佳, 等. 独活提取液浓缩过程中蛇床子素稳定性研究[J]. 天津中医药大学学报, 2011, 30(1): 48-49.

- [15] 石磊, 郑美萍, 肖增璜, 等. 临床致病菌整合子检测及耐药基因盒序列分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(11): 1204-1206.
- [16] 杨维青, 贾文祥, 殷长甫, 等. 铜绿假单胞菌第 I 类整合子相关基因的解析和定位[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(12): 730-732.
- [17] Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance markers of Class 1 and Class 2 integron-bearing *Escherichia* from irrigation water and sediments [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(7): 822-826.