

应用纪要

# 在Alliance™ iS HPLC System上利用高效液相色谱法同时测定盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏及其相关化合物

Fadi L. Alkhateeb, Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

## 摘要

本研究开发出一种同时测定两种活性成分（盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏）及其相关化合物的液相色谱法。该方法使用XSelect™ CSH C<sub>18</sub>色谱柱，在40 °C的温度和2.0 mL min<sup>-1</sup>的流速下通过单次运行在20 min内使分析物实现完全分离。本研究还对系统适应性、范围、准确度（回收率）、日内和日间精密度进行了全面评估。此外还发现该方法在API浓度80%~120%的工作浓度范围内呈线性，相关系数(R<sup>2</sup>)大于0.997。在实际应用中，该方法成功用于市售滴眼液和滴鼻液的常规分析，未受到辅料的显著干扰。

## 优势

这种将XSelect CSH C<sub>18</sub>色谱柱与Alliance iS HPLC System结合使用的单一HPLC方法可以替代几种单独的方法，用于分析盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏活性药物成分(API)的含量和有机杂质。

---

## 简介

萘甲唑啉是一种活性药物化合物，可用作减充血剂和血管收缩剂，帮助缓解眼部发红和浮肿。而马来酸非尼拉敏是一种抗组胺药，通常用于缓解由普通感冒、流感、过敏或其他呼吸道疾病引起的暂时症状。这两种活性药物成分(API)通常结合在滴眼液中，以缓解过敏性结膜炎，包括枯草热<sup>[1,2]</sup>。为确保药物成分、剂量和纯度符合法规要求，出于质量保证(QA)和质量控制(QC)目的对此类药物的含量进行分析至关重要。

近年来，美国药典(USP)通过现代化修订来更新各论中过时的分析方法。这一举措旨在提供更新的公共标准并加强监管机构保护公众健康的工作。更新重点放在各论的主要章节，包括鉴定、含量测定和有机杂质分析。

现代化过程的一个关键要素是消除分析程序中的有害溶剂和试剂。目前，业界使用单独的色谱方法来分析药物制剂中的各种API。这种方法虽然有效，但是有机溶剂会产生大量危险废物。

为尽可能减少危险废物，一种解决方案是使用单一色谱方法来分析多种活性物质及其相关化合物。在本研究中，我们将三种USP色谱方法组合成一种LC方法来分析两种API（盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏）及其相关化合物。

这些分析物的名称和化学式详见表1。

化合物		化学式
马来酸非尼拉敏API 及相关化合物	马来酸非尼拉敏	$C_{20}H_{24}N_2O_4$
	2-苄基吡啶	$C_{12}H_{11}N$
	4-苄基吡啶	$C_{12}H_{11}N$
盐酸萘甲唑啉API 及相关化合物	盐酸萘甲唑啉	$C_{14}H_{15}ClN_2$
	1-萘乙酸	$C_{12}H_{10}O_2$
	相关化合物A	$C_{14}H_{16}N_2O$

表1. 本研究中使用的API和相关化合物的名称和分子式

## 实验

马来酸非尼拉敏及其相关化合物（2-苄基吡啶、4-苄基吡啶）由美国药典(USP)委员会(Rockville, MD, USA)友情提供。盐酸萘甲唑啉及其相关化合物（1-萘基乙酸、相关化合物A）也分别由USP提供。标准储备液用稀释剂（90:10流动相A/流动相B）制备，随后稀释以制备包含非尼拉敏/萘甲唑啉500/40  $\mu\text{g/mL}$ 和5  $\mu\text{g/mL}$ 相关物质的分离度测试混合物。所有溶液均盛装于PP容器中并储存在冷冻柜(-20 °C)中。包含0.025% (v/v)马来酸非尼拉敏和0.3% v/v盐酸萘甲唑啉的非处方滴眼液制剂购自当地药店。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	配备可变波长紫外检测器的Alliance iS HPLC System
检测:	TUV (双波长, 260 nm和280 nm)
色谱柱:	XSelect CSH $C_{18}$ 色谱柱, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm

	pH范围: 2~10
柱温:	40 °C
样品温度:	5 °C
进样体积:	8 µL
流速:	2.0 mL min <sup>-1</sup>
流动相A:	0.05% (v/v)三乙胺和0.05% (v/v)磷酸的水溶液 (pH未经调节)
流动相B:	0.05% (v/v)磷酸的乙腈溶液
梯度曲线:	5%有机相和95%水相初始保持6 min, 然后采用有机相在7 min内从5%增加至95%的线性梯度。

## 数据管理

色谱软件:	Empower™ 3色谱数据系统
-------	------------------

---

## 结果与讨论

为验证色谱系统的功能, 必须执行系统适应性测试(SST)。SST是一种验证色谱系统效率和重现性的标准程序, 旨在确保色谱系统适用于特定分析。为证明这一点, 利用该系统重复进样12次SST工作标样 (500/40 µg/mL马来酸非尼拉敏/盐酸萘甲唑啉), 结果如表2所示, 表明连续12次进样得到的萘甲唑啉和非尼拉敏的峰面积相对标准偏差(%RSD)小于0.1。非尼拉敏和萘甲唑啉峰的保留时间%RSD分别为0.02和0.14。这些结果表明, 所开发的方法和系统提供了出色的保留时间和峰面积重复性。

系统适用性试验汇总结果  
萘甲唑啉API

进样	RT	峰面积
1	8.502	139752
2	8.509	139833
3	8.504	139831
4	8.505	139713
5	8.505	140127
6	8.504	139939
7	8.505	139705
8	8.503	139993
9	8.505	140010
10	8.504	139981
11	8.504	139934
12	8.501	139780
平均值	8.504	139883
标准偏差	0.002	133.868
% RSD	0.02	0.10

系统适用性试验汇总结果  
非尼拉敏API

进样	RT	峰面积
1	4.543	2152529
2	4.557	2151601
3	4.547	2153481
4	4.547	2151214
5	4.552	2153755
6	4.541	2152935
7	4.550	2154672
8	4.543	2153289
9	4.552	2155339
10	4.540	2152494
11	4.535	2154027
12	4.544	2154806
平均值	4.546	2153345
标准偏差	0.006	1267.523
% RSD	0.14	0.06

表2.工作标准溶液重复进样12次的系统适应性评估结果

## API的线性

评估色谱方法的线性对于在较宽的浓度范围内准确可靠地定量分析物至关重要。通常通过检测不同浓度的相同分析物来建立校正曲线，以确定该分析物在未知样品中的浓度。本研究通过制备马来酸非尼拉敏/盐酸萘甲唑啉浓度范围为其目标浓度(500/40 µg/mL) 80%~120%的五份混合物来评估线性。然后将各溶液重复两次进样至色谱系统，并记录响应面积。通过对峰面积与浓度作图来建立得到的线性校正曲线，并计算回归方程，结果表现出强烈的线性相关性，相关系数( $R^2$ )大于0.997，如图1所示。

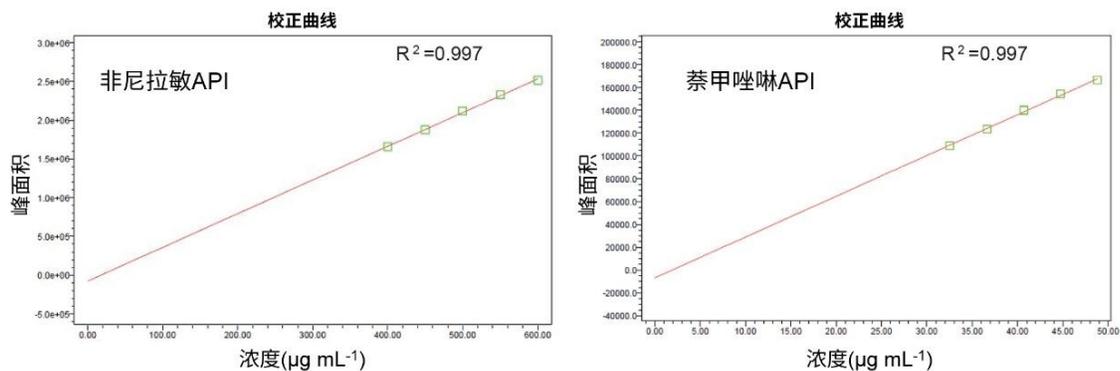


图1.非尼拉敏和萘甲唑啉API的线性。这些曲线通过进样分析浓度范围为目标浓度80%~120%的五份工作标样建立。

## 相关化合物

分析方法从API峰中分离相关化合物的能力对于确保药物安全性、有效性和稳定性至关重要。为评估所开发的方法分离活性成分与其相关化合物的能力，有趣的是使用包含盐酸萘甲唑啉/马来酸非尼拉敏及其相关化合物的标准分离度测试混合物运行该方法。获得的结果证明，该方法可有效分离混合物中的所有化合物，最低USP分离度为2.4，如图2和表3所示。

## 相关化合物

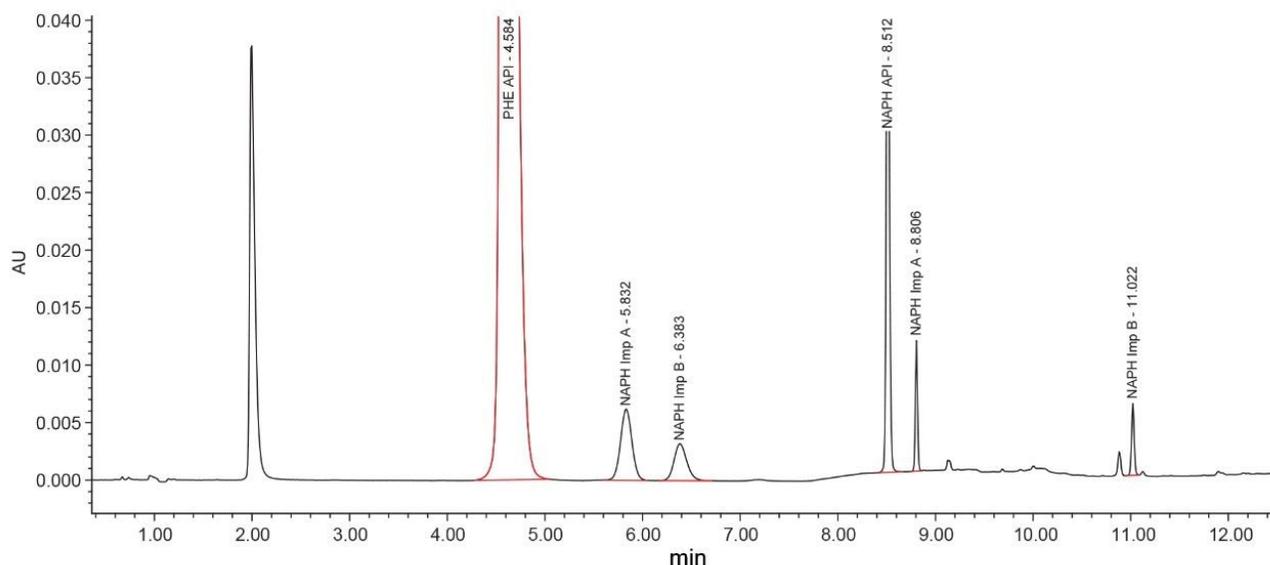


图2.工作样品中加入了5% API浓度水平的相关化合物。最终溶液包含：500  $\mu\text{g/mL}$ 非尼拉敏（25  $\mu\text{g/mL}$ 相关化合物Phe Imp A和Phe imp B）和40  $\mu\text{g/mL}$ 萘甲唑啉（2  $\mu\text{g/mL}$  Naph Imp A和Naph Imp B）。260 nm处的单波长紫外吸收。

	名称	保留时间	K'	USP分离度	USP分离度 (HH)
1	PHE API	4.584	3.6		
2	PHE Imp A	5.832	4.8	5.5	5.7
3	PHE Imp B	6.383	5.4	2.4	2.5
4	NAPH API	8.521	7.5	14.2	14.6
5	NAPH Imp A	8.806	7.8	5.4	6.0
6	NAPH Imp B	11.022	10.0	42.5	48.8

表3.分离度测试混合物中所有化合物峰的USP分离度值（图3）

## 日内和日间精密度

精密度是指当该程序重复应用于从同一均质样品中提取的多个样品时，各个结果之间的一致性水平。如前文系统适应性评估部分所述，通过对系统适应性混合物进行12次重复进样来评估该方法的日内精密度。对于日间精密度，在两天内分析相同的样品（第一天12次重复进样，第二天再进行5次重复进样）。结果显示，在17次重复进样中，非尼拉敏的峰面积和保留时间%RSD分别为0.15和0.58。萘甲唑啉也观察到类似的结果，峰面积和保留时间%RSD值分别为0.03和0.59。结果表明该方法对目标化合物的检测具有良好的精密度，%RSD低于0.6%，确认该方法具有足够高的精密度。12次和17次进样的叠加色谱图如图3所示。

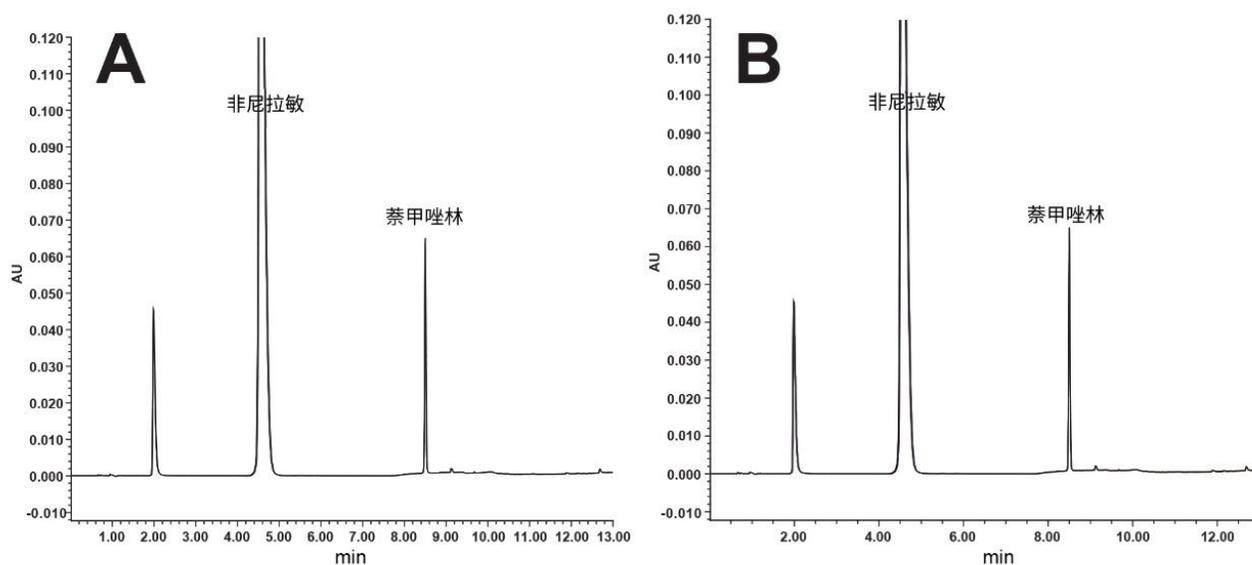


图3.系统适应性测试(SST)溶液的代表性分离结果：A表示在同一天对溶液进行12次重复进样，B表示在两天内对同一溶液进行17次重复进样。SST溶液包含500/40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马来酸非尼拉敏/盐酸萘甲唑啉。所用条件与实验部分所述的条件相同（280 nm处UV检测）

## 滴眼液和滴鼻液的分析

然后使用该方法分析市售滴眼液和滴鼻液样品。样品制备如下：将溶液用稀释剂（90:10流动相A/流动相B）稀释至工作浓度，配方1、2和3眼部过敏缓解溶液中马来酸苯尼拉敏和盐酸萘甲唑啉的浓度分别为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；配方4、5和6眼部发红清凉滴眼液中盐酸萘甲唑啉的浓度为40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明，所开发的方法成功满足USP各论的标准，两种API（非尼拉敏(PHE)和萘甲唑啉(NAP)）的含量回收率在90%~110%的范围内[3-5]。四种不同药物制剂的代表性分离结果如图4所示。

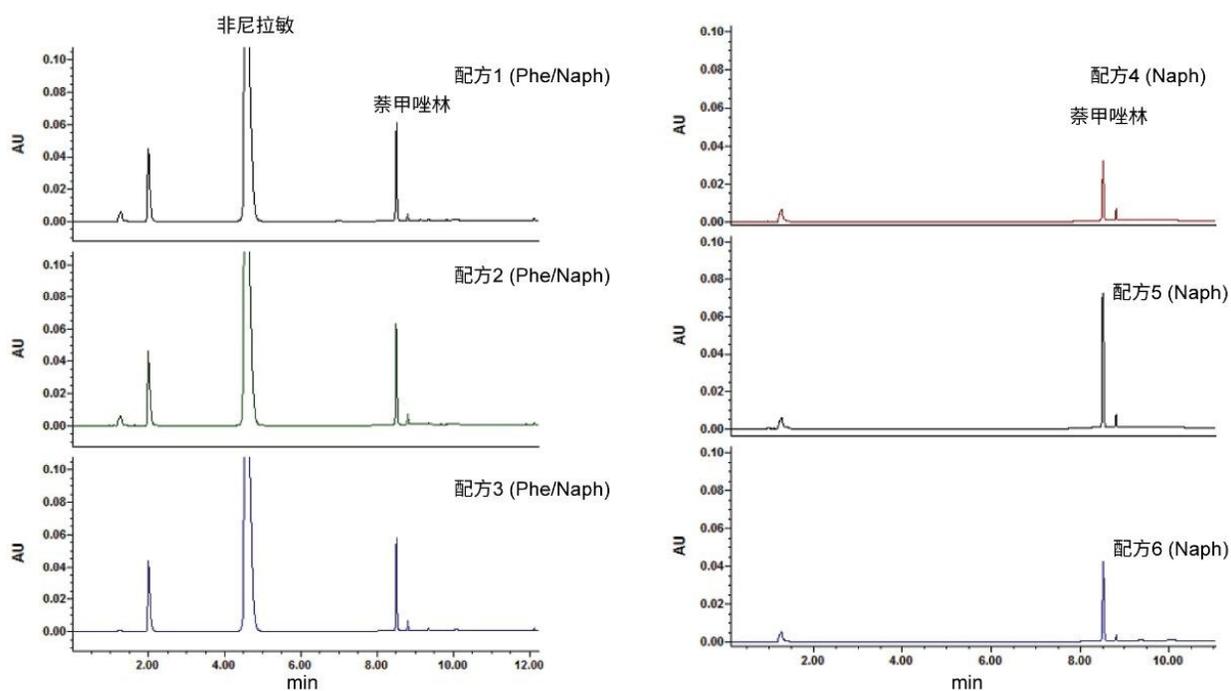


图4.包含非尼拉敏(PHE)和萘甲唑啉API（配方1、2和3）以及仅包含萘甲唑啉API（配方4、5和6）的市售滴鼻液的代表性分离结果

## 结论

- 本研究开发出一种专门用于分析活性成分及其相关化合物的单一液相色谱方法，该方法将有关盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏滴眼液和滴鼻液三个USP各论方法相结合。
- Alliance iS HPLC System能够在单一HPLC方法中快速可靠地分离多种API及其相关化合物。

## 参考资料

1. A. Uncini, G. De Nicola, A. Di Muzio, G. Rancitelli, L. Colangelo, D. Gambi, P.E. Gallenga, Topical

naphazoline in treatment of myopathic ptosis, *Acta Neurol Scand* 87(4) (1993) 322–4.

2. L. Quan, H. He, Treatment with olopatadine and naphazoline hydrochloride reduces allergic conjunctivitis in mice through alterations in inflammation, NGF and VEGF, *Mol Med Rep* 13(4) (2016) 3319–3325.
3. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride Nasal Solution, USP40-NF35, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2017.
4. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride Ophthalmic Solution, USP40-NF35, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2017.
5. USP Monograph, Naphazoline Hydrochloride and Pheniramine Maleate Ophthalmic Solution, USP40-NF35, The United States Pharmacopeia.

---

## 特色产品

[Alliance iS HPLC System](https://www.waters.com/nextgen/cn/zh/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html)

[Empower 色谱数据系统](https://www.waters.com/10190669)

720007876ZH, 2023年3月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

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

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