Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

应用ACQUITY QDa质谱检测器定量分析药片制剂中无发色团盐酸美金刚的优势

Margaret Maziarz, Mark Wrona和 Sean M. McCarthy
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 采用ACQUITY® QDa®检测器，可以很容易地直接分析无发色团化合物
- 凭借ACQUITY QDa检测器，可实现准确的组分鉴定
- 无需进行复杂耗时的衍生化步骤
- 与现有UPLC系统和方法完美兼容

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统
ACQUITY UPLC色谱柱
ACQUITY QDa检测器
Empower® 3 CDS软件
注射式过滤器

关键词

UPLC，QDa，无发色团化合物，盐酸美金刚，亚2 µm颗粒色谱柱，质谱，ApexTrack™积分

简介

无紫外发色团或紫外吸光系数低的化合物通常难以进行分析。由于这些化合物无法直接通过UV进行检测，因此必须依赖替代方法对其进行鉴定与测定。组分鉴别的正确性对于所有药品来说都十分重要，这个环节的失败可能使药品的安全性、功效或以上二者均大打折扣。

对于紫外吸收极低或无紫外吸收的组分，通常需要对样品进行柱前或柱后衍生，以便进行紫外检测。而对于无发色团的药物化合物盐酸美金刚，可在文献中查到若干种在制剂中对其进行定量测定的方法。药物制剂中盐酸美金刚的测定方法鲜有报道，包括凭借柱前衍生技术进行紫外检测的HPLC法[1,2]以及GC-FID法[3,4]。虽然这些方法高效而且灵敏，但都不是质量控制实验室进行常规检测的理想之选。这些方法都需要复杂繁琐的柱前衍生步骤或额外的仪器分析步骤(如气相色谱分析)。由于缺乏简便直观的检测方法，所以极易带入额外不确定的可变因素。这些方法通常还需要额外的方法开发时间、耐受性测试、用户培训及监控，用以提高分析的质量。而与此相比，质谱检测则能够快速、准确地测定无发色团化合物，且无需复杂的样品处理步骤。

在本应用纪要中，我们介绍了ACQUITY QDa模块的应用，将这一小巧稳定且简单易用的质谱检测器用于定量分析无发色团的盐酸美金刚(一种常用于治疗阿尔茨海默氏症引起的智力衰退的药物)。在此，我们将UPLC方法与ACQUITY QDa检测器联用，对药片制剂中的盐酸美金刚进行定量测定。我们将展示进行常规分析时质谱检测的系统适用性、方法线性和特异性。

总体而言，质谱检测可快速鉴定和分析无发色团化合物，并能提供准确可靠的结果。因此，质谱检测为UV技术提供了补充，适用于QC实验室中的常规检测。

实验

UPLC方法条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC CORTECS® C_{18}+，2.1 x 50 mm，1.6 µm
柱温:	45 °C
流速:	0.6 mL/min
进样体积:	1.0 µL
溶剂A:	125 mM甲酸的水溶液
溶剂B:	水
溶剂C:	乙腈
分离:	梯度

步骤	时间 (min)	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)	溶剂 C (%)	曲线
1	Initial	10.0	85.0	5.0	Initial
2	2.5	10.0	42.5	47.5	6
3	2.6	10.0	0.0	90.0	6
4	3.1	10.0	0.0	90.0	6
5	3.2	10.0	85.0	5.0	6
6	5.0	10.0	85.0	5.0	6

清除/样品清洗:	50:50水/甲醇
密封清洗液:	90:10水/乙腈
UV检测器:	ACQUITY UPLC PDA: 210 – 400 nm (在210 nm下检测)

MS方法条件

质谱检测器:	ACQUITY QDa (扩展性能泵)
电离模式:	ESI+
质谱采集范围:	100 – 300 Da
单离子记录:	180.2 Da
采样速率:	10点/秒
毛细管电压:	0.8 kV
锥孔电压:	15 V
探头温度:	600 °C
数据:	棒状图
系统控制、数据采集和分析:	Empower 3 FR2 CDS软件

溶液制备

标准溶液

盐酸美金刚储备液以甲醇制备，浓度为1.0 mg/mL。然后使用标准稀释液(10:90甲醇/水)将储备液稀释至0.005 mg/mL的工作浓度。使用标准稀释液(10:90甲醇/水)稀释工作标准溶液，制成线性标准品。将线性标准品制备为以下浓度：0.05、0.10、0.15、0.25、0.50、0.75和1.00 µg/mL。

药片制剂样品溶液

将含有10 mg盐酸美金刚的药片制剂溶于50:50 0.1 N HCl/乙醇中，*制成浓度为1.0 mg/mL的样品储备液。对溶液进行超声处理，并在3500 rpm下离心30分钟。最终溶液采用0.2 µm GHP膜注射式过滤器进行过滤，*并用样品稀释液(0.1 N HCl)稀释至0.75 µg/mL的工作浓度。

*本应用纪要中测试并使用的最终方法、其它溶出和过滤条件。

结果与讨论

盐酸美金刚为三环胺类，缺少紫外检测必需的发色团(图1)。因此不能通过UV直接进行检测。但是它易于电离，可在ACQUITY QDa检测器中产生稳定的质谱信号。图2显示了若干种检测器信号。不出所料，浓度为1 µg/mL的美金刚在210 nm处的紫外信号未显示出可识别的峰(图2a)。

盐酸美金刚
•$C_{12}H_{21}N$•HCl
•单一同位素质量数:
215.14 Da
179.17 Da free base

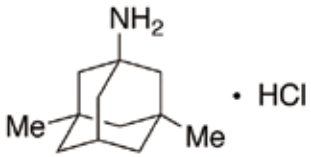

图1. 盐酸美金刚的化学信息与结构。

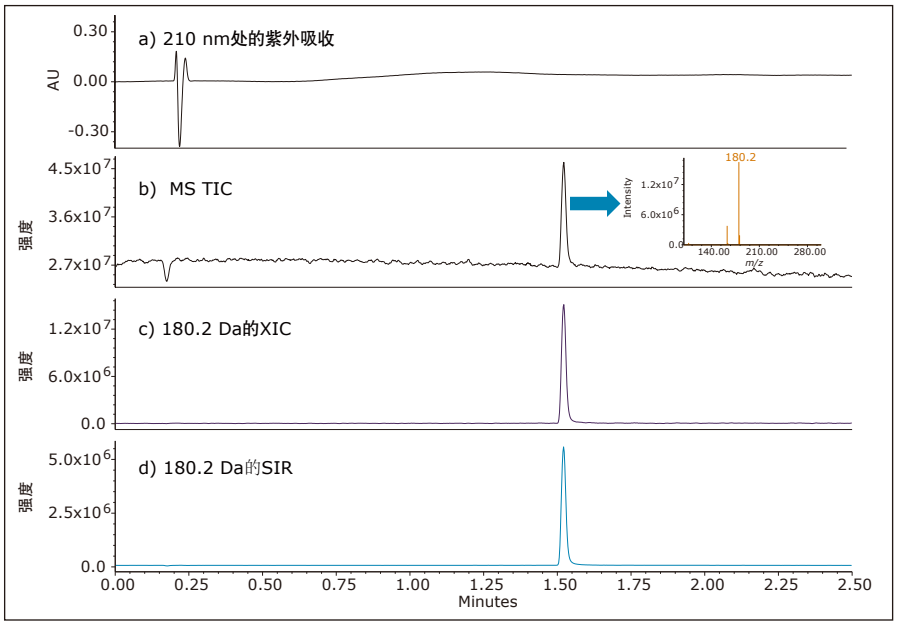

图2. 分别采用配备PDA和ACQUITY QDa检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统采集的盐酸美金刚的UV和MS谱图数据。

系统适应性

根据USP通用章节<621>“色谱”[5]中定义的规范，考察重复五次进样1 μg/mL标准品的重现性(图3)，以此验证UPLC方法的性能。通过处理180.2 Da的SIR数据可获得UPLC的系统适应性结果，如图4所示。保留时间和峰面积的重复性均很好地保持在USP规定的2% RSD以内。

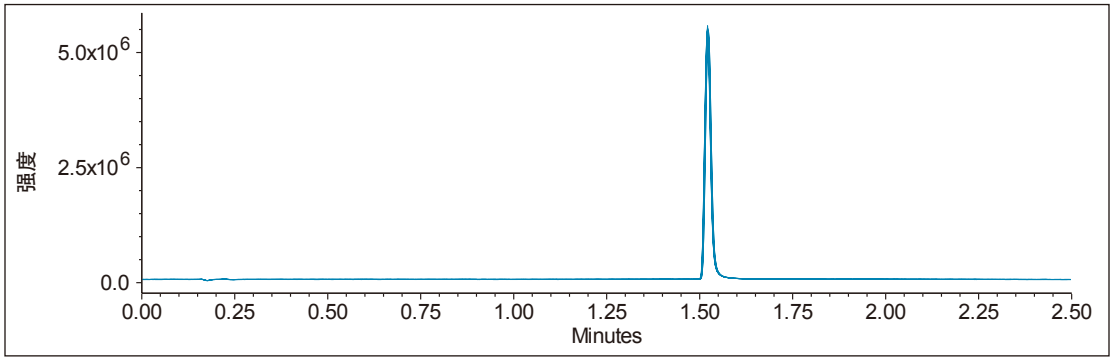

图3. 盐酸美金刚标准品五次重复进样的叠加谱图(采用180.2 Da的SIR数据)。

System Suitability_Report

Sample Set ID: 12773
Result Set ID: 14455
Channel Name: QDa 3: SIR Ch1

Name: Memantine

	Name	SampleName	Inj	RT	Area	USP Tailing	K Prime
1	Memantine	Memantine SS: 1ug/mL	1	1.523	6071507	1.2	5.1
2	Memantine	Memantine SS: 1ug/mL	2	1.522	6076992	1.2	5.1
3	Memantine	Memantine SS: 1ug/mL	3	1.521	6107702	1.2	5.1
4	Memantine	Memantine SS: 1ug/mL	4	1.521	6139821	1.2	5.1
5	Memantine	Memantine SS: 1ug/mL	5	1.521	6157180	1.2	5.1
Mean				1.522	6110640	1.2	5.1
Std. Dev.				0.001	37714.946		
% RSD				0.06	0.62		

图4.标准溶液五次重复进样所得的系统适应性结果(采用180.2 Da的SIR数据)。

线性

采用0.05 μg/mL至1.0 μg/mL之间的七个浓度评估盐酸美金刚质谱检测方法的线性。
使用本方法时盐酸美金刚峰面积与浓度之间的线性相关性良好，相关系数(R^2)≥0.998(图5)。
此外，计算出的x值或浓度的偏差小于7.0%(图6)。

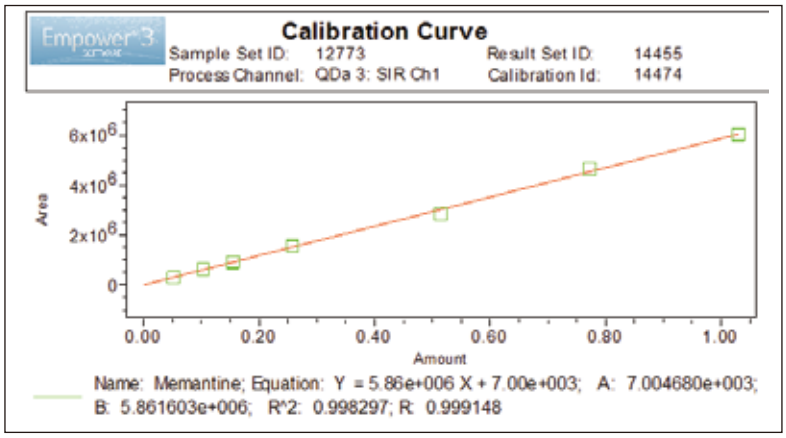

图5. 盐酸美金刚检测方法的线性。使用180.2 Da的SIR数据进行数据处理。

Empower 3

Calibration Curve %Deviation

Sample Set ID: 12773 Result Set ID: 14455
Channel Name: QDa 3: SIR Ch1

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.05150

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	1	1	305873	0.05150	0.05099	-0.995
2	Memantine	1	2	309364	0.05150	0.05158	0.161
3	Memantine	1	3	305437	0.05150	0.05091	-1.139

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.10300

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	2	1	635819	0.10300	0.10728	4.152
2	Memantine	2	2	625800	0.10300	0.10557	2.493
3	Memantine	2	3	639816	0.10300	0.10796	4.814

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.15450

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	3	1	920154	0.15450	0.15578	0.832
2	Memantine	3	2	917046	0.15450	0.15525	0.488
3	Memantine	3	3	911865	0.15450	0.15437	-0.084

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.25750

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	4	1	1561034	0.25750	0.26512	2.959
2	Memantine	4	2	1566506	0.25750	0.26605	3.322
3	Memantine	4	3	1579787	0.25750	0.26832	4.202

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.51500

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	5	1	2837467	0.51500	0.48288	-6.237
2	Memantine	5	2	2843904	0.51500	0.48398	-6.023
3	Memantine	5	3	2856054	0.51500	0.48605	-5.621

Peak MemantineX Value (ug/mL): 0.77250

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	6	1	4662628	0.77250	0.79426	2.817
2	Memantine	6	2	4642911	0.77250	0.79089	2.381
3	Memantine	6	3	4640096	0.77250	0.79041	2.319

Peak MemantineX Value (ug/mL): 1.03000

	Name	Level	Injection	Response	X Value (ug/mL)	Calc. Value (ug/mL)	% Deviation
1	Memantine	7	1	6015896	1.03000	1.02513	-0.473
2	Memantine	7	2	6042378	1.03000	1.02965	-0.034
3	Memantine	7	3	6041853	1.03000	1.02956	-0.043

图6. 使用180.2 Da的SIR数据进行数据处理得出的校准曲线。测量结果的偏差百分比小于7.0%。

样品分析

接下来将UPLC/MS方法用于分析市售盐酸美金刚药片制剂，以证明该方法用于常规分析的特异性。为开发出用于药片制剂的样品制备步骤，我们考虑了多种稀释剂与过滤器，目的是为了达到USP专论中定义的盐酸美金刚药片制剂回收率的可接受标准[4]。根据该专论中的规定，“盐酸美金刚片中包含的盐酸美金刚应相当于不低于(NLT)盐酸美金刚($C_{12}H_{21}N$ • HCl)标示量的90.0%且不超过(NMT)标示量的110.0%。”

研究过程中所测定的样品稀释剂如表1所示。分别使用列出的所有稀释剂溶解片剂制备成样品溶液，然后对储备液进行超声和离心。在稀释至工作浓度之前使用0.2 µm GHP注射式过滤器对储备液进行过滤。数据显示，使用含50:50 0.1 N HCl/乙醇稀释剂制备出的样品得到的盐酸美金刚回收率最高，为99.9%。

片剂制备组	储备液稀释剂	工作溶液稀释剂	回收率%
1	H_2O	90:10 H_2O/甲醇	67.0
2	0.01 M H_3PO_4	0.01 M H_3PO_4	89.4
3	0.05 M H_3PO_4	0.05 M H_3PO_4	91.9
4	0.1 M H_3PO_4	0.1 M H_3PO_4	91.9
5	0.1 N HCl	0.1 N HCl	90.1
6	50:50 0.05 M H_3PO_4/乙醇	0.05 M H_3PO_4	93.7
7	50:50 0.1 N HCl/乙醇	0.1 N HCl	99.9

表1. 为开发盐酸美金刚药片制剂分析的样品制备步骤进行的稀释剂研究。

除稀释剂外，还评估了不同类型过滤器对回收率的影响。样品溶液中存在的微粒或不溶性物质可能会对色谱分析产生干扰，或表现出较差的回收率。通过样品过滤步骤清除微粒则通常能够改善回收率。将使用三种不同滤膜的所得回收率与不使用滤膜的回收率(对照)进行比较，得出了研究结果(表2)。使用三种0.2 µm的注射式过滤器过滤由50:50 0.1 N HCl/乙醇制备的样品储备液。如表2所示，使用GHP膜注射器进行过滤可最有效地回收药片制剂中的盐酸美金刚。未过滤样品溶液的化合物回收率显著低于经GHP过滤器过滤的溶液的回收率。这些结果表明，过滤步骤和谨慎选择过滤器类型对于最大程度提高回收率是必不可少的。

注射式过滤器	沃特世部件号	储备液稀释剂	工作溶液稀释剂	回收率%
未过滤	N/A	50:50 0.1N HCl/乙醇	0.1N HCl	94.5
GHP	WAT200562	50:50 0.1N HCl/乙醇	0.1N HCl	99.8
尼龙	WAT097962	50:50 0.1N HCl/乙醇	0.1N HCl	93.3
PVDF	WAT200804	50:50 0.1N HCl/乙醇	0.1N HCl	98.1

表2. 为开发盐酸美金刚药片制剂的样品制备步骤进行的注射式过滤器研究。

分析样品时，分别检测了三个单独的片剂制备样品以进行盐酸美金刚分析。图7展示了使用ACQUITY QDa检测器所得的样品稀释剂和片剂样品溶液的色谱数据的一个示例(采用180.2 Da的SIR数据)。三个制备样品中盐酸美金刚的平均回收率百分比介于96.0至100.1%之间(图8)，能够达到USP专论中定义的盐酸美金刚药片制剂回收率90.0–100.0%的可接受标准。

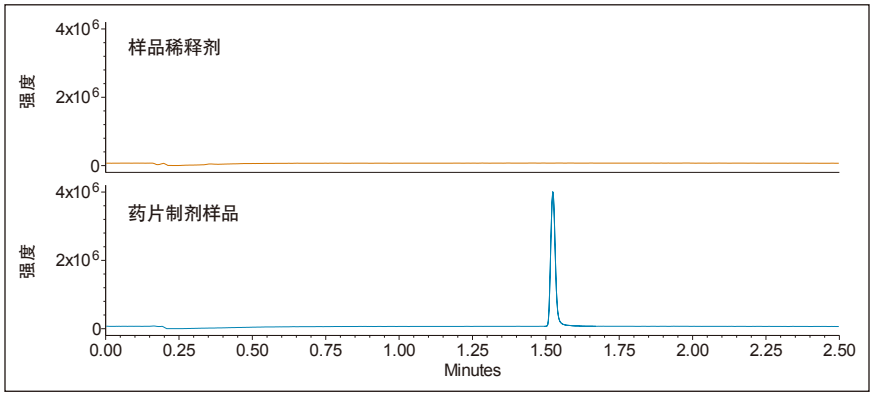

图7. 药片制剂样品溶液的盐酸美金刚分析结果(采用180.2 Da的SIR数据)。

Sample %Recovery Report

Sample Set ID: 12660
Result Set ID: 14518
Channel Name: QDa 3: SIR Ch1

Sample Name: Memantine Tablet Prep 1

	SampleName	Inj	Cal Id	Calculated Amount (ug/mL)	Target Amount (ug/mL)	% Rec	Pass?
1	Memantine Tablet Prep 1	1	14474	0.7178	0.7500	95.70	Pass
2	Memantine Tablet Prep 1	2	14474	0.7231	0.7500	96.41	Pass
3	Memantine Tablet Prep 1	3	14474	0.7200	0.7500	96.00	Pass
Mean						96.0	
Std. Dev.						0.4	
% RSD						0.37	

Sample Name: Memantine Tablet Prep 2

	SampleName	Inj	Cal Id	Calculated Amount (ug/mL)	Target Amount (ug/mL)	% Rec	Pass?
1	Memantine Tablet Prep 2	1	14474	0.7533	0.7500	100.44	Pass
2	Memantine Tablet Prep 2	2	14474	0.7470	0.7500	99.60	Pass
3	Memantine Tablet Prep 2	3	14474	0.7514	0.7500	100.19	Pass
Mean						100.1	
Std. Dev.						0.4	
% RSD						0.43	

Sample Name: Memantine Tablet Prep 3

	SampleName	Inj	Cal Id	Calculated Amount (ug/mL)	Target Amount (ug/mL)	% Rec	Pass?
1	Memantine Tablet Prep 3	1	14474	0.7334	0.7500	97.79	Pass
2	Memantine Tablet Prep 3	2	14474	0.7348	0.7500	97.98	Pass
3	Memantine Tablet Prep 3	3	14474	0.7275	0.7500	97.00	Pass
Mean						97.6	
Std. Dev.						0.5	
% RSD						0.53	

图8. 药片制剂样品中盐酸美金刚的回收率百分比(采用180.2 Da的SIR数据)。USP专论中指定的盐酸美金刚药片制剂回收率%可接受标准为90.0–100.0%。

结论

采用ACQUITY QDa检测器进行的质谱检测能够实现无发色团盐酸美金刚的检测和定量测定。由质谱数据计算得出的系统适应性和方法线性良好。针对药片制剂的分析，开发出了用于盐酸美金刚定量测定的非衍生化样品制备步骤，无需在分析之前执行复杂繁琐的柱前衍生方案。SIR的使用实现了对目标质量数的选择，减少了制剂样品分析过程中的干扰。

总体上来说，ACQUITY QDa质谱检测器是一种稳定、易用、正交于UV检测器的检测技术。它可以提供准确可靠的结果，使此项技术成为QC实验室中常规检测的理想之选。

参考文献

1. Narola B., Singh A.S., Santhakumar P.R., Chandrashekhar T.G., A Validated Stability-Indicating Reverse Phase HPLC Assay Method for the Determination of Memantine Hydrochloride Drug Substance with UV-Detection Using Precolumn Derivatization Technique, *Analytical Chemistry Insights*, 2010:5, 37–45.
2. Jalalizadeh H., Raei M., Tafti R.F., Farsam H., Kebriaeezadeh A., Souri E., A Stability-Indication HPLC Method for the Determination of Memantine Hydrochloride in Dosage Forms through Derivatization with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene, *Scientia Pharmaceutica*, 2014:82, 265–279.
3. Jadhav S.A., Landge S.B., Niphade N.C., Development and Validation of Stability-Indicating GC-FID Method for the Quantitation of Memantine HCl and Its Non-Chromophoric Impurities in Bulk and Pharmaceutical Dosages, *Chromatography Research International*, 2012, 10.
4. USP Monograph, Memantine Hydrochloride Tablets, USP37-NF32, The United States Pharmacopeia Convention, official May 1, 2014.
5. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2013.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、UPLC、ACQUITY UPLC、QDa、CORTECS和Empower是沃特世公司的注册商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司。印制于中国 2014年9月 720005179ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com