

GC-MS 法测定大蒜素有关物质和稳定性研究

魏宁漪, 吴建敏, 张启明*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立检测大蒜素原料药有关物质的气质联用方法, 并对大蒜素的稳定性进行研究。方法: 采用 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 柱温: 起始温度 60 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃·min⁻¹ 升至 220 ℃, 保持 5 min; EI 源温度: 200 ℃。结果: 2 批大蒜素原料中的有关物质分别为 7.20% 和 10.11%, 主要杂质为一硫二丙烯、二硫二丙烯和四硫二丙烯。结论: 该方法简便、快速, 专属性好, 灵敏度高, 可用于大蒜素中有关物质的定性定量检测, 并可用于大蒜素的稳定性研究。

关键词: 抗感染药; 大蒜素; 三硫二丙烯; 有关物质; 稳定性; 高效液相色谱; 质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1699-04

GC-MS determination of related substance in alltride and study on its stability

WEI Ning-yi, WU Jian-min, ZHANG Qi-ming*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish GC-MS methods to determine related substance in alltride and study on stability. **Methods:** Using a GC-MS method with DB-5MS capillary column(30 m×0.25 mm×0.25 μm), which temperature rose by program. The initial temperature was 60 ℃, maintained for 5 min, rose to 220 ℃ with a rate of 10 ℃·min⁻¹, maintained for 5 min. The temperature of ion source was 200 ℃. **Results:** The content of related substance in two batches of alltride was 7.20% and 10.11% by GC-MS method. The main impurities are diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl tetrasulfide. **Conclusion:** This method is fast, simple and reproducible, and suitable for the determination of related substance in alltride and study on stability.

Key words: anti-infective; alltride; diallyl trisulfide; related substance; stability; HPLC; MS

大蒜素为抗感染类药^[1], 适用于深部真菌和细菌感染。目前国内已批准的药用大蒜素, 均是采用化学合成法进行制备得到, 但从合成工艺中可以明确, 大蒜素为丙烯基多硫化物的混合物, 其中的主要成分为三硫二丙烯。由于丙烯基多硫化物的物理化学性质都极为相似, 因此目前工业上仍无法获取到纯度较高的三硫二丙烯原料^[2]。大蒜素的药品标准中采用薄层色谱法进行有关物质检测, 而大蒜素的胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、肠溶胶丸、注射剂、葡萄糖注射剂等制剂标准中未对有关物质进行测定。本实验采用 GC-MS 法建立了检测大蒜素中杂质的方法, 并根据杂质质谱图与 NIST 谱库中标准质谱图进行比对, 可准确定性。由于大蒜素不稳定, 本文通过加速试验对大蒜素的稳定性进行研究, 对可能引起

大蒜素降解的各种因素进行研究, 并采用本文建立的 GC-MS 法对大蒜素长期放置过程中产生的杂质进行定性定量。本法简便、快速, 灵敏度高, 结果准确可靠。

1 仪器与试剂

岛津 GC-MS 2010 气-质联用仪, GCMS Solution 工作站。甲醇为色谱纯(百灵威, 批号 LC60K02), 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水; 大蒜素, 工业合成, 由江苏正大清江制药有限公司提供, 批号 041025, 100104。

2 色谱-质谱条件

采用 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气: He; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 起始温度 60 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃·min⁻¹ 升至 220 ℃, 保持

* 通讯作者 Tel: (010) 67095292; E-mail: ZQM@nicbp.org.cn

5 min; 进样口温度: 220 °C; 接口温度: 220 °C; 进样量: 1 μL ; 分流比: 1:20; EI 源温度: 200 °C; 电子能量: 70 eV; 扫描质量范围: 45 ~ 600 u; 扫描速率: 710 $\text{u} \cdot \text{s}^{-1}$ 。理论板数按三硫二丙烯计算不低于 20000, 三硫二丙烯峰与相邻杂质峰分离度均大于 2.0。

3 有关物质鉴定

采用 GC-MS 法, 按“2”项下的色谱-质谱条件, 取“4.2”项下的储备液进样, 对大蒜素原料中存在的有关物质进行分析, 并与 NIST 谱库中的标准质谱图进行比对, 检索出相似度(SI)高于 80 的杂质, 确定其结构。供试品溶液总离子流图见图 1, 有关物质检索结果见表 1。

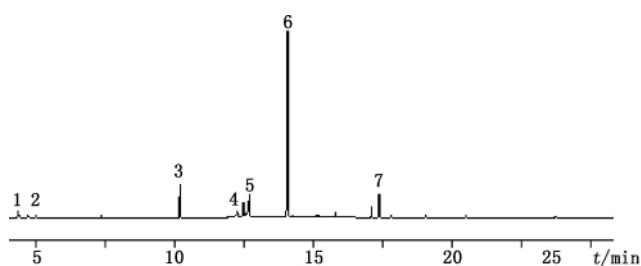


图 1 大蒜素总离子流图(批号: 100104)

Fig 1 TIC of alltride (Lot No. 100104)

表 1 大蒜素有关物质的检索结构

Tab 1 Identification results of related substances of alltride

峰号 (peak No.)	t_R/min	离子 (ions) m/z	化学结构 (chemical structure)	检索相似度 (similar search)
1	4.4	106, 64, 45		89
2	4.7	114, 73, 45		94
3	10.0	146, 105, 81		85
4	12.3	144, 111, 97		88
5	12.7	144, 111, 72		87
6	14.0	178, 73, 113		94
7	17.4	210, 146, 73		92

4 方法学研究

4.1 破坏性试验

取大蒜素(批号: 100104)约 25 mg 若干份, 置

25 mL 量瓶中, 进行如下试验。

酸破坏: 加甲醇 1 mL 溶解后, 加 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL 振摇 2 h, 加 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 加正己烷定容至刻度, 摇匀, 取上清液进样分析。

碱破坏: 加甲醇 1 mL 溶解后, 加 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL 振摇 2 h, 加 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL, 加正己烷定容至刻度, 摇匀, 取上清液进样分析。

氧化破坏: 加甲醇 1 mL 溶解后, 加 3% 过氧化氢溶液 1 mL 振摇 2 h, 加正己烷定容至刻度, 摇匀, 取上清液进样分析。

光照破坏: 在 254 nm 紫外灯下照射 2 h, 加正己烷定容至刻度, 摇匀, 进样分析。

加热破坏: 在 60 °C 加热破坏 2 h, 加正己烷定容至刻度, 摇匀, 进样分析。

试验结果(图 2)表明, 样品经过破坏后均有不同程度的降解, 降解杂质均能与主峰良好分离, 表明本法专属性良好。三硫二丙烯热降解产生杂质含量最高, 根据质谱图检索结果, 产生的主要降解产物为二硫二丙烯和四硫二丙烯。

4.2 线性关系考察 取本品适量(批号: 100104), 精密称定, 加正己烷溶解并稀释制成每 1 mL 中含 1.013 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 分别精密吸取储备液适量, 加正己烷稀释制成浓度为 0.01013, 0.05065, 0.1013, 0.5065, 1.013 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别精密量取上述溶液 1 μL 注入气-质联用仪, 记录总离子流图; 以浓度为横坐标(C), 以峰面积为纵坐标(A), 进行线性回归, 得线性方程:

$$A = 1.341 \times 10^7 C + 1.023 \times 10^3 \quad r = 0.9991$$

结果表明三硫二丙烯在 0.01013 ~ 1.013 μg 之间呈良好的线性关系。

4.3 检出限及定量限测定 用正己烷将浓度为 0.01013 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的线性溶液逐步稀释, 测定三硫二丙烯的 $S/N=3$ 时检出限为 0.02540 ng; $S/N=10$ 时定量限为 0.1013 ng。

4.4 精密性试验 取线性溶液(0.01013 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)连续进样 6 针, 按三硫二丙烯峰面积计算 RSD 为 1.1%; 取本品适量, 用正己烷制备 6 份溶液(浓度约为 0.01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按上述色谱条件测定, 以三硫二丙烯的响应因子计算 RSD 为 1.5%。结果说明进样精密性和重复性良好。将供试品溶液在制备后的 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 结果三硫二丙烯峰面积在 8 h 内无明显变化, RSD 为 2.1%, 表明溶液稳定性良好。

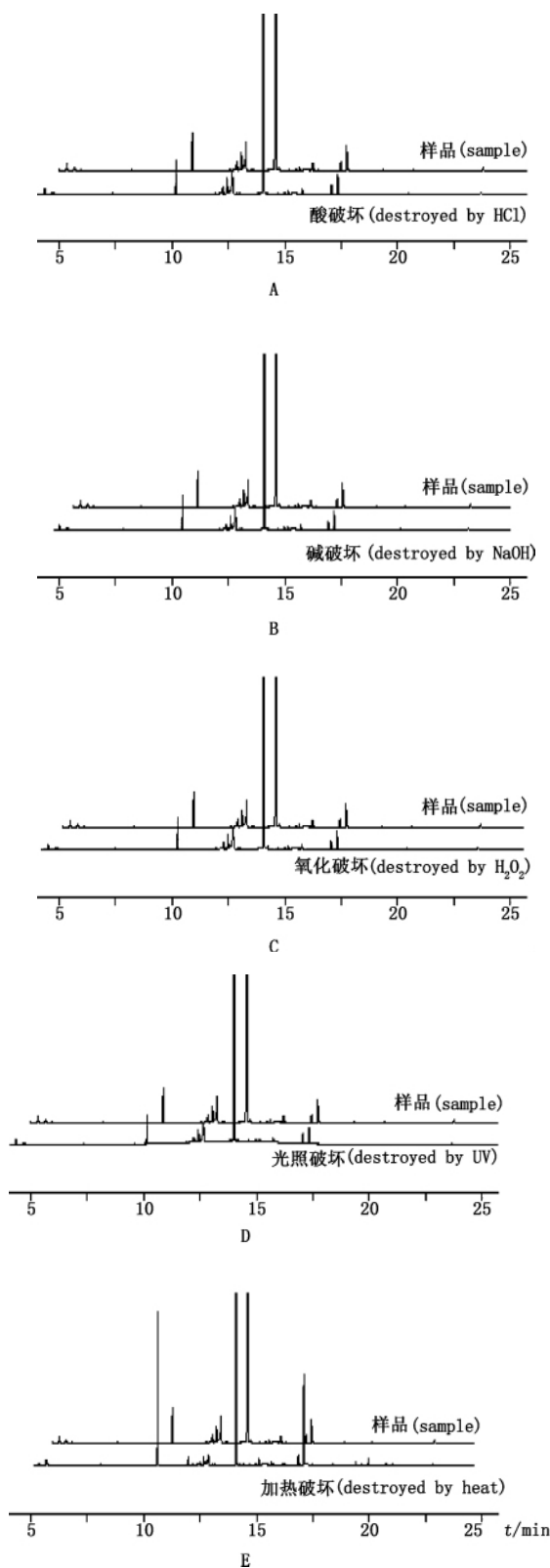


图2 破坏性试验的总离子流图

Fig 2 GC-MS TIC of destructive test

A. 酸破坏(destroyed by $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$) B. 碱破坏(destroyed by $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$) C. 氧化破坏(destroyed by $3\% \text{H}_2\text{O}_2$) D. 光照破坏(destroyed by UV 254 nm) E. 加热破坏(destroyed by 60°C heat)

5 样品测定

取本品适量,用正己烷溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加正己烷稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。照“2”项下条件进行测定,按自身对照法计算各杂质的量。结果见表 2。

表 2 大蒜素有关物质测定结果(%)

Tab 2 Determination results of related substances of alltride

批号 (Lot No.)	一硫二丙烯 (diallyl sulfide)	二硫二丙烯 (diallyl disulfide)	四硫二丙烯 (diallyl tetrasulfide)	其他杂质 (individual impurities)	总杂质 (total impurities)
041025	0.61	5.00	1.20	0.40	7.21
100104	0.25	3.18	1.62	5.06	10.11

6 稳定性研究

6.1 加速稳定性试验 根据专属性试验结果,取大蒜素(批号:100104)样品,分别在不同温度下放置,照“5”项下方法制备供试品溶液和对照溶液,按“2”项下条件进行测定,采用自身对照法测定有关物质含量。结果见表 3。测定结果表明当大蒜素在 4°C 以下温度储存时,降解产物不会明显增加。

表 3 加速稳定性试验测定结果(%)

Tab 3 Content of related substances in accelerated testing

放置时间 (storage time) / d	-20°C	4°C	室温 (room temperature) / 25°C	40°C
5	9.5	9.8	10.0	10.8
10	9.7	9.9	10.2	13.3
30	9.8	10.2	10.9	19.5

6.2 长期稳定性试验 取大蒜素(批号:041025)样品,在室温(25°C)条件下,置棕色直管中熔封,密封放置 5 年,照“5”项下方法制备供试品溶液和对照溶液,按“2”项下条件进行测定,采用自身对照法测定有关物质含量,降解杂质由 7.4%(放置时测定结果)增加至 25.3%(第 5 年测定结果)。

7 讨论

7.1 大蒜素标准的修订 由于大蒜素与大蒜名称相似,使很多研究人员误认为大蒜素是大蒜中的天然成分。但实际上大蒜素为工业合成制备得到,是丙烯基多硫化物的混合物,并非大蒜中的天然成分,而是大蒜中的蒜氨酸酶解为大蒜辣素,大蒜辣素不稳定,继续降解产生的多种硫化物之一^[3],后经工业合成制备得到,因此应对大蒜素及其制剂标准进

行修订^[4]。

7.2 有关物质检查方法的选择 大蒜素原料标准中采用薄层色谱法进行有关物质测定;大蒜素注射剂标准中采用气相色谱法对三硫二丙烯进行含量测定^[5];大蒜药材标准中采用液相色谱法测定三硫二丙烯的含量^[6],上述测定方法对大蒜素中的杂质响应也各不相同,显示纯度差异较大。薄层色谱法对大蒜素中各杂质的分离效果不佳,检测灵敏度较低。而大蒜素中无紫外吸收或紫外吸收为末端吸收的杂质,采用液相色谱法较难检测。故 HPLC 法测定大蒜素中的有关物质含量较低,检测到的杂质个数也较少;而气相色谱-质谱联用法可有效地检出大蒜素中的各种杂质,灵敏度高,分离效果好,杂质的质谱图与 NIST 谱库中标准质谱图比对,可准确定性。

7.3 进样口温度的选择 温度对大蒜素的杂质影响较大,试验过程中考察了进样口温度对大蒜素的影响。当进样口温度低于 250℃ 时,大蒜素(批号:100104)中的杂质含量稳定,为 10.11%,当进样口温度高于 250℃ 时,大蒜素中的杂质含量随进样口温度升高而明显增加至约 12%。因此试验过程中进样口温度和传输线温度均不高于 250℃。

7.4 贮藏条件的改变 大蒜素的国家药品标准中规定储存条件为遮光,密封保存,即在室温下放置。但根据加速稳定性试验和长期稳定性试验结果说明,大蒜素在室温下放置,三硫二丙烯不断降解出杂质,主要降解产物为二硫二丙烯和四硫二丙烯,推测可能三硫二丙烯分子发生 β -消除反应,引起二硫键断裂,进而发生分解反应^[7],生成二硫二丙烯,或二硫键断裂后聚合生成四硫二丙烯。因此标准中贮藏条件应修订为冷处密封保存,大蒜素相关制剂的贮藏条件也应相应修订。

7.5 有关物质的鉴定 大蒜素中的主要杂质为一硫二丙烯(峰 2)、二硫二丙烯(峰 3)和四硫二丙烯(峰 7),其他杂质含量较低,多为含硫化合物。本次试验中检测出乙烯二噻己烯(峰 4 和 5),该化合物最早被认为是大蒜辣素的降解产物^[8],首次在合成的三硫二丙烯中被检测出。

参考文献

- 1 Official National Drug Specification: Local Specifications Promoted to National Specifications(国家药品标准化药地标升国标第一册). 2002. Vol I (第一册): 8, 12
- 2 ZHU Yong-hui(朱永辉), LIU Yun-ying(刘云英), ZHANG Chang-chu(张长初). Synthesis and application of alltride(大蒜素的合成及应用). *Shandong Food Ferment*(山东食品发酵), 2008 4(151): 39
- 3 Robert TR, Richard DH, Elaine KF, et al. Determination of allixin, S-allylcysteine and volatile metabolites of garlic in breath, plasma or simulated gastric fluids. *Nutrition* 2001 131: 968S
- 4 WANG Li(王丽), SONG Min(宋敏), HANG Tai-jun(杭太俊), et al. HPLC tandem-mass spectrometric analysis of the chemical components and decomposition products of allixin extract of garlic(大蒜辣素提取物及其降解产物的 HPLC-MS/MS 研究). *Acta Pharm Sin*(药学学报) 2009 44(1): 74
- 5 WEI Ning-yi(魏宁漪), WU Jian-min(吴建敏), ZHANG Qi-min(张启明). Discussion on drug specification of garlic and alltride(关于大蒜和大蒜素质量标准的商榷). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2011 31(1): 180
- 6 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部): 23
- 7 GUAN Rong-fa(关荣发), WANG Shu-cai(王淑彩), XU Zi-rong(许梓荣). Study on the stability of alltride(大蒜素稳定性的研究). *China Feed*(中国饲料) 2003(1): 23
- 8 Iberl B, Winkler G, Knobloch K. Products of allixin transformation: Ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Med* 1990 56(2): 202

(本文于 2011 年 8 月 5 日修改回)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告