

HPLC-MS/MS法研究精制蒜氨酸中有关物质

袁耀佐^{1,4}, 顾洁¹, 杭太俊^{1,2*}, 陈坚³, 张正行^{1,2}

(中国药科大学 1. 药物分析室, 2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009;
3. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 4. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008)

摘要: 研究精制蒜氨酸样品中的有关物质。采用 HPLC-MS/MS一级质谱扫描总离子流谱测定有关物质的准分子离子, 并利用他们的色谱保留时间、二级质谱及 或对照品对照进行结构鉴定。全扫描总离子流谱结果表明, 精制蒜氨酸中主要含 7 个有关物质成分, $[M+H]^+$ 离子 m/z 分别为 116, 133, 147, 152, 175 及两个 m/z 同为 178 的蒜氨酸同分异构体。其中 m/z 为 116, 133, 147, 175 的 $[M+H]^+$ 离子相应的物质分别鉴定为脯氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸, m/z 为 152 的 $[M+H]^+$ 离子鉴定为甲基-L-半胱氨酸亚砷, m/z 178 的两个蒜氨酸同分异构体分别经二级质谱鉴定为异蒜氨酸和环蒜氨酸。精制蒜氨酸中主要有有关物质分别为氨基酸及蒜氨酸的同系物及同分异构体。

关键词: 蒜氨酸; 有关物质; HPLC-MS/MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)06 - 0639 - 04

Related substances in purified alliin determined by HPLC-MS/MS

YUAN Yao-zuo^{1,4}, GU Jie¹, HANG Tai-jun^{1,2*}, CHEN Jian³, ZHANG Zheng-xing^{1,2}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, 2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 4. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract: To study the related substances in purified alliin, HPLC-MS/MS method carried out on a Phenomenex NH₂ column was used for screen and identification of the related substances with full scan MS spectra determination of their $[M+H]^+$ ions and then the analyses of the retention time, product MS spectra and/or chemical reference standards. The full scan HPLC-MS chromatogram showed that there were seven major related substances in the purified alliin and their m/z of the $[M+H]^+$ ions with increasing retention were 116, 133, 147, 152, 175, 178 and 178, separately. And they were identified as proline, asparagine, glutamine, methionine, arginine, isoalliin and cycloalliin (both were isomers of alliin), respectively. The major related substances in purified alliin are amino acids, homologue and the isomers of alliin.

Key words: alliin; related substances; HPLC-MS/MS

蒜氨酸 (alliin, S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷), 是大蒜中特有的含硫氨基酸, 存在于大蒜鳞芽中, 含量约 0.5% ~ 1.4%。1909年 Rundquist 从大蒜中首次分离得到, 固体状态下稳定、无臭^[1]。常温下蒜氨酸在蒜酶和水的作用下, 迅速转化为大蒜辣素 (allicin), 并产生丙酮酸和氨。大蒜辣素是大蒜发

挥疗效的主要成分, 但其在室温下很不稳定, 迅速分解, 难以分离提纯, 需要 -80℃ 保存, 无法直接开发成药物^[2]。国内外药物学家均致力于从大蒜中分离纯化出蒜氨酸和蒜酶, 分别制成适当制剂, 在临用前混合, 产生大蒜辣素, 供临床使用。陈坚等^[3,4]已建立了蒜氨酸和蒜酶的分离纯化制备工艺。本研究采用 HPLC-MS/MS 对该工艺制备的蒜氨酸精制品中的有关物质进行了系统地分析鉴定。

收稿日期: 2006-12-19.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 25 - 83271090,

E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

材料与amp;方法

药品与试剂 精制蒜氨酸由新疆医科大学提供。脯氨酸、精氨酸、胱氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺对照品由江苏省药品检验所提供。甲醇为色谱纯,水为高纯水,其他试剂为分析纯。

仪器 美国 Thermo-Finnigan 公司 TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪, Xcalibur 1.1 数据处理系统。

色谱与质谱条件

色谱条件 色谱柱: Phenomenex NH₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 甲酸 (75:25), 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 分流 (7:3) MS 检测; 柱温: 35 °C; 进样量为 20 μL。

质谱检测参数 电喷雾正离子化, 雾化气压: 241.15 kPa, 辅助气压力: 34.45 kPa, 毛细管温度: 350 °C。总离子扫描 (TIC) 和二级质谱扫描 (product) 检测 (Ar 气 CID, 0.2 Pa, 能量 10 eV)。

样品的制备与 HPLC-MS/MS 的检测 称取精制蒜氨酸适量, 用流动相溶解并制成 1 mg·mL⁻¹ 溶液, 取 20 μL, 注入色谱仪, 记录总离子流图和有关物质的 MS, MS² 谱。

分别取精氨酸、门冬酰胺、胱氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺对照品适量, 用流动相溶解并制成 0.1 mg·mL⁻¹ 溶液, 分别取 20 μL, 注入色谱仪, 记录各组分的色谱图 (SIM) 和 MS, MS² 谱。

结果与amp;讨论

1 有关物质测定

精制蒜氨酸供试品是以新疆产大蒜 (*Allium sativum* L) 为原料, 经阳离子交换色谱法等一系列工艺制备而得。文献^[5,6]报道, 大蒜中含有多种氨基酸、同分异构体异蒜氨酸 (iso-alliin)、环蒜氨酸 (cycloalliin) 和同系物甲基-L-半胱氨酸亚砷 (methiin) 等, 它们也易被阳离子柱吸附而共存于蒜氨酸样品中。因此, 本实验参考文献^[5]的色谱条件, 建立了使各有关物质有效分离的色谱系统, 对精制蒜氨酸样品进行全扫描和选择性离子检测测定。结果显示 (图 1, 图 2), 供试品中除蒜氨酸主成分外, 还有其他 7 个有关物质, 依保留时间递增顺序, 分别如图 2: A, B, C, D, E, F, G, 总离子扫描测得 [M+H]⁺ 离子 *m/z* 分别为 175, 116, 178, 178, 147, 133, 152, 采用与对照品对照及与文献^[5]报道的大蒜化学成分分析比较, 发现 *m/z* 为 175, 116, 147, 133 的有关物质分别与精氨酸 (*M_r* 174)、脯氨酸 (*M_r*

115)、谷氨酰胺 (*M_r* 146)、门冬酰胺 (*M_r* 132) 相应, *m/z* 152 离子与甲基-L-半胱氨酸亚砷 (*M_r* 151) 相应, *m/z* 为 178 的两个成分 (C, D) 为蒜氨酸 (*M_r* 177) 的同分异构体。因此精制蒜氨酸中的有关物质为常见氨基酸、蒜氨酸同系物和同分异构体。

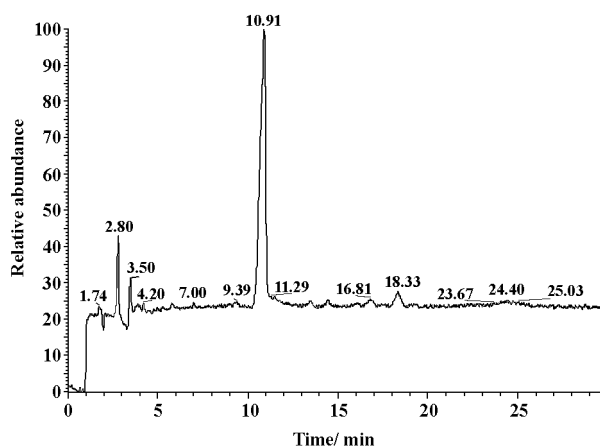


Figure 1 TIC of the purified alliin

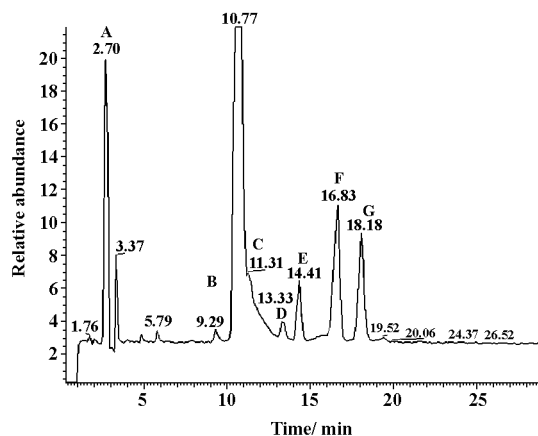


Figure 2 HPLC-SIM chromatogram of the purified alliin

2 有关物质结构确证

2.1 常见氨基酸有关物质确证 采用 HPLC-MS/MS 测定精制蒜氨酸中各有关物质的二级质谱, 并与精氨酸、脯氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺对照品的 HPLC-MS/MS 二级质谱对照。结果显示 (表 1), 有关物质 A, B, E, F 的色谱保留时间及二级质谱分别与精氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、门冬酰胺的色谱保留时间及二级质谱一致, 主要碎片离子峰均能得到合理的解释, 确证有关物质 A 为精氨酸, 有关物质 B 为脯氨酸, 有关物质 E 为谷氨酰胺, 有关物质 F 为门冬酰胺。

Table 1 The main ion fragment of MS² and of retention time of related substances in the purified alliin

Related substance	Main ion fragment of MS ²	Retention time of related substances /m in	Retention time of reference substance /m in
A(arginine)	175, 158, 116, 157, 130, 70, 60, 112	2. 70	2. 93
B(proline)	116, 70	9. 29	9. 63
E(glutamine)	130, 147, 84	14. 41	14. 82
F(asparagine)	133, 87, 116, 74, 88	16. 83	17. 04

2.2 蒜氨酸同系物甲基-L-半胱氨酸亚砷的确证
供试品中检测到有关物质 G 的 [M + H]⁺ 离子 *m/z* 为 152, 与文献^[6]报道大蒜中蒜氨酸同系物“甲基-L-半胱氨酸亚砷”相对分子质量相应。测得有关物质 G 二级质谱中的主要碎片离子 *m/z* 分别为 106, 88 和 70, 均为甲基-L-半胱氨酸亚砷的合理裂解产生(图 3), 确证 G 为甲基-L-半胱氨酸亚砷(methiin)。

2.3 蒜氨酸同分异构体的结构确证 精制蒜氨酸供试品中除有主成分峰 (*t_R* 10.8 min) 外, 在 *t_R* 分别约 11.4 min 和 13.3 min 处还有两个 *m/z* 178 的 [M + H]⁺ 离子(有关物质 C 和 D)。文献^[6]报道, 大蒜中含有蒜氨酸、异蒜氨酸和环蒜氨酸 3 种同分异构体(图 4), 其中异蒜氨酸为 *S*-丙烯基-L-半胱氨酸亚砷, 环蒜氨酸是异蒜氨酸的环合物。

二级质谱测定结果表明(表 2), 有关物质 C 与主成分蒜氨酸的二级质谱完全一致, 具有相同的质谱裂解过程(图 5), 用 HPLC-PDA 提取两者的紫外

图谱无明显区别, 表明两者结构极其相似, 结合文

Table 2 The main ion fragments of MS² amino acids related substances in the purified alliin

Related substance	Main ion fragment of MS ²
C(isoalliin)	178, 88, 137, 120, 161, 73
Alliin	178, 88, 137, 120, 161, 73
D(cycloalliin)	178, 88, 91

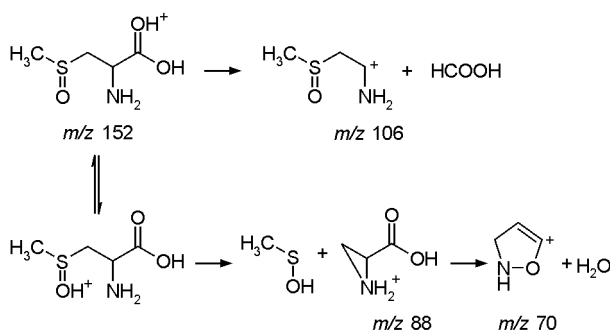
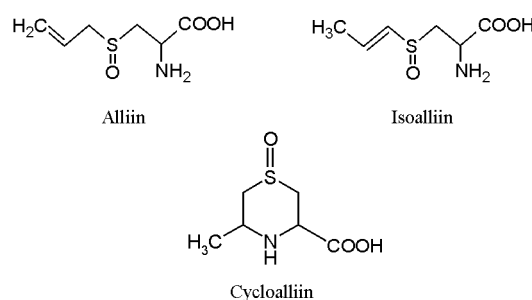
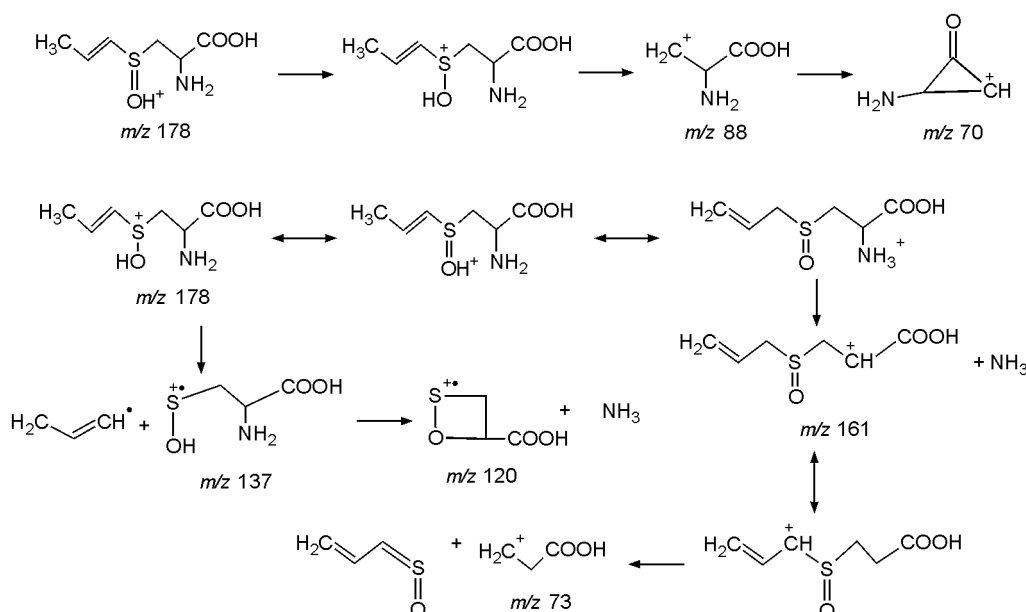
**Figure 3** MS² fragmentation of the related substance G (methiin)**Figure 4** The structures of alliin and its isomers**Figure 5** MS² fragmentation of the related substance C (isoalliin)

Table 3 The structures of related substances in purified alliin

The number of the related substance	m/z ($[M+H]^+$)	Retention time /min	Chemical structure	Chemical name
A	175	2.70		Arginine
B	116	9.23		Proline
C	178	11.31		Isoalliin
D	178	13.33		Cycloalliin
E	147	14.41		Glutamine
F	133	16.83		Asparagine
G	152	18.18		Methiin

献^[6],可以判断有关物质 C 为异蒜氨酸;有关物质 D 与蒜氨酸的二级质谱明显不同,根据质谱裂解规律分析确证,其与环蒜氨酸的质谱裂解相应(图 6),故有关物质 D 应为环蒜氨酸。

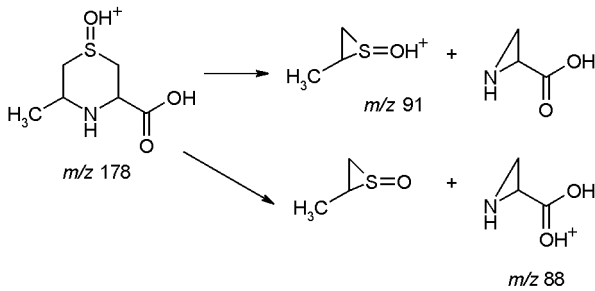


Figure 6 MS² fragmentation of the related substance D (cycloalliin)

结论

研究建立了蒜氨酸有关物质的 HPLC-MS/MS 分析测定方法,并成功地对精制蒜氨酸供试品中的有关物质采用全扫描总离子流色谱、选择性离子检测、选择性离子二级质谱测定,获得了它们的相对分子质量和结构信息。研究发现精制蒜氨酸中主要含有 7 个有关物质。通过对照品保留时间和质谱比较,确证了精制蒜氨酸中存在的氨基酸有关物质:脯

氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸;同时根据二级质谱裂解规律与色谱分离,对无对照品的 3 种有关物质分析确证为蒜氨酸同系物甲基-L-半胱氨酸亚砷、同分异构体异蒜氨酸和环蒜氨酸(表 3)。

References

[1] Keusgen M. A high-throughout method for the quantitative determination of alliin [J]. *Planta Med*, 1998, 64: 736 - 740.
 [2] Cruz-Villalon G. Synthesis of alliin and purification by solid-phase extraction [J]. *Anal Biochem*, 2001, 290: 376 - 378.
 [3] Li Y, Wang R, Li G, et al. Purification and properties of alliinase from fresh garlic [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2005, 22: 579 - 583.
 [4] Chang JM, Sun WF, Zhang LJ, et al. Identification and isolation of alliin in *Allium sativum* L [J]. *West China J Pharm Sci (华西药科学杂志)*, 2003, 18: 427 - 428.
 [5] Lee JM, Hamly JM. Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* L.) cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 9100 - 9104.
 [6] Ichikawa M, Ide N, Yoshida J, et al. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 1535 - 1540.