

## • 实验研究 •

## 施图伦滴眼液中化学成分的 LC-MS/MS 法鉴定

杨保华, 何威之, 郭雅琦

上海信谊药厂有限公司 药物研究所, 上海 201206

**摘要:** 目的 建立 LC-MS/MS 法, 对施图伦滴眼液中化学成分进行鉴定。方法 采用 HPLC-MS/MS 法对色谱峰进行质谱分析, 结合对照品以及水解试验, 并参考文献确认各成分。结果 确认了 15 个成分, 其中包括七叶亭苷和 14 个洋地黄强心苷类成分。结论 该方法快速、灵敏, 可为施图伦滴眼液的质量控制及稳定性研究提供依据, 为洋地黄化学成分进一步研究提供参考。

**关键词:** 施图伦滴眼液; 七叶亭苷; 洋地黄; 强心苷; LC-MS

中图分类号: R282.71 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)02-0113-03

## Identification of chemical constituents in Augentropfen Stulln Mono by LC-MS/MS

YANG Bao-hua, HE Wei-zhi, GUO Ya-qi

Shanghai Sine Pharmaceutical Co., Ltd., Pharmaceutical R &amp; D Center, Shanghai 201206, China

**Abstract: Objective** To establish an LC-MS/MS method for identification of chemical constituents in Augentropfen Stulln Mono.

**Methods** By using HPLC-MS/MS, reference substances, and hydrolysis test, the ingredients were identified according to their molecular weight.

**Results** Fifteen components were identified including esculin and fourteen digitalis cardiac glycosides.

**Conclusion** This method is rapid, sensitive and could be used in quality control and stability study of the product.

**Key words:** Augentropfen Stulln Mono; esculin; *Digitalis purpurea* L.; cardiac glycoside; LC-MS

施图伦滴眼液又名七叶洋地黄双苷滴眼液, 德国 Pharma Stulln GmbH 公司生产, 由七叶亭苷(秦皮甲素)和洋地黄叶提取物组成, 用于治疗老年性眼底黄斑变性、眼疲劳等。洋地黄叶为玄参科植物紫花洋地黄 *Digitalis purpurea* L. 的干燥叶, 其化学成分主要为洋地黄强心苷类, 目前已发现 20 余种<sup>[1]</sup>, 主要包括紫花洋地黄苷 A、B (purpurea glycosid A、B) 等原生苷和洋地黄毒苷 (digitoxin)、羟基洋地黄毒苷 (gitoxin)、吉他洛苷 (gitaloxin) 和洋地黄次苷 (stroseside) 等次生苷<sup>[2]</sup>。早期主要采用薄层色谱和高效液相色谱法鉴别洋地黄叶中强心苷<sup>[3]</sup>, 但需要大量对照品。本实验采用 LC-MS/MS 法对施图伦滴眼液中洋地黄强心苷进行了快速鉴定, 可为其质量控制和稳定性研究提供依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 LC/MSD Trap XCT 离子阱液质联

用仪, 纯净水(娃哈哈牌), 施图伦滴眼液(德国 Pharma Stulln GmbH 公司, 批号 060604), 七叶亭苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 200405), 洋地黄毒苷对照品(Sigma-Aldrich, Inc, 批号 053K1280, 质量分数为 97%), 紫花洋地黄苷 A、B 对照品(百灵威公司, 质量分数 > 98.5%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Macroscape C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱程序: 0~5 min、15%B, 5~35 min、15%~60%B, 35~41 min、60%~15%B, 41~50 min、15%B, 50 min (停止); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 220 nm; 进样体积 100 μL; 柱温 30 °C。

质谱条件: 雾化气压力 2.4 × 10<sup>5</sup> Pa, 干燥气温度 350 °C, 体积流量 10 L/min, 电喷雾电压 3 500 V

收稿日期: 2011-03-01

作者简介: 杨保华 (1979—), 女, 安徽安庆人, 中级职称, 天然药物化学专业硕士, 主要从事中药和天然药物的研究开发。

Tel: (021)58999120 E-mail: xian\_yang@163.com

(负离子方式), 扫描范围  $m/z$  100~1 000。

## 2.2 对照品溶液的制备

取七叶亭苷对照品适量, 加纯净水制成质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对照品溶液。取洋地黄毒苷、紫花洋地黄苷 A、B 对照品适量, 分别加 50% 乙醇制成质量浓度为 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备

取施图伦滴眼液适量, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.4 HPLC-UV-MS/MS 分析

分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 100  $\mu\text{L}$  进样分析, 记录时间为 50 min。

## 2.5 结果

由负离子扫描获得准分子离子峰, MS/MS 给出的碎片信息, 根据相对分子质量, 再结合 DAD 给出的最大吸收峰鉴定出 15 个成分, 分别为七叶亭苷 (esculin, 2)、洋地黄毒苷元-葡萄糖苷 (digitoxigenin-glucoside, 5)、羟基洋地黄毒苷元-洋地黄糖-葡萄糖苷 (digitalin, 10)、奥多诺苷 H (odoroside H, 11)、洋地黄次苷 (strosposide, 15)、羟基洋地黄毒苷元 (gitoxigenin, 17)、洋地黄毒苷元-洋地黄毒糖-葡萄糖苷 (digitoxigenin-digitoxose-glucoside, 21)、羟基洋地黄毒苷元-洋地黄毒糖苷 (gitoroside, 21')、紫花洋地黄苷 B (purpurea glycoside B, 23)、

羟基洋地黄毒苷元-双洋地黄毒糖苷 (gitoxigenin-bis-digitoxoside, 24)、羟基洋地黄毒苷 (gitoxin, 28)、洋地黄毒苷元-洋地黄毒糖苷 (digitoxigenin-mono-digitoxoside, 30)、紫花洋地黄苷 A (purpurea glycosid A, 31)、洋地黄毒苷元-双洋地黄毒糖苷 (digitoxigenin-bis-digitoxoside, 32)、洋地黄毒苷 (digitoxin, 33)。其中成分 2 的紫外吸收波长为 202、222、334 nm, 成分 5、7 的紫外吸收波长为 210 nm, 成分 10、15、17、21、21'、24、30 的紫外吸收波长为 220 nm。

七叶亭苷、洋地黄毒苷、紫花洋地黄苷 A、紫花洋地黄苷 B 经对照品保留时间确认。施图伦滴眼液 pH 值 4.2~4.6, 在 80  $^{\circ}\text{C}$  加热 3 h 后, 保留时间在 21~24 min 的色谱峰降低, 而成分 17 的色谱峰明显升高, 提示其为多数苷的水解产物, 与鉴定为羟基洋地黄毒苷元的结论一致。

洋地黄毒苷、洋地黄毒次苷在洋地黄叶的次生苷中的量较高, 与文献的检测结果一致<sup>[4]</sup>。

洋地黄苷类化合物在反相色谱柱上, 洗脱顺序按极性大小呈规律性排列, 单糖苷 > 双糖苷 > 三糖苷; 葡萄糖苷 > 洋地黄糖苷 > 洋地黄毒糖苷; 羟基洋地黄毒苷元的苷类 > 洋地黄毒苷元的苷类。施图伦滴眼液的总离子流图见图 1, LC-MS/MS 分析结果见表 1。

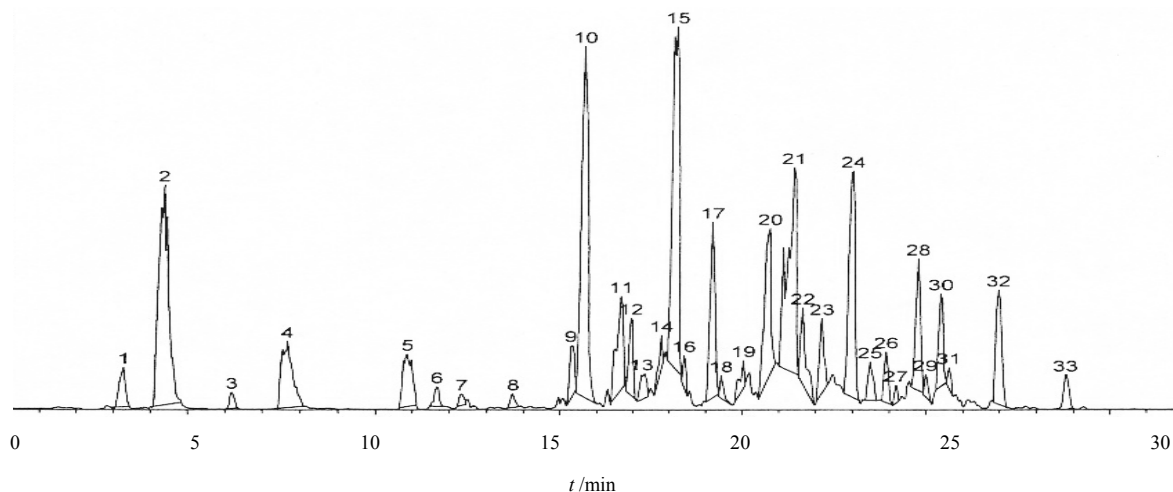


图 1 施图伦滴眼液的总离子流图

Fig. 1 Total ion current of Augentropfen Stulln Mono

## 3 讨论

液相色谱条件采用了施图伦滴眼液质量标准的梯度洗脱条件, 该梯度能将大部分洋地黄苷类成分

基线分离, 适用于 LC-MS/MS 分析。

实验中发现正离子方式不适合洋地黄强心苷类成分。在负离子的质谱扫描图上能找到一系列准分

表1 施图伦滴眼液的 LC-MS/MS 鉴定结果  
Table 1 LC-MS/MS identification of Augentropfen Stulln Mono

峰号	一级谱 $m/z$	二级谱 $m/z$	$M_r$
2	339.1[M-H] <sup>-</sup>		340.3
5	571.7(572.2 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup>	535.2、517.2,	536.7
7	733.8(734.1 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup> 、811.4[M+TFA-H] <sup>-</sup>	697.3	698.5
10	747.7(748.4 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup> 、825.3[M+TFA-H] <sup>-</sup>	711.3、675.3	712.8
11	570.2 (570.1 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup>	533.2、515.2,	534.7
15	585.6(586.0 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup> 、663.3[M+TFA-H] <sup>-</sup>	595.2、570.1、531.3	550.6
17	425.6[M+Cl] <sup>-</sup> 、503.3[M+TFA-H] <sup>-</sup>		390.5
21	701.6(702.2 <sup>1)</sup> [M+Cl] <sup>-</sup> 、665.8 [M-H] <sup>-</sup> 、779.4 [M+TFA-H] <sup>-</sup>	665.3、629.4	666.7
21'	555.7[M+Cl] <sup>-</sup> 、519.7[M-H] <sup>-</sup> 、633.4[M+TFA-H] <sup>-</sup>		520.4
23	978.0[M+Cl] <sup>-</sup> 、941.7[M-H] <sup>-</sup>		942.7
24	685.6[M+Cl] <sup>-</sup> 、649.6[M-H] <sup>-</sup> 、763.4[M+TFA-H] <sup>-</sup>		650.5
28	815.8[M+Cl] <sup>-</sup> 、779.8[M-H] <sup>-</sup> 、893.5[M+TFA-H] <sup>-</sup>		780.9
30	539.7[M+Cl] <sup>-</sup> 、503.9[M-H] <sup>-</sup> 、617.4[M+TFA-H] <sup>-</sup>		504.7
31	961.7[M+Cl] <sup>-</sup> 、925.7[M-H] <sup>-</sup>		926.7
32	669.8[M+Cl] <sup>-</sup> 、634.5[M-H] <sup>-</sup> 、747.4[M+TFA-H] <sup>-</sup>		634.8
33	800.4[M+Cl] <sup>-</sup> 、763.8[M-H] <sup>-</sup> 、877.5[M+TFA-H] <sup>-</sup>		764.9

1) 为二级谱的母离子

1) parent ions of second spectra

子离子峰，在以[M+Cl]<sup>-</sup>为母离子的二级谱中也能找到[M-H]<sup>-</sup>。

在紫外色谱图上基本看不到原生苷的峰，原生苷大部分都被降解成次生苷。未知成分7的相对分子质量为698.5，未找到与其一致的已知成分，是否为洋地黄毒苷元-双葡萄糖苷（ $M_r$  698.5）需要进一步研究证实，未知成分26的紫外最大吸收波长为210 nm，但在质谱上未出现规律的准分子离子峰，是否为洋地黄强心苷类物质，还有待进一步研究。

对洋地黄叶化学成分的研究主要集中在20世纪五六十年代的德国，洋地黄为我国的引种品种，因花形漂亮，在上海、浙江等地栽培作观赏用，国内对其研究较少。施图伦滴眼液现行质量标准，是以洋地黄毒苷做对照品，计算总苷的量，从HPLC-UV图谱看，滴眼液中洋地黄毒苷的量很低，羟基

洋地黄毒苷-洋地黄糖-葡萄糖、洋地黄次苷和羟基洋地黄毒苷元为其主要成分，国内仿制该品种的厂家在提高标准时可作为参考。

#### 参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2009: 6913.
- [2] Haack E, Kaiser F, Gube M, *et al.* Die genuinen glykoside der Blatter und Samen von *Digitalis purpurea* [J]. *Kurze Originalmitteilungen*, 1956, 13(43): 301-302.
- [3] Ikeda Y, Fujii Y, Yamazaki M. Quantitative HPLC analysis of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(6): 897-901.
- [4] Fujii Y, Ikeda Y, Yamazaki M. High-performance liquid chromatographic determination of secondary cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves [J]. *J Chromatogr*, 1989, 479(2): 319-325.