

UFLC-MS/MS 法快速测定酚酞片中的酚酞

张军民¹, 傅思武¹, 赵晋¹, 白静雅¹, 石晓峰²

1. 西北民族大学医学院, 甘肃 兰州 730030

2. 甘肃省医学科学研究院, 甘肃 兰州 730050

摘要: **目的** 建立超快速液相色谱-质谱/质谱联用(UFLC-MS/MS)法测定酚酞片中酚酞的量。**方法** 样品以乙醇提取、微孔滤膜滤过、离心后,通过电喷雾离子化(ESI),采用多反应检测(MRM)方式进行正离子检测,用于定量分析的检测离子为 m/z 319.0→225.2。采用 Shim-pack XR-ODS 色谱柱(75 mm×3.0 mm, 2.0 μm)分离,以乙腈-水-甲酸(55:45:0.1)为流动相,体积流量为 0.40 mL/min,在 3 min 内完成酚酞定量分析。**结果** 线性范围为 2.5~1 000.0 ng/mL,最低检测限为 2.5 ng/mL;日内 RSD 小于 1.85%,日间 RSD 小于 2.56%。**结论** 本方法灵敏度高,分析速度快,操作简单,可作为酚酞片中酚酞质量控制方法。

关键词: 酚酞;片剂;UFLC-MS/MS

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)02-0155-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.013

Rapid quantification of phenolphthalein in Phenolphthalein Tablets using UFLC-MS/MS

ZHANG Jun-min¹, FU Si-wu¹, ZHAO Jin¹, BAI Jing-ya¹, SHI Xiao-feng²

1. Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China

2. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To establish an ultra fast liquid chromatography/tandem mass spectrometric (HPLC-MS/MS) method for the determination of phenolphthalein in Phenolphthalein Tablet (PT). **Methods** The samples were extracted by ethanol, filtered with microporous membrane, and centrifugated. LC/MS/MS detection was performed by using a triple-stage quadrupole mass spectrometer working in multiple reaction monitoring mode (MRM) with positive electrospray ionization (ESI), using the transitions of m/z 319.0→225.2 of phenolphthalein. Chromatographic separation was achieved using Shim-pack XR-ODS column (75 mm × 3.0 mm, 2.0 μm) with isocratic flow and elution with acetonitrile-water-formic acid (55:45:0.1) and a flow rate of 0.4 mL/min. The analyte was quantified in a single run within 3 min. **Results** The linearity was demonstrated over the expected concentration range of 2.5—1 000.0 ng/mL, and the lower limit of quantification (LLOQ) was 2.5 ng/mL. The intra-day precision expressed as RSD was 1.85% or less, while the inter-day result was 2.56% or less for phenolphthalein. **Conclusion** The method is more convenient with good repeatability and high sensitivity, and could be successfully applied for the determination of phenolphthalein in PT.

Key words: phenolphthalein; tablets; UFLC-MS/MS

酚酞口服后在肠内遇胆汁及碱性液形成可溶性钠盐,刺激结肠黏膜,促进其蠕动,并阻滞肠液被肠壁吸收而起缓泻作用。用于习惯性顽固性便秘,也可在各种肠道检查前用作肠道清洁剂^[1]。

《中国药典》2010年版(二部)采用紫外分光光度(UV)法^[2]对酚酞片进行定量测定。目前文献

对酚酞定量测定方法主要有方波伏安法^[3]、高效液相色谱(HPLC)法^[4-9],已经报道方法主要倾向于基于 HPLC 的酚酞片剂含量测定方法,均存在分析时长,灵敏度偏低的缺点。另有文献采用高效液相色谱-质谱/质谱联用(HPLC-MS/MS)法测定减肥类药品及保健品中非法掺入酚酞的研究^[10],

收稿日期: 2013-09-03

作者简介: 张军民,男,硕士,研究方向为药物分析。

*通信作者 石晓峰,男,教授,研究方向为药物分析。Tel: (0931)2938696 E-mail: luzhang@126.co

分析较为灵敏,但却未见采用此法对酚酞片的研究报道,笔者通过优化色谱和质谱条件建立了控制酚酞片质量的 HPLC-MS/MS 方法,此方法操作简单,分析时间快,结果准确,灵敏度高,重复性好,大大提高了分析工作效率,为酚酞片质量控制提供了一种准确、简便、可靠、快速、高效、科学的方法。

1 材料

1.1 仪器

HPLC—20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); API3200 三重四极杆串联质谱仪(美国 AB 公司); 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); 超声波清洗器(奥特赛恩斯仪器有限公司); 涡旋混匀器(金坛市金城教学仪器厂)等。

1.2 试剂

酚酞对照品(批号 100091-199601, 供含量测定用, 中国食品药品检定研究院); 酚酞片(批号 110302、100201、110601、110701、111002, 市售); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(批号 14117, 色谱纯, 美国 Dima 公司); 灭菌注射用水(批号 110128112, 西安京西双鹤药业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

色谱柱为 Shim-pack XR-ODS 柱(75 mm×3.0 mm, 2.0 μm), 流动相为乙腈-水-甲酸(55:45:0.1), 体积流量 0.40 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL, 整个分析流程用时 3 min。

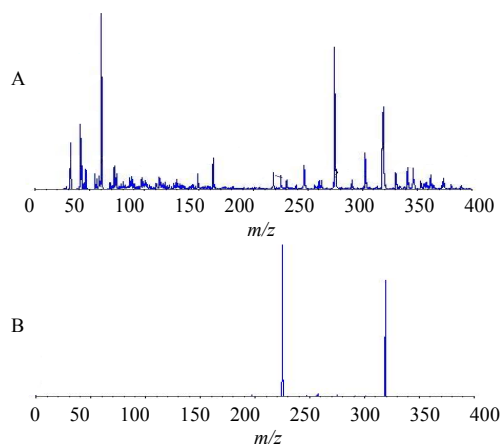
质谱采用 ESI 正离子多反应(MRM)方式检测; 酚酞在 ESI 源正离子电离方式下, 有较好的质谱响应, 主要生成 $[M+H]^+$ 离子峰, m/z 为 319.0, 选择性对 $[M+H]^+$ 离子进行产物离子质谱分析得相应的二级扫描质谱图, 见图 1。喷雾电压(IS)4 500 V, 雾化温度(TEM)250 °C, 酚酞检测离子对 m/z 319.0 → 225.2, 碰撞诱导解离电压(DP)248 kPa; 碰撞能量(CE)200 kPa。

2.2 标准溶液的配制

精密称取酚酞对照品 2.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 得 200 μg/mL 酚酞标准溶液作为储备液。将储备液依次用甲醇稀释成质量浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0 ng/mL 的系列标准溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取酚酞片 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量(约相当于酚酞 0.10 g), 置 100 mL 量瓶中, 加



A-母离子质谱图, B-碎片离子质谱图

A- mass-spectrogram of parent ion, B- mass-spectrogram of fragment ion

图 1 酚酞扫描质谱图

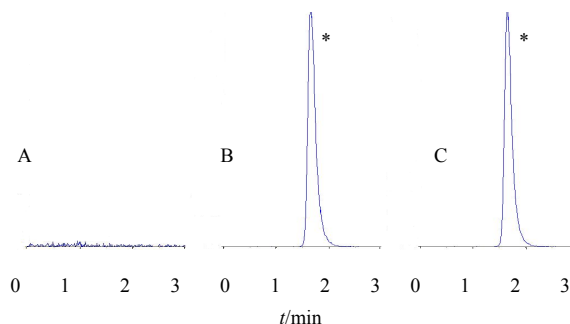
Fig. 1 MS/MS spectra of phenolphthalein

乙醇使酚酞溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 50 μL, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 在上述色谱条件下, 分别取空白溶液、对照品溶液与供试品待测溶液进行测定, 得到特征峰, 结果表明, 辅料对测定无干扰, 见图 2。

2.4.2 线性关系 将“2.3”项下酚酞系列标准溶液进行 UFLC-MS/MS 分析, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 酚酞标准曲线 $Y=564X+235$ ($r=0.9997$), 权重: $1/x^2$ 。结果表明酚酞在 0.5~1 000.0 ng/mL 线形关系良好, 最低定量限为 0.5 ng/mL, 结果见表 1。



A-空白溶液; B-酚酞对照品; C-酚酞片; *-酚酞

A- blank solvent, B- blank solvent spiked with standard phenolphthalein, C- phenolphthalein tablets; *- phenolphthalein

图 2 酚酞 UFLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 Representative UFLC-MS/MS chromatograms of phenolphthalein

2.4.3 精密度 取一定量的酚酞储备液用甲醇稀释成质量浓度为 1.5、500.0、850.0 ng/mL 的质量控制 (QC) 样品各 5 份, 进行 UFLC-MS/MS 分析, 计算得日内 RSD; 取上述浓度的 QC 样品连续测定 3 d, 得日间 RSD, 结果日内测定的相对标准偏差小于 1.85%, 日间测定的相对标准偏差小于 2.56%, 符合制剂分析的方法学要求。

2.4.4 重复性 精密称取同一批酚酞片 5 份, 按“2.4”项下平行制备 5 份供试品溶液, 进行 UFLC-MS/MS 分析, 酚酞的 RSD 值为 1.79%。结果显示, 本方法测定有较好的重复性。

2.4.5 稳定性 取同一份供试品溶液, 分别于配制后 0、6、24 h 下依法测定, 酚酞峰面积的 RSD 值为 2.01%, 结果表明供试品溶液于室温下放置 24 h 稳定。

2.4.6 回收率 取 3 份酚酞片供试品溶液各 0.5 mL, 依次加入浓度为 1 000.0 ng/mL 的酚酞标准溶液 50、200、500 μ L, 混匀后进行 UFLC-MS/MS 分析, 计算回收率, 结果平均加样回收率为 99.77%, RSD 为 1.20%。

2.5 定量测定

按“2.3”项下方法制备各种不同剂型酚酞供试品溶液, 依次进行 UFLC-MS/MS 分析, 测定不同制剂中酚酞的含量, 结果见表 1。

表 1 酚酞含量测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of phenolphthalein ($n=3$)

批号	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	质量分数/%
110 302	501.40±8.26	100.28
100 201	497.80±9.01	99.56
110 601	505.00±8.22	101.00
110 701	509.60±7.40	101.92
111 002	495.80±11.32	99.16

3 讨论

选用 1 μ g/mL 酚酞标准品溶液进行质谱条件的选择, 以 ESI⁺作为电离模式, 酚酞母离子扫描有较好的质谱响应, 且分别对 IS、DP、TEM、CE 等质

谱参数进行了优化, 使得质谱扫描达到最佳。本实验同时考察了流动相中不同浓度的甲酸对酚酞检测的影响。综合考虑峰形、响应值和分析时间, 当乙腈-水-甲酸 (55:45:0.1) 时色谱图较好, 可用于其制剂定量测定。

本实验首次采用 UFLC-MS/MS 方法进行酚酞片含量测定, 定量限为 2.5 ng/mL, 所述方法具有简单、灵敏、可靠等优点, 并且回收率良好, 辅料未见干扰。研究结果发现, 不同厂家生产的酚酞片含量有一定差异, 故建立一种快速测定酚酞的 UFLC-MS/MS 质量控制方法具有重要意义, 与药典采用的紫外法相比, 本方法更加准确、灵敏、快速, 减少了操作误差, 且取样量少, 适用于不同厂家酚酞片的定量测定。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 498.
- [2] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 881-882.
- [3] 冒爱荣, 严金龙. 方波伏安法测定酚酞片含量 [J]. 理化检验: 化学分册, 2007, 43(10): 881-882.
- [4] Geeta N, Baggi T R. Determination of phenolphthalein by reverse phase high-performance liquid chromatography [J]. *Microchem J*, 1990, 42(2): 170-175.
- [5] 秋颖姮, 李美芳, 王铁杰. 高效液相色谱法测定酚酞片含量 [J]. 中国药师, 2005, 8(11): 966-967.
- [6] 万庆, 钱世兵. RP-HPLC 法测定酚酞片的含量 [J]. 安徽医药, 2006, 10(12): 922-923.
- [7] 吴红英. 高效液相色谱法测定酚酞片中酚酞含量的研究 [J]. 山西医药杂志, 2010, 39(2): 161-162.
- [8] 孙银华. HPLC 法测定酚酞片中酚酞的含量 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(25): 15-16.
- [9] 陈斌, 胡昭君, 余岳林, 等. 中成药和保健食品中非法添加西药成分检测方法的探索 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1677-1680.
- [10] 邱颖姮, 王铁杰, 李美芳, 等. 液相色谱-串联四极杆质谱联用法测定减肥类药品及保健品中非法掺入酚酞的研究 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11): 1609-1611.