

基于 AQbD 理念的 Labsolutions MD 软件 用于磺胺类化合物的 HPLC 分析方法开发

LC-341

摘要：本实验采用岛津 HPLC 方法开发系统，以磺胺类药物的方法开发为例，详细探讨了 Labsolutions MD 软件的功能与特点。Labsolutions MD 软件是基于 AQbD 理念的方法开发软件，支持方法开发的整个流程。该软件可根据实验设计 (DoE) 分析样品，并利用分析结果构建设计空间，开发出稳健可靠的综合分析方法，界面直观可视，即使缺乏经验的分析人员也同样能够轻松驾驭，是高效进行分析方法开发的利器。

关键词：Labsolutions MD 磺胺类化合物 方法开发

AQbD 为 Analytical Quality by Design 的缩写，意为“分析质量源于设计”，通过设计而非验证来开发稳健的分析方法，近年来为国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 所提倡，旨在系统性地评估 / 验证分析方法。

Labsolutions MD 软件基于 AQbD 理念，致力于帮助分析工作者“轻松高效”“科学系统”的实现稳健的分析方法开发。相关的工作流程都可以使

用 Labsolutions MD 完成，包括根据实验设计分析样品，利用分析结果构建设计空间，以及在确定最佳分析条件后评估其稳健性。使用 Labsolutions MD 开发软件，即使缺乏经验的分析人员也同样能够得到稳健的分析方法。

本文利用岛津 HPLC 方法开发系统结合 Labsolutions MD 建立了磺胺类化合物更高效、更可靠的方法开发。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津高效液相色谱仪，具体配置为：

输液泵：LC-30AD x 2 (含 LPGE)

柱温箱：CTO-20AC

自动进样器：SIL-30ACMP

系统控制器：CBM-20A

检测器：SPD-M30A

软件：Labsolutions Ver.5.114

Labsolutions MD Ver.1.01



图 1 Labsolutions MD 软件的特点图

1.2 样品信息

表 1 样品信息

No.	化合物名称	Name	CAS 号
1	磺胺噻唑	Sulfathiazole	72-14-0
2	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	127-79-7
3	磺胺二甲唑	Sulfamoxol	729-99-7
4	磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxy pyridazine	80-35-3
5	磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	723-46-6
6	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	1220-83-3
7	磺胺邻二甲氧嘧啶	Sulfadoxine	2447-57-6
8	磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	526-08-9
9	磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	651-06-9

分别称取表 1 中对照品适量，精密称定，加入适量溶剂溶解，分别制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，作为标准品储备液。分别取各对照品储备液适量，加入乙腈稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准品溶液，即得。

1.3 Labsolutions MD 软件分析方法开发流程

如图 2 所示，借助 Labsolutions MD 软件对磺胺类化合物进行了方法开发。实验通过 DoE 筛选流动相、色谱柱等色谱条件，优化梯度，创建设计空间，确认最佳分析条件，并进行了耐用性分析，获得高效、稳定的分析方法。

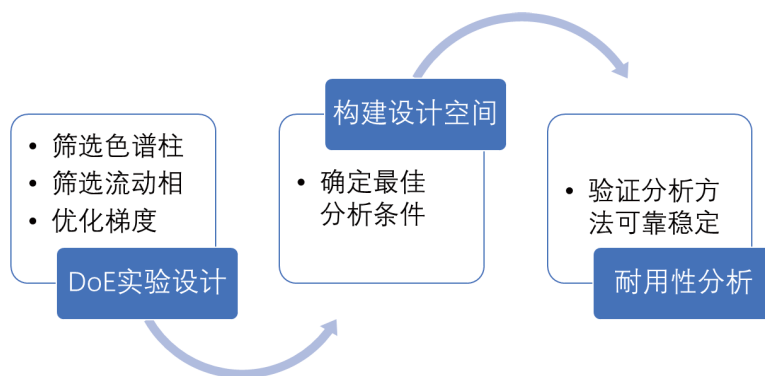


图 2 Labsolutions MD 软件分析方法开发流程

■ 结果与讨论

2.1 筛选阶段

2.1.1 筛选阶段实验设计

由于流动相、色谱柱对色谱峰的分离起到关键性作用，因此在筛选阶段采用全因子实验对流动相 (2 \times 3 种)、色谱柱 (3 根) 进行了实验设计，如表 2 所示。

表 1 样品信息

流动相:			
A 相:	A1—H ₂ O	A2—0.1% 甲酸水溶液	
B 相:	B1—MeOH	B2—ACN	*B3—ACN:MeOH=1:1
色谱柱:			
1	Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm \times 2.1 mm I.D., 1.9 μm) , P/N: 227-31012-05		
2	Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm \times 2.1 mm I.D., 1.9 μm) , P/N: 227-32001-03		

3 Shim-pack GIST C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2μm) , P/N: 227-30001-04

分析条件:

流速: 0.4 mL/min
 柱温: 40°C
 进样量: 1 μL
 洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序如下,
 B conc 5% (0 min) ~ 95% (5-7 min) ~ 5% (7.01-13 min)

*B3 通过流动相混合功能 (ASB) 自动获得。

2.1.2 筛选阶段的综合评估

在筛选阶段采用全因子设计总共筛选 5 种流动相和 3 种色谱柱, 因此需对其进行评估, 来确定哪种分离条件的色谱图是最佳的。Labsolutions MD 软件可以自动计算出评估值*, 从而快速轻松地找到最佳色谱分离条件。

分离状态的综合评估值* = 检测到的峰数 P × [分离度 (Rsn) 的和]

图 3 为各色谱峰按照从最高到最低的顺序排列的综合评估值, 评估值越高, 在一定程度上色谱分离状态越好。分析结果显示, 当使用 Shim-pack Velox SP-C18 色谱柱, 以水 - 甲醇为流动相, 评估值最高, 分离效果最好, 具体实验参数如表 3 所示。

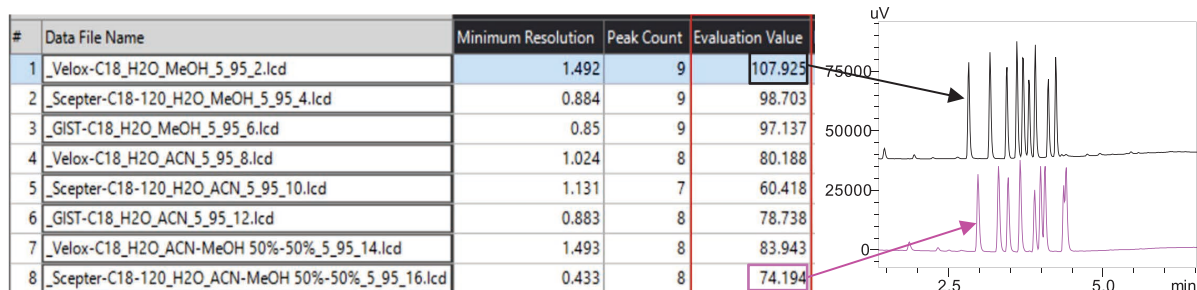


图 3 筛选阶段流动相、色谱柱的综合评估值

表 3 筛选阶段最佳分析条件

流动相:

A 相: A1—H2O
 B 相: B1—ACN

色谱柱:

2 Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9μm) , P/N: 227-32001-03

分析条件:

流速: 0.4 mL/min
 柱温: 40°C
 进样量: 1 μL
 洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序如下,
 B conc 5% (0 min) ~ 95% (5-7 min) ~ 5% (7.01-13 min)

2.2 优化阶段

在筛选阶段选择最佳流动相和色谱柱种类后, 考虑到流动相组成及柱温对色谱峰的分离影响比较大, 因此在优化阶段的实验设计中采用 Box-Behnken 模型以更少的实验次数探索流动相起始浓度 (5%、15%、25%)、

终止浓度（70%、85%、100%）和柱温（30℃、40℃、50℃）的最佳组合，有效提升了实验效率。

图 4 为最小分离度的设计空间，可以同时研究流动相浓度和柱温关键参数对分离度的影响。热力图可将参数的有效区域可视化，其中橙红色代表分离度好的区域，蓝绿色代表分离度差的区域。根据设计空间，Labsolutions MD 可模拟出不同分析条件下的色谱图，并可预测出最佳的分析条件（图 4 中蓝色方框处），具体参数详见表 4，色谱图如图 5 所示。

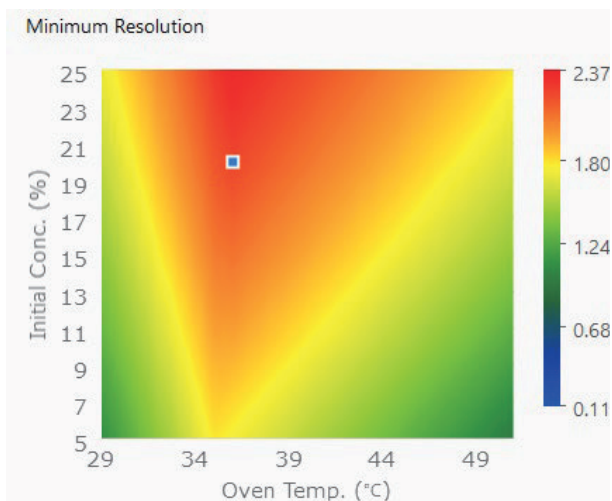


图 4 最小分离度的设计空间

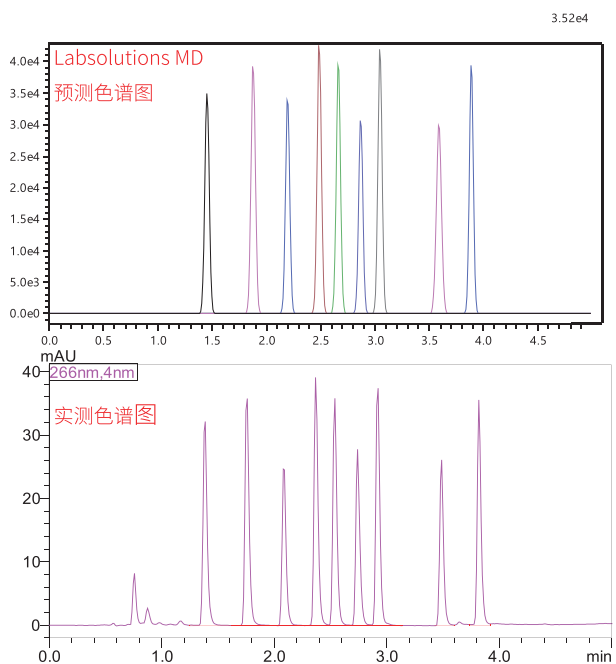


图 5 最佳分析条件的色谱图

表 3 筛选阶段最佳分析条件

流动相:

A 相: A1—H₂O
B 相: B1—ACN

色谱柱:

2 Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm), P/N: 227-32001-03

分析条件:

流速: 0.4 mL/min

柱温: 36°C

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 时间程序如下,
B conc 20% (0 min) ~ 70% (5-7 min) ~ 20% (7.01-13 min)

2.3 耐用性分析

分析方法的耐用性是指在分析方法发生细小改变时, 检测结果不受影响的能力, 用于说明分析方法正常使用时的可靠性。耐用性评估对参数的变化将如何影响结果和确保方法的可靠性非常重要。

Labsolutions MD 可通过设计空间创建实验设计自动执行耐用性评估, 确保分析方法的可靠性。在软件中输入分析条件波动的允许范围, 在该波动下能够提出满足指定分离效果的稳定分析条件, 从而进行耐用性评估。在本例中, 流动相起始终止比例波动 5%, 柱温波动 1°C (图 6 中黑色方框), 从而验证对分离的影响。图 7 为耐用性评估的色谱图, 各峰分离良好, 具体结果详见表 5。说明该参数变化对分离的影响非常小, 方法的耐用性好。

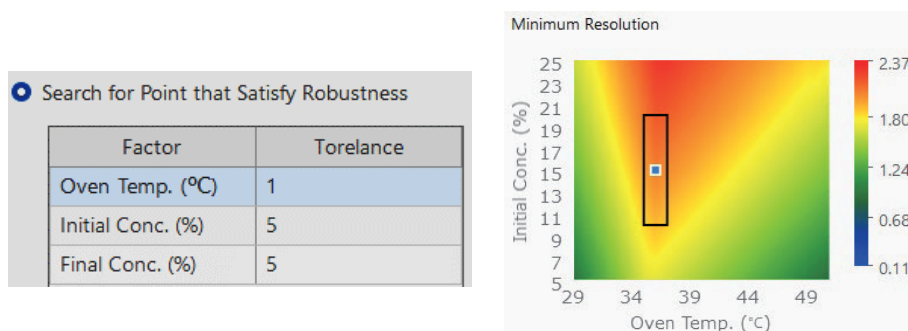


图 6 耐用性允差范围

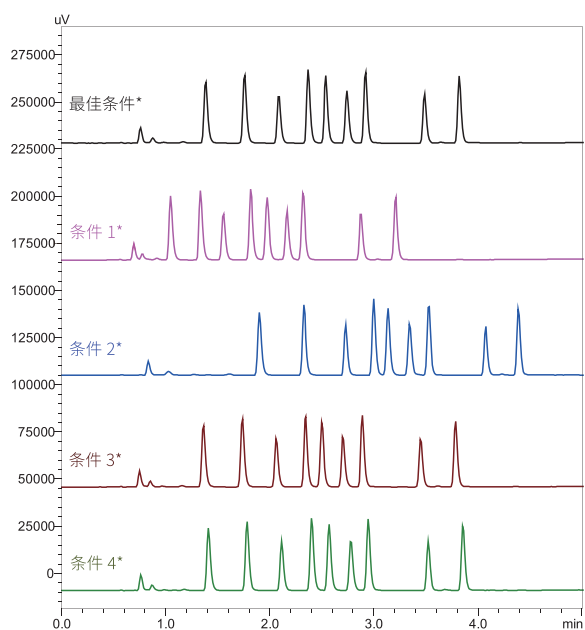


图 7 耐用性评估色谱图

表 5 耐用性分析各峰分离度结果

No.	化合物名称	最佳条件 *	条件 1*	条件 2*	条件 3*	条件 4*
1	磺胺噻唑	-	-	-	-	-
2	磺胺甲基嘧啶	5.114	3.960	5.543	5.060	5.001
3	磺胺二甲唑	4.454	2.950	5.506	4.465	4.584
4	磺胺甲氧哒嗪	3.819	3.535	3.789	3.754	3.924
5	磺胺甲恶唑	2.287	2.000	1.879	2.046	2.250
6	磺胺间甲氧嘧啶	2.719	2.349	2.743	2.633	2.794
7	磺胺邻二甲氧嘧啶	2.404	1.959	2.533	2.543	2.233
8	磺胺苯吡唑	7.928	7.300	7.842	7.819	7.915
9	磺胺对甲氧嘧啶	4.643	4.437	4.389	4.488	4.582

注：* 最佳条件：起始浓度 20%；终止浓度 70%；柱温 36°C

* 条件 1：起始浓度 25%；终止浓度 75%；柱温 36°C

* 条件 2：起始浓度 15%；终止浓度 65%；柱温 36°C

* 条件 3：起始浓度 20%；终止浓度 70%；柱温 37°C

* 条件 4：起始浓度 20%；终止浓度 70%；柱温 35°C

■ 结论

本文以开发多种磺胺类化合物的分析方法为例，详细探讨了基于 AQbD 理念 Labsolutions MD 软件的主要功能和特点。Labsolutions MD 软件基于科学方法的工作流程，能够开发研究出不依赖经验的综合分析方法，为分析方法开发的工作流程提供支持，确保方法稳定、数据可靠。

岛津应用云

