

# UFLC-MS/MS法测定氨茶碱制剂中的氨茶碱含量<sup>Δ</sup>

张娟红<sup>1,2\*</sup>,王 荣<sup>1,2#</sup>,谢 华<sup>2</sup>,贾正平<sup>1,2</sup>,李文斌<sup>1</sup>,谢希晖<sup>1,2</sup>(1.兰州军区兰州总医院全军高原损伤防治重点实验室,兰州 730050;2.兰州大学药学院,兰州 730050)

中图分类号 R927.2;R974 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0071-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.25

**摘要** 目的:建立测定氨茶碱制剂(片剂和注射液)中氨茶碱含量的方法。方法:采用超快速液相色谱串联质谱(UFLC-MS/MS)法。色谱柱为Shim-pack XR-ODS,流动相为乙腈-0.4%甲酸水溶液(54:46),流速为0.40 ml/min;通过电喷雾离子化、采用多反应检测方式进行正离子检测,用于定量分析的检测离子为 $m/z$  181.0→124.0。结果:在3 min内可完成氨茶碱定量分析;氨茶碱检测质量浓度线性范围为0.25~100 ng/ml( $r=0.999 8$ ),最低定量限为0.25 ng/ml;平均回收率为99.75%,日内、日间RSD均<2.84%。结论:本方法灵敏、准确、专属性好、定量限低且分析时间短,适用于氨茶碱制剂的含量测定。

**关键词** 氨茶碱制剂;超快速液相色谱串联质谱法;含量测定

## Content Determination of Aminophylline in Aminophylline Preparation by UFLC-MS/MS

ZHANG Juan-hong<sup>1,2</sup>, WANG Rong<sup>1,2</sup>, XIE Hua<sup>2</sup>, JIA Zheng-ping<sup>1,2</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>, XIE Xi-hui<sup>1,2</sup>(1.PLA Key Laboratory of Plateau Damage Control, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China;2.School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of aminophylline in Aminophylline preparations (tablet and injection). METHODS: UFLC-MS/MS was adopted. The determination was performed on Shim-pack XR-ODS column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% formic acid solution (54:46) at the flow rate of 0.40 ml/min; the detection was performed in multiple reaction monitoring mode (MRM) with positive electrospray ionization (ESI), using the transitions of  $m/z$  181.0→124.0 of aminophylline. RESULTS: Quantity analysis of aminophylline was completed within 3 min. Linear range of aminophylline were 0.25-100 ng/ml ( $r=0.999 8$ ) with average recovery of 99.75%. The limit of quantification (LOQ) was 0.25 ng/ml, and intra-day and inter-day RSDs were lower than 2.84%. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and specific with low LOQ, and it costs short time. It is suitable for the content determination of Aminophylline preparations.

**KEY WORDS** Aminophylline preparation; UFLC-MS/MS; Content determination

- [4] 张好琳,曹玲.降糖保健食品中非法添加盐酸苯乙双胍和格列本脲的检测[J].药学与临床研究,2007,15(5):423.
- [5] 潘字宏,王仕平,晏敏英,等.降糖类药品与保健食品中掺入盐酸苯乙双胍的检测方法[J].中国药业,2008,17(16):36.
- [6] 罗干明.降糖类中药及保健食品中掺入的盐酸苯乙双胍检测[J].中国药业,2009,18(4):31.
- [7] 余倩,车宝泉.RP-HPLC检查中药保健品中的西药降糖成分[J].中国药学杂志,2005,40(4):316.
- [8] 朱炳辉,龙朝阳,吴西梅,等.固相萃取/高效液相色谱法对中成药和保健品中7种降糖化学药物的测定[J].分析测试学报,2008,27(5):534.
- [9] 郭栋,那顺朝克图,王江华,等.高效液相色谱法测定降糖中成药中添加的高极性化学降糖药物[J].色谱,2009,27(2):211.
- [10] 李晓燕,刘斐,郑静,等.液质联用检查降糖中药制剂中掺入的7种化学药品[J].中国药事,2008,22(11):980.
- [11] 张喆,高青,余倩,等.中药制剂及保健品中违禁添加9种化学降糖药的HPLC-MS/MS定性检测[J].中国医药工业杂志,2007,38(1):39.
- [12] 谢瑶,石萌萌,庞欣.高效液相色谱及液相色谱-质谱联用技术在保健食品检测中的应用[J].化学通报,2010(8):684.
- [13] 郑建国,周明辉,李政军.化学检测样品前处理技术研究进展[J].检验检疫学刊,2011,21(6):1.

(收稿日期:2012-01-30 修回日期:2012-05-23)

Δ 基金项目:国家科技部重大项目资助(No.2008ZXJ09014-010)

\* 硕士研究生。研究方向:体内药物分析。电话:0931-8994675

# 通信作者:主任药师,博士。研究方向:临床药学。电话:0931-8994675。E-mail:wangrong-69@163.com

氨茶碱为茶碱和乙二胺的复合物,主要用于支气管哮喘和喘息性支气管炎,与受体激动药合用可提高疗效。虽然许多新的抗哮喘药物不断涌现,但是氨茶碱仍是当今最广泛使用的抗哮喘药物之一。其还可用于治疗急性心功能不全和心源性哮喘、胆绞痛<sup>[1-2]</sup>,近年来还发现氨茶碱对急性缺氧动物吸氧后再缺氧损伤有预防作用<sup>[3]</sup>。

目前,氨茶碱含量测定方法主要有高效液相色谱(HPLC)法<sup>[4-5]</sup>、毛细管电泳(CE)法<sup>[6]</sup>、拉曼光谱法<sup>[7]</sup>等。《中国药典》2010年版<sup>[8]</sup>载有氨茶碱片剂、注射剂及缓释片的含量测定方法为紫外分光光度(UV)法,但此方法存在分析时间长、灵敏度低、辅料干扰多等缺点。随着液相色谱质谱联用技术的逐步推广,建立氨茶碱不同剂型超快速液相色谱串联质谱联用(UFLC-MS/MS)法用于其质量控制有着重要的意义。本试验通过优化色谱和质谱条件建立了测定氨茶碱制剂含量的UFLC-MS/MS法,该方法缩短了分析时间,大大提高了分析工作效率,尤其可能适用于微量样品的分析,比如可用于药动学的研究。

## 1 材料

UFLC仪(日本岛津公司);API 3200三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)。

氨茶碱标准品(中国食品药品检定研究院,批号:0844-9802,纯度:供含量测定用);氨茶碱片(山西云鹏制药有限公司,批号:B110101、A100302、A101002,规格:每片0.1g);氨茶碱注射液(上海现代哈森药业有限公司,批号:10091612,规格:2 ml:0.25 g;山西晋新双鹤药业有限公司,批号:1005161,规格:2 ml:0.25 g;常州兰陵制药有限公司,批号:1010202,规格:10 ml:0.25 g;河南润弘制药股份有限公司,批号:1011231,规格:2 ml:0.25 g);乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,水为灭菌注射用水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱、质谱条件的建立

色谱柱:Shim-pack XR-ODS(75 mm×3.0 mm,2.0 μm);流动相:乙腈-0.4%甲酸水溶液(54:46,V/V),流速:0.40 ml/min;柱温:25℃;进样量:10 μl;整个分析流程用时3 min。

质谱采用电喷雾离子源(ESI)正离子多反应(MRM)方式检测;氨茶碱在ESI源正离子电离方式下,有较好的质谱响应,主要生成[M+H]<sup>+</sup>离子峰,为m/z 181.0;喷雾电压(IS):4 500 V;雾化温度(TEM):450℃;氨茶碱检测离子对m/z 181.0→124.0;碰撞诱导解离电压(DP):35 psi;碰撞能量(CE):25 psi。选择性对[M+H]<sup>+</sup>离子进行碎片质谱分析得相应的二级扫描质谱图,见图1。

### 2.2 方法的专属性

在“2.1”项色谱条件下,分别取空白溶液(流动相)、“2.3”项下标准品溶液与供试品溶液(片剂,批号:B110101)进样测定,得到特征峰。结果,氨茶碱保留时间附近未见杂质峰,说明辅料对测定无干扰,详见图2。

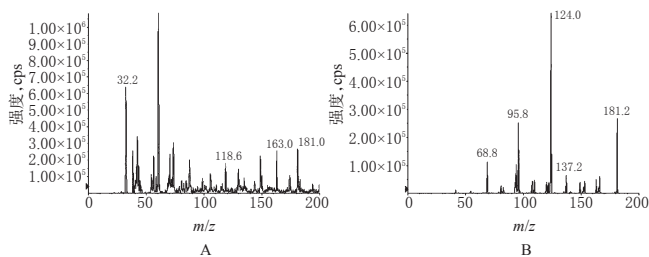


图1 氨茶碱扫描质谱图

A. 母离子;B. 碎片离子

Fig 1 MS/MS spectra of aminophylline

A. parent ion;B. fragment ion

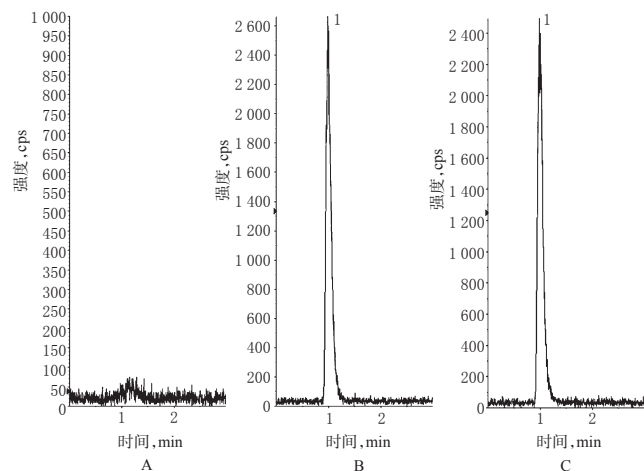


图2 超快速液相色谱串联质谱图

A. 空白溶液;B. 标准品溶液;C. 供试品溶液;1. 氨茶碱

Fig 2 UFLC-MS/MS chromatograms

A. blank solution;B. standard solution; C. test sample solution; 1. aminophylline

### 2.3 溶液的制备

标准品溶液:精密称取氨茶碱标准品0.002 0 g于10 ml量瓶中,加入灭菌注射用水溶解并定容,得质量浓度为200 μg/ml氨茶碱标准溶液作为贮备液;将贮备液依次用流动相稀释成质量浓度为0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 ng/ml的系列标准品溶液。

供试品溶液:取氨茶碱片20片,精密称定,研细。精密称取适量(约相当于氨茶碱50 mg),置于200 ml量瓶中,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液10 ml与水30 ml,振摇10 min使氨茶碱溶解,用水稀释至刻度,摇匀,滤过。精密吸取续滤液20 μl,置于100 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

精密量取氨茶碱注射液适量,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液定量稀释制成每1 ml中约含氨茶碱100 μg的溶液。精密吸取溶液50 μl,置于100 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

供试品溶液进样前于10 000 r/min离心3 min,吸取上清液于进样瓶中待测。

### 2.4 标准曲线的制备

取“2.3”项下氨茶碱系列标准品溶液进样分析,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得方程

$Y=353X+1.1\times 10^3$  ( $r=0.9998$ ), 权重:  $1/x^2$ 。结果表明, 氨茶碱检测质量浓度线性范围为  $0.25\sim 100$  ng/ml, 最低定量限为  $0.25$  ng/ml。

### 2.5 精密度试验

取一定量的氨茶碱标准品贮备液用甲醇稀释成质量浓度为  $0.3$ 、 $50$ 、 $85$  ng/ml 的质量控制(QC)样品各 5 份, 进样分析, 计算得日内 RSD 分别为  $2.45\%$ 、 $1.85\%$ 、 $0.90\%$ ; 取上述浓度的 QC 样品连续测定 3 d, 得日间 RSD 分别为  $2.84\%$ 、 $1.91\%$ 、 $1.13\%$ 。RSD 均  $\leq 2.84\%$ , 符合制剂分析的方法学要求。

### 2.6 重复性试验

精密称取同一批氨茶碱片 5 份, 按“2.3”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 进样分析, 结果含量的 RSD =  $1.11\%$ , 表明本方法有较好的重复性。

### 2.7 回收率试验

取已知含量的氨茶碱供试品溶液(片剂, 批号: B110101)  $0.5$  ml 共 5 份, 分别加入  $100$  ng/ml 的氨茶碱标准品溶液  $10$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $500$   $\mu$ l, 涡旋混匀后进样分析, 计算回收率。结果氨茶碱回收率分别为  $99.10\%$ 、 $99.50\%$ 、 $99.29\%$ 、 $100.29\%$ 、 $99.66\%$ 、 $100.64\%$ , 平均值为  $99.75\%$ , 符合要求。

### 2.8 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别于制备后  $0$ 、 $6$ 、 $24$  h 后依法测定, 结果, 峰面积的 RSD =  $1.67\%$ , 表明供试品溶液于室温下放置  $24$  h 稳定。

### 2.9 2 种氨茶碱制剂含量测定结果

按“2.3”项下方法制备不同批号氨茶碱供试品溶液, 进样分析。结果不同厂家的药品含量测定结果均符合《中国药典》要求, 但不同剂型的氨茶碱含量有一定差异, 详见表 1。

表 1 7 批氨茶碱制剂含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab 1 Content determination of aminophylline in 7 batches of Aminophylline preparation ( $n=3$ )

剂型	批号	供试品溶液稀释浓度, ng/ml	测定值/ $\bar{x}\pm s$ , ng/ml	占标示量百分含量, %
片剂	B110101	50	$49.88\pm 0.85$	99.76
片剂	A100302	50	$51.06\pm 1.21$	102.12
片剂	A101002	50	$50.16\pm 1.49$	100.33
注射液	10091612	50	$51.86\pm 0.74$	103.72
注射液	1005161	50	$51.98\pm 0.93$	103.96
注射液	1010202	50	$52.68\pm 1.17$	105.36
注射液	1011231	50	$50.41\pm 0.61$	100.82

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

本试验前期考察了流动相中不同体积分数 ( $0.2\%$ 、 $0.3\%$ 、 $0.4\%$ ) 的甲酸水溶液对氨茶碱检测的影响, 发现当甲酸体积分数为  $0.4\%$  时, 氨茶碱峰形、响应值和分析时间均较好, 所以选择以乙腈- $0.4\%$  甲酸水溶液 ( $54:46, V/V$ ) 为流动相, 同时检测

限更低。

### 3.2 质谱条件的选择

选用  $1$   $\mu$ g/ml 氨茶碱标准品溶液进行质谱条件的选择, 以 ESI<sup>+</sup> 作为电离模式, 氨茶碱有较好的质谱响应, 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, 以便检测, 最终确立了“2.1”项下的各项质谱条件为最优。

虽然已有报道采用 HPLC 法、UV 法测定氨茶碱制剂含量的方法, 但目前尚未见采用 UFLC-MS/MS 法测定氨茶碱制剂含量的文献报道。本试验方法具有简单可靠、准确灵敏、快速高效的优点, 并且重复性好, 辅料未见干扰。

研究结果发现, 不同剂型的氨茶碱含量有一定差异, 故建立氨茶碱质量控制的 UFLC-MS/MS 方法具有重要意义, 本方法氨茶碱定量限为  $0.25$  ng/ml, 适用于少量样品及生物样品的分析, 与已有报道的 HPLC 法、UV 法相比, 本方法更加灵敏、准确、专属性好, 减少了操作误差, 且取样量少, 适用于氨茶碱制剂的含量测定, 同时也可能适用于血样等生物样品的分析。

## 参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 17 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 446.
- [2] 陈怡禄, 邓力, 吕回, 等. 婴儿氨茶碱急性中毒的临床诊断治疗及药物代谢动力学[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(2): 145.
- [3] 牟信兵, 廖国云, 高钰琪, 等. 速尿和氨茶碱对小猪再缺氧损伤的预防效果[J]. 中华航空航天医学杂志, 2004, 15(3): 137.
- [4] 黄跃生, 刘志松, 吕荷, 等. 高效液相色谱法测定复方茶碱片中主要成分的含量[J]. 药物分析杂志, 1992, 12(1): 28.
- [5] Yin C, Tang C, Wu X. HPLC determination of aminophylline, methoxyphenamine hydrochloride, noscapine and chlorphenamine maleate in compound dosage forms with an aqueous-organic mobile phase[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(1): 39.
- [6] Chen G, Chu Q, Zhang L, et al. Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 457(2): 225.
- [7] Mazurek S, Szostak R. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(5): 1 235.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 836-837.

(收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-07-11)

《中国药房》杂志——《剑桥科学文摘》(CSA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅