

使用系统性筛选策略高效开发盐酸萘甲唑啉、马来酸非尼拉敏和相关物质的分析方法

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

我们使用系统性筛选策略开发出一种用于盐酸(HCl)萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏活性药物成分(API)及其相关物质分析的超高压液相色谱(UHPLC)方法。按照预定义的实验计划，在研究过程中系统地筛选主要的选择性因子，从而实现高效的方法开发。利用同时配备PDA检测器和ACQUITY™ QDa质谱检测器的Arc™ Premier系统开发方法。Empower™色谱数据系统(CDS)支持自动创建色谱方法、峰追踪、数据分析和报告出具。最终方法的运行条件可与质谱(MS)兼容，成功分离了所有化合物，且所有峰之间的USP分离度 ≥ 1.5 ，重复进样表现出不凡的重复性。

优势

- 使用系统性筛选策略提高方法开发的效率
- Empower 3 CDS工具支持自动创建色谱方法、数据分析、峰追踪和报告出具
- 使用PDA和ACQUITY QDa质谱检测器准确鉴定组分并确认谱峰纯度

简介

系统性方法开发策略以一组预定义的目标和实验方案为基础¹。在整个过程中系统地评估选择性和分离度的关键影响因子，以获得理想的分离效果和分离度。采用系统化方案可以快速有效地开发耐用方法，从而可靠地生成可重现的准确结果。

盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏是在用于治疗眼部炎症和过敏性结膜炎的复方滴眼液中发现的活性成分²。文献中发表的许多方法要么只能分析单个API，要么缺乏对杂质（或相关物质）的专属性。关于盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏滴眼液的USP专论规定了API的测定程序，但缺乏测定杂质的方法³。关于盐酸萘甲唑林滴眼液和滴鼻液的USP专论也没有提供杂质测定程序^{4,5}。欧洲药典记载了两种方法分别用于盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏相关物质的分析^{6,7}。

在本研究中，我们通过一种系统性筛选策略来开发一种用于欧洲药典规定的盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏API及其相关物质分析的LC方法^{6,7}。该系统化方案包括探索、筛选和优化步骤。研究中使用了Arc Premier系统和Premier色谱柱。Arc Premier系统配备有色谱柱管理器和溶剂选择阀，可通过自动切换色谱柱和有机改性剂大幅提高方法开发的灵活性。在研究过程中利用紫外和质谱数据准确鉴定和追踪样品组分，以及验证谱峰纯度。本研究所开发的方法可以同时测定盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏API及其相关物质，适用于复方药物制剂的分析。

实验

化合物（表1）购自Sigma-Aldrich和Toronto Research Chemicals (TRC)。质谱级试剂和溶剂购自Honeywell。

样品描述

标准品溶液：

使用甲醇配制浓度为4.0 mg/mL的单标储备液。用80:20的水/甲醇稀释剂稀释储备液，制备用于方法开发的混标溶液，其中盐酸萘甲唑林和马来酸非尼拉敏活性成分的浓度为0.5 mg/mL，相关物质的浓度为40 µg/mL。用于方法开发的化合物列表见表1。

化合物	名称	化学式	单同位素质量数(Da)
马来酸非尼拉敏	PHE API	$C_{20}H_{24}N_2O_4$	356.17 游离碱: 240.16
2-苄基吡啶	PHE杂质A	$C_{12}H_{11}N$	169.09
4-苄基吡啶	PHE杂质B	$C_{12}H_{11}N$	169.09
盐酸萘甲唑啉	NAPH API	$C_{14}H_{15}ClN_2$	246.09 游离碱: 210.11
N-(2-氨基乙基)-2-(1-萘基)乙酰胺	NAPH杂质A	$C_{14}H_{16}N_2O$	228.13
1-萘乙酸	NAPH杂质B	$C_{12}H_{10}O_2$	186.07
1-萘乙腈	NAPH杂质C	$C_{10}H_7CH_2CN$	167.07
β -萘甲唑啉	NAPH杂质D	$C_{14}H_{14}N_2$	210.11

表1.用于方法开发的化合物列表

滴眼液

含有0.3%马来酸非尼拉敏和0.025%盐酸萘甲唑啉的非处方(OTC)滴眼液

- 用稀释剂（80:20水/甲醇）将样品稀释至工作浓度：马来酸非尼拉敏约500 μ g/mL，盐酸萘甲唑啉约40 μ g/mL。

液相色谱条件

液相色谱系统：

Arc Premier系统、带主动预加热功能的色谱柱管理器、PDA和ACQUITY QDa质谱检测器

样品瓶：

LCMS最大回收样品瓶，容积2 mL，P/N：600000670CV

方法开发条件

色谱柱：	<p>所有色谱柱尺寸均为4.6 × 100 mm，2.5 μm</p> <p>XSelect Premier CSH C₁₈ (P/N: 186009873)</p> <p>XSelect Premier CSH苯己基柱(P/N: 186009890)</p> <p>XSelect Premier HSS T3 (P/N: 186009859)</p> <p>Atlantis Premier BEH C₁₈ AX (P/N: 186009397)</p> <p>XBridge Premier BEH C₁₈ (P/N: 186009848)</p>
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5.0 μL
流速：	1.0–1.5 mL/min
流动相：	<p>A: 1%甲酸水溶液</p> <p>B: 1%氢氧化铵水溶液</p> <p>C: 水</p> <p>D1: 乙腈</p> <p>D2: 甲醇</p>
梯度：	<p>斜率：10分钟内有机相从5%增加到90%、80%、70%、60%</p> <p>时间：10分钟、11分钟、12分钟和13分钟内有机相从5%增加到90%</p>
清洗溶剂：	<p>清除/样品清洗：50:50水/甲醇</p> <p>密封件清洗液：90:10水/乙腈</p>

检测器设置: PDA: 210-400 nm (提取260 nm下的谱图)

最终方法条件

检测: UV 260 nm

色谱柱: XSelect Premier CSH C₁₈, 4.6 x 150 mm, 2.5 μm
(P/N: 186009874)

柱温: 42 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 5.0 μL

流速: 1.1 mL/min

流动相A: 0.1%甲酸水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的甲醇溶液

梯度表

时间(min)	%A	%B	曲线
初始	95.0	5.0	6
1.00	95.0	5.0	6
15.00	10.0	90.0	6
16.00	10.0	90.0	6
16.10	95.0	5.0	6
21.00	95.0	5.0	6

质谱条件

质谱系统： ACQUITY QDa质谱检测器

电离模式： 正离子和负离子

采集范围： 50-250 Da

毛细管电压： 0.8 kV

锥孔电压： 2 V

数据管理

结果与讨论

方法开发

系统性筛选策略

我们通过系统性筛选策略开发出一种用于盐酸萘甲唑啉、马来酸非尼拉敏及其相关物质分析的UHPLC方法（图1）。该方案首先是定义分离标准和色谱系统，随后再开展实验研究。方法开发研究由快速探索、筛选和优化步骤组成。在研究过程中系统地评估pH、色谱柱填料和有机改性剂等主要的选择性因子，以获得理想的分离效果。根据特定标准评估每一步方法开发的结果。选择效果最好的方法并进一步优化，以满足预定义的性能可接受标准。

盐酸萘甲唑啉、马来酸非尼拉敏及其相关物质的分离标准包括：峰间的USP分离度 ≥ 1.5 、峰拖尾 ≤ 1.5 、保留因子(k^*) ≥ 2.0 。本研究选择了配置有色谱柱管理器和溶剂选择阀的Arc Premier系统，能够自动筛选色谱柱和有机改性剂。该系统还配备了ACQUITY QDa和PDA质谱检测器，能够快速鉴定样品成分并确认峰纯度。

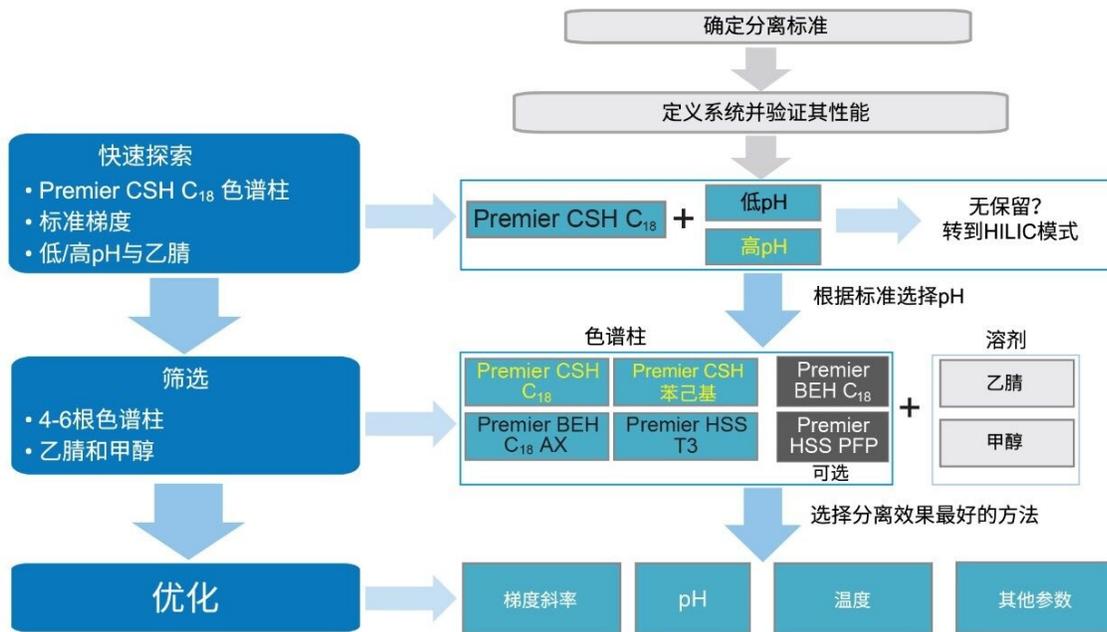


图1.方法开发的系统性筛选策略工作流程

快速探索

快速探索的目的是快速确定使分析物获得理想保留效果的分离条件。使用XSelect Premier CSH C₁₈色谱柱，以10分钟内5–90%乙腈的梯度对125 mM甲酸和125 mM氢氧化铵储备液进行低pH和高pH实验。使用ACQUITY QDa质谱检测器提供的质谱数据按质荷比(*m/z*)追踪分析物在低pH和高pH条件下的色谱保留情况（图2）。所得数据由Empower自动处理，通过ApexTrack积分检测峰。使用Empower 3软件中的MS峰追踪处理和报告功能监测pH实验中每种分析物的洗脱顺序。MS峰追踪报告显示了色谱分析中具有特定*m/z*值的各峰的保留时间（图2B）。在低pH和高pH条件下均观察到一个额外的峰(*m/z* 114.9)，研究发现它是一种马来酸盐，与游离碱非尼拉敏峰分离而来。有些分析物具有相同的质量数，例如萘甲唑啉API和萘甲唑啉杂质D(*m/z* 211.1)，以及非尼拉敏杂质A和杂质B(*m/z* 170.1)。ACQUITY QDa未检测到萘甲唑啉杂质C化合物，因此没有该化合物的质谱数据。

Empower自定义评分报告通过确定满足分离目标的峰总数来促进条件的选择（图3）。低pH条件使所有分析物都获得了理想的保留性和分离效果，因此被选择用于方法开发研究的筛选阶段。

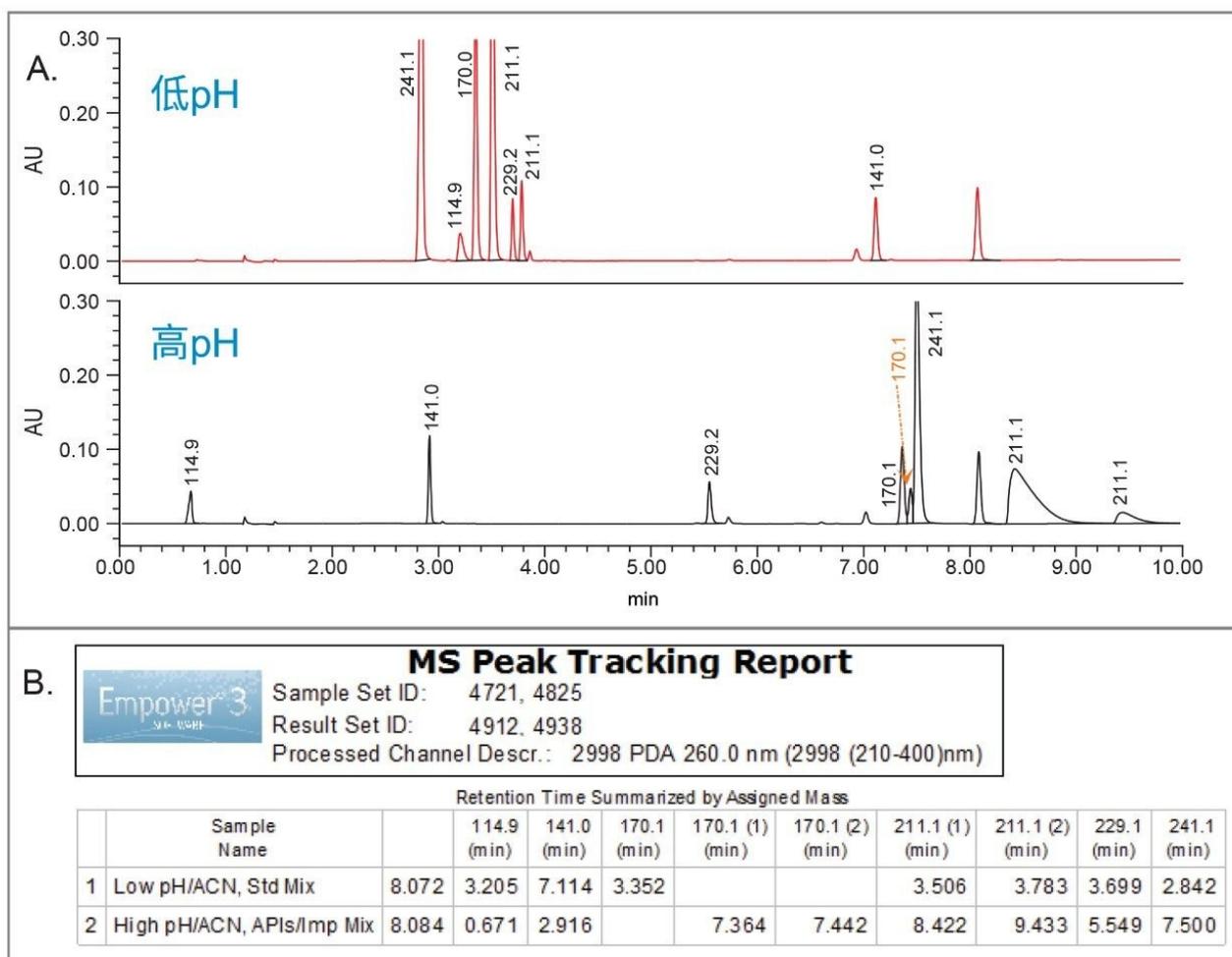


图2.快速探索低pH和高pH条件。色谱数据(A)和MS峰追踪报告(B)。

Empower 3 Waters	SCORING REPORT	
	Sample Set ID: 4961	
	Result Set ID: 5008	
Processed Channel Descr.: 2998 PDA 260.0 nm (2998 (210-400)nm)		

	Sample	Total Peaks	Total Peaks Rs ≥ 1.5	Total Peaks Tailing ≤ 1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	LowpH, ACN	8	7	7	1.39	2.045	8.07
2	High pH, ACN	9	6	4	-0.44	1.007	9.69

图3.快速探索的Empower 3评分报告。保留性好的条件排名更高。

筛选

在低pH以及乙腈和甲醇有机改性剂条件下筛选MaxPeak Premier色谱柱。选择不同的基质颗粒和固定相以提供广泛的选择性。色谱柱管理器配备了切换阀，可自动筛选色谱柱，无需用户干预。这一步执行分离的梯度与快速探索步骤中使用的梯度相同。整个研究所运行的色谱方法都是使用Empower样品组生成器(SSG)⁸创建的。

Empower SSG可自动创建仪器方法、方法组和样品组方法，同时更改色谱参数。评分报告表明，使用Premier CSH C₁₈和甲醇溶剂时分离效果最佳，得到的峰数量最多，分离度 ≥ 1.5 ，峰拖尾小于1.5（图4）。

Empower 3		SCORING REPORT	
		Sample Set ID:	2191, 2101
		Result Set ID:	3401, 3438
		Processed Channel Descr.:	2998 PDA 260.0 nm (2998 (210-400)nm)

	Sample	Total Peaks	Total Peaks Rs >=1.5	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Lowest Rs	Min k*	RT of Last Peak
1	NAPH/PHE Imp, CSH C18-MeOH	9	7	6	5	1.182	2.06	9.17
2	NAPH/PHE Imp, HSS T3-MeOH	9	6	5	3	0.701	0.73	9.60
3	NAPH/PHE Imp, HSS T3-ACN	9	5	5	3	0.783	0.44	8.69
4	NAPH/PHE Imp, CSH PH-MeOH	9	5	4	5	0.120	1.41	9.35
5	NAPH/PHE Imp, BEH AX-ACN	8	6	6	6	0.632	-0.02	8.57
6	NAPH/PHE Imp, CSH PH-ACN	8	6	6	5	1.070	0.58	8.01
7	NAPH/PHE Imp, BEH AX-MeOH	8	5	4	4	1.121	0.97	9.60
8	NAPH/PHE Imp, CSH C18-ACN	7	6	5	7	1.664	1.37	8.12

图4.筛选色谱柱和溶剂的Empower评分报告

优化

对使用Premier CSH C₁₈和甲醇的方法进一步优化，确保满足所有分离标准。优化步骤调整的色谱参数包括梯度时间、梯度斜率、pH、柱温、流速和柱长。增加柱长，而粒径2.5 μm保持不变，得到的结果满足所有峰之间分离度 ≥1.5的分离目标（图5）。优化后的方法使相关物质与高浓度非尼拉敏和萘甲唑啉活性成分之间实现了出色的分离。确保API峰与杂质之间实现分离至关重要，因为杂质测定方法为了检测微量杂质通常需要使用高浓度活性成分制备供试品。

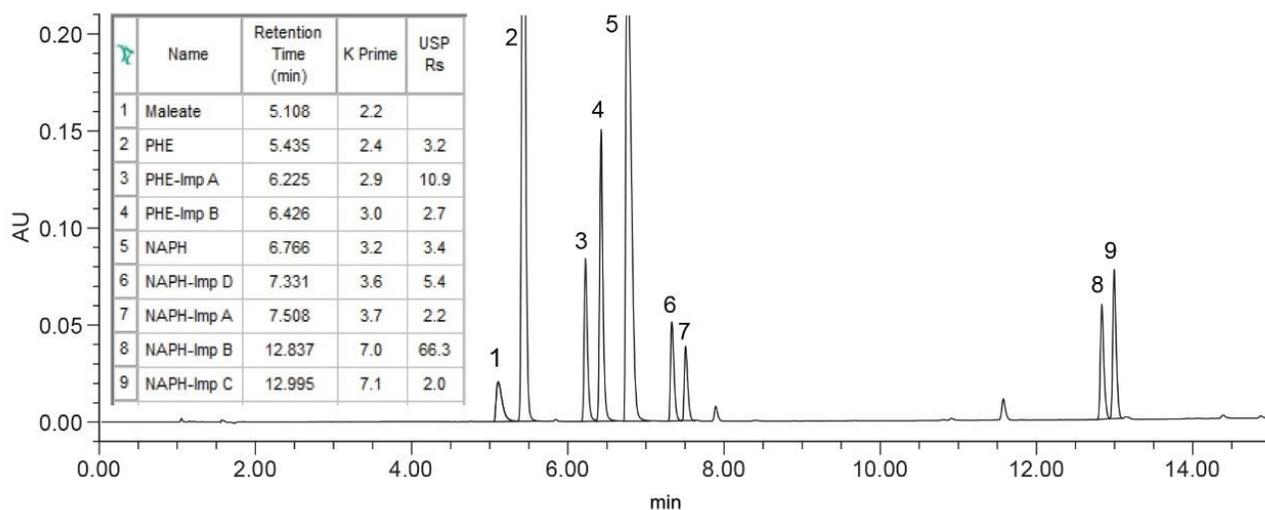


图5.使用4.6 x 150 mm, 2.5 μm色谱柱在42 °C下进行色谱分离。样品：盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏，浓度为0.5 mg/mL；相关物质，浓度为40 μg/mL。UV检测波长为260 nm。

系统适应性

六次重复进样的系统适应性结果显示保留时间和峰面积具有出色的重现性（图6）。峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)分别为≤0.58%和≤0.05%。

Empower 3		System Suitability	
Sample Set ID:	Sample Set Id 7184	Result Set ID:	Result Set Id 7812
Channel Name:	260 nm	Sample:	APIs/Imp 25ug/mL

	Name	# of Inj.	%RSD RT	%RSD Peak Areas	Ave USP Rs	Ave USP Tailing	Ave KPrime
1	Maleate	6	0.02	0.58		1.5	2.2
2	PHE	6	0.04	0.22	3.5	1.3	2.4
3	PHE-Imp A	6	0.04	0.07	11.3	1.5	2.8
4	PHE-Imp B	6	0.05	0.22	2.7	1.4	2.9
5	NAPH	6	0.04	0.16	5.0	1.4	3.2
6	NAPH-Imp D	6	0.04	0.32	6.5	1.5	3.5
7	NAPH-Imp A	6	0.04	0.19	2.3	1.5	3.6
8	NAPH-Imp B	6	0.05	0.16	65.5	1.4	6.7
9	NAPH-Imp C	6	0.05	0.19	1.9	1.3	6.7

图6. 每种分析物25 $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液6次重复进样的系统适应性。UV检测波长为260 nm。

滴眼液的分析

本研究分析了含有马来酸非尼拉敏和盐酸萘甲唑啉API的滴眼液，以证明所开发的方法可以将所有分析物与制剂赋形剂分离。这一步是为了证明方法专属性，通常通过验证色谱峰的光谱纯度来完成。

在本研究中，我们使用紫外和质谱数据来确认滴眼液制剂（含有500 $\mu\text{g/mL}$ 马来酸非尼拉敏和40 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸萘甲唑啉）中的分析物具有光谱同质性（图7）。Empower峰表显示每种分析物的纯度角小于阈值角，证实具有光谱同质性（图7A）。这一点也可以在萘甲唑啉杂质A的紫外纯度图中看出来（图7B）。此外，Empower 3“质谱分析”窗口的峰纯度谱图显示，整个峰（前沿、顶点和后沿）整个峰中存在一种质量数(m/z 229.1)，其对应于萘甲唑啉杂质A（图7C）。紫外峰纯度图和质谱数据均证实分析物具有光谱同质性，确保不会受到样品配方中任何赋形剂的干扰。

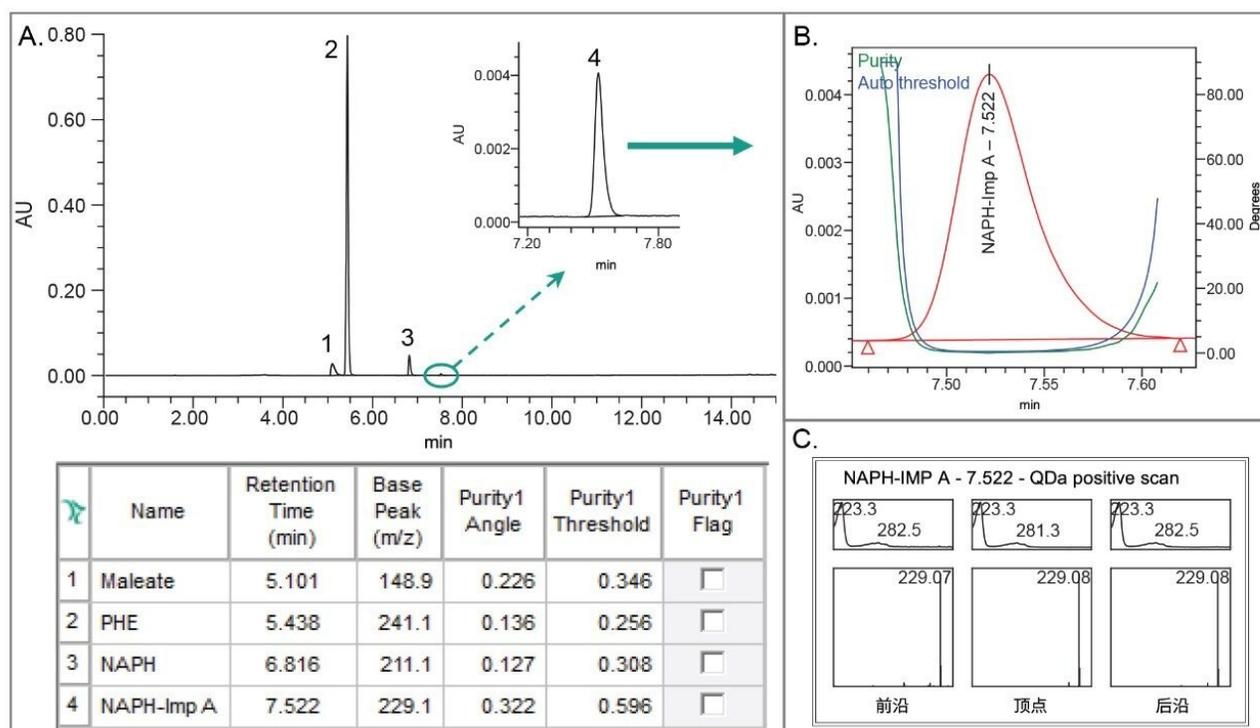


图7.滴眼液的分析。色谱分离与峰表数据(A)。萘甲唑啉杂质A的紫外峰纯度图(B)和显示峰纯度谱图的Empower 3“质谱分析”窗口(C)。

结论

本研究利用系统性筛选策略成功开发出一种能够同时测定盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏API及其相关物质的UHPLC方法。Arc Premier系统配备有色谱柱管理器和溶剂选择阀，可在一次色谱运行中自动筛选多种色谱柱和流动相。ACQUITY QDa质谱检测器与UV检测器相结合，能够快速鉴定样品组分、追踪洗脱顺序和确认光谱峰纯度。Empower软件支持自动峰检测、数据分析和报告出具。

利用预定义的系统性筛选策略和Empower CDS，可以更快、更有效地开发出稳定耐用的方法，可靠地生成可重现的准确结果，从而提高方法验证和跨实验室转移的成功率。

参考资料

1. Hong P, McConville P. 在液相色谱方法开发中实施系统性筛选策略的全面解决方案.沃特世白皮书, 720005268ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>> , 2018.
2. <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-2734/naphazoline-pheniramine-ophthalmic-eye/details> <<https://www.webmd.com/drugs/2/drug-2734/naphazoline-pheniramine-ophthalmic-eye/details>> .
3. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride and Pheniramine Maleate Ophthalmic Solution, USP40-NF35, The United States Pharmacopeia.
4. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride Ophthalmic Solution, USP40- NF35, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2017.3.
5. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride Nasal Solution, USP40-NF35, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2017.2.
6. European Pharmacopeia Monograph, Naphazoline Hydrochloride, European Pharmacopeia 10.0, released January 2009.or 01/2009:0730.
7. European Pharmacopeia Monograph, Pheniramine Maleate, European Pharmacopeia 10.0, released January 2009.or 01/2009:1357 .
8. Maziarz M, Rainville PD.使用Empower样品组生成器自动创建用ACQUITY™ QDa检测器进行分析的色谱方法 .沃特世应用简报, 720007775ZH, 2022.

特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007850ZH, 2023年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)