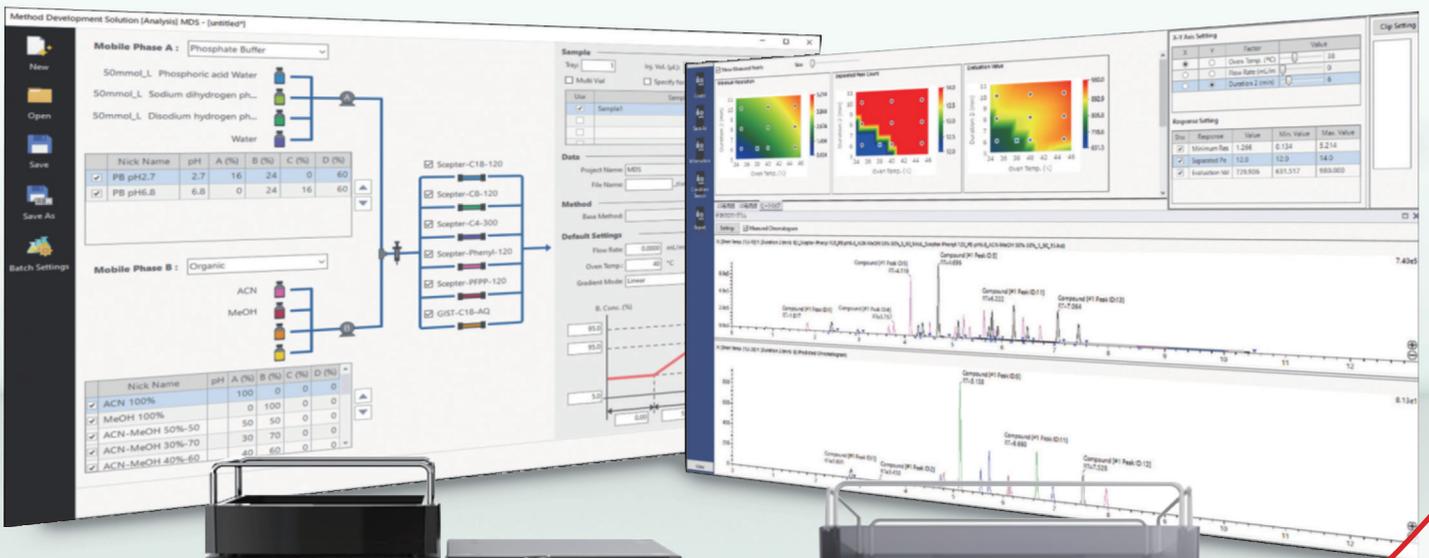


分析质量源于设计 (AQbD) 在HPLC方法开发中的实践案例集



AQbD

通过实验设计提高分析条件筛选的效率

使用实验过程设计收集数据，可以在更少的尝试中有效地筛选分析条件

筛选阶段

优化阶段

构建设计空间将分析方法的稳健性可视化

该软件可以绘制因素 - 响应关系图，并建议高稳健的分析条件。并且支持色谱图模拟。

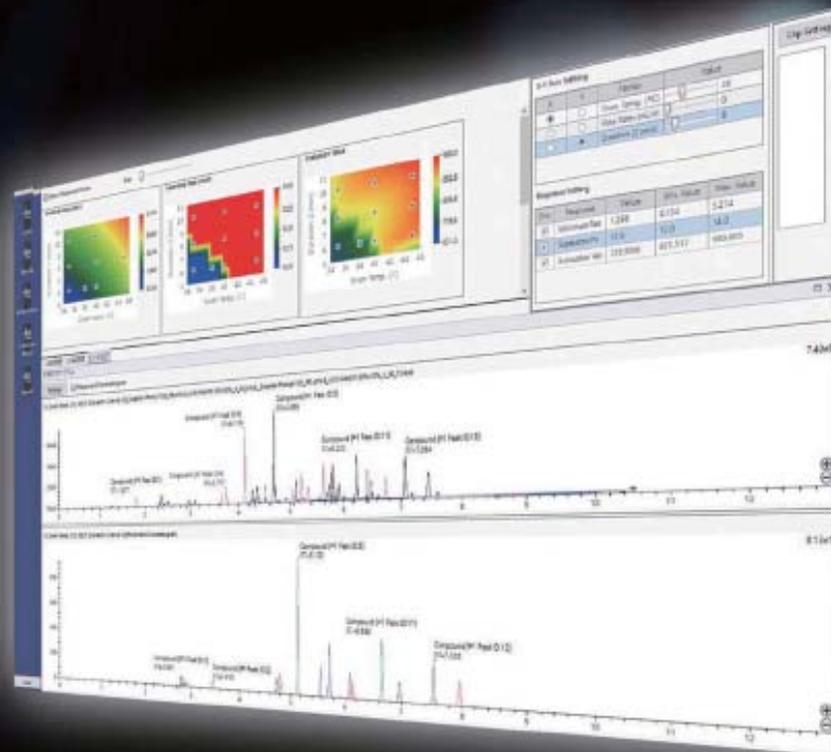
验证阶段

集中管理数据库中的所有实验结果

该软件可输出总结实验设计、设计空间、色谱图和其他相关信息的报告。同时可管理数据库中的信息，以确保数据的完整性。

更高效地开发具有更高可靠性的分析方法

LabSolutions MD 软件基于“分析质量源于设计”（AQbD）理念，通过设计基于科学和风险的实现方法来开发高效的方法。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。



前言

液相色谱方法的开发过程是一个严谨且系统化的过程，需要根据目标化合物的性质，选择流动相、色谱柱和检测器，创建批表，分析数据，并在分析结果的基础上不断完善分析参数。这个过程耗时且复杂，分析人员要具备专业的色谱知识，并可能需要进行多次尝试和调整，才能找到一个合适的方法。传统的方法开发模式往往显得比较盲目，不仅费时费力，成本也较高。此外，在传统方法开发中，往往没有充分考虑各参数的耐用性和稳健性，导致在不同实验室转移时，方法测试的重现性常常受到挑战。

为了解决这些问题，采用系统化的方法开发策略显得尤为重要。这种策略不仅强调全面的实验设计和数据分析，还注重对方法的稳健性进行评估，从而增强方法的可重现性和可靠性。通过实施更加科学的方法开发流程，可以显著提高效率，降低成本，同时确保所开发的方法在不同环境下的稳定性与一致性。

ICH Q14 为分析方法开发提供了实践指南，强调分析质量源于设计的理念 (AQbD)。在 AQbD 的框架下，方法开发不仅仅是基础实验和结果分析的简单组合，而是需要进行全面的风险评估和多变量分析，通过设计实验 (DoE) 来系统性评估影响分析结果的关键因素。借助方法开发工具和统计学软件进行数据分析，可以得到一个高性能、耐用性好、设计空间可靠、准确性高且收集的方法知识丰富的分析方法。这种方法的使用生命周期长，大大节省了人力和时间成本。

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。分析工作者可以在方法开发过程中进行严谨的实验设计和数据分析，确保每一步都在科学的基础上进行。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，形成可供实际应用的高效、稳定的分析方法。

本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心



目录

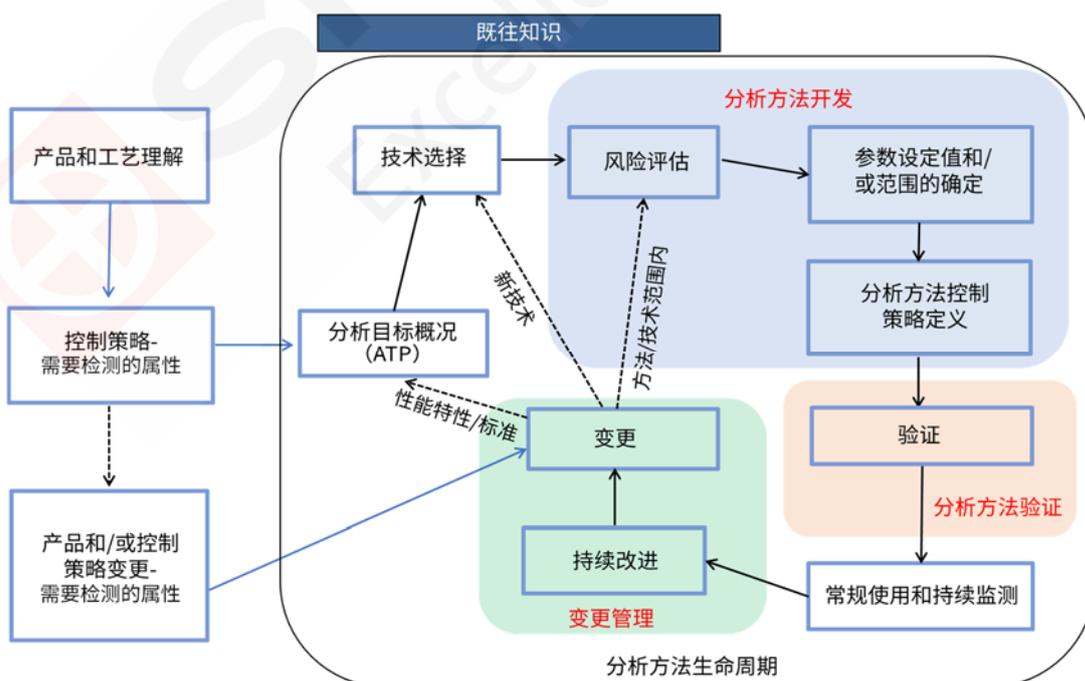
第 1 章 AQbD 相关法规概述	1
第 2 章 LabSolutions MD 方法开发系统简介	3
第 3 章 LabSolutions MD 应用数据集	8
3.1 LabSolutions MD 典型工作流程.....	9
3.2 药物杂质方法开发	16
恩格列净有关物质 HPLC 方法开发.....	17
酒石酸美托洛尔有关物质方法开发	23
阿托伐他汀钙有关物质 HPLC 方法开发.....	29
优化药品中抗衡离子	35
酮洛芬杂质分析方法开发	38
单四极杆质谱仪对药物杂质进行高效的方法开发.....	42
寡核苷酸及其相关杂质的分析方法开发.....	46
3.3 复杂多组分化合物方法开发	54
磺胺类化合物的 HPLC 分析方法开发.....	55
经典名方当归建中汤含量测定的方法开发.....	61
11 种染料成分的检测方法开发	67
3.4 其他智能化使用场景下的应用	75
使用 LabSolutions MD 提高手性化合物的分离效率	76
科学创建设计空间 高效筛选色谱柱.....	81
基于 AI 算法的 LC 方法开发自动梯度优化.....	85
pH 自动筛选实现高效分析方法开发	88
附录 LabSolutions MD 操作步骤	90

第1章 AQbD 相关法规概述

分析方法质量源于设计 (Analytical Method Quality by Design, AQbD) 是一种系统性的方法，旨在通过科学的设计和优化，确保分析方法的质量和可靠性。AQbD 强调在分析方法开发过程中，从设计阶段开始就考虑和控制各种影响因素，以确保最终的分析方法能够稳定、准确地满足预期的分析目标。AQbD 来源于质量源于设计 (Quality by Design, QbD)，QbD 是一种始于预先定义的目标，采用科学和风险管理的方法来增加对产品和过程的理解并用于过程质量控制的系统方法。

美国食品和药物管理局 (FDA) 是药品设计与研发领域的倡导者。2002 年，FDA 发起了“面向 21 世纪的药品质量”倡议，以增强和现代化对药品生产和产品质量的监管。2004 年，FDA 在《21 世纪药品生产质量管理规范——一种基于风险的方法》的报告中正式提出 QbD 概念，将其扩展至药品的研发、生产和商业应用，把生命周期管理引入到制药行业，开创了药品行业内质量设计理念的先河，开启了基于风险的药品质量监管新时期。此前瞻性 QbD 理念亦获得人用药品注册技术规定国际协调会议 (ICH) 认可，被纳入质量体系框架中，晋升为指导全球药品质量体系的指导原则和实践框架。为了提高制药领域产品工艺开发的质量，将更安全、更有效的药品高效推向市场，2004-2018 年，ICH 陆续发布了包括“Q8 药品研发”、“Q9 质量风险管理”、“Q10 药品质量体系”、“Q11 药物的研发和生产”，以及“Q12 药品生命周期管理的技术和监管考虑”等一系列指南。QbD 在药物开发和制造中已经成为一个重要的概念，帮助制药行业建立质量风险管理，确立质量控制策略和药品质量体系。

分析方法开发过程与 QbD 的核心思想具有相通之处，故将这种生命周期管理的方式引入至分析方法领域，便形成了 AQbD。利用该原则进行分析方法开发，确保方法在整个产品和方法生命周期中满足预期性能要求。2018 年，ICH 提出了“Q14 分析方法开发”草案，标志着 AQbD 原则的正式提出，该指



南于 2022 年正式发布。Q14 文件阐述了质量设计原理在分析方法开发中的应用，旨在促进分析工艺科学

化统一，为分析开发过程提供准则，改善了行业和监管机构之间的沟通，允许更有效、科学合理和基于风险的授权和变更管理。此外，Q14还为Q2(R1)分析方法验证的修订奠定了基础，促成了Q2(R2)新质量指南的出台，Q2(R2)进一步明确了分析方法验证的新标准与原则。

ICH Q14 和 Q2(R2)指南的发布促进了这一理念的国际化实施，加强了分析方法的科学性和风险管理，



得到了多国药典如 USP 和 BP 的支持与推广。USP 提出新增通则<1220>分析方法生命周期方案 (Analytical Procedure Life Cycle), 并于 2021 年 11 月收录在《美国药典》(USP-2021)。通则<1220>在分析方法中引入基于 AQbD 和风险评估管理 (Risk Management, RM) 等理念, 关注分析目标概要 (ATP), 指出 ATP 是生命周期方法的重要组成部分, 侧重分析方法的目标设计。同年, 英国药典 (BP) 补充章节发布了关于 AQbD 在制药领域中的应用, 对分析方法生命周期进行指导。中国也致力于推进药品安全质量控制, 积极应用 AQbD 等先进方法来强化药品质量管理体系, 2024 年 4 月, 药品审评中心网站更新 ICH Q2(R2) 及 Q14 这两项指导原则正文及附录, 并于次月由药品监督管理局正式公告实施。

AQbD 原则的引入及其在国际指南和各国药典中的体现, 不仅标志着分析方法开发进入了一个更加系统化、科学化的新时代, 而且强调了从研发到生产全周期的质量控制和风险管理的重要性。随着全球范围内对 AQbD 原则的接纳与实践, 未来药物分析领域将朝着更高效、更协同的方向发展, 为保障公众健康和促进医药行业发展奠定坚实的基础。

第2章 LabSolutions MD 方法开发系统简介

在高效液相色谱方法开发过程中，化合物的保留因子、柱效和选择性三个关键参数对分离结果起着决定性作用，可以通过调节色谱柱的种类、选择合适的有机溶剂、控制流动相的 pH 值以及优化梯度斜率等方式进行精细调整，从而达到改善分离的效果。

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{柱效}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{选择性}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{保留因子}}$$

图 1. 分离度公式

传统分析方法开发主要依赖试错法，通过调整影响选择性的参数（如 pH 值、色谱柱和流动相类型以及仪器条件等）并参考既往知识（如科学和技术出版物以及公司自有开发和分析经验），实验人员反复优化色谱条件，直至满足分析目标。这种分析模式对实验人员的专业能力和体力都有极大要求；随后市场推出了一种自动色谱柱和流动相切换系统，减少了手动更换流动相和色谱柱的繁琐操作，降低了对实验人员专业素质的要求，简化了实验过程，该系统即可自动评估不同色谱柱和流动相的选择性，并优化梯度条件。但多柱多阀方法开发模式仍面临挑战，如缺乏系统化实验设计和明确的变化区间，这使得方法稳健性还有待提高。

为了进一步提高方法的稳健性，需要进一步探索和优化实验设计。LabSolutions MD 方法开发软件基于 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。在分析方法开发过程中，使用实验设计法（DoE）、应用统计学方法，从实验数据中高效地提取影响方法的关键参数，然后确定这些参数的有效区域，将其作为设计空间进行可视化处理，更有效地评估和分析实验结果，降低潜在的风险，以确保方法的稳健性、可重复性和可靠性。LabSolutions MD 通过以科学依据和风险评估为基础的研究，得以进行不依赖于经验和感觉的综合性分析方法开发探索，从而开发出稳健且低风险的分析方法。

一、AQBd 方法开发的优势

与传统方法开发相比，AQBd 方法开发展现出以下显著优势：

1、分析方法的开发和验证时

- 能够进行不依赖于经验和感觉的综合性分析方法开发研究
- 通过成体系的研究，累积知识，加深对分析方法的理解
- 能够开发稳健且低风险的分析方法

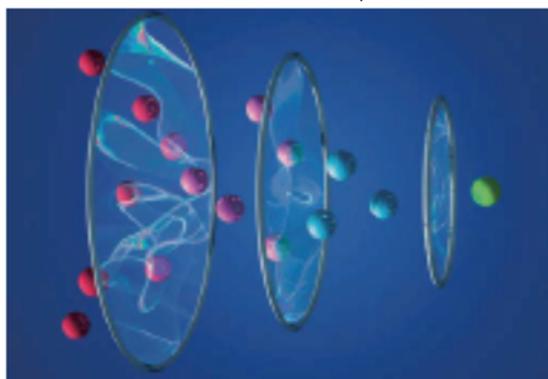
2、技术转移和试验运用时

- 通过解决试验问题防止工时的浪费
- 根据累积的知识高效地持续改善试验方法
- 能够管理和减少实施错误质量评价的风险

二、基于 AQBd 的分析方法开发工作流程

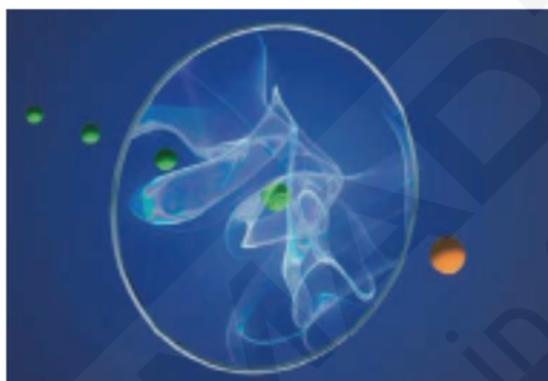
STEP 1 分析方法初步筛选

初步筛选对色谱分离有主要影响的参数，如流动相 pH 值、有机相混合比例和色谱柱类型等。



STEP 2 分析方法优化

以初筛结果确定的分析条件为起点，验证其它参数的理想设定值，如泵的梯度条件。

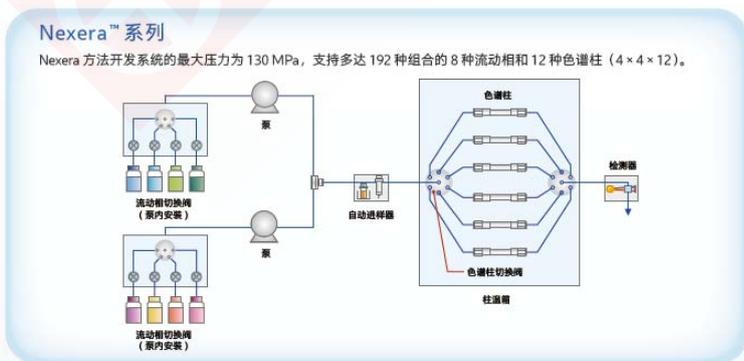


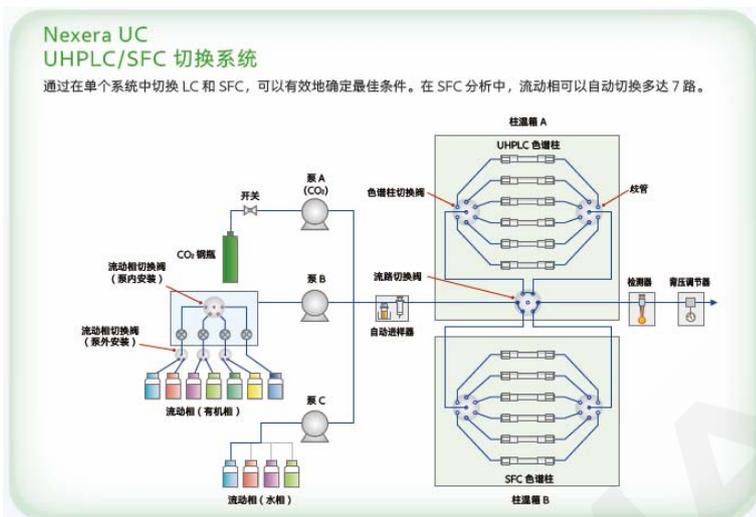
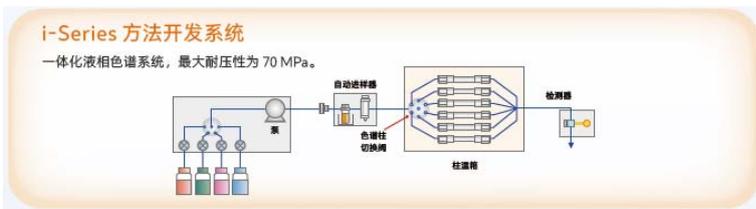
STEP 3 稳健性评估

验证优化后分析条件中在允许的范围内参数的微小变化对结果有影响。

三、方法开发系统硬件特点

方法开发系统基于岛津先进的 UHPLC 技术平台，专为分析方法的开发与优化而设计。该系统兼容 Nexera、i-Series 和 Nexera UC 全系列产品，能够与各类 LC 检测器（如 UV、PDA、RID、RF、ELSD 和 AD）无缝集成，并支持“单四极杆 LC/MS 检测器”，这为用户提供了更广泛的选择和更高的灵活性。特别是当配合使用 PDA 检测器与单四极杆质谱仪时，能够提供更为精准的数据解析能力，显著提升分析结果的可靠性和准确性。



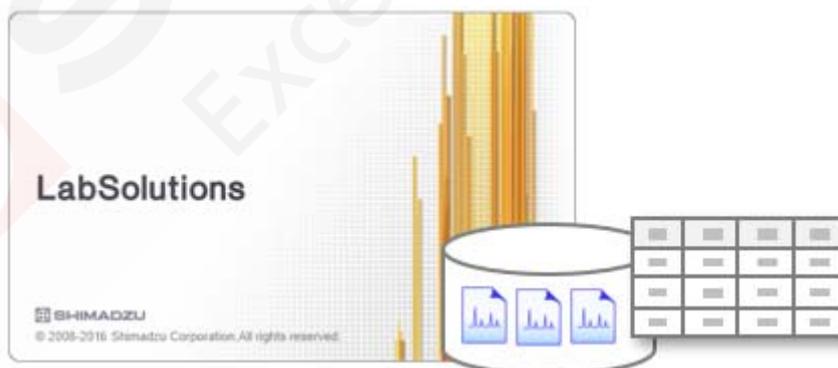


方法开发系统硬件

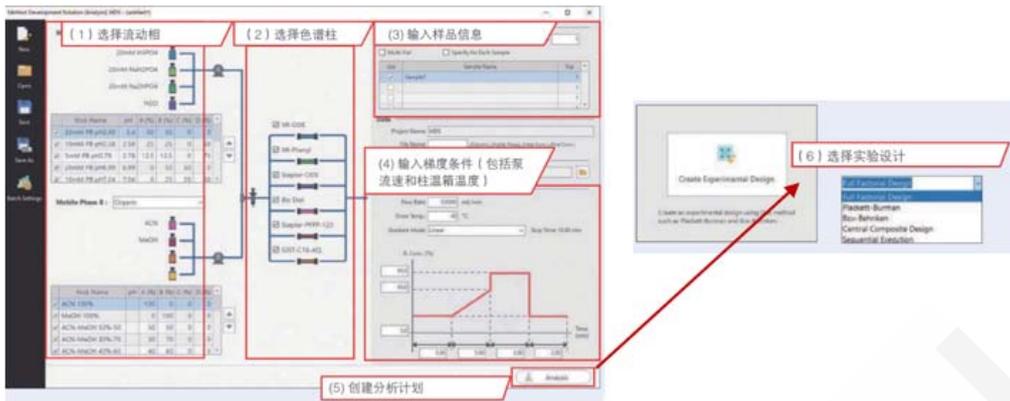
四、LabSolutions MD 方法开发软件特点

1、轻松创建分析计划表

本软件可与 LabSolutions 色谱工作站无缝协作，无需任何文件的导入导出即可实现实验设计 (DoE) - 分析计划表 (批处理表) - 仪器操控三者之间的自动联动，这不仅大大提高了操作效率，而且可以减少人为错误。



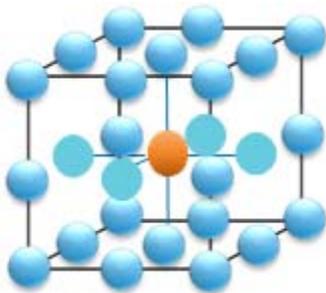
在 LabSolutions MD 方法开发软件界面上，创建筛选所需的大量方法文件和分析计划的过程可以通过以下步骤 (1) 到 (6) 快速完成。只需一次点击就可以选择流动相和色谱柱，并根据实验设计 (DoE) 即可一键生成综合分析计划表，不仅包含所有需要考察的方法文件，还自动创建所需柱平衡和空白分析计划。



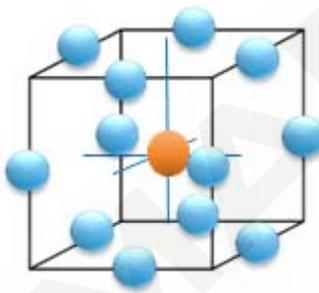
六步设置轻松建立分析计划表

2、通过实验设计提高分析条件筛选的效率

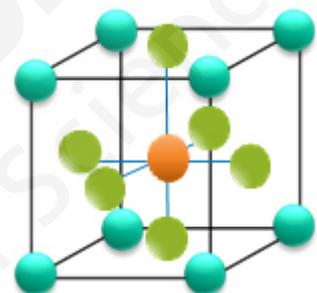
LabSolutions MD 中加入了不同的实验设计模型供用户创建分析计划，可以在更少的尝试中有效地筛选分析条件，大大提升实验效率。



完全因子设计



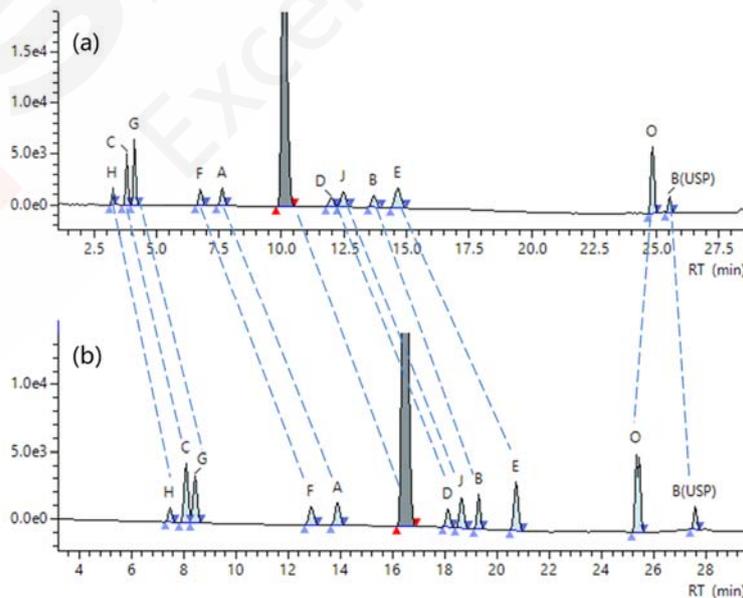
BOX-Behnken 设计



中心复合设计

3、峰跟踪功能自动识别目标化合物

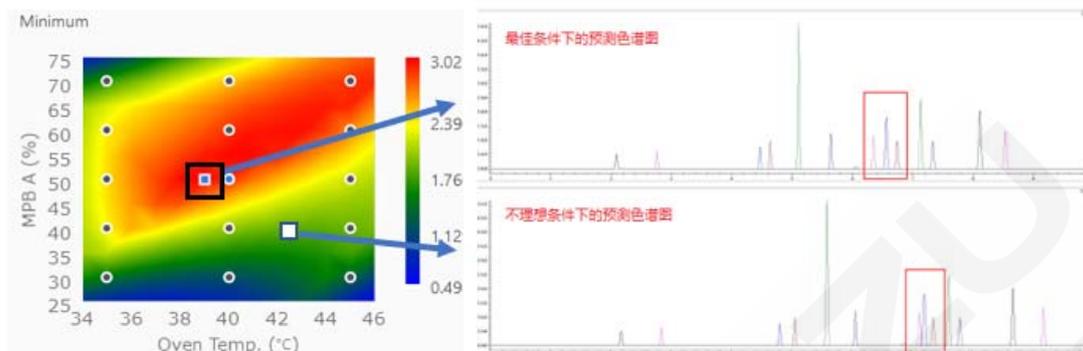
在方法开发过程中，化合物的保留时间会随着分析条件的变化而不同，在大量的数据下，如何高效准确的识别化合物，是一项非常困难的工作。LabSolutions MD 可以根据 m/z 相似度、UV 光谱的相似度、峰高、峰面积等信息自动追踪不同保留时间的化合物，得到可信的化合物匹配结果。



根据 UV 光谱的相似度，自动跟踪具有不同保留时间的相同化合物

4、构建设计空间将分析方法的可视化

LabSolutions MD 软件中可构建可视化的设计空间，通过绘制因素- 响应关系图，能够在图中直观的推荐的高稳健分析条件。并且支持色谱图模拟，准确的预测不同点位（不同参数）下的色谱图。



5、集中管理数据库中的所有实验结果确保数据完整性

由于方法开发全部过程（包括创建实验设计、获取数据和设计空间中的所有方法开发步骤）都可以无缝集成在同一软件中，使用 LabSolutions MD 能够很容易地检查分析过程和结果，无需任何耗时的文件导入或导出步骤。所有相关的信息，如实验设计、设计空间和色谱图，都可以在报告中输出。同时，通过统一的数据和报告管理能够确保数据的完整性。



方法开发数据的集中化管理

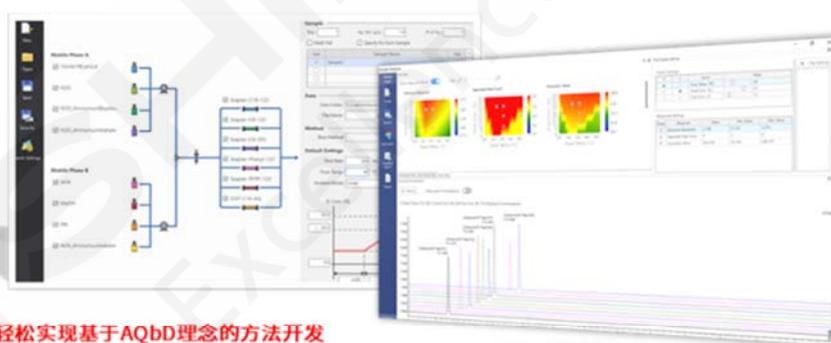
第3章 LabSolutions MD 应用数据集

液相色谱是一种高效且可靠的分析技术，专门用于复杂混合物中各组分的精确分离与定量分析，在确保产品质量、推动科学研究和满足监管合规性方面均有至关重要的作用。随着科学技术的不断进步，分析方法的发展已不再仅仅是简单的实验过程。研究人员需要深入理解关键质量属性、关键工艺参数及多变量参数之间的交叉影响。结合先进的统计学工具和计算模型，优化实验设计，研究人员可以更好地预测和控制分析过程中的变异因素，减少试错成本，加速方法开发周期，进而提高分析结果的准确性和重现性，确保产品质量的一致性和合规性。

本章将深入探讨 LabSolutions MD 方法开发软件的功能与特点，分享最新的技术趋势、实践经验和成功应用案例，旨在提供一个全面而详细的 AQbD 方法开发参考指南，以应用于更广泛的领域，从而提升工作效率和分析质量。具体而言，本章内容分为四个主要部分：

- 全面介绍 LabSolutions MD 工作流程
- 药物杂质方法开发
- 多组分同时分析 HPLC 方法开发
- 其他智能化使用场景下的应用

使用 LabSolutions MD 软件基于实验设计和数据驱动的方法开发策略，不仅提升了实验室的工作效率，也为工业生产和药物研发等领域的质量控制提供了强有力的保障。



轻松实现基于AQbD理念的方法开发

- + 高效
通过实验设计
提高分析条件筛选的效率
- + 直观
构建设计空间
将分析方法的稳健性可视化
- + 合规
集中管理数据库中的所有实验结果
确保数据完整性



3.1 LabSolutions MD 典型工作流程

系统介绍了使用 LabSolutions MD 软件对小分子药物进行基于分析质量源于设计 (AQbD) 的高效稳健分析方法开发。基于 AQbD 的分析方法开发通常由筛选 (Screening)、优化 (Optimization) 和稳健性评价 (Validation) 3 阶段组成。对于以上各个阶段, 使用实验设计法进行分析, 对分析结果构建设计空间, 并在确定最佳分析条件后进行耐用性评价, LabSolutions MD 的专用功能为每个阶段提供支持, 完成一系列分析方法开发的工作。

1. 背景

国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 就 ICH-Q14 中基于 AQbD 的分析方法开发举措进行了讨论。在基于 AQbD 的分析方法开发中, 建议根据实验设计法等高效实验获得数据, 将对分析结果有较大影

响的参数构建设计空间, 进行可视化。基于科学依据和风险, 研究以重视模型和实证研究为基础的系统化思维的分析方法, 从而开发稳健且低风险的分析方法。

2. 实验部分

2.1 样品信息

作为典型案例, 选择具有不同 log P 和 pKa 的小分子药物作为模型进行方法开发, 待研究的目标小分子药物的物理性质参数如表 1 所示。

表 1. 化合物信息表

序号	化合物	log P	pKa	序号	化合物	log P	pKa
1	丙磺舒	3.21	3.4	7	盐酸阿米替林	4.92	9.4
2	(S) - (+) - 萘普生	3.18	4.15	8	吲哚美辛	4.27	4.5
3	乙酰水杨酸	1.19	3.49	9	安替比林	0.38	1.4
4	双氯芬酸钠	4.51	4.15	10	利多卡因	2.44	8.01
5	盐酸罂粟碱	3	6.4	11	奎尼丁	3.44	8.56
6	盐酸地布卡因	4.4	8.85	12	甲氧氯普胺	2.62	9.27

2.2 筛选阶段

在筛选中, 通常情况而言, 流动相和色谱柱对化合物的保留和分离有较大影响, 因此在方法开发的初始阶段对这些因子进行了筛选。本实验采用全因子实验设计, 考察了流动相水相 (缓冲液) 2 种、有机相 3 种和色谱柱 6 种, 共计 36 个数据 ($2 \times 3 \times 6$) 进行了分析 (分析条件见表 2)。每种缓冲液的 pH 值 (泵 A) 以及有机溶剂的比例 (泵 B) 均由溶剂混合功能自动配置。与手动变更条件的情况相比, 分析过程流动相和色谱柱的自动切换, 大大提高了方法开发阶段的整体效率。

表 2. 筛选阶段分析条件

流 动 相	
A	相 ¹
	A1 : 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 2.7)
	A2 : 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8)

B	相 ²
	B1 : 乙腈
	B2 : 乙腈/甲醇=50: 50
	B3 : 甲醇
色 谱 柱 :	
1	Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31013-03
2	Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31034-03
3	Shim-pack Scepter C4-300 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31176-03
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31064-03
5	Shim-pack Scepter PFPP-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31054-03
6	Shim-pack Scepter C18 AQ HQ (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.0 μm), P/N:227-30808-02
分 析 条 件 :	
梯 度 程 序	: B 相浓度 5% (0 min) -80% (8.01-11 min) -5% (11.01-15min)
柱 温	: 40°C 进 样 体 积 : 1 μL 流 速 : 0.7 mL/min
检测波长	: 220-400 nm (SPD-M40)

*1 水相流动相按照以下组成, 通过流动相自动混合功能制备。

溶剂	流动相 A1	流动相 A2
A 50 mM 磷酸溶液	16%	0%
B 50 mM 磷酸二氢钠水溶液	24%	24%
C 50 mM 磷酸氢二钠溶液	0%	16%
D 水	60%	60%

*2 有机流动相按照以下组成, 通过流动相自动混合功能制备。

溶剂	流动相 B1	流动相 B2	流动相 B3
A 乙腈	100%	50%	0%
B 甲醇	0%	50%	100%

2.3 筛选的色谱图

图 1 为 Shim-pack Scepter Phenyl- 120 的色谱图。共洗脱出 14 个峰, 包括奎尼丁和乙酰水杨酸的杂质。由图可知, 每种化合物的保留时间和分离度会因水相的 pH 值、有机相种类和色谱柱的类型而发生显著变化。

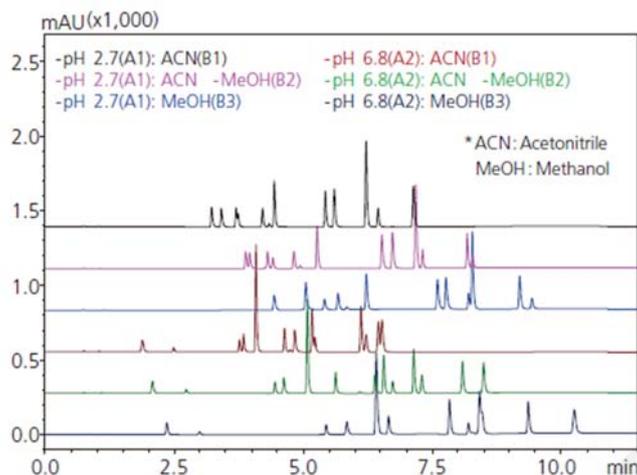


图 1. Shim-pack Scepter Phenyl-120 的色谱图

2.4 快速找到最佳条件

筛选阶段生成的色谱图与分析条件数量一样多，因此有必要评价在哪些条件下能够获最佳的分离。逐一手动检查所有色谱图，确认分离状态，需要耗费大量时间。LabSolutions MD 软件可以使用以下公式 1 来定量评价各条件下的分离状态，并可对其进行排序，因此能快速轻松地找出最佳条件。

$$(\text{评价值}) = P \times (R_{s1} + R_{s2} + \dots + R_{sp}) \cdot (\text{公式 1})$$

通过检出的峰数 (P) 与分离度 (Rs: 上限值 3.0) 总和的乘积来计算评价值。在筛选阶段获得的评价值降序显示结果如表 3 所示。确认了当水相为 20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、有机相为乙腈/甲醇=50: 50、色谱柱使用 Shim-pack Scepter Phenyl-120 时可获得最高评估值 (图 1: 绿色色谱图)。

表 3. 筛选阶段获得的评价值

色谱柱名称	MPA pH	MPBA (%)	评估值	最小分离度
Scepter-Phenyl-120	6.8	50	546.000	3.224
Scepter-CS-120	6.8	0	469.894	0.093
GIST-C18-AQ	2.7	0	465.124	1.075
GIST-C18-AQ	6.8	50	443.580	1.826
Scepter-C8-120	6.8	50	436.241	0.026
Scepter-Phenyl-120	2.7	50	419.659	1.743
Scepter-C18	2.7	0	419.338	1.518
Scepter-C18	6.8	50	396.000	4.326
Scepter-C4-300	2.7	0	394.239	0.402
Scepter-C18	6.8	100	384.553	2.046

2.5 通过方差分析确定对分离影响较大的参数

使用方差分析，可以量化每个参数 (如流动相、色谱柱等) 对分离的影响程度。确定对分离有重大影响参数有助于决定在优化阶段应进一步考察，从而提高方法开发的效率。

表 4 显示了每个参数的方差分析结果。“流动相 A×流动相 B”和“色谱柱” (红色) 的 p 值均小于 0.05。认为 p 值为 0.05 或更小的参数可以在每个水平上是不同的 (例如分离度)，表明它们对分离有很大的影响。

ANOVA 表格

显示绘图	影响	SSR	df	MS	F 值	p 值
<input checked="" type="checkbox"/>	MPA pH x MPB B (%)	44817.9	2	22408.9	6.72	0.0141
<input checked="" type="checkbox"/>	色谱柱名称	66312.0	5	13262.4	3.98	0.0302
<input checked="" type="checkbox"/>	色谱柱名称 x MPA pH	35853.2	5	7170.6	2.15	0.142
<input checked="" type="checkbox"/>	色谱柱名称 x MPS B (%)	50149.0	10	5014.9	1.50	0.265
<input checked="" type="checkbox"/>	MPB B (K)	9123.7	2	4561.9	1.37	0.298
<input checked="" type="checkbox"/>	MPA pH	3243.6	1	3243.6	0.973	0347
	错误	33336.5	10	3333.7		
	总计	242835.8	35			

表 4. 方差分析结果

2.6 筛选结果

通过筛选获得的评估值最高的条件如表 5 所示。使用水相为 20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、有机相为乙腈/ 甲醇=50: 50 以及色谱柱为 Shim-pack Scepter Phenyl-120 时具有最佳的分离。因此, 在 2.7 的优化阶段中, 基于以上条件, 对泵的梯度条件、柱温箱温度等参数进行进一步的研究。

表 5. 评估值最高的条件

流 动 相	
A	相
A2 : 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8)	

B	相
B2 : 乙腈/甲醇=50: 50	
色 谱 柱 :	
4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31064-03	
分析条件 :	
梯度程序	: B 相浓度 5% (0 min) -80% (8.01-11 min) -5% (11.01-15min)
柱 温	: 40°C 进样体积 : 1 μL 流 速 : 0.7 mL/min
检测波长	: 220-400 nm (SPD-M40)

2.7 分析方法的优化

在筛选阶段考察水相缓冲液的 pH 值和色谱柱种类后, 通过考虑有机流动相的混合比 (30、40、50、60、70%)、柱温箱温度 (35、40、45°C) 和梯度程序的最终浓度 (75、80、85 %) 等参数, 进一步优化分析条件, 并将以上参数的变化对最小分离度的影响创建设计空间, 如图 2 所示, 其中纵轴为有机流动相的混合比, 横轴为柱温箱温度。

通过构建设计空间, 能够全面可视化各种参数变化对最小分离度的影响。LabSolutions MD 还设计空间的整个区域内预测出最稳健的分析条件 (图 2 黑框内的点), 无需依赖直觉和经验即可构建稳健的分析方法。根据优化结果, 可知具有良好分离度和高稳健性的条件如下: 有机溶剂的混合比例为 50%、柱温箱温度为 39°C、梯度最高浓度为 80%。此外, 通过单击设计空间内的任意点 (图 2 内的点 A), 可以模拟出不同条件下的色谱图 (图 3)。色谱模拟功能可以在不运行任何分析的情况下, 快速模拟不同分析条件下化合物的分离行为。

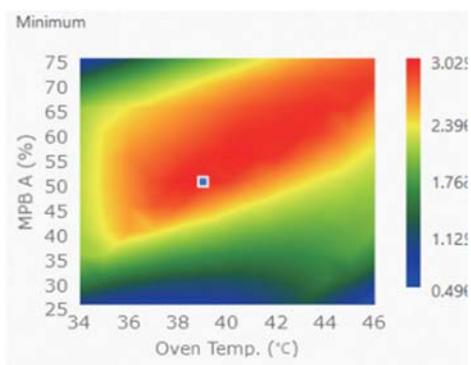


图 2. 最小分离度的设计空间 (最终梯度浓度为 80%)

*流动相 B A: 乙腈

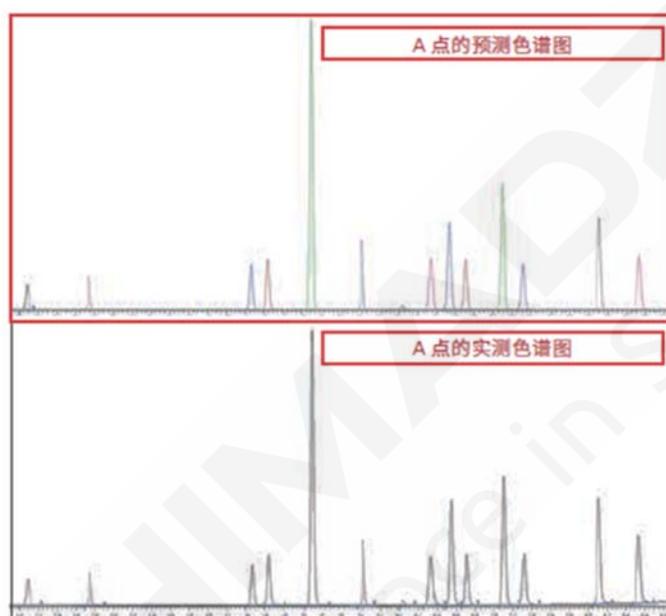


图 3. 点 A (图 2) 的预测色谱图和实测色谱图

2.8 通过谱峰跟踪自动鉴定化合物

改变有机流动相组成和柱温箱温度等各种参数后, 化合物的保留时间也会发生变化。当化合物保留时间的发生变化时, 人工对所有获得的数据鉴别每种化合物非常耗时, LabSolutions MD 能够通过使用光谱的相似度和面积值等任一指标或多种指标组合来自动对色谱峰进行跟踪 (图 4)。即使峰的洗脱位置因各种参数的变化而发生改变时, 也会迅速地自动识别所有数据的峰, 无需任何额外的人工工作, 大幅减少鉴定时间。

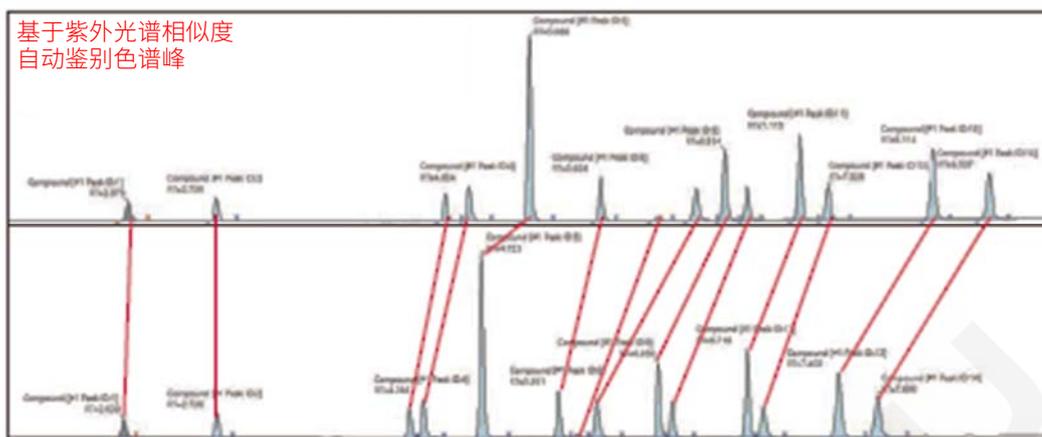


图 4.通过谱峰跟踪功能自动鉴定化合物

2.9 优化结果

优化阶段确定的条件如表 5 所示。通过设计空间，确认当有机流动相为乙腈/ 甲醇 = 50：50、柱温箱温度为 39°C、梯度程序的最终浓度为 80%时，具有良好的分离度和高稳健性。在 2.10 的稳健性评价阶段，通过确认在小范围内变化各种参数时对分离的影响来评价分析方法的稳健性。

表 5.优化阶段确定的分析条件

流 动 相	A 相		
	A2 : 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8)		
	B 相		
	B2 : 乙腈/甲醇=50: 50		
色 谱 柱 :	4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-31064-03		
分 析 条 件 :	梯度程序 : B 相浓度 5% (0 min) -80% (8.01-11 min) -5% (11.01-15min)		
	柱 温 : 39°C	进 样 体 积 : 1 μL	流 速 : 0.7 mL/min
	检测波长 : 220-400 nm (SPD-M40)		

2.10 分析方法的稳健性评价

在各种参数发生变化时，稳健性评价对理解该变化对测定值造成的影响、确保分析方法的可靠性十分重要。LabSolutions MD 对于优化确定的条件，小范围内改变优化阶段确认的参数条件，通过采用序贯实验设计，能够自动生成分析批处理表，以评价对分离的影响。具体来说，有机流动相的混合比改变 1% (49、50、51%)，柱温箱温度改变 1°C (38、39、40°C) (图 5 中的白色圆圈)，确认了各种参数变化对保留时间和分离度的影响。稳健性评价色谱图如图 6 所示。对于优化确定的条件，能够确认在改变各种参数时，分离度和保留时间的变化极小，表明根据设计空间推导的分析方法具有高稳健性。

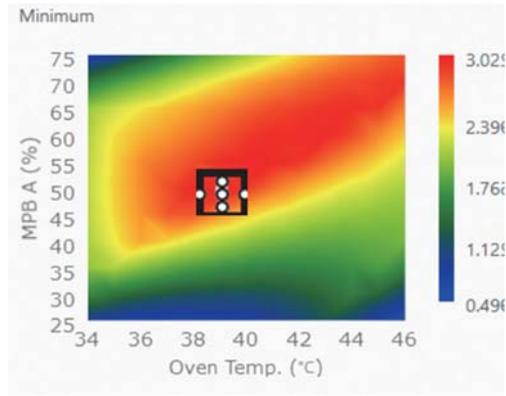


图 5. 稳健性评价的实验点

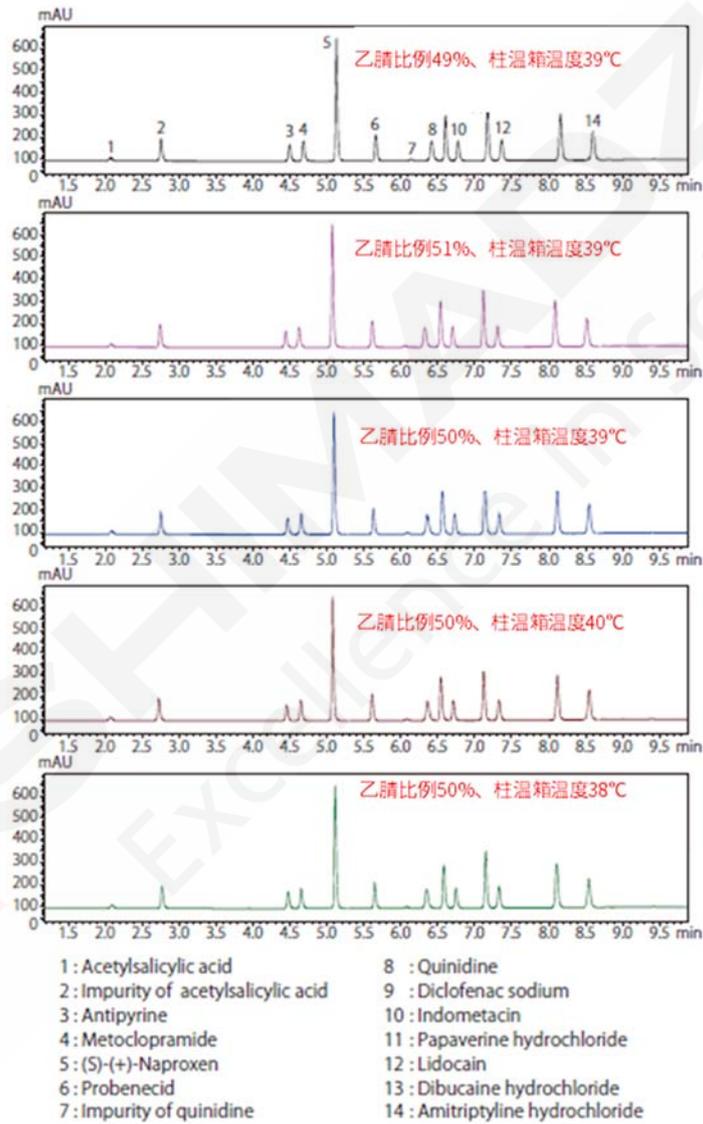


图 6. 稳健性评价的各个实验点（图 5 中的白圈）的色谱图

3.2 药物杂质方法开发

药物杂质是指药物在生产、储存和使用过程中产生的非目标化学物质，包括有机杂质、无机杂质、残留溶剂等。这些杂质可能来源于原料、合成过程中的副反应、制剂过程中的添加物或储存过程中的降解产物。杂质的存在不仅会影响药物的质量、纯度和稳定性，还可能引起不良反应，对患者的健康和安全构成潜在风险。因此，药物杂质的准确分析与有效控制是药品研发、生产和质量控制中的关键环节，也是药品监管机构审批新药时的重要考量因素。

色谱技术是药物杂质分析的重要基石。其中，高效液相色谱（HPLC）因其具有高分离效率、高灵敏度、广泛适用性和良好的重现性等优势，成为最常用的分析方法之一。HPLC 特别适用于热不稳定和极性较大的化合物的分析，在药物杂质分析中发挥着重要作用。随着技术的不断进步和法规要求的日益严格，分析方法的开发及验证正逐步向更高效、更合规和更稳健的方向发展。基于质量源于设计（AQbD）的理念被引入药物杂质分析方法的开发中，以系统化、结构化的方式提高方法的开发效率和可靠性。

本章旨在探讨药物杂质分析方法开发及验证流程，重点阐述基于 AQbD 理念的 LabSolutions MD 方法开发软件在药物杂质方法开发流程中的应用优势。通过实际案例分析和数据支持，详细展示 LabSolutions MD 其全面的功能和先进的设计理念，为确保药品的安全性和有效性做出了重要贡献，是药物质量控制和杂质研究的强有力技术支持。



恩格列净有关物质 HPLC 方法开发

摘要： 本实验采用岛津方法开发系统，结合 LabSolutions MD 软件，对恩格列净有关物质有效分离进行了方法开发，为方法开发提供了新思路。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 恩格列净 方法开发

技术特点：

- ❖ 遵循 AQbD 理念，使用 LabSolutions MD 开发出恩格列净有关物质稳健可靠分析方法。
- ❖ 根据各峰的分离度绘制设计空间，使分析条件和分离效果的关系可视化。

恩格列净为高选择性 SGLT2 抑制剂（钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂），是具有全新作用机制的降糖药物，除具有良好的降糖效果外，还能减轻体重，降低血压和血尿酸水平，具有明确的心血管和肾脏保护作用。另外恩格列净/二甲双胍复方制剂疗效确切，可以减少患者服药次数，提高依从性，为临床提供了一种简便有效的治疗选择。但目前恩格列净有关物质检查只有企业标准，未形成一个完整

的测试定方法，因此建立恩格列净有关物质的分析方法十分有必要。

LabSolutions MD 为岛津全新推出的方法开发软件，符合 AQbD 理念，使用 DoE 实验设计自动优化分析条件，形成稳定可靠分析方法。

L 本文利用岛津 HPLC 方法开发系统结合 LabSolutions MD 建立了恩格列净有关物质的更高效、更可靠的方法开发。

1. 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：

系统控制器	: CBM-20A	输液泵	: LC-30AD x 2 (含 LPGE)
检测器	: SPD-M30A	自动进样器	: SIL-30ACMP
柱温箱	: CTO-20AC	色谱工作站	: Labsolutions Ver.5.106 Labsolutions MD Ver.1.01

1.2 样品信息

表 1. 样品信息

No.	化合物名称	Name	CAS 号
1	杂质 1*	Empagliflozin Impurity 1	1620758-33-9
2	杂质 6	Empagliflozin Impurity 6	1620758-31-7
3	杂质 7	Empagliflozin Impurity 7	1620758-34-0
4	杂质 15	Empagliflozin Impurity 15	864070-37-1

5	杂质 41	Empagliflozin Impurity 41	2125472-55-9
6	杂质 68	Empagliflozin Impurity 68	1279691-35-8
7	杂质 10	Empagliflozin Impurity 10	915095-89-5
8	杂质 5	Empagliflozin Impurity 5	2770456-61-4
9	杂质 16	Empagliflozin Impurity 16	1279691-36-9
10	杂质 3	Empagliflozin Impurity 3	2452301-09-4
11	杂质 25	Empagliflozin Impurity 25	915095-99-7
12	杂质 12*	Empagliflozin Impurity 12	2452301-42-5
13	恩格列净	Empagliflozin	864070-44-0

注*杂质 1、杂质 12 为对映异构体，本例中作为一个峰控制。

分别称取表1中各对照品适量，精密称定，加入适量溶剂溶解，分别制成1000 µg/mL的溶液，作为标准品储备液。分别取各杂质对照品储备液适量，加入乙腈稀释成分别含恩格列净100 µg/mL、杂质1 µg/mL的混合标准品溶液，即得。

实验设计溶液制备：取阿托伐他汀钙与杂质 I 对照品、杂质 II 对照品、杂质 III 对照品各约 2.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，摇匀。

系统适用性溶液制备：参照中国药典阿托伐他汀钙检查项下有关物质测定法，取阿托伐他汀钙与杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII 对照品各约 2.5mg，置 50 ml 量瓶中，加二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

1.3 Labsolutions MD 软件分析方法开发流程

借助Labsolutions MD软件对恩格列净有关物质进行了方法开发。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。

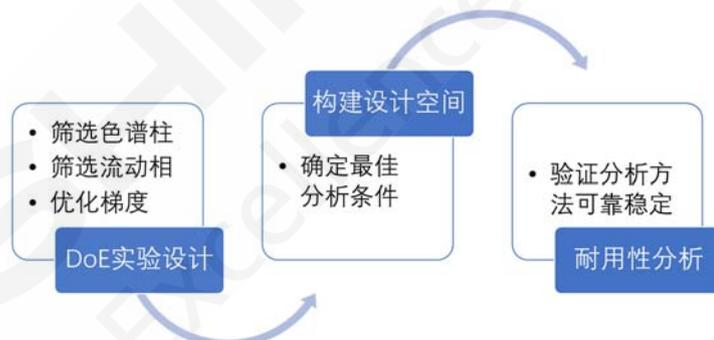


图1. Labsolutions MD软件分析方法开发流程

2. 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，在筛选阶段采用全因子实验设计对流动相(1×2种)、色谱柱(3根)、流动相 B 相起始比例 (0%、15%、30%) 进行了实验设计，如表 2 所示。

表 2. 筛选阶段实验设计表

流 动 相 :		
A 相 :	A1—H ₂ O	
B 相 :	B1—MeOH;	B2—ACN

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为0%，时间程序如下，

B conc 30% (0-25 min) ~ 80% (45-55 min) ~ 30% (55.01-65 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比例、流速、柱温的最佳组合，有效提升了实验效率，具体参数见表 4。

表 4. 优化阶段实验设计表

水平因素	水平 1	水平 2	水平 3
流速	0.8 mL/min	1 mL/min	1.2 mL/min
柱温	15°C	30°C	45°C
35 min 流动相比例	40%	60%	80%

图 3 为最小分离度的设计空间，可以同时研究流速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 3 中蓝色方框处），色谱图如图 4、保留时间信息如表 5 所示，具体参数详见表 6。

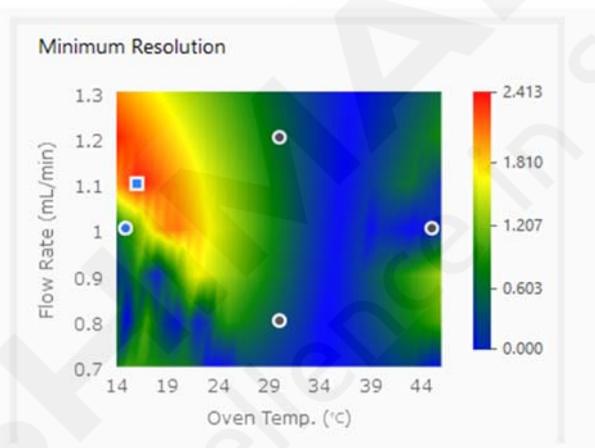
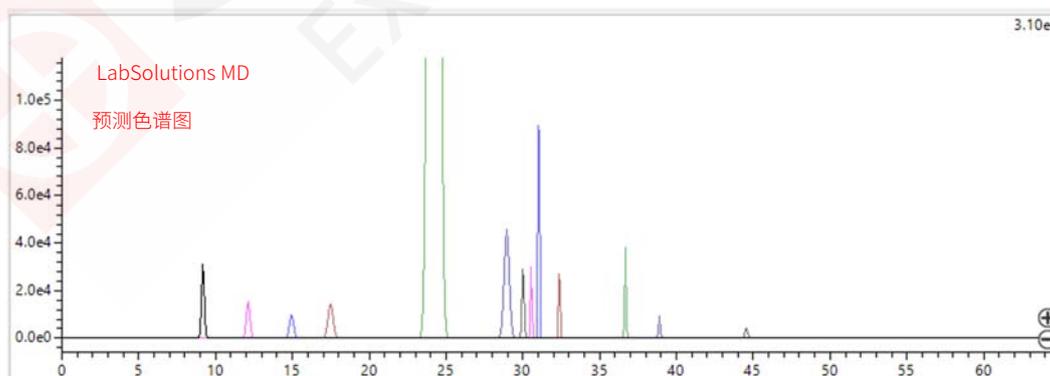


图 3. 最小分离度的设计空间



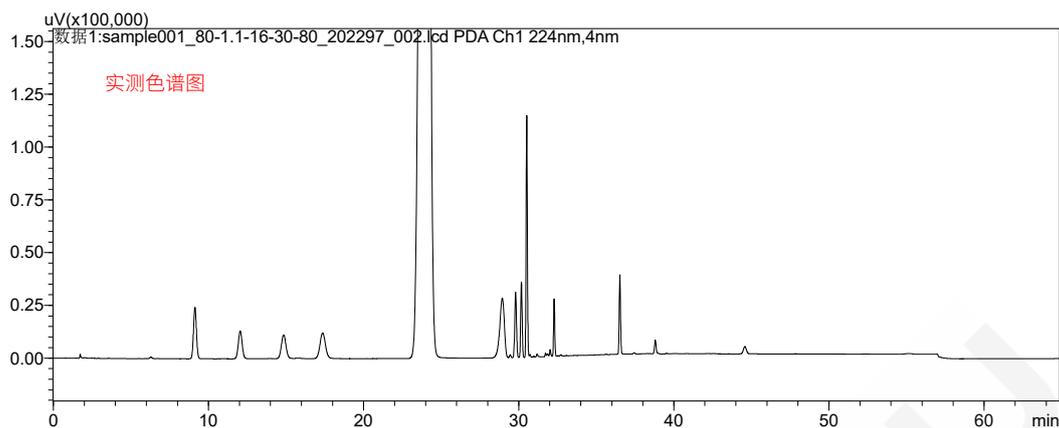


图 4. 最佳分析条件的色谱图

表 5. 最佳分析条件保留时间

No.	化合物名称	预测色谱图保留时间	实测色谱图保留时间
1	杂质 15	9.139	9.130
2	杂质 41	12.082	12.047
3	杂质 68	14.908	14.848
4	杂质 7	17.446	17.361
5	主成分	24.173	23.958
6	杂质 1 和 12	28.912	28.944
7	杂质 16	29.979	29.802
8	杂质 6a	30.511	30.174
9	杂质 6b	31.036	30.517
10	杂质 3	32.365	32.283
11	杂质 5	36.640	36.519
12	杂质 25	38.849	38.804
13	杂质 10	44.513	44.577

表 6. 最佳分析条件

流 动 相 :			
A 相 :	A1—H ₂ O		
B 相 :	B2—ACN		
色 谱 柱 :	3 Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm × 4.6 mm I.D., 5μm), P/N: 227-30742-08		
分 析 条 件 :			
流 速 :	1.1 mL/min	柱 温 :	16°C
进 样 量 :	20 μL	检 测 波 长 :	224 nm
洗 脱 方 式 :	梯度洗脱, B 相初始浓度为 0%, 时间程序如下, B conc 30% (0-25 min) ~80% (35-55 min) ~30% (56-65 min) *		

2.3 耐用性分析

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条件的稳定分析条件, 从而进行耐用性评估。在本例中, 流速波动 0.1 mL/min, 柱温波动 1°C (图 5 中黑色方框), 从而验证对分离的影响,

各峰分离良好，具体结果详见表 6。说明该参数变化下主峰与杂质峰均达到基线分离，方法的耐用性好。

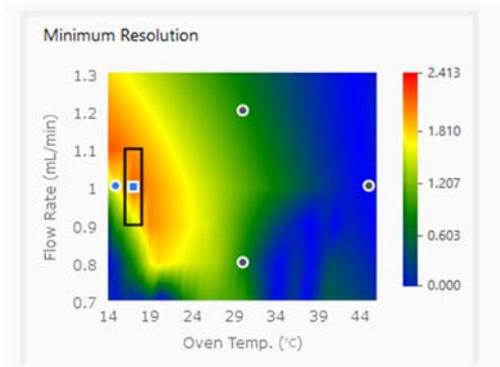


图 5. 耐用性允差范围

表 6. 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*	条件 5*	条件 6*	条件 7*	条件 8*	条件 9*
1	杂质 15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	杂质 41	7.268	7.251	7.089	7.009	7.43	7.239	7.097	7.552	7.369	7.176
3	杂质 68	5.597	5.619	5.486	5.428	5.708	5.562	5.467	5.771	5.634	5.493
4	杂质 7	4.239	4.298	4.185	4.125	4.343	4.221	4.131	4.349	4.247	4.126
5	主成分	8.792	8.9	8.685	8.533	9.022	8.792	8.577	9.059	8.835	8.581
6	杂质 1 和 12	7.109	6.334	7.229	5.373	6.903	6.902	5.387	7.097	6.844	5.356
7	杂质 16	2.272	2.094	2.225	3.006	2.286	2.215	3.181	2.371	2.274	3.362
8	杂质 6a	1.936	1.857	1.912	1.888	1.888	1.913	1.841	1.861	1.868	1.778
9	杂质 6b	2.078	1.834	2.02	2.194	1.914	2.087	2.214	1.949	2.097	2.218
10	杂质 3	11.976	11.304	11.636	11.942	11.687	11.962	12.045	11.905	12.084	12.112
11	杂质 5	27.883	27.188	27.331	27.874	27.816	27.867	27.819	27.846	27.81	27.579
12	杂质 25	12.745	12.154	12.336	12.632	12.627	12.711	12.685	12.775	12.852	12.795
13	杂质 10	20.918	21.152	20.457	20.11	21.395	20.856	20.038	21.505	20.834	19.827

注：*最佳条件：流速 1.1 mL/min；柱温 16°C；*条件 1：流速 1 mL/min、柱温 15°C；*条件 2：流速 1.1 mL/min、柱温 15°C；
*条件 3：流速 1.2 mL/min、柱温 15°C；*条件 4：流速 1 mL/min、柱温 16°C；*条件 5：流速 1.1 mL/min、柱温 16°C；
*条件 6：流速 1.2 mL/min、柱温 16°C；*条件 7：流速 1 mL/min、柱温 17°C；*条件 8：流速 1.1 mL/min、柱温 17°C；
*条件 9：流速 1.2 mL/min、柱温 17°C；

3. 结论

本文使用基于 AQbD 理念的 LabSolutions MD 软件开发恩格列净有关物质的分析方法，为 HPLC 的方法开发提供了新的思路。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。

4. 参考文献

何燕琳, 夏颖, 黄朝瑜, 樊洪玉, 朱嘉亮, 李睿, 李耕, 严菲. 恩格列净原料及片剂有关物质的检查方法[J]. 医药导报, 2025, 44(1): 24-30 <https://doi.org/10.3870/j.issn.1004-0781.2025.01.003>

柱温箱 : CTO-40C
检测器 : SPD-M40

自动进样器 : SIL-40C XS
软件 : Labsolutions Ver. 5.106
LabSolutions MD Ver. 1.01

1.2 样品信息

表 1. 样品信息

No.	中文名称	英文名称	CAS 号
1	杂质 A	Metoprolol Tartrate Impurity A	109632-08-8
2	杂质 B	Metoprolol Tartrate Impurity B	56718-71-9
3	杂质 C	Metoprolol Tartrate Impurity C	29122-74-5
4	杂质 D	Metoprolol Tartrate Impurity D	62572-90-1
5	杂质 E	Metoprolol Tartrate Impurity E	163685-38-9
6	杂质 F	Metoprolol Tartrate Impurity F	7695-63-8
7	杂质 G	Metoprolol Tartrate Impurity G	501-94-0
8	杂质 H	Metoprolol Tartrate Impurity H	62572-94-5
9	杂质 J	Metoprolol Tartrate Impurity J	163685-37-8
10	杂质 O	Metoprolol Tartrate Impurity O	154784-36-8
11	杂质 B(USP)	Metoprolol Tartrate Impurity B(USP)	56718-76-4
12	酒石酸美托洛尔	Metoprolol Tartrate	56392-17-7

分别称取表 1 中各对照品适量, 精密称定, 加入适量溶剂溶解, 分别制成 1000 µg/mL 的溶液, 作为标准品储备液。分别取各杂质对照品储备液适量, 加入乙腈稀释成分别含酒石酸美托洛尔 100 µg/mL、杂质 1 µg/mL 的混合标准品溶液, 即得。

2. 结果与讨论

2.1 实验设计

从色谱分离原理看, 影响分离要素第一位的是固定相类型。本例是在已经确定了色谱柱的基础上进行后续研究, 考察了流动相的组成变化、柱温箱温度以及流速大小对酒石酸美托洛尔与有关物质的分离的影响, 酒石酸美托洛尔有关物质的实验设计如表 2 所示。

表 2. 筛选阶段实验设计表

流动相 :			
A 相 :	50mM 乙酸铵-1%乙酸水溶液		
B 相 :	ACN		
色谱柱 :	Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5µm), S/N: 1A5153356		
分析条件 :			
B 相起始浓度 :	10, 15, 20% (3 水平)	B 相终止浓度 :	60%
流速 :	0.8, 1.0, 1.2 mL/min (3 水平)	柱温 :	20, 30, 40°C (3 水平)
洗脱方式 :	梯度洗脱, 时间程序如下, B conc 10% (0 min) ~20% (15min) ~60% (30 min) ~90% (30.1-35 min) ~10% (35.1-40 min)		
进样量 :	1 µL	检测波长 :	275 nm

2.2 峰追踪 (i-PeakTracer) 功能自动识别色谱峰

为了构建准确的相应曲面，需要在每个条件下准确识别所有化合物峰。峰追踪功能可以使用峰洗脱顺序、UV 光谱、MS 质谱相似度、峰面积及峰面积百分比、峰高度及峰高度百分比等多种参数对色谱峰进行自动追踪鉴定，从而实现设计空间的精确构建，大大减少手动识别的繁琐程度，提高工作效率。本实验采用峰洗脱顺序、UV 光谱相似度大于 0.9 对色谱峰进行追踪，图 1 为不同条件下峰追踪的色谱图。

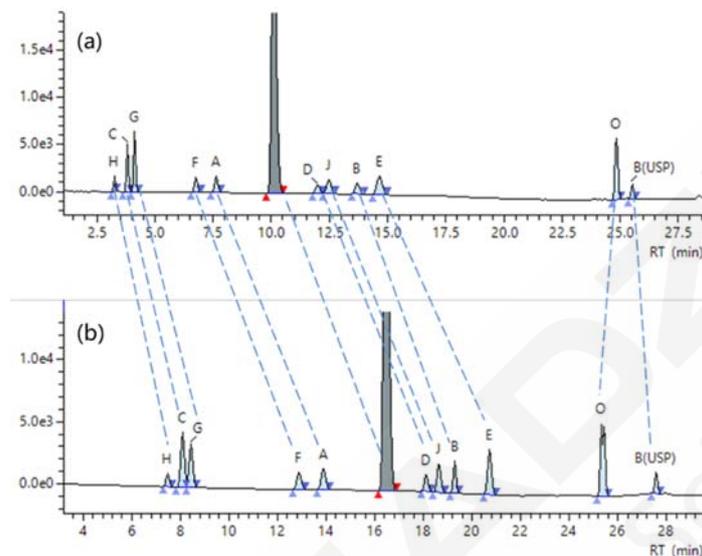


图 1. 峰追踪色谱图

(a) B 相起始浓度：15%，流速：1.2 mL/min，柱温：40°C

(b) B 相起始浓度：10%，流速：1.0 mL/min，柱温：20°C

2.3 设计空间——分析条件的可视化

LabSolutions MD 软件可以绘制设计空间，可以将分析条件和分离关系进行评价。根据化合物的保留时间，将流速与柱温，B 相起始浓度与柱温绘制最小分离度的设计空间，可以同时研究流速、柱温、B 相起始浓度关键参数对分离度的影响，如图 2 所示。

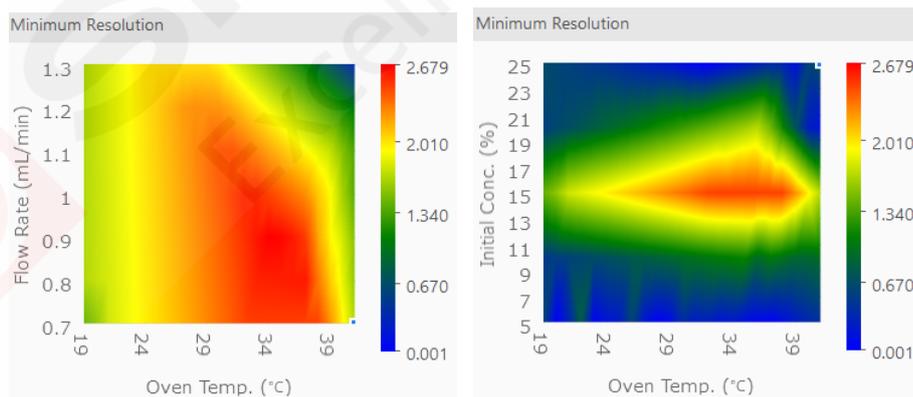


图 2. 最小分离度的设计空间

对有关物质的分析方法开发而言我们可能更为关注主成分与周围杂质或者难分离杂质之间的分离度。LabSolutions MD 还能够绘制特定化合物的设计空间，酒石酸美托洛尔的分度度的设计空间如图 3 所示，因此我们可以比较直观地确认酒石酸分离良好的分析条件。

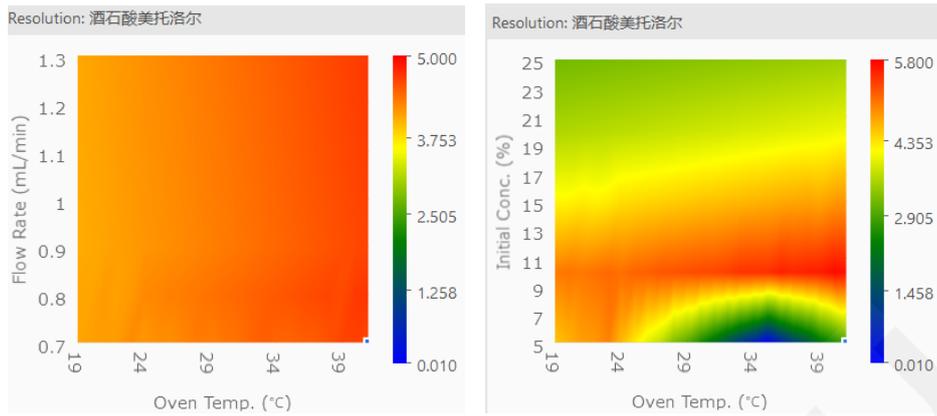


图 3. 酒石酸美托洛尔最小分离度的设计空间

2.4 计算最佳条件分析条件

LabSolutions MD 软件可以根据绘制的设计空间来预测出最佳的分析条件，排除了对分析人员专业直觉的过度依赖。图 4 蓝色正方形为 LabSolutions MD 给出最佳分析参数，预测的色谱图如图 5 所示。根据 LabSolutions MD 给出的最佳分析参数上机分析，实测色谱图如图 6 所示，各峰分离度均大于 1.5，结果参见表 3。

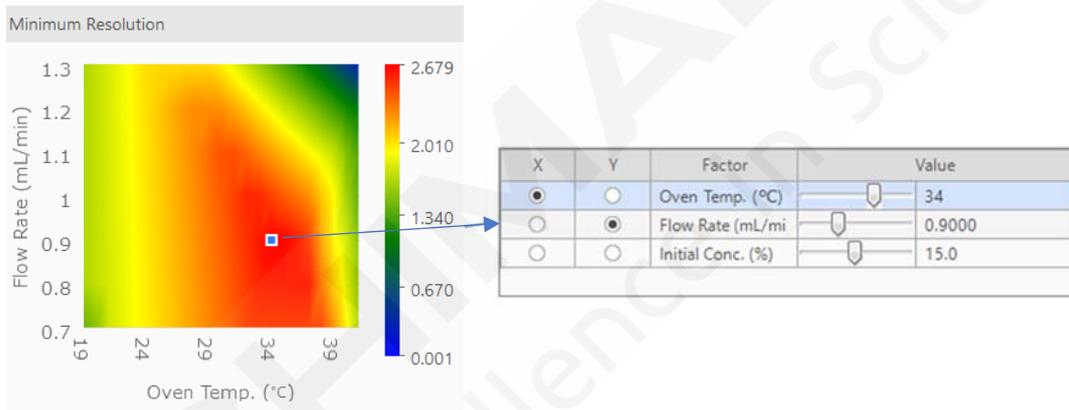


图 4. 最佳分析参数

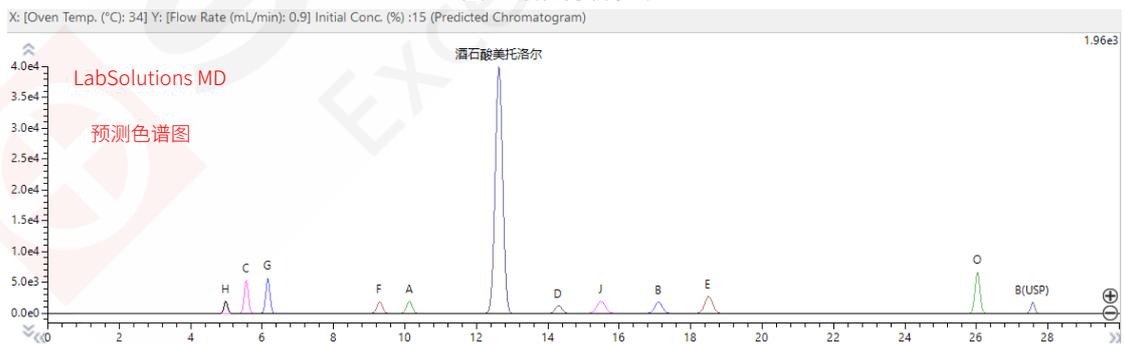


图 5. 最佳分析条件预测色谱图

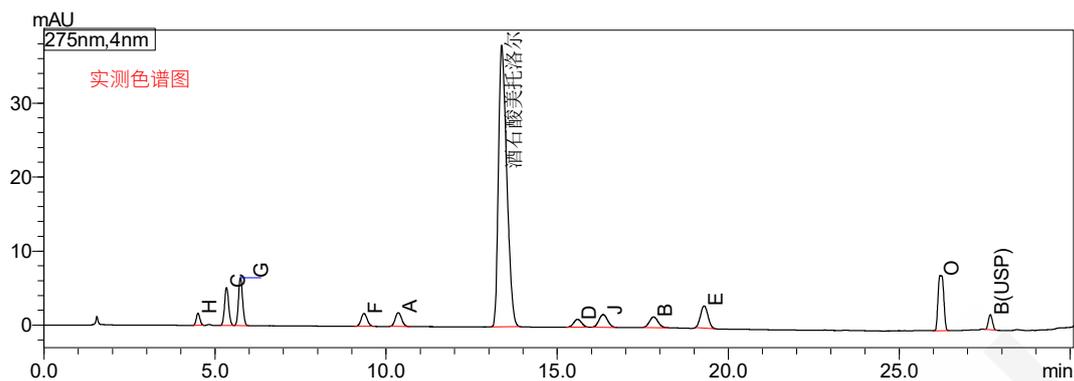


图 6. 最佳分析条件实测色谱图

表 3. 最佳条件实测色谱图各峰分离度结果

化合物名称	杂质 H	杂质 C	杂质 G	杂质 F	杂质 A	酒石酸美托洛尔	杂质 D	杂质 J	杂质 B	杂质 E	杂质 O	杂质 B(USP)
分离度	-	3.955	1.797	12.964	2.946	7.485	5.013	1.67	3.162	3.391	20.332	5.964

2.5 耐用性分析

借用 LabSolutions MD 软件进行耐用性分析，在软件中输入分析条件波动的允许范围，软件自动根据序贯设计创建批处理表，进行耐用性评估。在本例中，流速波动 0.1 mL/min，柱温波动 1°C（图 7 中黑色方框），从而验证对分离的影响。图 8 为耐用性评估的色谱图，各峰分离良好，方法的耐用性好。

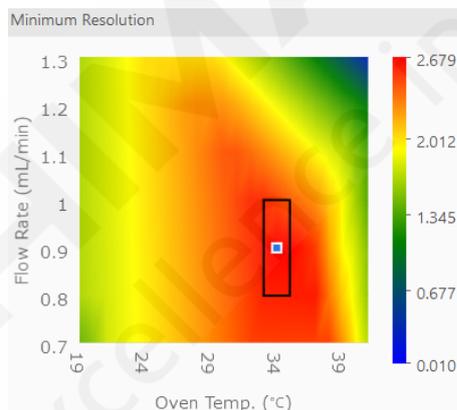


图 7. 耐用性评估区域

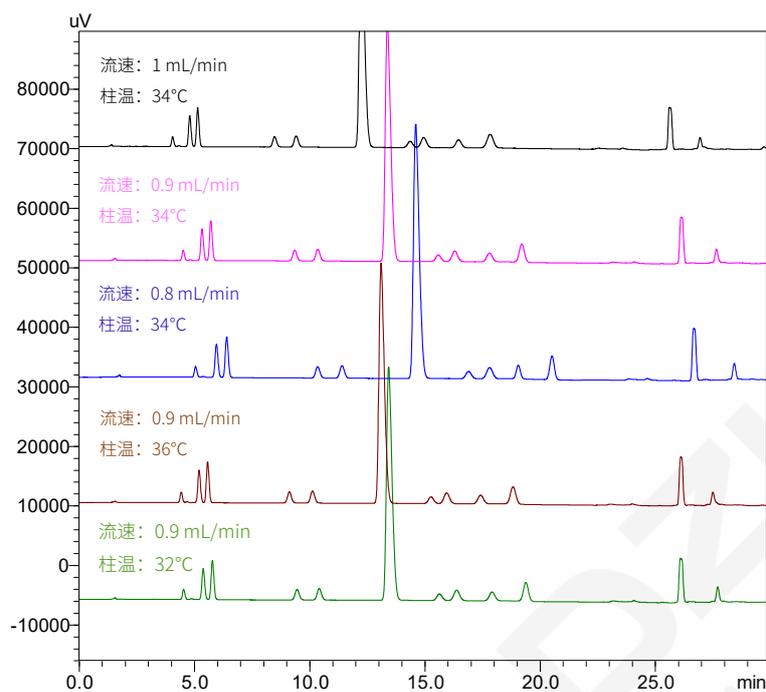


图 8. 耐用性分析色谱图

3. 结论

本文使用基于AQbD理念的LabSolutions MD软件开发酒石酸美托洛尔有关物质的分析方法，为HPLC的方法开发提供了新的思路。峰追踪功能通过使用多个参数，对不同分析条件的数据实现了色谱峰的自动鉴定。通过绘制设计空间，可以直观地掌握各种参数变化对分离度的影响，并且可以给出最佳分析条件，预测出该条件下的色谱图。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。

阿托伐他汀钙有关物质 HPLC 方法开发

摘要： 本实验使用岛津方法开发系统结合 LabSolutions MD 对阿托伐他汀钙有关物质的测定进行了方法开发，展示了 LabSolutions MD 软件的在 HPLC 方法开发中自动和智能化的功能与特点。LabSolutions MD 软件是基于 AQB 理念的方法开发软件，可根据实验设计（DoE）分析样品，并构建设计空间，开发出稳健可靠的分析方法。

关键词： LabSolutions MD 阿托伐他汀钙 方法开发

技术特点：

- ❖ 使用 LabSolutions MD 开发出阿托伐他汀钙有关物质的稳健可靠分析方法。
- ❖ 与现行《中国药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，液相质谱溶剂兼容性更高，分析时间也大大缩短。

阿托伐他汀钙片为高胆固醇血症和冠心病药物，能有效降低非致死性心肌梗死的风险，降低致死性和非致死性卒中的风险、降低血管重建术的风险，降低因充血性心力衰竭而住院的风险，降低心绞痛的风险。

现行《中国药典》中阿托伐他汀钙片检查项下有关物质有检定要求，其中杂质 I（去氟阿托伐他汀钙）、杂质 II（阿托伐他汀钙非对映异构体）、杂质 III（二氟阿托伐他汀钙）和阿托伐他汀钙的结构相近，

色谱保留行为类似，因此本文使用 LabSolutions MD 软件结合方法开发系统，对其进行方法开发。LabSolutions MD 软件可帮助分析工作者“轻松高效”“科学系统”的实现稳健的分析方法开发，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。

1. 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：

系统控制器	: CBM-40	输液泵	: LC-40D XS × 2
脱气机	: DGU-403	自动进样器	: SIL-40C XS
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40
质谱检测器	: LCMS-2050	色谱工作站	: Labsolutions Ver.5.118 Labsolutions MD Ver.2.01

1.2 混合对照品溶液的配制

实验设计溶液制备：取阿托伐他汀钙与杂质 I 对照品、杂质 II 对照品、杂质 III 对照品各约 2.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，摇匀。

系统适用性溶液制备：参照中国药典阿托伐他汀钙检查项下有关物质测定法，取阿托伐他汀钙与杂质

I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII 对照品各约 2.5mg，置 50 ml 量瓶中，加二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

2. 结果与讨论

2.1 实验设计

从色谱分离原理看，影响分离要素关键因素包含固定相类型、流动相类型、以及洗脱条件。为更加全面的研究阿托伐他汀钙有关物质的保留行为，本例在已经确定了色谱柱及流动相种类的基础上进行了后续细致研究，考察了流动相初始变化、柱温箱温度以及流速大小对阿托伐他汀钙与有关物质的分离的影响，阿托伐他汀钙有关物质的 HPLC 实验设计如表 1 所示，共 27 (3 x 3 x 3) 种方案。只需单击选择要考察的实验因子，LabSolutions MD 软件即可自动创建批处理表格，大大减少了手动创建时间，提高分析效率。

表 1.实验设计表

液相条件	
流动相：	
A 相：	20 mM 乙酸铵溶液 (冰醋酸调节 pH 值至 4.4)
B 相：	乙腈
色谱柱：	Shim-pack GIST-HP AQ (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm), P/N: 227-30807-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司
分析条件：	
B 相起始浓度：	35, 40, 45% (3 水平)
B 相终止浓度：	95%
流速：	0.3, 0.4, 0.5 mL/min (3 水平)
进样量：	1 μL
柱温：	30, 40, 50°C (3 水平)
检测波长：	PDA (254 nm)
洗脱方式：	梯度洗脱，时间程序如下， B conc 40% (0-15 min) ~ 95% (18-21 min) ~ 40% (21.1-26 min)
质谱条件	
离子化模式：	DUIS (±)
脱溶剂温度：	500°C
雾化气流速：	3 L/min
DL 温度：	250°C
加热气流速：	7 L/min
扫描模式：	SCAN (m/z 100-800)
干燥气流速：	5 L/min

2.2 色谱峰追踪功能

LabSolutions MD 具有针对不同数据的化合物精准识别、高效追踪的峰追踪功能，大大减少手动识别的繁琐程度，进而实现设计空间的精确构建。LabSolutions MD 自动峰追踪功能支持多种专属性追踪方式，如峰洗脱顺序、UV 光谱、MS 质谱相似度、峰面积及峰面积百分比、峰高度及峰高度百分比等，大大提高工作效率。本实验采用峰洗脱顺序、MS 质谱相似度对色谱峰进行追踪，结果如图 1 所示。

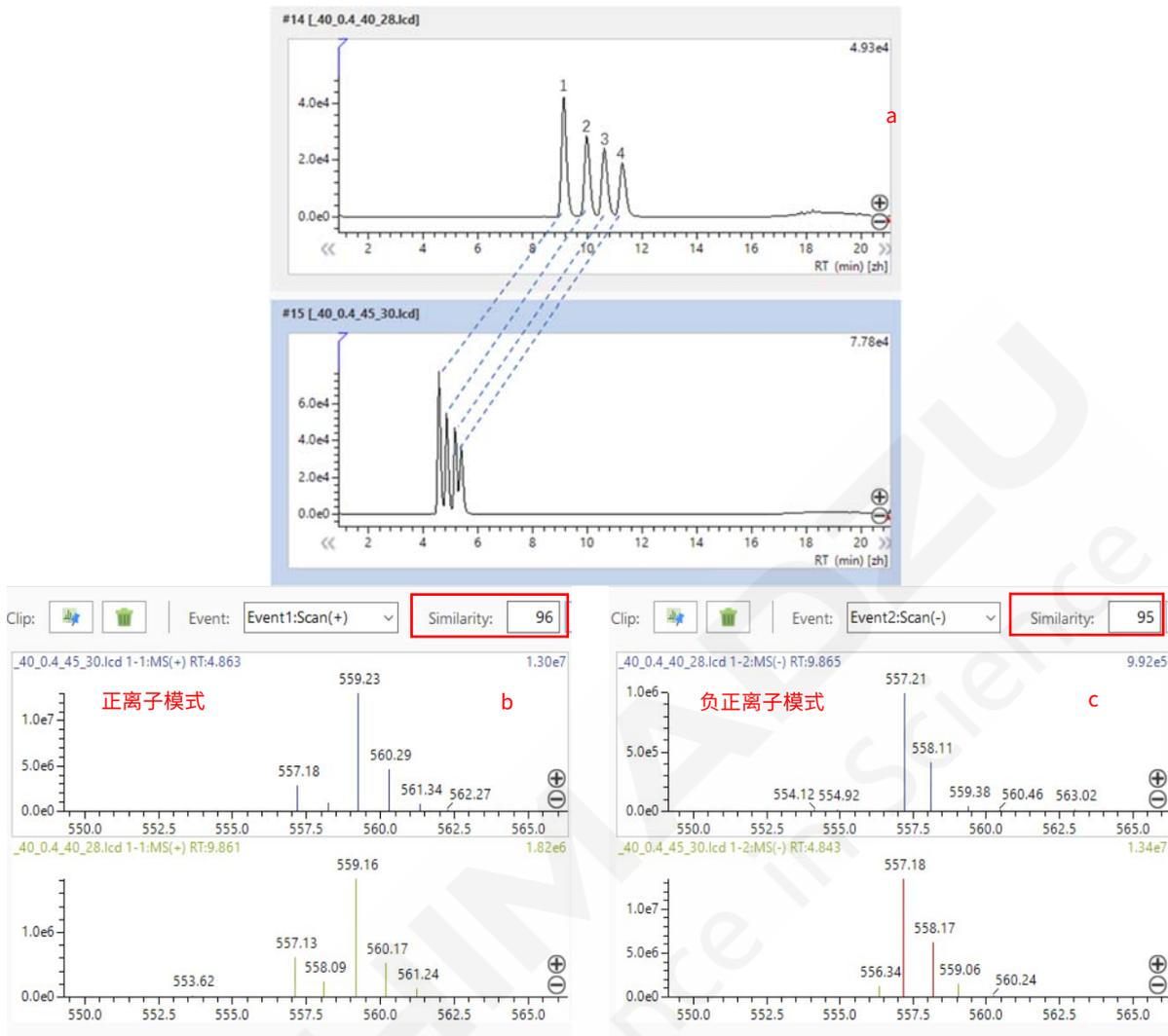


图 1. 峰追踪功能 (1 杂质 I、2 杂质 II、3 阿托伐他汀钙、4 杂质 III)

UV 峰追踪色谱图(a); 阿托伐他汀正离子模式比较质谱图(b); 阿托伐他汀负离子模式比较质谱图(c)

2.3 设计空间——分析条件可视化

基于峰追踪的结果，使用 LabSolutions MD 软件的根据已识别化合物的保留时间回归功能 [Regression using Identified RT] 对分析条件和分离关系进行评价，从而创建设计空间。创建得到的模型热力图如图 2 所示，其可以同时研究流速、柱温及 B 相起始浓度对色谱峰分离度的影响，将分析条件可视化，因此可以比较直观地确认阿托伐他汀钙分离良好的分析条件。

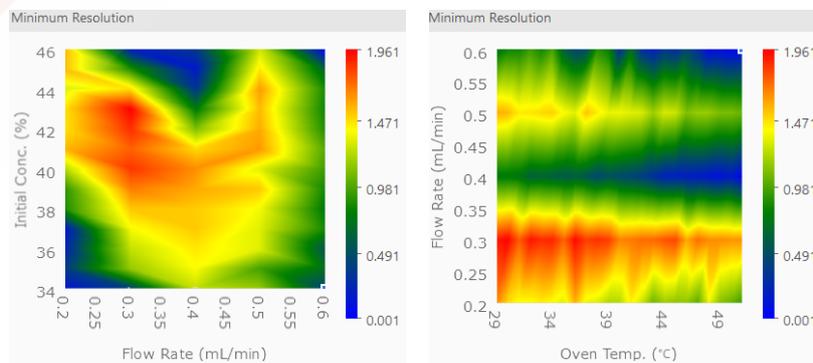


图 2. 最小分离度的设计空间

(左: B 起始浓度与流速的最小分离度设计空间; 右: 流速与柱温的最小分离度设计空间)

2.4 计算最佳分析条件

LabSolutions MD 软件可以根据绘制的设计空间来预测出最佳的分析条件。图 3 蓝色正方形为 LabSolutions MD 给出最佳分析参数，根据 LabSolutions MD 给出的最佳分析参数上机分析，色谱图如图 4 所示，各峰分离度均大于 1.5，结果参见表 2。

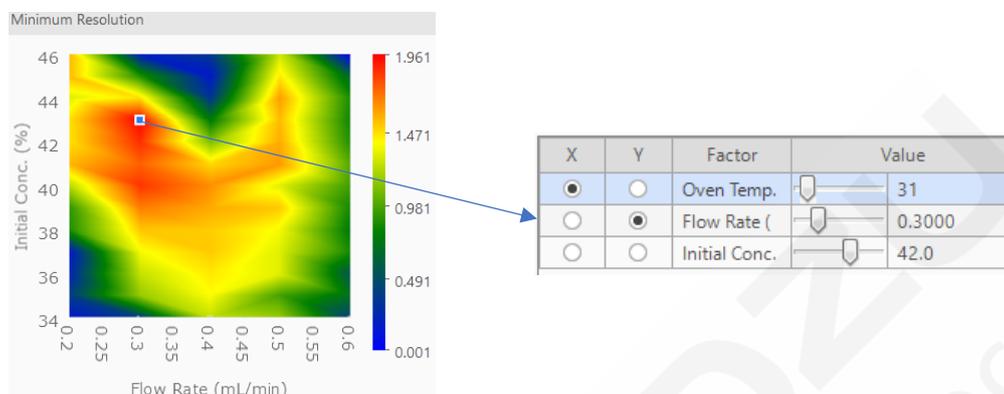


图 3. 最佳分析参数

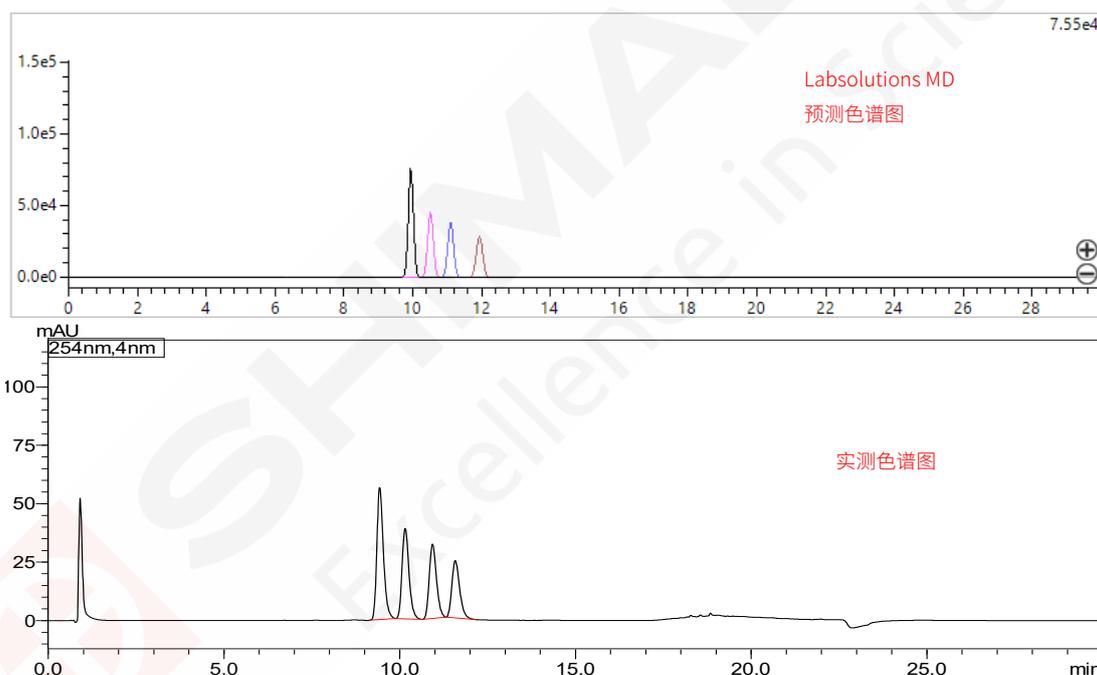


图 4. 最佳分析条件的色谱图

表 2. 最佳条件实测色谱图各峰分离度结果

化合物名称	杂质 I	杂质 II	阿托伐他汀钙	杂质 III
分离度	-	2.032	2.059	1.627

2.5 耐用性考察

使用 LabSolutions MD 软件进行耐用性考察，在软件中输入分析条件波动的允许范围，软件自动根据序贯设计创建批处理表，进行耐用性评估。在本例中，流速波动 0.1 mL/min、起始比例波动 1%、柱温波动 1°C，来验证对分离的影响。各响应因子的方差分析如图 5 所示，通过方差分析，柱温的 p Value 均大于 0.05，而起始浓度、流速的 p Value 均小于 0.05，说明在一定范围内各化合物的分离度与柱温的关联性较小，

但起始浓度和流速对整个分离相对影响程度更大，在后续方法转移及稳定性测试的时候要严格控制。



图 5. 方差分析结果

2.6 阿托伐他汀钙有关物质确证

《中国药典》阿托伐他汀钙检查项下有关物质测定法共检测七种杂质，其中杂质I、杂质II、杂质III和阿托伐他汀钙的结构相近，色谱保留行为类似，实现完全分离存在挑战；而杂质VII极性很强、反相色谱保留小，杂质VI和杂质V极性较弱，反相色谱保留强。相对而言实现杂质VII、杂质VI和杂质V的基线分离，难度较小。因此本实验初期以四种难分离的化合物（杂质I、杂质II、杂质III和阿托伐他汀钙）建模，实现方法开发的效率最大化。为研究的充分性及方法的普适性，将《药典》中剩余四种杂质加入，验证新建方法的适用性。

按照2.4预测的分析条件测定系统适用性溶液，色谱图如图6所示。结果表明，系统适用性溶液色谱图中，出峰顺序为杂质VII、杂质I、杂质II、阿托伐他汀钙、杂质III、杂质IV、杂质VI、杂质V，阿托伐他汀钙与杂质II之间的分离度为2.068，以上符合系统适用性要求（《药典》项下有关物质系统适用性要求阿托伐他汀钙与杂质II之间的分离度应不小于1.5），可用于阿托伐他汀钙有关物质的测定。与《药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，该方法流动相未使用THF，液相及质谱溶剂兼容性更高，且分析时间与《药典》中的130 min相比，仅为25 min，大大提高分析效率。

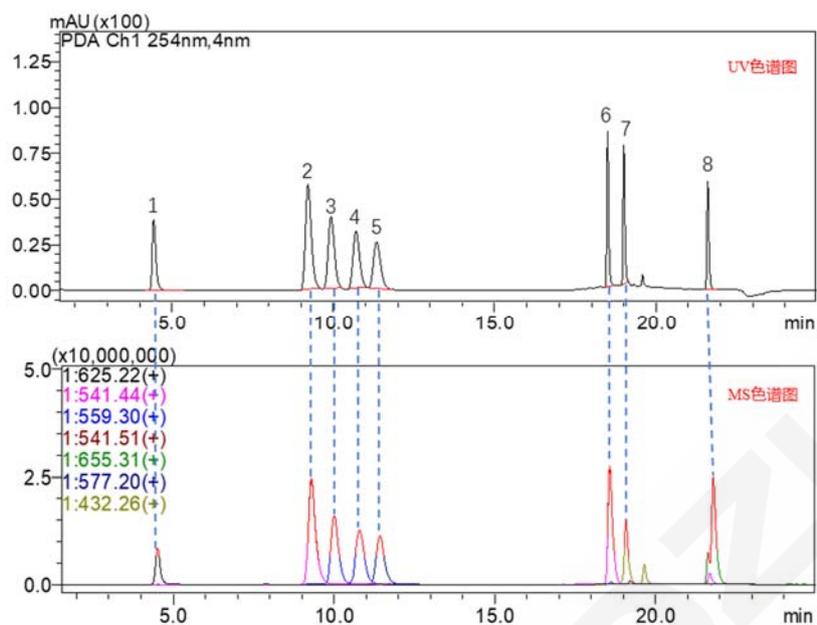


图 6. 系统适用性溶液色谱图

(1 杂质 VII、2 杂质 I、3 杂质 II、4 阿托伐他汀钙、5 杂质 III、6 杂质 IV、7 杂质 VI、8 杂质 V)

3. 结论

本文使用岛津 HPLC 方法开发系统结合 LabSolutions MD 对阿托伐他汀有关物质测定进行了方法开发。在 LabSolutions MD 软件的使用了峰追踪、设计空间构建、方差分析等功能，获得了最佳分析条件。与 2020 版《中国药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，液相质谱溶剂兼容性更高，分析时间也大大缩短。Labsolutions MD 软件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。

优化药品中抗衡离子

技术特点

- ❖ 通过使用软件，轻松而全面地改变各参数，高效地开发分析方法。
- ❖ 直观地评价分离度和分析参数的关系，掌握有效的参数区域。

由于作为药品有效成分的物化性质和药代动力学性质会因抗衡离子的不同而异，因此我们会在药品开发阶段研究多种抗衡离子，并选择最优的盐。此外，合成阶段使用的催化剂和离子等无机杂质残留会影响产品的安全性、溶解性和稳定性等性质，因此将离子作为杂质进行分析也非常重要。本文将介绍使用离子排阻色谱法，对经常被用作药品抗衡

离子有机酸的甲酸、乙酸、富马酸和马来酸进行分析的示例。此次，我们使用分析方法开发支持软件 LabSolutions MD 和一体型高效液相色谱仪 LC-2050C 3D，通过绘制设计空间，将各成分在综合改变各种参数时的变化进行可视化，并对分析条件进行了优化。

1. 实验部分

1.1 分析条件

在离子排阻模式下，成分的保留行为取决于色谱柱温度和流动相中的酸浓度，且保留时间会因分析条件的不同而发生很大的变化，因此需要研究一种能够良好分离目标成分的分析条件。

我们使用 LabSolutions MD 研究了能够良好分离甲酸、乙酸、富马酸和马来酸 4 种成分的分析条件。除考察对分离较大的酸浓度外，还考察了柱温箱温度，全面系统的研究了影响因素。具体为以 1 mmol/L 为步长，在 1 ~ 5 mmol/L 的范围内改变酸浓度，以 5°C 为步长，在 30°C ~ 50°C 的范围内改变柱温，分析条件如表 1 所示。

表 1. 实验设计表

流动相：	
A 相	: H ₂ O
B 相	: 10 mM 高氯酸
色谱柱：	
1	Shim-pack Fast-OA (100 mm × 7.8 mm I.D., 5 μm) × 2, P/N: S228-59942-41
2	Shim-pack Fast-OA (G) (10 mm × 4.0 mm I.D., 5 μm), P/N: S228-59942-42
分析条件：	
B 浓度	: 10, 20, 30, 40, 50% (5 水平)
柱温	: 30, 35, 40, 45, 50°C (5 水平)
流速	: 0.8 mL/min
检测波长	: PDA (210 nm)
	进样体积 : 10 μL

2.结果与讨论

2.1 谱峰自动跟踪

LabSolutions MD 具有通过使用多个参数来鉴定峰的功能。本实验针对每个成分，通过组合使用高度百分比和峰洗脱顺序这两个参数来鉴定每个峰，进行了色谱峰的跟踪(图 1)。

与其他有机酸相比，富马酸的保留时间会因酸浓度和柱温箱温度的不同而显著变化。对洗脱顺序不变的马来酸，通过峰高百分比和洗脱顺序进行筛选，其他成分则仅使用峰高进行追踪。即使富马酸峰洗脱顺序发生了变化，也成功自动追踪到相应的色谱峰。

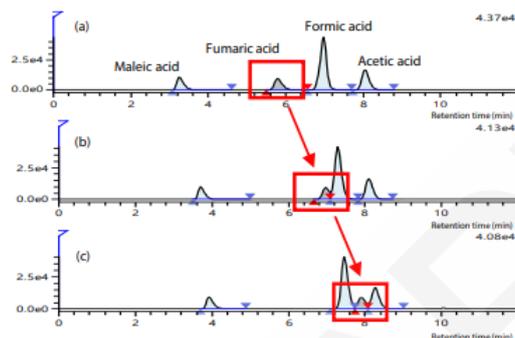


图 1. 各分析条件下的色谱图

柱温：50°C，B 浓度：10% (a)；柱温：50°C，B 浓度：30% (b)；柱温：35°C，B 浓度：40% (c)

2.2 通过设计空间对分离度进行可视化

LabSolutions MD 能够绘制设计空间，能够可视化分析条件和分离的关系并进行评价。基于化合物的保留时间信息，流动相 B 浓度为纵轴、柱温为横轴，在高度方向绘制各峰最小分离度的设计空间(图 2)。暖色区域表示响应高和最小分离度大的区域，由此直观地判断了有效的分析条件。

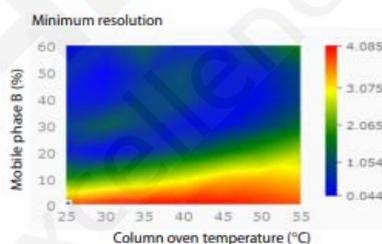


图 2. 有关参数和响应的设计空间

LabSolutions MD 还能够针对特定化合物的绘制设计空间，从而对每种成分进行分离和分析条件的评价。甲酸和乙酸的分度下限值分别设为 1.5 时的设计空间如图 3 所示。根据该图可知，左上角区域甲酸的分度 ≥ 1.5 ，但乙酸在该区域与其他成分的分度不佳。此外，通过 2D 轮廓线将分度进行重叠，可以从多个维度对有效区域进行评价，可直观地确认每种成分之间的关系以及分度 ≥ 1.5 的有效区域(图 4)。

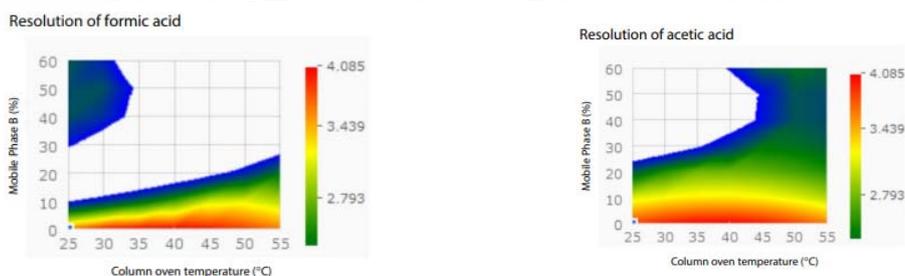


图 3. 各成分分离度相关的设计空间

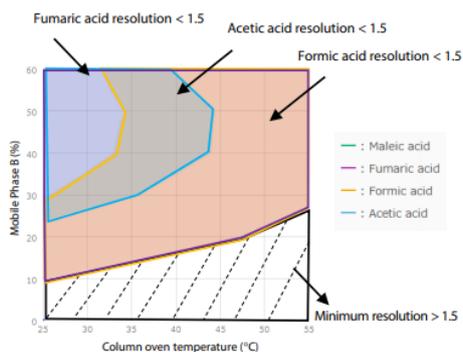


图 4. 2D 轮廓线重叠

2.3 给出最佳分析条件

LabSolutions MD 具有根据模型分析结果来搜索最佳条件的功能。通过使用该功能，能够在各种分析参数的整个变化区域内给出分离良好且具有高稳健性的分析条件。对此，我们研究了最小分离度的最优值，并确认了相关参数(图 5)。

根据给出的分析参数预测出的色谱图和实测色谱图分别如图 6 所示，确认了各种成分的分和保留时间没有显著偏差。

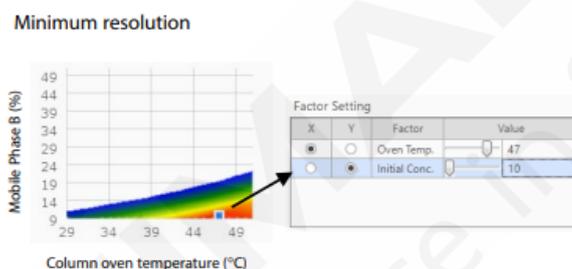


图 5. 给出的最佳分析参数

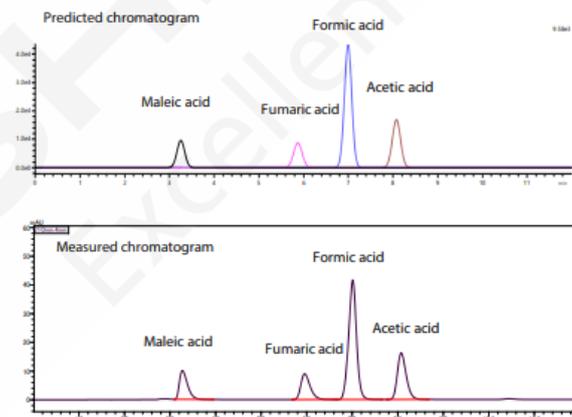


图 6. 预测色谱图和实测色谱图

3. 总结

使用 LabSolutions MD 研究了分离 4 种有机酸的方法开发。通过使用多个峰追踪参数（如出峰顺序、高度百分比等），即使峰洗脱顺序发生变化的成分也自动完成了峰的鉴定。通过绘制设计空间，能够直观掌握各种参数变化对分离度的影响，并确认最佳分析条件。因此，LabSolutions MD 可以根据理论对分析条件进行优化，而减少对主观判断的倚重，强调实证研究和量化评估。

酮洛芬杂质分析方法开发

技术特点

- ❖ 将影响药物主成分和杂质分离度的关键因素可视化，有效寻找最佳分析条件。
- ❖ 通过可视化分析条件与不同区域色谱柱的热力图，能够高效地对色谱柱批次之间的差异进行耐用性评价。

为确保安全，需要严格管理药品中的有关物质并开发具有高可靠性的分析方法。LabSolutions MD 是一款基于 AQBd 的分析方法开发支持软件，可以满足分析方法的筛选、优化和稳健性评价等阶段。本文以酮洛芬有关物质方法开发为例，对流动相及色谱柱进行了系统优化，

最终开发出稳健耐用的分析方法。

在综合调整流动相组成、柱温箱温度、流速等各种参数时，通过可视化“设计空间”来评估每种化合物的分离度。在优化后的稳健性评价阶段，通过将设计空间应用于不同批次的色谱柱，以有效评估不同批次色谱柱的稳健性。

1. 实验部分

1.1 分析条件

酮洛芬与有关物质的分析条件如表 1 所示。不仅考察对分离影响较大的流动相组成，还通过改变柱温箱温度及流速，对酮洛芬与有关物质的分离进行了全面研究。具体参数如下：以 5% 的步长将乙腈比例从 40% 变为 60%（5 个级别），以 5°C 的步长将柱温箱温度从 35°C 变为 45°C（3 个级别），并以 0.1 mL/min 的步长将流速从 0.6 mL/min 变为 0.8 mL/min（3 个级别）。

表 1. 分析条件

仪 器	: Nexera™ X3 方法开发系统		
流 动 相	:		
	A	相	: 0.1% 甲酸水溶液
	B	相	: 乙腈
色 谱 柱	:		
	Shim-pack Velox C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 μm), P/N:227-32010-03		
分 析 条 件	: (等度洗脱)		
	B 相 浓 度	: 40, 45, 50, 55, 60% (5 个级别)	
	柱 温	: 35, 40, 45°C (3 个级别)	
	流 速	: 0.5 mL/min	进 样 体 积 : 0.1 μL
	检测波长	: 254 nm (SPD-M40, UHPLC 池)	

2. 结果与讨论

2.1 酮洛芬与有关物质的分离

等度洗脱时的乙腈比例为 60% 和 40% 时的色谱图分别如图 1 和图 2 所示（柱温箱温度 40°C、流速 0.7 mL/min）。色谱图中的 Imp1~3 为有关物质，当乙腈比例为 60% 时，Imp2 和 Imp3 和酮洛芬未实现基线分离。另一方面，当乙腈比例为 40% 时，Imp1~3 的峰完全分离，表明流动相中的乙腈比例对目标峰的分

离有显著影响。为确定最佳分析条件，创建我们乙腈比例、柱温和流速与分离度的设计空间，对分离度进行了可视化。

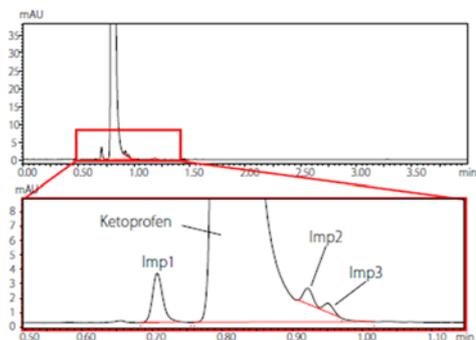


图 1. B 相浓度 60% 色谱图

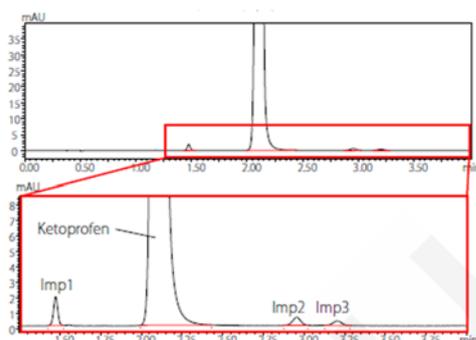


图 2. B 相浓度 40% 的色谱图

2.2 通过设计空间对分离度进行可视化

酮洛芬与 Imp2，以及 Imp2 与 Imp3 的分离度的设计空间如图 3 所示。图中的红色区域分离度较大，蓝色分离度相对小。LabSolutions MD 能够在各种参数的整个变化区域内给出具有良好分离和高稳健性的条件。在图 3 中（左下角的蓝色正方形），LabSolutions MD 设计空间显示，酮洛芬和 Imp2 以及 Imp2 和 Imp3 的最佳分离条件是乙腈比例为 40%、柱烘箱温度为 35°C、流速为 0.6 mL/min。利用设计空间，可以很容易地了解各参数对分离度的影响，实现科学的方法优化，从而找到最佳条件。

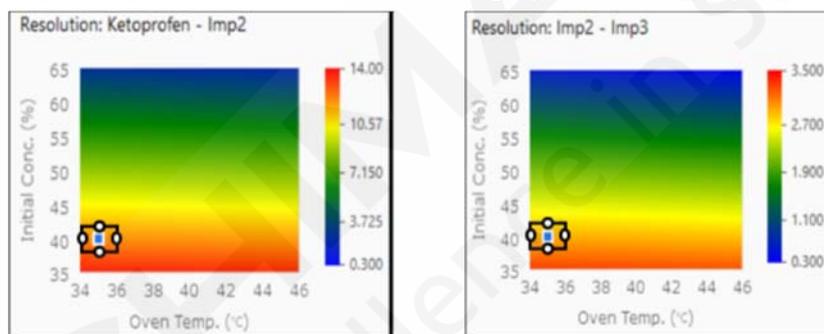


图 3. 酮洛芬与 Imp2（左）、Imp2 与 Imp3（右）的分离度的设计空间

2.3 稳健性评价

关于酮洛芬与有关物质的分离，我们对通过设计空间获得的最佳条件（乙腈比例 40%、柱温箱温度 35°C、流速 0.6 mL/min）。对乙腈比例（39%、40%、41%）、柱温箱温度（34°C、35°C、36°C）进行耐用性考察（图 3 中的蓝色点和 4 个白圈，共 5 点），验证了该变化对分离的影响。图 4 分别为酮洛芬与 Imp2（左），以及 Imp2 与 Imp3（右）的分离度可视化设计空间，整个设计空间内酮洛芬与 Imp2 的分离度大于 8、Imp2 与 Imp3 的分离度大于 2，均处于分离度较大的橙色和红色区域。这意味着酮洛芬与 Imp2、以及 Imp2 与 Imp3 的分离在乙腈比例和柱温箱温度的整个变化区域内分离良好，显示出通过设计空间优化的分析方法具备较高的稳健性。此外，为评价色谱柱批次间差异的稳健性，对另外两个批次的色谱柱创建了设计空间（图 5、图 6），色谱图如图 7 所示。在图 4~图 6 中，可知整个设计空间均处于高亮区域，分离度较大，表明优化后的条件的稳健性较高，与色谱柱批次无关。

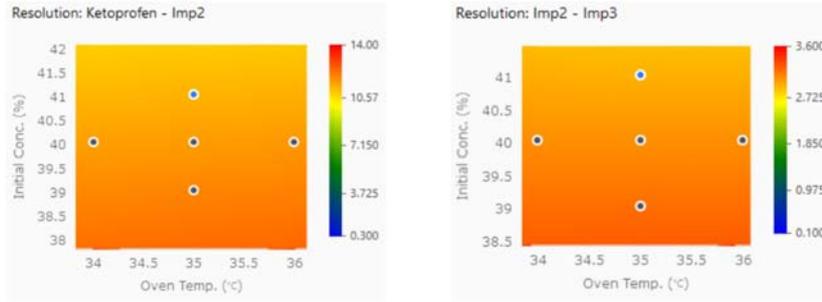


图 4. 耐用性酮洛芬与 Imp2 (左)、Imp2 与 Imp3 (右) 的分离度的设计空间

*图中的圆圈 (共 5 点) 表示进行了分析的点 (色谱柱批次 1)

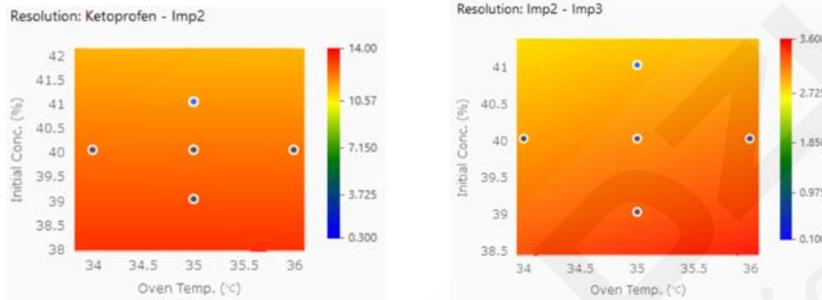


图 5. 耐用性酮洛芬与 Imp2 (左)、Imp2 与 Imp3 (右) 的分离度的设计空间

*图中的圆圈 (共 5 点) 表示进行了分析的点 (色谱柱批次 2)

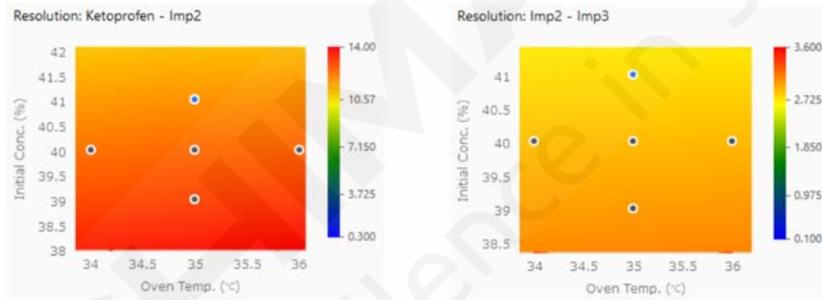


图 6. 耐用性酮洛芬与 Imp2 (左)、Imp2 与 Imp3 (右) 的分离度的设计空间

*图中的圆圈 (共 5 点) 表示进行了分析的点 (色谱柱批次 3)

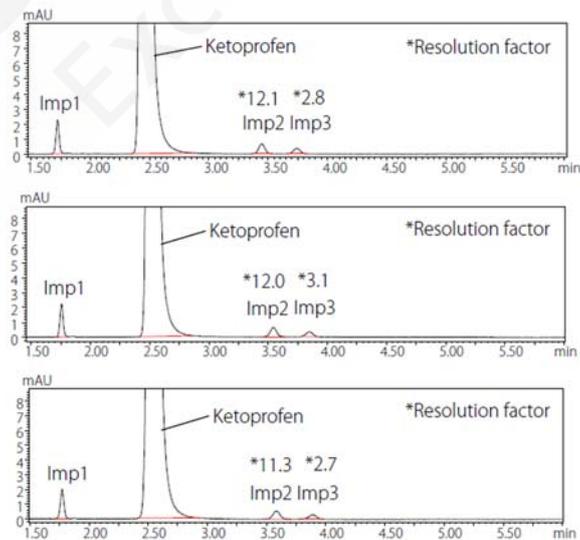


图 7. 不同批次的色谱柱 (图 4~图 6 的点 A) 的色谱图

(上: 批次 1、中: 批次 2、下: 批次 3)

3. 总结

本文以 LabSolutions MD 稳健高效开发药物有关物质分析方法为例，通过设计空间可视化 API 和杂质的分离度，可以在不完全依赖用户经验的情况下对分析方法进行有效的优化和稳健性评估，还可以通过构建不同批次的色谱柱的设计空间，来评估色谱柱的稳健性。本文介绍的有关物质方法开发过程不仅有助于提升分析方法的可靠性，还可以有效的提升分析方法验证的效率。



单四极杆质谱仪对药物杂质进行高效的方法开发

摘要：本文介绍了 LabSolutions MD 在开发孟鲁司特钠（一种用于哮喘维持治疗的药物）杂质的 LC 分析方法中的应用。通过“设计空间”进行可视化以及改变梯度程序的各个参数来评估孟鲁司特钠和各种杂质的分离度。虽然以前很难用光电二极管阵列检测器（PDA）准确跟踪具有相似紫外光谱的各种杂质，但 LCMS-2050 可以解决这个问题。此外，利用分离度和最后一个洗脱峰的 RT 的设计空间，可以有效地开发出既能提供出色分离度又能缩短分析时间的方法。

技术特点

- ❖ 使用 LCMS-2050 单四极杆质谱仪进行峰跟踪，可通过准确跟踪具有相似紫外光谱的各种杂质来支持高度可靠的方法开发。
- ❖ 使用 LabSolutions MD 开发分析方法不仅能够提供出色分离度还能缩短分析时间。

1. 实验部分

1.1 分析条件

表 1 显示了孟鲁司特钠及其杂质分离的优化研究中使用的分析条件。通过改变最终梯度浓度和梯度程序的斜率，研究了孟鲁司特钠及其杂质的分离度，以找到最佳条件。最终浓度的变化范围为 75%至 85%，增量为 5%（3 个水平），梯度斜率的变化范围为 8 min 至 18 min，增量为 5 min（3 个水平）。

表 1. 优化的分析条件

液相色谱条件：	Nexera™ X3（方法开发系统）	
流动相：	泵 A: 0.15 %甲酸水溶液	
	泵 B: 0.1 %甲酸乙腈溶液	
色谱柱：	Shim-pack Scepter Phenyl-120（100 mm × 3.0 mm 内径，1.9 μm）	
分析条件		
初始 B 浓度：	45 %	
最终 B 浓度：	75、80、85%（3 个水平）	
梯度斜率：	8、13、18min（3 个水平）	
时间程序	： B 浓度 45%（0-3 min）→75%（11 min）→85%（11.01-13 min）→45%（13.01-18 min）注：如果最终 B 浓度为 75%，梯度斜率为 8min	
柱温：	30 °C	
流速：	0.5 mL/min	
进样量：	10 μL（1000 mg/L）	
检测器（PDA）：	238 nm（SPD-M40，UHPLC 流通池）	
质谱条件：	LCMS-2050	
离子源：	ESI/APCI（DUIS），正负离子模式	
扫描范围：	SCAN（m/z 400-800）	Qarray 电压：+20 V
雾化气流量：	2.0 L/min	干燥气流量：5.0 L/min
加热气流量：	7.0 L/min	脱溶剂温度：450 °C
D L 温度：	200 °C	接口电压：+3.0 kV / -2.0 kV

2. 结果与讨论

2.1 利用 LCMS-2050 准确跟踪峰

图 1 显示了在最终梯度浓度为 80%，梯度斜率为 8min 和 18min 时获得的 LC 色谱图，以及各杂质（杂质 1 到 6）的 m/z。图 2 显示了杂质 1 到杂质 6 的紫外光谱。杂质 1 和杂质 6（相似度>0.99）、杂质 2 和杂质 4（相似度>0.9）、以及杂质 3 和杂质 5（相似度>0.999）的紫外光谱之间的相似度非常类似，基于紫外光谱进行峰跟踪难度很高。相比之下，LabSolutions MD 通过 LCMS-2050 进行了基于 m/z 的峰跟踪，以准确鉴定具有相似紫外光谱的杂质（图 1）。

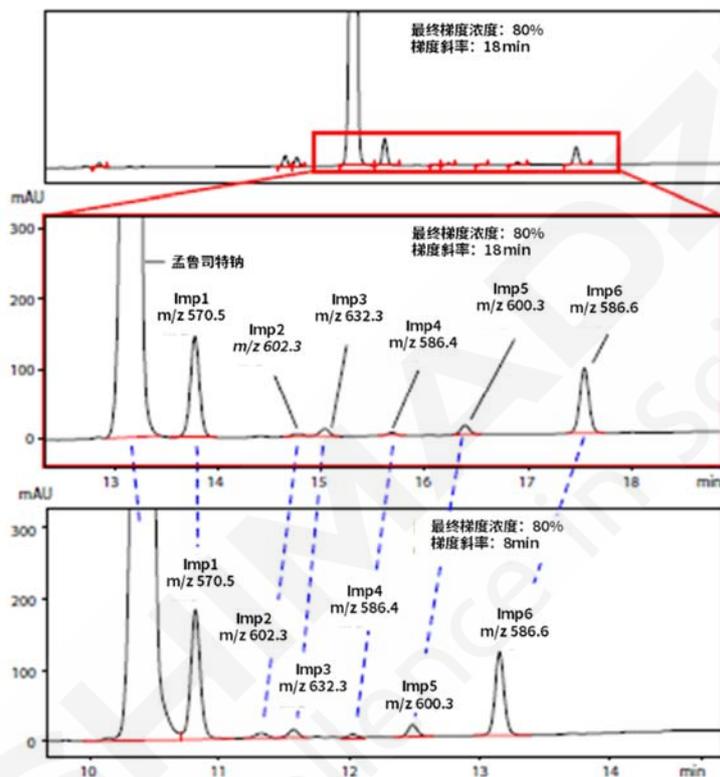


图 1. 最终梯度浓度为 80%、梯度斜率为 8 min（下）和 18 min（上）基于 m/z 峰追踪色谱图

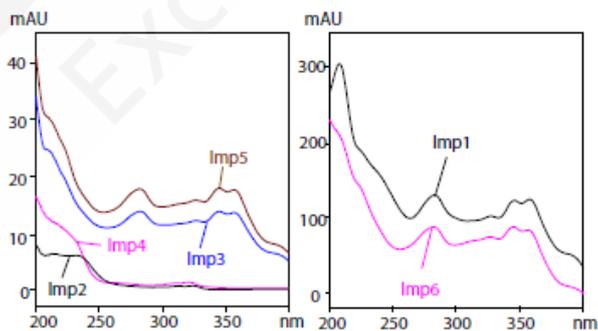


图 2. 孟鲁司特钠杂质（杂质 1 到 6）的紫外光谱图

2.2 最佳分析条件的设计空间评估

为了确定最佳的分析条件，当最终浓度和梯度斜率发生变化时，通过设计空间对分离度进行了可视化。图 3 显示了孟鲁司特钠和杂质 1 分离度的设计空间。红色区域表示分离度较高，蓝色区域表示分离度较低。通过设计空间对分离度进行可视化，表明较低的终浓度和较长的梯度斜率可以实现更好的分离。

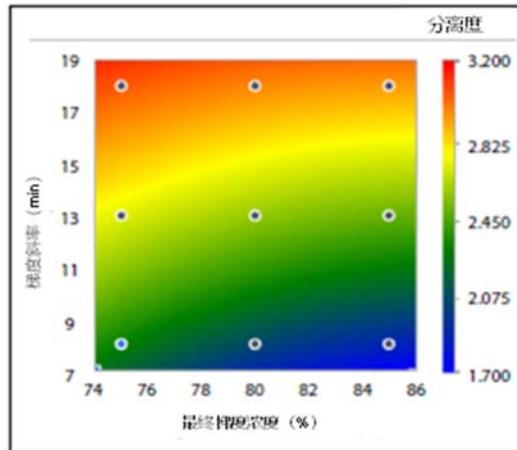


图 3. 孟鲁司特钠和杂质 1 分离度的设计空间

LabSolutions MD 可以通过叠加设计空间来简化对最佳分析条件的筛选。图 4 显示了满足孟鲁司特钠和杂质 1 分离度 >2.6 时的分析条件面积，各化合物的最小分离度 >1.2 ，最后一个洗脱峰（杂质 6）的 $RT < 17$ min。图中绿线围成的区域是最小分离度 <1.2 的区域，蓝线围成的区域是孟鲁司特钠和杂质 1 分离度 <2.6 的区域，粉线围成的区域是最后一个洗脱峰的 $RT > 17$ min 的区域，剩下的区域（由黑色阴影线所示）是满足所有标准的情况。在画有阴影线的面积内，分析时间最短的最佳点在 A 点附近，该点用红色圈出。因此，通过叠加分离度和最后一个洗脱峰的 RT 的设计空间，可以很容易地找到提供足够分离度和较短分析时间的最佳条件。

利用设计空间能够很容易地了解 LC 参数如何影响相关参数，如分离度和 RT 。这意味着可以在不依靠用户经验的情况下确定一个可靠的分析方法。

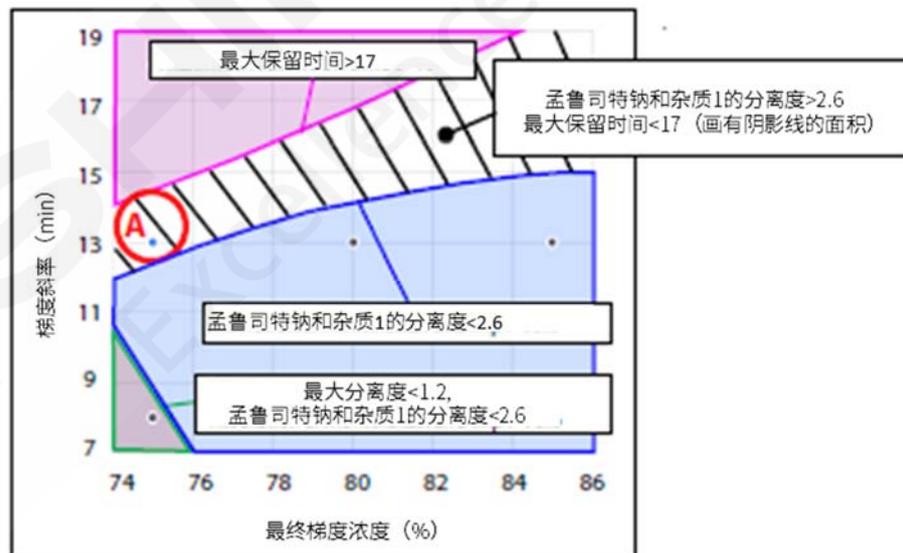


图 4. 分离度和最后一个峰出峰时间的设计空间的叠加

2.3 最佳条件下的色谱图

在最佳条件下得到的色谱图（A 点）如图 5 所示。结果显示，孟鲁司特钠和杂质 1 的分离度为 2.7，各杂质的最小分离度为 1.4（杂质 3），最后一个洗脱峰的保留时间小于 17 分钟，成功满足了标准。

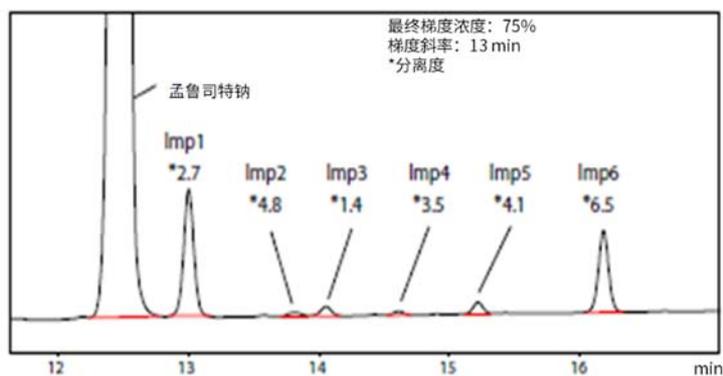


图 5. 在最佳条件下的色谱图

3. 结论

本文介绍了通过使用 LabSolutions MD 和 LCMS-2050 对药物杂质进行高效的方法开发。基于 m/z 的峰跟踪，即使在紫外光谱相似的情况下，也能准确鉴别各种杂质。将每个化合物的分离度和最后一个洗脱峰的 RT 的图谱进行可视化和叠加，可以轻松开发出更高效（分离度）且快速（分析时间）的方法，无需考虑用户体验。

寡核苷酸及其相关杂质的分析方法开发

技术特点

- ❖ 通过 LabSolutions MD 可以提高寡核苷酸和相关杂质最佳分离条件的方法开发工作效率。
- ❖ 寡核苷酸和相关杂质峰可以通过单四极杆质谱仪 LCMS™-2050 进行正确追踪。
- ❖ 惰性 UHPLC 系统 Nexera™XS inert、Shim-pack Scepter™Claris (惰性柱) 可抑制寡核苷酸的金属配位吸附, 并获得良好的峰形。

以反义寡核苷酸等为代表的核酸药物通过作用于细胞内外的靶点(基因、蛋白等)发挥药效。核酸药物是通过化学合成生产的, 但在其合成过程中会引入错误长度的产物以及保护基团等多种杂质, 因此, 如何正确分离含有杂质的大量寡核苷酸是一大挑战。LC 分析中, 反相离子对色谱法(RP-IP)是一种分离带有电荷的物质时常用的分离模式。在 RP-IP 中, 分离模式会随着流动相的离子对试剂添

加浓度以及有机溶剂成分的不同而发生变化, 但是, 变化的模式取决于寡核苷酸链长、碱基组成和修饰键的有无等, 因此, 针对每个目标序列分别进行分离优化尤为重要。本文介绍使用分析方法开发辅助软件 LabSolutions MD, 针对具有不同链长和修饰键的寡核苷酸及相关杂质, 分别通过筛选和优化阶段, 高效地实现寡核苷酸和相关杂质的最佳分离。

1. 实验部分

1.1 样品信息

作为测定样品使用的寡核苷酸序列(共 6 种)如表 1 所示。将全长的产物(FLP)以及 3' 端、5' 端缺失 1 个或 3 个碱基的 n-1(3')、n-1(5')和 n-3 的缺失体、或添加 1 个碱基的 n+1 加合体、5' 端的由硫代磷酸酯修饰为磷酸二酯键的 PS→PO 突变体的 5 种杂质, 共计 6 种物质的混合样品作为合成反义寡核苷酸的模型样品使用。

表 1. 样品寡核苷酸序列表

名称	序列(5' →3')	长度
FLP	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT- dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	20 mer
n-1(3')	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT- dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*	19 mer
n-1(5')	mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG- dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	19 mer
n-3	T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA- A*-T*-mC*-mC*-mC*	17 mer
n+1	T*-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA- dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	21 mer
PO	FLP 5' 端的PS→PO变化体	20 mer

备注: * = 2' -O-methoxyethyl, m = 5-methyl, d = 2' -deoxy, PS(full)

2. 结果与讨论

2.1 流动相的筛选

筛选阶段(分析条件: 表 2)中主要考察对保留和分离造成重大影响的参数, 研究了水相流动相中的

HFIP 以及离子对试剂（三乙胺：TEA）的添加浓度、有机流动相中的乙腈和甲醇混合比例。具体来说，将 HFIP 的添加浓度设为 100、200mmol/L（2 种水平）、TEA 的添加浓度设为 5、10、15、20mmol/L（4 种水平）、有机流动相中的乙腈比例设为 0、50、100%（3 种水平），共创建了 24（2×4×3）种实验设计，以搜索最佳的组合。LabSolutions MD 可以按照流动相和色谱柱等各种参数组合自动生成实验设计，不会出现失误。此外，使用流动相混合功能，可以自动制备含不同 HFIP 和 TEA 添加浓度以及有机溶剂比例的流动相。通过点击选择所使用的流动相，即可按照所选择的添加浓度和有机溶剂比例自动制备流动相，因此，不仅可以大幅减少手动制备的负担，还能防止出现制备失误。

表 2. 分析条件

液相色谱条件：		Nexera XS 生物惰性系统（方法开发系统）	
流 动 相 ：			
泵 A	流路 A	100 mmol/L HFIP 和 20 mmol/L TEA 水溶液	
	流路 B	100 mmol/L HFIP 水溶液	
	流路 C	200 mmol/L HFIP 和 20 mmol/L TEA 水溶液	
	流路 D	200 mmol/L HFIP 水溶液	
泵 B	流路 A	乙腈	
	流路 B	甲醇	
色 谱 柱 ：		Shim-pack Scepter Claris (100 mm ×2.1 mm I.D., 3 μm, P/N: 227-31210-05)	
分 析 条 件			
时间程序 (%B)：	6% (0-3 min) →24% (36 min) →50%(36-37 min) →6%(37-46 min)		
柱 温 度：	60 °C		
流 速 度：	0.4 mL/min		
进 样 量：	2 μL		
检测器 (PDA)：	260 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性池)		
质 谱 条 件 ：			
LCMS-2050			
离 子 源 ：	ESI/APCI (DUIS)，负离子模式		
扫 描 范 围 ：	SCAN (m/z 400-800)		
雾 化 气 流 量 ：	2.0 L/min	干 燥 气 流 量 ：	5.0 L/min
加 热 气 流 量 ：	7.0 L/min	脱 溶 剂 温 度 ：	450 °C
D L 温 度 ：	200 °C	接 口 电 压 ：	-2.0 kV

2.2 流动相的筛选结果

通过改变水相中的 HFIP 和 TEA 添加浓度、有机相中的乙腈和甲醇的混合比例形成的 24 种分析条件的色谱图（FLP 和各杂质，共 6 种）如图 1 所示。

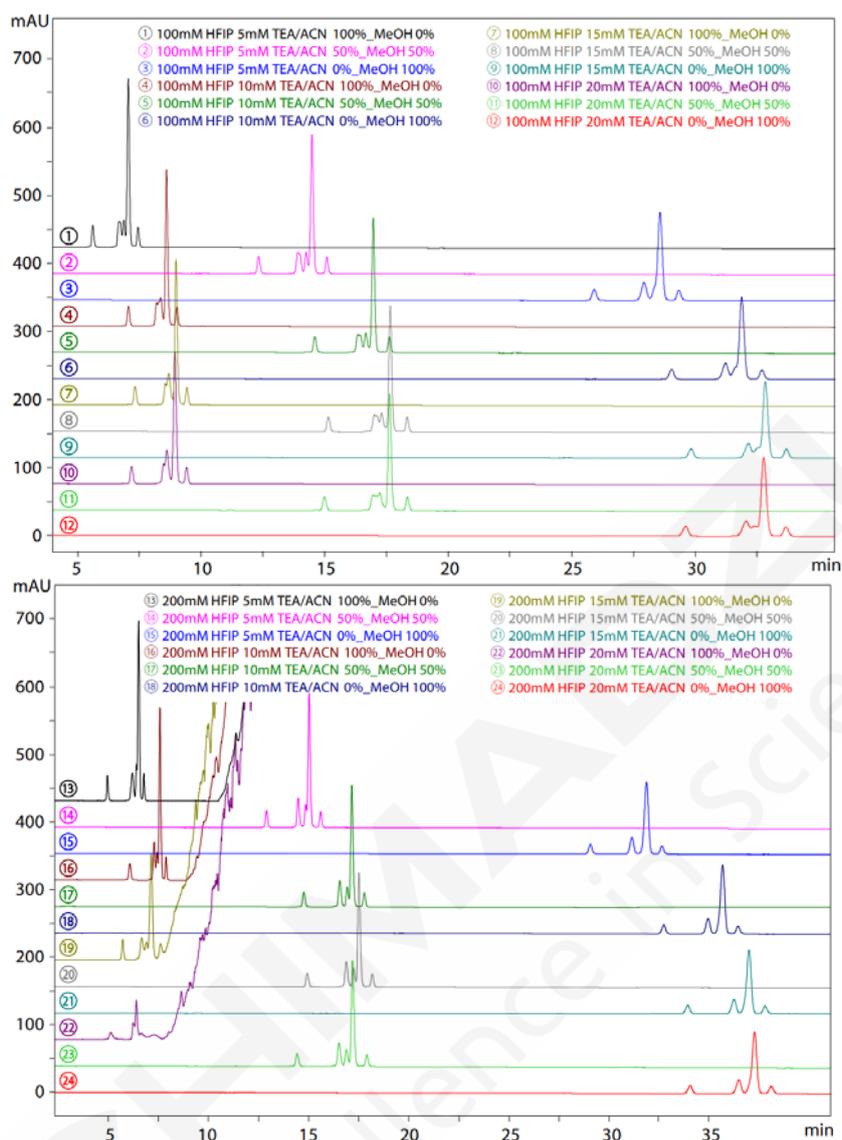


图 1. 通过流动相的筛选获得的色谱图 HFIP 添加浓度 100 mmol/L(上)、200 mmol/L(下)

由于 HFIP 和 TEA 的添加浓度以及有机溶剂成分不同，可以发现 FLP 和各杂质的保留和分离会发生很大变化。另外，在 HFIP 为 200mmol/L、乙腈为 100%的条件（图 1 中的⑬、⑯、⑲、⑳）下，观察到了基线的变化。这可能会对各样品的峰形以及定量造成影响。

2.3 通过筛选结果快速搜索最佳流动相条件

为了在筛选中获得与研究条件数量一致的色谱图，需要对各个分析条件获得目标物的分离效果进行评估，但这项工作需要具有色谱法相关知识和经验，而且十分耗时。LabSolutions MD 可以使用如下的公式 1 对各条件下的分离状态进行定量评估和排序，不依赖分析人员的感觉和经验，任何人都可以快速、轻松地搜索最佳条件。

$$(\text{评价}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{P-1}) \dots \quad (\text{公式 1})$$

评价值可通过峰检测数 (P) 和分离度 (Rs) 总和的乘积进行计算。将筛选阶段中得到的评价值按照从高到低的顺序表示，结果如图 3 所示。HFIP 的添加浓度为 100 mmol/L、TEA 的添加浓度为 10 mmol/L、有机流动相使用乙腈/甲醇=50:50 时获得最高的评价值，为 FLP 和各种杂质分离的最佳流动相条件（图 1 中⑤的色谱图、该色谱图在图 3 中放大显示）。另外，在各杂质中，n-1(5') 和 n-1(3') 的分离度最小，推

测这是因为 n-1(5') 和 n-1(3') 的链长相同，结构类似。

然后，在优化阶段，研究了柱温箱温度、梯度程序等各种 LC 参数的最佳水平，搜索了进一步改进分离度，具有更高稳定性的条件。

流动相A简称	流动相B简称	评价值
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	54.074
100mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	53.77
100mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	52.477
100mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	51.919
200mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	47.016
200mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.926
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.836
200mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	45.719
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 0%	38.822
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 0%	37.732

图 2. 综合评估排序（按照评价值从高到低的顺序显示前 10 的条件）

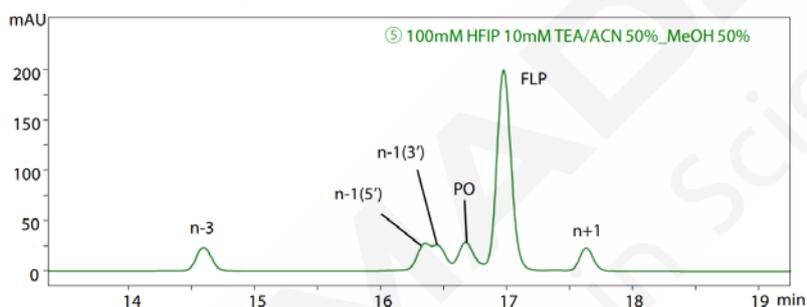


图 3. 评价值最高的色谱图（放大图 2 中 ⑤ 的色谱图）

2.4 各种 LC 参数的优化

针对在筛选过程中获得了最佳分离的水相及有机相，将有机流动相中的乙腈比例在 40、50、60%（3 种水平）中变化，柱温箱温度在 55、60、65°C（3 种水平）中变化，梯度初始浓度在 6、7、8%（3 种水平）中变化，优化了 FLP 和各杂质的分离。获得的色谱图如图 5~7 所示。从中观察到，有机流动相中的乙腈比例越高、柱温箱温度越高、梯度初始浓度越高，则各峰的分离度有越高的趋势。然后对 FLP 和各杂质进行峰值追踪，以实现分离度在设计空间中的全面可视化。

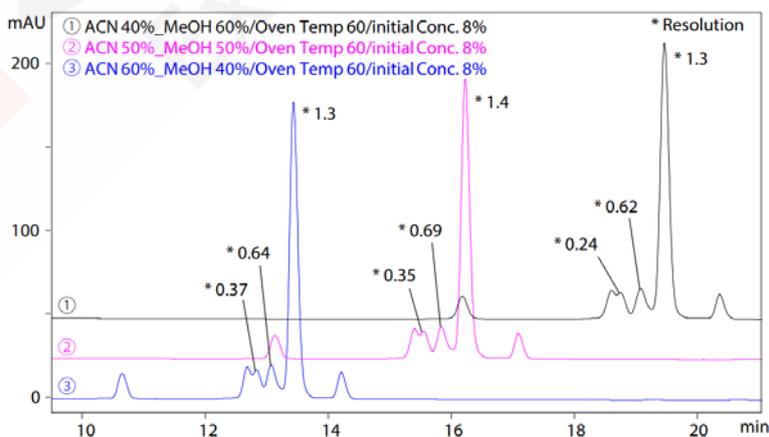


图 4. 改变乙腈比例的色谱图 40% (①)、50% (②)、60% (③)

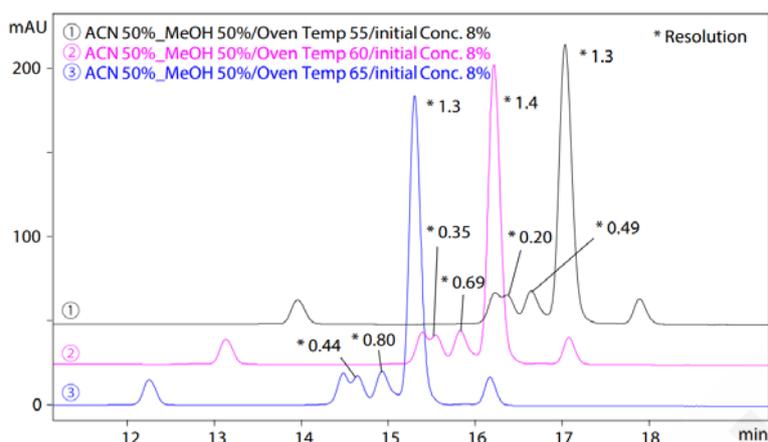


图 5. 改变柱温箱温度的色谱图 55°C(①)、60°C(②)、65°C(③)

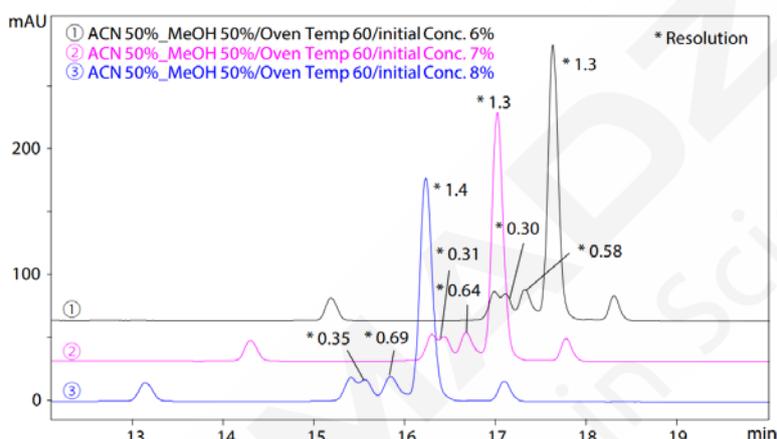


图 6. 改变梯度初始浓度的色谱图 6%(①)、7%(②)、8%(③)

2.5 杂质峰的 MS 追踪

在柱温箱温度为 60°C、梯度初始浓度为 8%、有机流动相中的乙腈比例为 50%和 60%的条件下获得的 LC 色谱图以及各杂质 MS 光谱的基峰 m/z 如图 7 所示，各杂质的 UV 光谱如图 8 所示。结果表明，在寡核苷酸的杂质中，n-3、n-1(5')、n-1(3')、PO、n+1 的 UV 光谱非常类似，相似度均为 0.99 以上，通过 UV 光谱进行追踪非常困难。另一方面，LabSolutions MD 可以依据 LCMS-2050 的质谱信息进行峰追踪，因此，针对 UV 光谱类似的有关物质，也能进行准确地鉴定（图 7）。

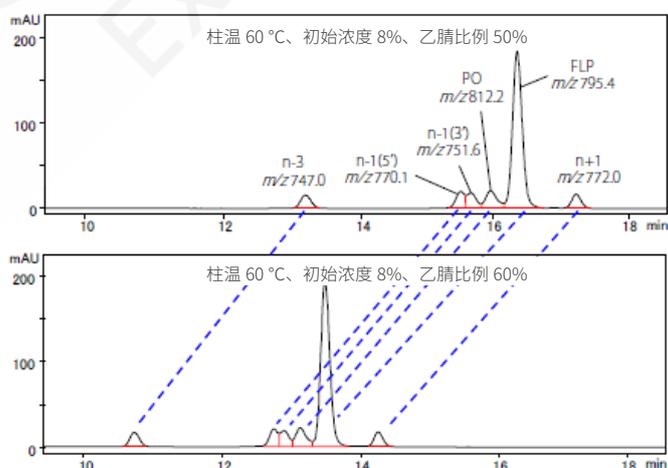


图 7. 柱温箱温度 60°C、初始浓度 8%、乙腈比例 50%(上)及 60%(下)的 LC 色谱图

*虚线表示通过质谱信息追踪有关物质

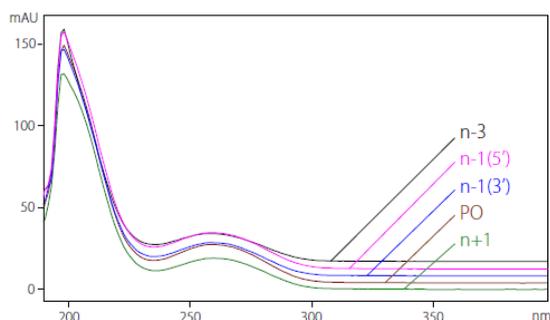


图 8 寡核苷酸的杂质的 UV 光谱

本研究追踪寡核苷酸的杂质时使用了通过 LCMS-2050 获得的质谱信息，LabSolutions MD 除质谱信息之外，还可以使用 UV 光谱相似度、面积值等的任意参数准确追踪分析对象的峰。即使因为分析条件的变更导致峰洗脱位置发生变化的情况下，也可以针对全部数据自动识别峰，大幅缩短鉴定所需的工作量（图 9）。只需从下拉列表中选择用于追踪的项目（图 9 中的红框内），即可轻松对所有数据进行峰追踪。

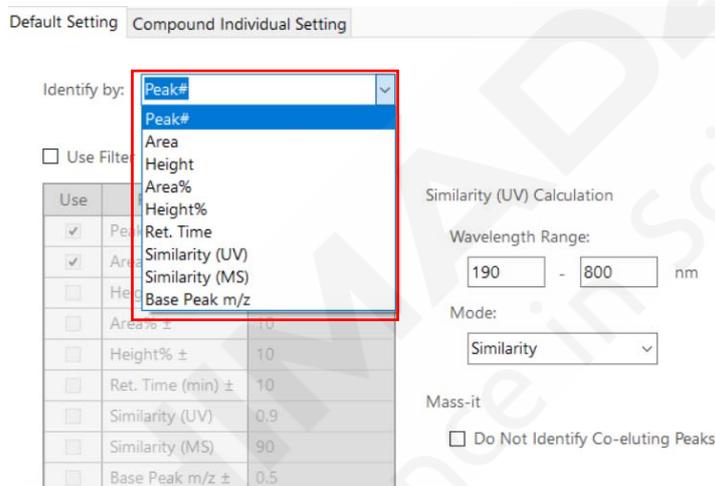
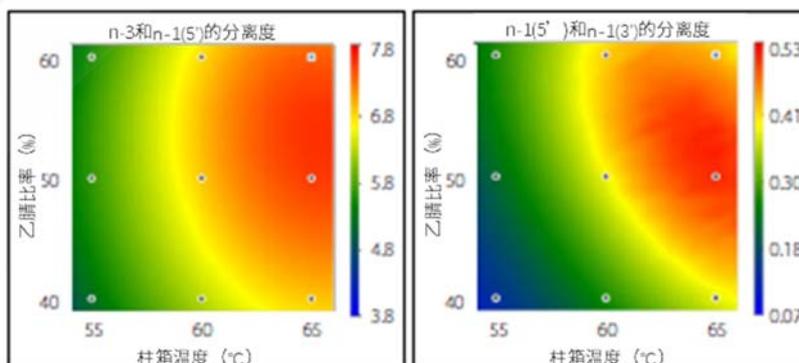


图 9. LabSolutions MD 的峰追踪设置画面

通过设计空间对 FLP 及各杂质的分离度进行可视化，搜索了具有良好的分离度和高稳定性的最佳分离条件。

2.6 通过设计空间预测最佳分析条件

将有机相中的乙腈比例、柱温箱温度与 FLP 和各杂质分离度的设计空间如图 10 所示。图中的红色区域表示分离度大、蓝色区域表示分离度小的区域。通过设计空间的绘制可知，柱温箱温度越高，分离效果越好，而乙腈的最佳配比与化合物有关。



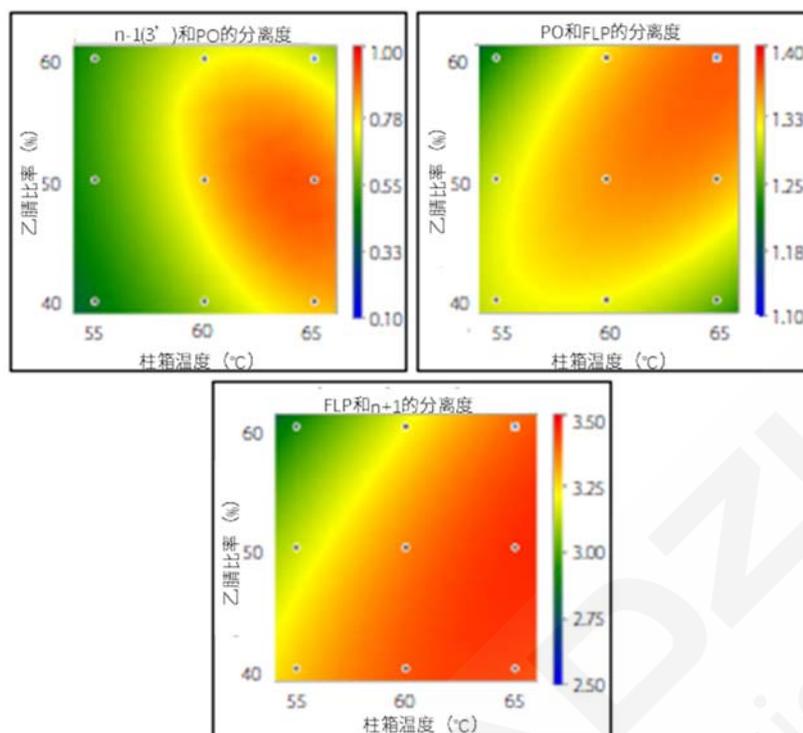


图 10. FLP 和各杂质的分离度的设计空间

*梯度初始浓度为 8%

LabSolutions MD 通过重叠绘制多个设计空间，可以自动搜索满足多个标准的最佳条件。例如，将最难分离的 $n-1(5')$ 和 $n-1(3')$ 的分离度最大、第 2 难分离的 $n-1(3')$ 和 PO 的分离度为 0.7 以上、最终峰 ($n+1$) 的保留时间 16 分钟以下作为标准，通过重叠绘制满足上述条件的条件区域进行搜索，确认最佳分析条件 (图 11)。图 11 的绿线内的区域表示 $n-1(3')$ 和 PO 的分离度小于 0.7 的区域，橙线内表示最终峰的保留时间大于 16 分钟的区域，剩下的区域用黑线阴影表示，红色圆圈内的点 A 是 $n-1(5')$ 和 $n-1(3')$ 的分离度最大的条件 (乙腈比例 54%、柱温箱温度 65°C、初始浓度 8%)。通过叠加最后一个洗脱峰的出峰时间和最小分离度的设计空间，可以很容易地找到同时满足分离度和更短分析时间的最佳条件。

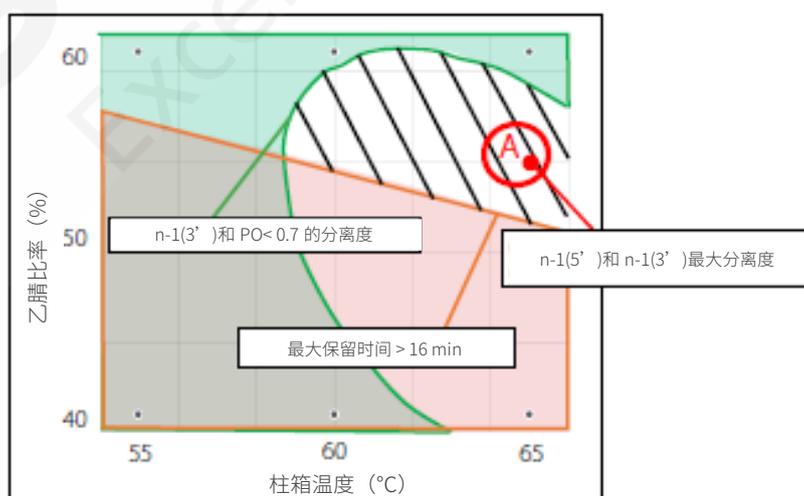


图 11. 通过重叠绘制设计空间搜索最佳条件

2.7 最佳分离条件下的色谱图

通过设计空间搜索的最佳条件（点 A）下的色谱图如图 12 所示。n-1(3') 和 PO 的分离度为 0.7 以上、最终峰 (n+1) 的保留时间在 16 分钟以内，并考虑到缩短分析时间，完成了对分离的优化。虽然 n-1(5') 和 n-1(3') 的链长相同，结构类似，但可通过设计空间将分离度进行全面可视化，减轻对分析者专业要求，以模型和算法作为决策支持工具进行分离优化。

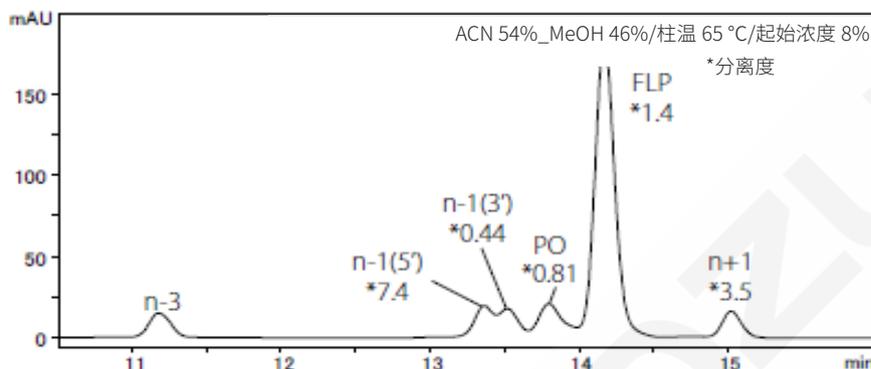


图 12. 优化条件下的色谱图

HFIP 的添加浓度 100 mmol/L、TEA 的添加浓度 10 mmol/L

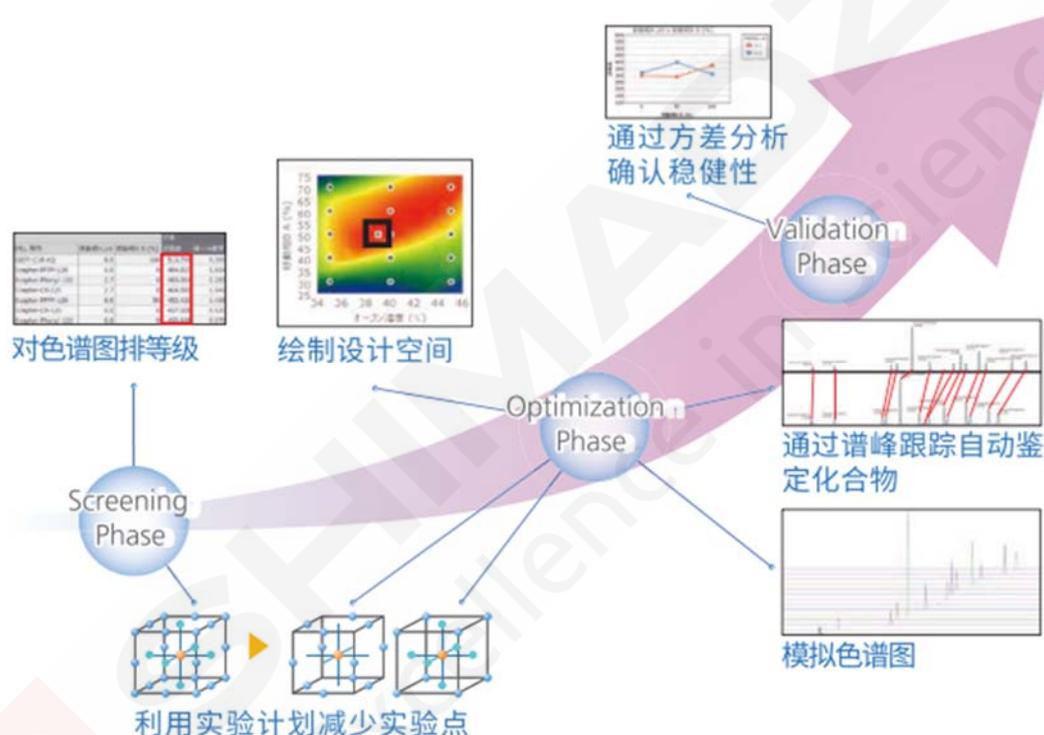
3. 结论

在寡核苷酸的分析中，分离度随着添加到流动相中的 HFIP 以及离子对试剂的浓度、有机溶剂成分、柱温箱温度以及梯度程序等各种 LC 参数的不同而发生变化。另外，变化的行为取决于寡核苷酸链长、碱基组成和修饰键的有无等，因此，需要针对每个目标序列分别进行分离优化。另一方面，针对各目标序列分别进行全面分析，解析所获得的庞大的数据，搜索最佳条件都需要耗费大量的工作量。使用 LabSolutions MD 时，可自动创建实验设计和制备流动相，另外，在分析方面，可实现峰追踪的自动化，通过设计空间高效地搜索最佳条件。如本文的所示，通过 LabSolutionsMD 与惰性 UHPLC 系统 NexeraXSinert、Shim-packScepterClaris（惰性柱）、单四极杆质谱仪 LCMS-2050 的组合，可以提高寡核苷酸分析方法开发工作流程的效率。

3.3 复杂多组分化合物方法开发

开发适用于复杂多组分同时分析的 HPLC 方法是一项技术要求高且综合性强的工作，涉及多学科知识的融合与应用。面对成分复杂、性质各异的混合物，研究人员通常需要通过一系列色谱柱和多种流动相的组合试验来探索最优方法，以确定最适合分离特定化合物的条件。为了获得最佳分离效果，还需对梯度洗脱、柱温、pH 值等关键参数进行精细调整，不断优化和完善 HPLC 分析方法。

本章将介绍 Labsolutions MD 方法开发软件应用于复杂多组分同时分析的应用案例，该软件通过系统的实验设计和自动化筛选工具，帮助研究人员快速找到最优的流动相和色谱柱组合，并优化分析条件。通过 Labsolutions MD 的辅助，研究人员能够逐步建立稳定、高效的 HPLC 分析方法，显著提升复杂多组分混合物的分离和定量分析能力，推动医药、食品、化工等领域的研究和应用向前发展。



磺胺类化合物的 HPLC 分析方法开发

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。

1. 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)	系统控制器	: CBM-20A
柱温箱	: CTO-20AC	检测器	: SPD-M30A
自动进样器	: SIL-30ACMP	软件	: Labsolutions Ver.5.114 Labsolutions MD Ver.1.01

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	Sulfamethoxypyridazine	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

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

图 2 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 2. 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—H ₂ O
	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°C、40°C、50°C）的最佳组合，有效提升了实验效率。

图 3 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 3 中蓝色方框处），具体参数详见表 4，色谱图如图 4 所示。

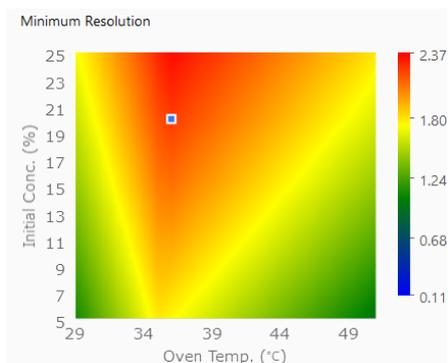


图 3. 最小分离度的设计空间

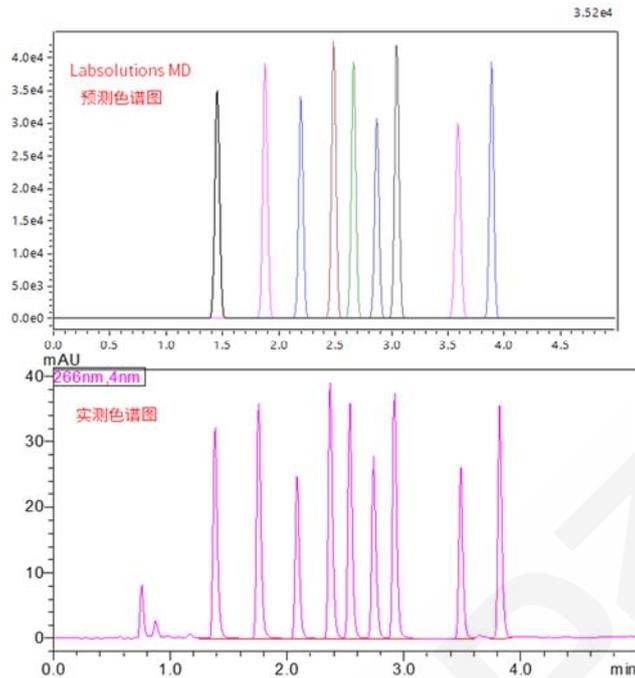


图 4. 最佳分析条件的色谱图

表 4. 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 5 中黑色方框)，从而验证对分离的影响。图 6 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 5. 耐用性允差范围

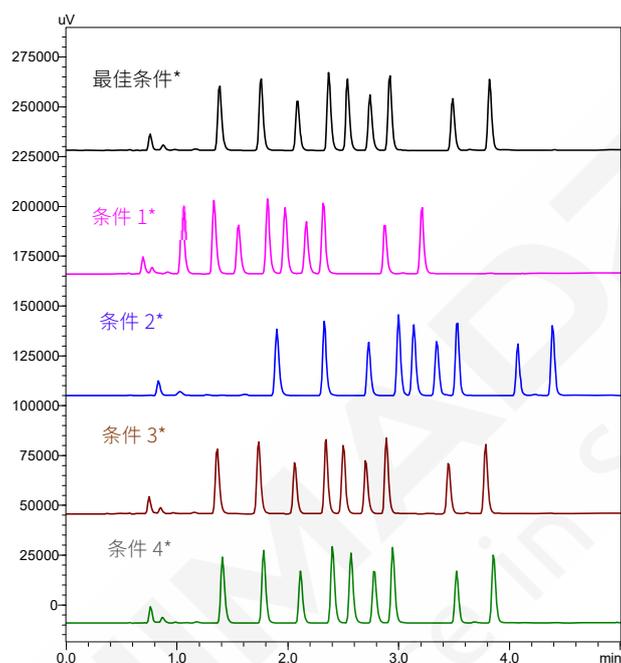


图 6. 耐用性评估色谱图

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	磺胺甲氧吡嗪	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;

3. 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，能够开发研究出脱离对经验式思维的依赖的综合分析方法，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。



经典名方当归建中汤含量测定的方法开发

摘要：本实验使用岛津 HPLC 方法开发系统结合 LabSolutions MD 对经典名方当归建中汤含量测定进行了方法开发，展示了 Labsolutions MD 软件的在 HPLC 方法开发中自动和智能化的功能与特点。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 经典名方 当归建中汤 方法开发

技术特点：

- ❖ 使用 LabSolutions MD 开发出经典名方当归建中汤含量测定的稳健可靠分析方法。
- ❖ 根据各峰的分离度绘制设计空间，使分析条件和分离效果的关系可视化。

当归建中汤出自《千金翼方》(唐·孙思邈)，由当归、桂心、甘草、芍药、生姜、大枣六味药组成，具有温补气血，缓急止痛的功效。2018年4月，国家中医药管理局发布了《古代经典名方目录（第一批）》的通知，当归建中汤被收录其中。然而，当归建中汤的检测方法未收录于药典或相关药品标准检验方法中。因此，目前缺乏对当归建中汤更为综合全面的质量控制方法研究。

本文利用岛津HPLC方法开发系统结合

LabSolutions MD软件，对经典名方当归建中汤含量测定进行方法开发。Labsolutions MD软件可帮助分析工作者“轻松高效”“科学系统”的实现稳健的分析方法开发，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。

1.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：

系统控制器	: CBM-20Alite	输液泵	: LC-30AD ×2 (含 LPGE)
脱气机	: DGU-20A5R ×2	自动进样器	: SIL-30AC
柱温箱	: CTO-20AC	检测器	: SPD-M20A
质谱检测器	: LCMS-2050	色谱工作站	: Labsolutions Ver.5.118 Labsolutions MD Ver.2.01

1.2 混合对照品溶液的配制

精密称取芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸铵对照品适量，置于容量瓶中，加入甲醇定容至刻度，制得浓度为 200 µg/mL 的混合对照品溶液。

表 3. 化合物信息表

No.	化合物名称	CAS 号	加合离子	m/z
1	芍药内酯苷	39011-90-0	[M+H] ⁺	481.17
2	芍药苷	23180-57-6	[M-H] ⁻	525.10
3	阿魏酸	1135-24-6	[M+H] ⁺	195.07
4	甘草苷	551-15-5	[M-H] ⁻	417.12
5	肉桂酸	140-10-3	[M+H] ⁺	149.06
6	桂皮醛	14371-10-9	[M+H] ⁺	133.06
7	甘草酸铵	53956-04-0	[M-H] ⁻	821.40

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 3 种流动相和 3 种色谱柱，对结果进行评估来确定哪种分析条件所获得的色谱图是最优的。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析条件。

由于经典名方当归建中汤供试品成分较为复杂，色谱图中除有效成分色谱峰以外，有较多未知化合物色谱峰，供试品溶液相较于对照品溶液的出峰数量及峰分离度结果更具有参考意义，因此筛选阶段选择使用 1.3 制备得到的供试品溶液进行测试。所获得的全部色谱图按照综合评估值从最高到最低的顺序排列，结果如图 1 所示。结果表明，使用色谱柱型号为 Shim-pack Velox SP-C18，以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈作为流动相，其评估值最高，分离效果最好，具体实验参数如表 4 所示。

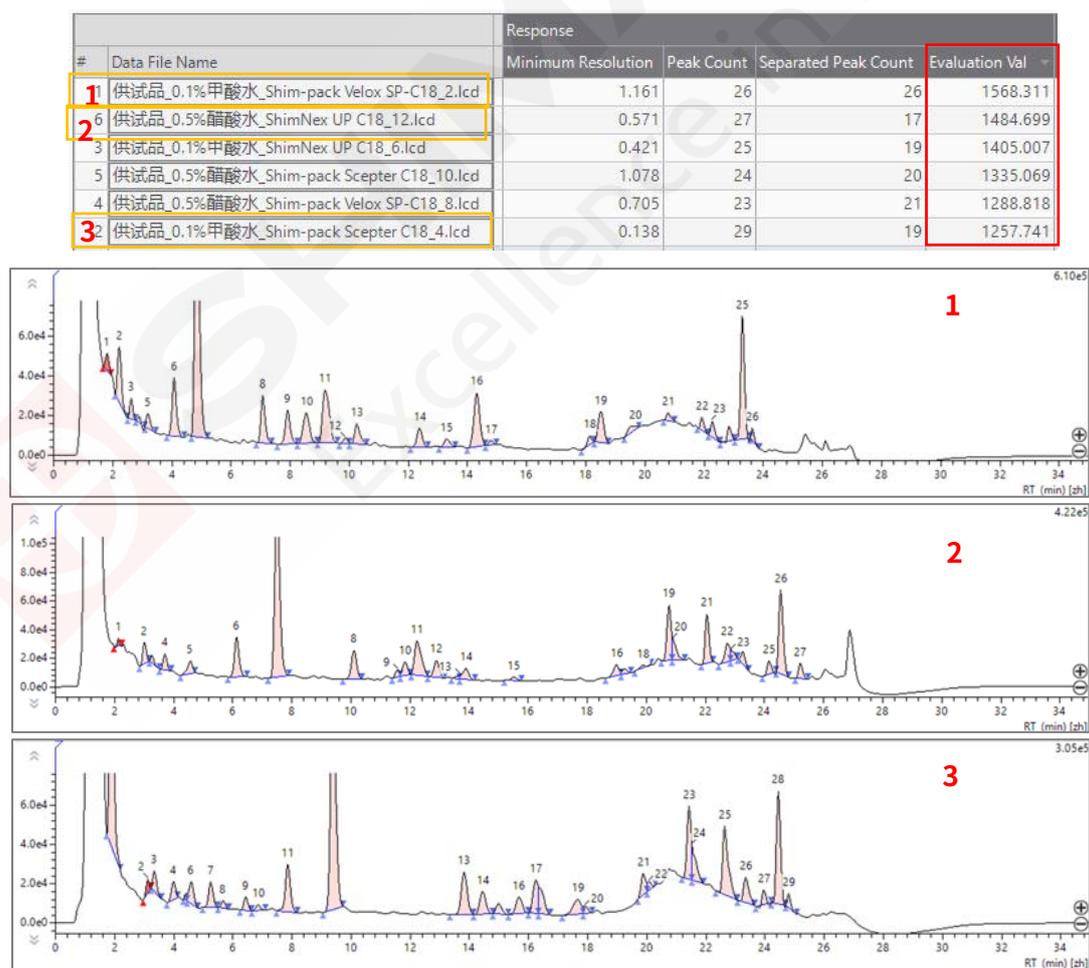


图 1. 筛选阶段流动相、色谱柱的综合评估值

表 4. 筛选阶段最佳分析条件（液相条件）

流动相：			
A 相	: A1—0.1%甲酸水溶液		
B 相	: B—乙腈		
色谱柱：			
1	Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.8 μm), P/N: 227-32001-03		
分析条件：			
流速	: 0.3 mL/min	进样量	: 2 μL
柱温	: 30°C	检测波长	: PDA (254 nm)
洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 12%, 洗脱程序见表 2。			

2.1.3 供试品溶液有效成分定性确证

为排除供试品溶液出现假阳性问题，按照2.1.2最终评估值最高分的分析条件（见表4）采集对照品溶液色谱图。使用目标峰保留时间一致性、UV光谱、MS质谱参数对各色谱峰定性鉴别，结果如图2所示。

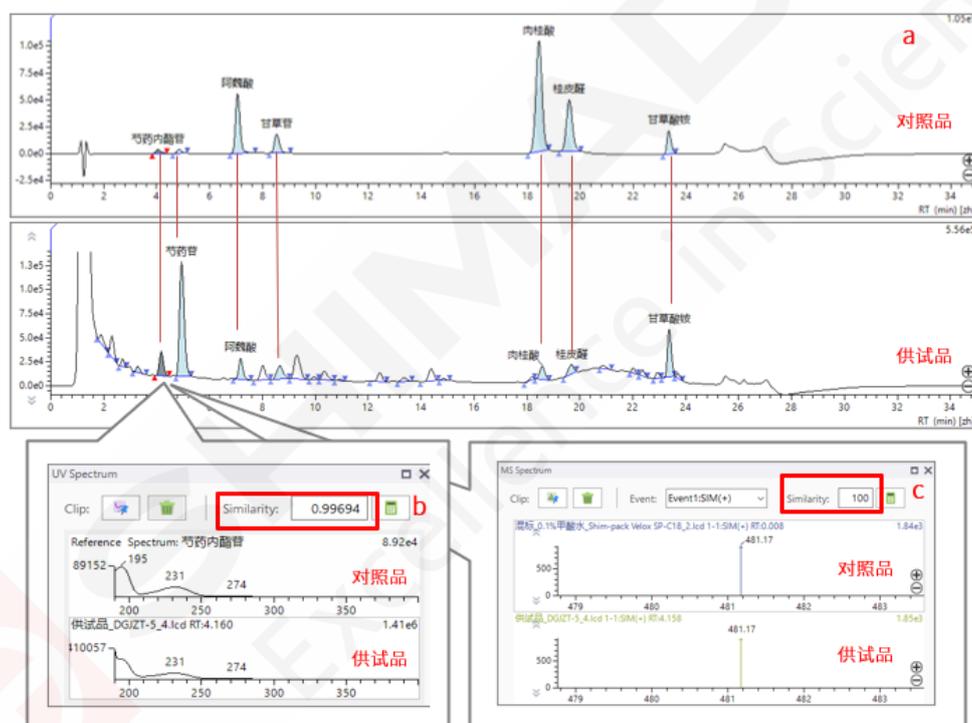


图 2. 对照品溶液和供试品溶液比较色谱图 (a); 对照品溶液和供试品溶液芍药内酯苷比较 UV 光谱图 (b); 对照品溶液和供试品溶液芍药内酯苷比较质谱图 (c)

2.2 优化阶段

2.2.1 色谱峰追踪功能

峰追踪功能可以使用峰洗脱顺序、UV光谱、MS质谱相似度、峰面积及峰面积百分比、峰高度及峰高度百分比等多种参数对色谱峰进行自动追踪鉴定，从而实现优化阶段的设计空间模型图精确构建，大大减少手动识别的繁琐程度，提高工作效率。本实验采用峰洗脱顺序、UV光谱、MS质谱相似度对色谱峰进行追踪，结果如图3所示。

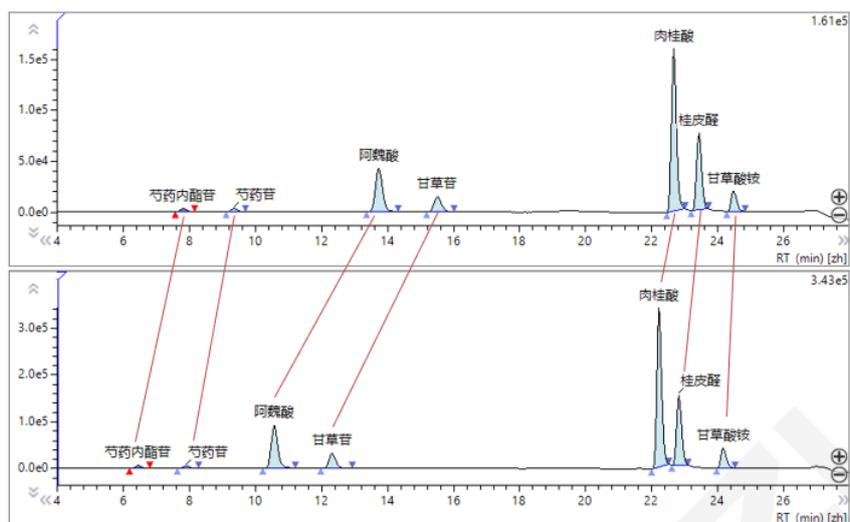


图 3. 色谱峰追踪功能

2.2.2 模型解析

在筛选阶段选择最佳流动相和色谱柱种类后，进一步考虑流速及柱温对色谱峰分离的影响，在优化阶段的实验设计中采用全因子设计（Full Factorial Design）设计探索流速（0.2 mL/min、0.25 mL/min、0.3 mL/min）和柱温（30°C、35°C、40°C）的最佳组合。

在LabSolutions MD软件Postrun功能下创建化合物表并对所有色谱峰进行正确识别，使用[Model Analysis]项下的 [Regression using Identified RT] 预测每个色谱峰的保留时间，进行更加正确的模型解析。创建得到的模型图热力图如图4所示，其可以同时研究流速及柱温对色谱峰分离度的影响。热力图中橙红色区域代表色谱峰分离度良好，蓝绿色代表色谱峰分离度较差。根据设计空间，Labsolutions MD可模拟出不同分析条件下的色谱图（见图5），并可预测出最佳的分析条件，具体参数表5。

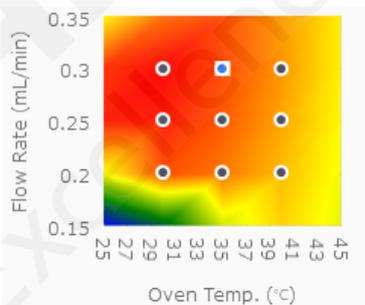


图 4. 最小分离度的设计空间

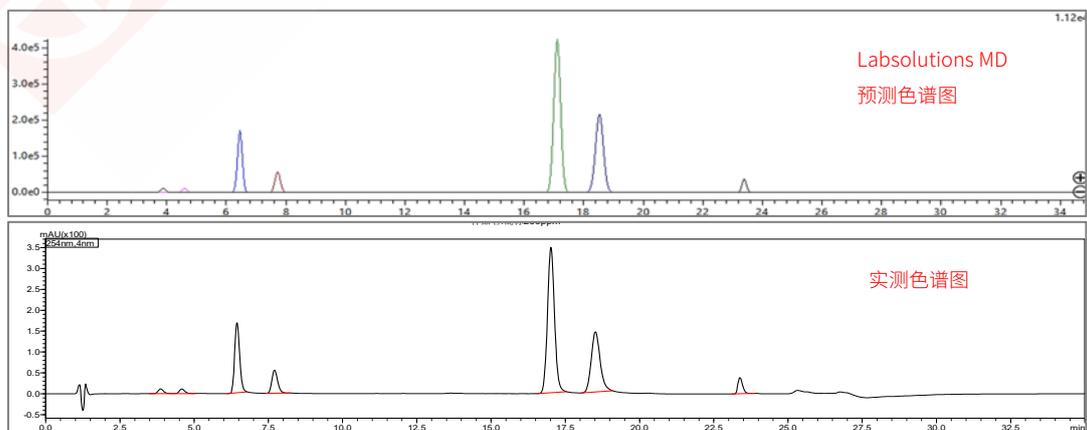


图 5. 最佳分析条件的色谱图

表 5. 最佳分析条件

流 动 相 :	
A	相 : A1—0.1%甲酸水溶液
B	相 : B—乙腈
色 谱 柱 :	
Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.8 μm), P/N: 227-32001-03	
分 析 条 件 :	
流 速	: 0.3 mL/min
柱 温	: 35°C
进 样 量	: 2 μL
洗 脱 方 式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 12%, 洗脱程序见表 2。

2.2.3 重复性考察

取混合对照品溶液, 按照2.2.2中的分析条件进行上机分析, 连续进样6针, 计算重复性。结果表明, 混合对照品溶液7个组分的保留时间RSD%为0.02~0.19%, 峰面积RSD%为0.33%~0.57%, 方法重复性良好, 仪器精密度良好。结果见表6。

表 6. 混合对照品溶液 7 个组分重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	芍药内酯苷	0.19	0.57
2	芍药苷	0.18	0.54
3	阿魏酸	0.11	0.39
4	甘草苷	0.10	0.55
5	肉桂酸	0.08	0.33
6	桂皮醛	0.08	0.42
7	甘草酸铵	0.02	0.51

3. 结论

本文使用岛津HPLC方法开发系统结合LabSolutions MD对经典名方当归建中汤含量测定进行了方法开发。在LabSolutions MD软件的“筛选”、“优化”阶段使用了峰追踪、模型解析等功能, 获得最佳分析条件。Labsolutions MD软件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。

接口电压：3.0/-2.0 kV

干燥气流速：5.0 L/min

加热气流速：5.0 L/min

脱溶剂温度：400 °C

DL 温度：250 °C

扫描模式：SIM (具体参数见表1)

表 1.SIM 参数

序号	化合物	+/-	m/z	接口电压(V)	Qarray(V)
1	分散黄 9	-	273.06	-2	3
2	溶剂黄 1	+	198.1	3	Auto
3	分散红 17	+	345.16	3	10
4	分散蓝 106	+	336.11	3	Auto
5	分散棕 1	+	433.02	3	Auto
6	分散橙 37	+	392.07	3	Auto
7	分散橙 1	+	319.12	3	Auto
8	分散黄 23	-	301.11	-2	3
9	分散橙 149	+	459.21	3	Auto
10	分散红 151	+	532.16	3	Auto
11	溶剂红 23	+	353.14	3	Auto

2. 样品制备

准确移取十一种染料成分标准溶液于容量瓶中，加入适量50%甲醇水溶液，配置成浓度为1 µg/mL的混合标准溶液，经0.22µm滤膜过滤后进样分析。

3. 结果与讨论

3.1 筛选阶段

3.1.1 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 2 种流动相和 3 种色谱柱进行了实验设计，如表 2 所示，筛选分类情况如表 3 所示：

表 2. 筛选阶段实验设计表

流动相:			
流动相 L1	: A-0.1%甲酸+20 mM 甲酸铵水溶液; B-0.1%甲酸甲醇溶液		
流动相 L2	: A-0.1%甲酸+20 mM 甲酸铵水溶液; B-0.1%甲酸乙腈溶液		
色谱柱:			
色谱柱 S1	: Shim-pack Velox C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-32009-03)		
色谱柱 S2	: Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 3.0 µm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-21014-05)		
色谱柱 S3	: Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 µm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-30722-05)		
分析条件:			
流速	: 0.55 mL/min	柱温	: 35°C
进样量	: 20 µL	检测波长	: 290 nm
洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 55%, 时间程序如下,			
B conc 55% (1 min) ~ 90% (5-10 min) ~ 100% (12-15 min) ~ 55% (15.1-18 min)			

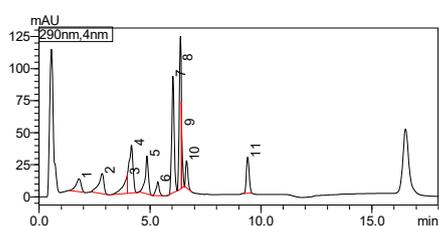
表 3. 通用梯度条件分类

	色谱柱 S1	色谱柱 S2	色谱柱 S3
流动相 L1	S1L1	S2L1	S3L1
流动相 L2	S1L2	S2L2	S3L2

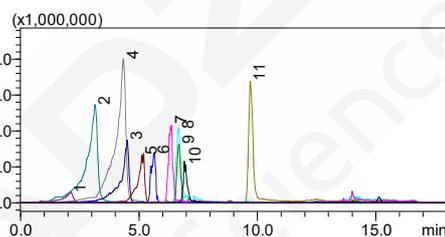
3.1.2 筛选阶段的综合评估

在筛选阶段采用全因子设计总共筛选2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。

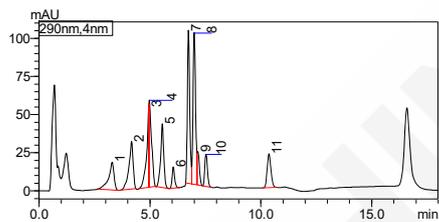
图1为分析相关色谱图，图2为各色谱峰按照从最高到最低的顺序排列的综合评估值，评估值越高，在一定程度上色谱分离状态越好。分析结果显示，当使用Shim-pack GIST C18-AQ色谱柱，以0.1%甲酸+20 mM甲酸铵水溶液和0.1%甲酸甲醇溶液为流动相，评估值最高，分离效果最好，具体实验参数如表4所示。



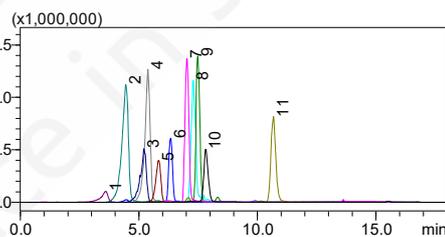
S1L1 分析条件 290 nm 色谱图



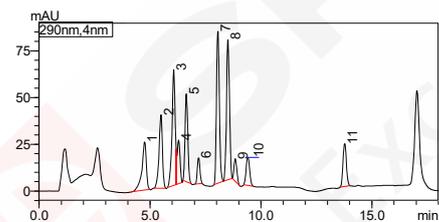
S1L1 分析条件 EIC 色谱图



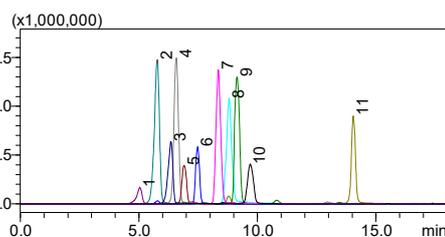
S2L1 分析条件 290 nm 色谱图



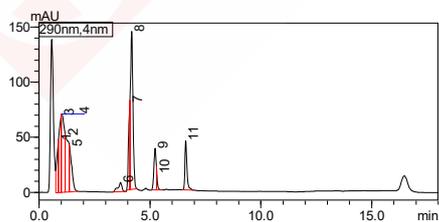
S2L1 分析条件 EIC 色谱图



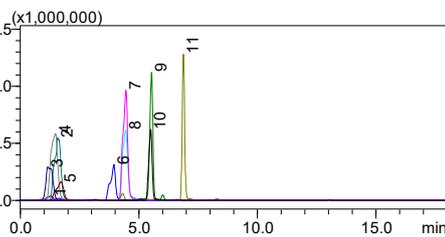
S3L1 分析条件 290 nm 色谱图



S3L1 分析条件 EIC 色谱图



S1L2 分析条件 290 nm 色谱图



S1L2 分析条件 EIC 色谱图

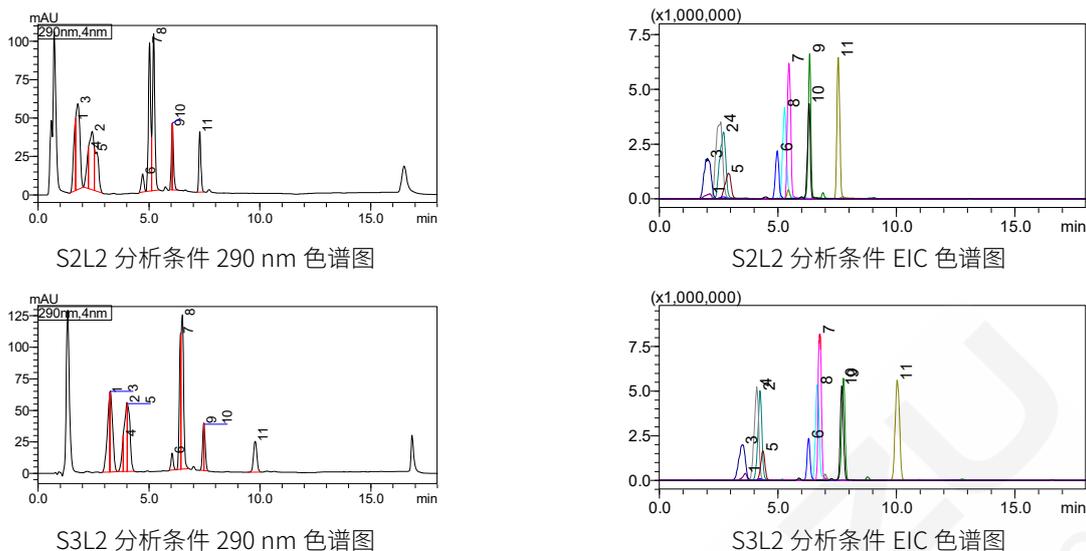


图 1. 11 种染料成分在通用梯度条件 1 下的色谱图 (编号见表 2)

Data File Name	Minimum Resolution	Peak Count	Evaluation Val
S3L1.lcd	1.319	11	233.688
S1L1.lcd	2.165	11	167.489
S2L1.lcd	1.294	11	159.424
S2L2.lcd	0.931	11	26.511
S3L2.lcd	1.689	11	18.579
S1L2.lcd	0	11	0

图 2. 筛选阶段流动相、色谱柱的综合评估值

表 4. 筛选阶段最佳分析条件

流动相:	
A 相	: 0.1%甲酸+20 mM 甲酸铵水溶液
B 相	: 0.1%甲酸甲醇溶液
色谱柱 : Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30722-05)	
分析条件 :	
流速	: 0.55 mL/min
进样量	: 20 μL
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 55%, 时间程序如下, B conc 55% (1 min) ~ 90% (5-10 min) ~ 100% (12-15 min) ~ 55% (15.1-18 min)
柱温	: 35°C
检测波长	: 290 nm

3.2 峰追踪 (i-PeakTracer)

由于在色谱条件优化过程中, 方法优化的效果与流动相的流速、流动相初始比例和流动相梯度变化情况有关。因此, 基于初步筛选结果, 为进一步提高Rt为5~10min色谱峰分离度, 对流动相的流速、流动相初始比例和流动相梯度变化进行优化。参考筛选阶段最佳分析条件对Flow Rate、Initial Conc.和Duration 2进行优化, 共进行45次优化分析, 变量参数具体情况如表5所示。

通过“i-PeakTracer”峰追踪功能, 以Flow Rate=0.5 mL/min, Initial Conc.=50%, Duration 2=5min为参考数据, 对所得色谱图进行自动峰识别, 识别参数如图3所示, 识别参考数据结果见表6, 部分色谱图识别结果见图4所示:

表 5.变量参数

No.	变量参数名称	初始参考值	变化值	变量梯度	变量范围
1	Flow Rate	0.5 mL/min	0.05 mL/min	1	0.45 mL/min ~0.55 mL/min
2	Initial Conc.	65%	7.5%	2	50%~80%
3	Duration 2	5 min	1 min	1	4 min~6 min

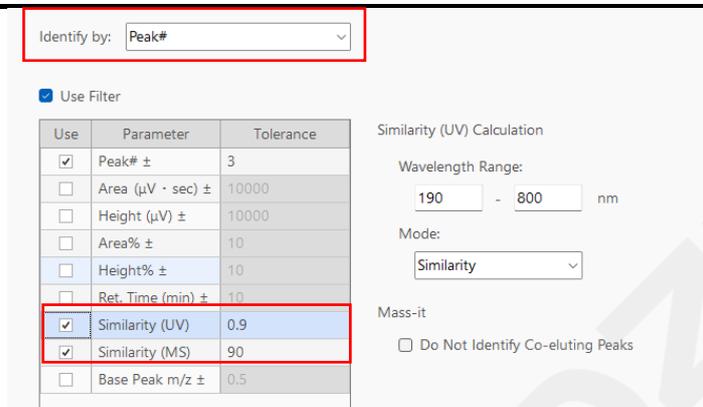
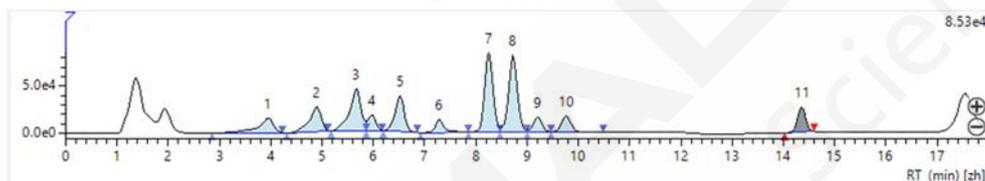
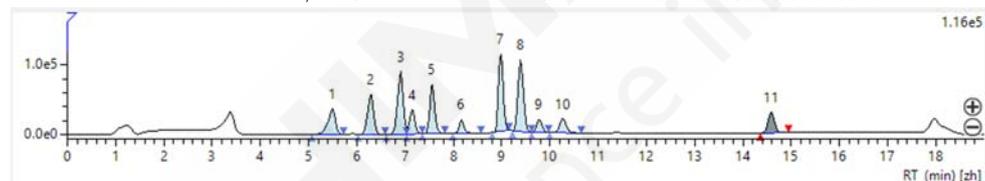


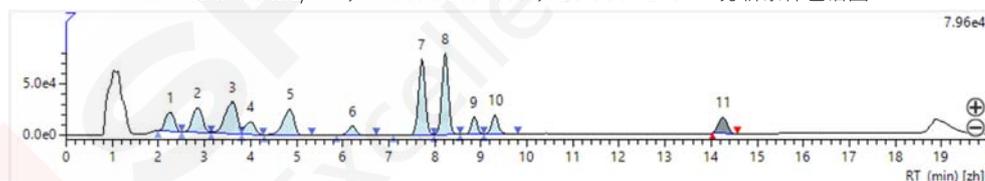
图 3. 识别参数



Flow Rate=0.45 mL/min, Initial Conc.=65%, Duration 2=4min分析条件色谱图



Flow Rate=0.5 mL/min, Initial Conc.=50%, Duration 2=5min分析条件色谱图



Flow Rate=0.55 mL/min, Initial Conc.=72.5%, Duration 2=6min分析条件色谱图

图 4. 部分识别色谱图结果

表 6.参考数据识别结果

No.	化合物名称	保留时间	m/z	No.	化合物名称	保留时间	m/z
1	分散黄 9	5.93	273.06	7	分散橙 1	9.54	319.12
2	溶剂黄 1	6.77	198.1	8	分散黄 23	10.00	301.11
3	分散红 17	7.36	345.16	9	分散橙 149	10.43	459.21
4	分散蓝 106	7.62	336.11	10	分散红 151	10.99	532.16
5	分散棕 1	8.00	433.02	11	溶剂红 23	15.41	353.14
6	分散橙 37	8.62	392.07				

峰识别参数：UV 光谱、MS 质谱和洗脱顺序

3.3 ANOVA 方差分析

对基于液相分析条件二的Flow Rate、Initial Conc.和Duration 2三个变量因子的数据进行单因子和多因子方差分析。结果显示，Flow Rate、Duration 2和Initial Conc.的p.Value值均小于0.01，说明三个变量均对分离造成的较大影响，具体结果如图5所示：

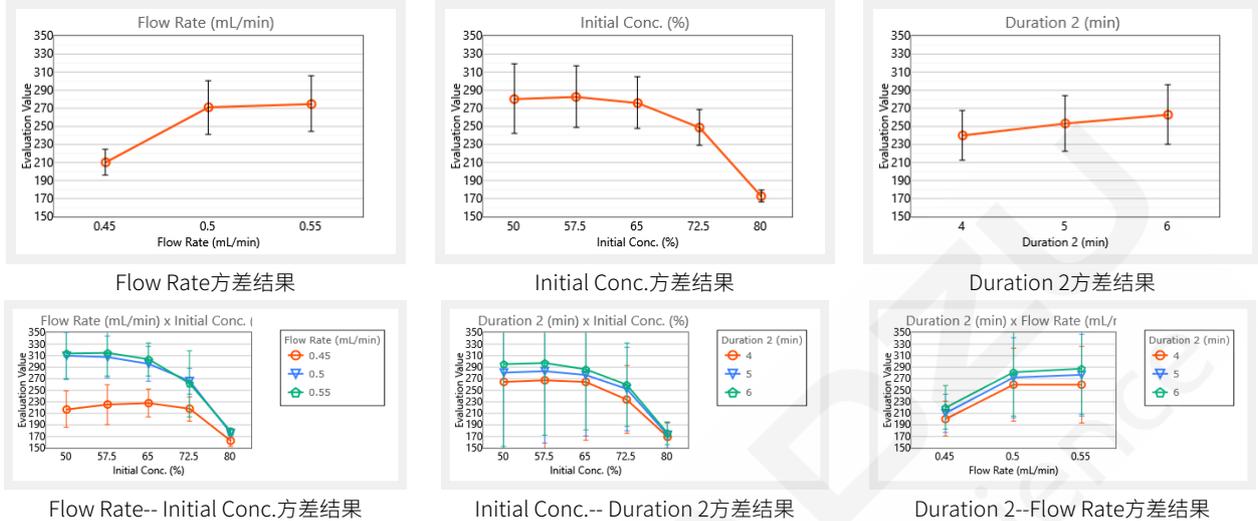


图 5. ANOVA 方差分析结果

3.4 model Analysis 模型解析

将Flow Rate、Initial Conc.和Duration 2三个变量因子下分析所得数据通过“model Analysis”解析功能进行处理，建立“Heat Map”图和“3D Contour Plot”图。根据分析结果自动选取最优因子，结果显示：Flow Rate = 0.55 mL/min，Initial Conc. = 55%，Duration 2 = 6.00 min为最优因子。“Heat Map”和“3D Contour Plot”结果如图6所示：

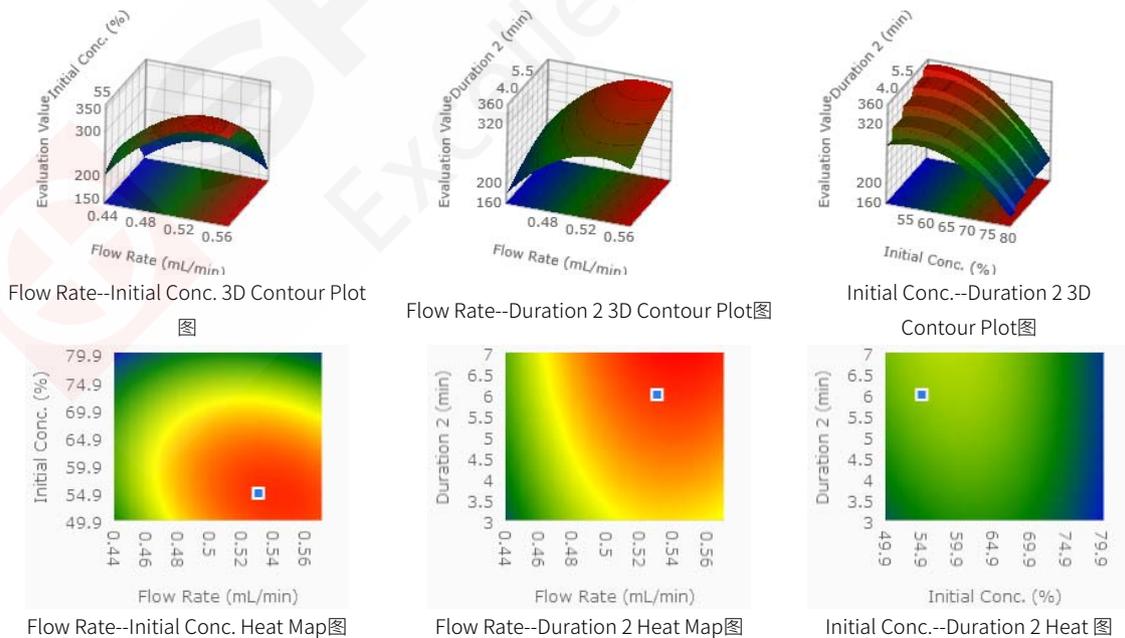


图 6. model Analysis 解析结果

3.5 最优液相分析条件

基于最优液相分析条件：色谱柱Shim-pack GIST C18-AQ和流动相A-0.1%甲酸水+20 mM甲酸铵溶液与B-0.1%甲酸甲醇，Flow Rate=0.55 mL/min，Initial Conc.=55%，Duration 2=6.00min建立方法分析，其结果显示，目标物检出峰个数、峰型及峰分离情况均良好。相关色谱图结果如图7所示，具体分析参数如表7所示：

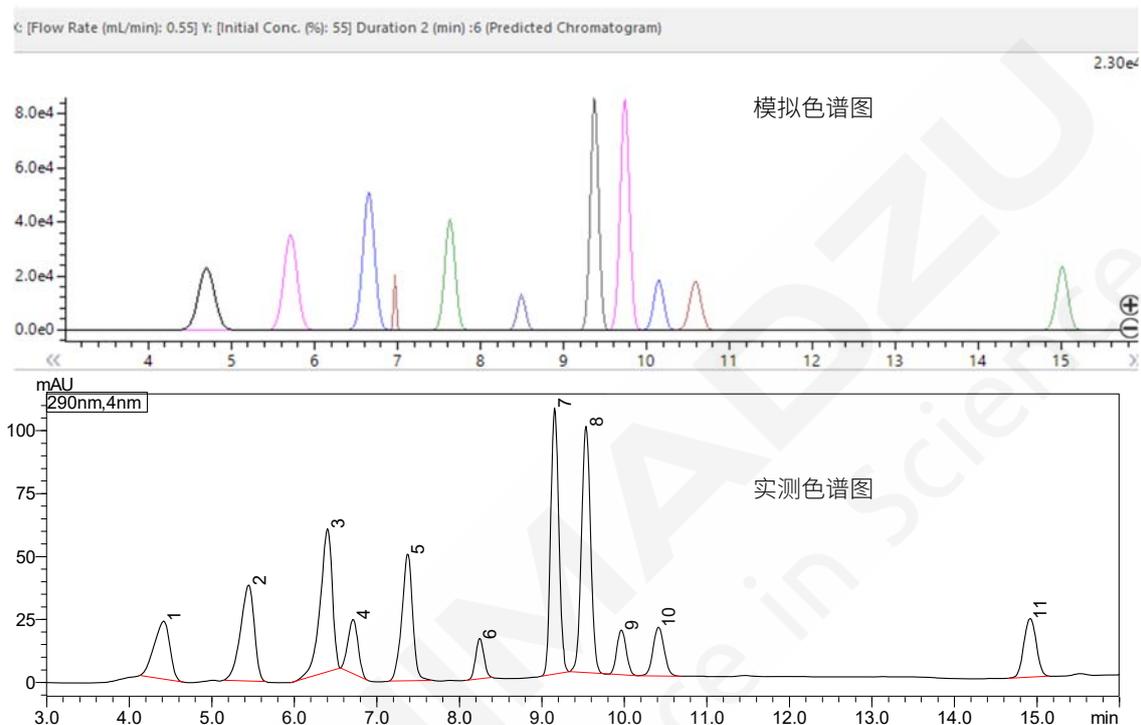


图7. 最优液相分析条件下290 nm色谱图（上侧为模拟色谱图，下侧为实测色谱图）

表 7. 最优液相分析条件

液相条件	
色谱柱：	Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 μm)
流动相：	A-0.1%甲酸+20 mM 甲酸铵水溶液 B-0.1%甲酸甲醇溶液
流速：	0.55 mL/min
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相起始浓度为 55%，梯度洗脱时间程序如表 8 所示

表 8. 通用梯度洗脱时间程序二

时间 min	单元	处理命令	值
1.00	泵	B Conc	55
6.00	泵	B Conc	90
11.00	泵	B Conc	90
13.00	泵	B Conc	100
16.00	泵	B Conc	100
16.10	泵	B Conc	55
19.00	控制器	STOP	

4. 结论

本方法利用岛津 Nexera LC-30A 方法开发系统与质谱仪 LCMS-2050 联用，结合 Labsolutions MD 软件，开发 11 种染料成分的液相分析方法。通过多色谱体系方法，对多变量因子探索最优分析条件，基于 ANOVA 和 model Analysis 解析功能进行分析，生成最优液相条件。基于分析结果，创建液相分析方法进行测试，其结果重现性良好。说明该系统与 Labsolutions MD 软件结合，可以快速开发 11 种染料成分液相分析方法。

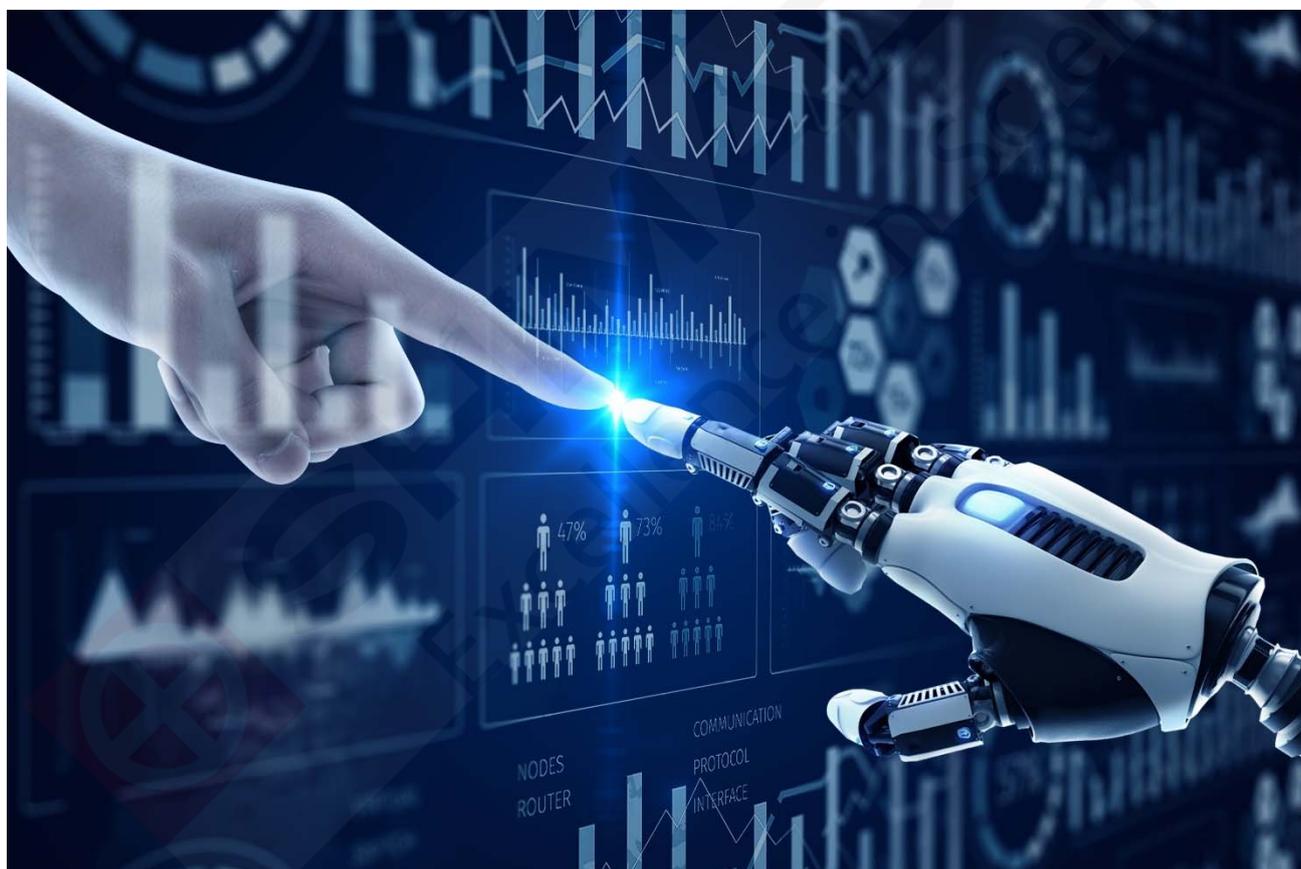


3.4 其他智能化使用场景下的应用

LabSolutions MD 方法开发系统不仅在传统方法优化中发挥着关键作用，还具备多项先进功能，使其成为实验室研究与质量控制不可或缺的工具。该系统能够自动筛选流动相的最佳 pH 值，确保分析过程更加高效和准确；同时，智能选择合适的色谱柱，进一步提升分离效果和检测灵敏度。通过先进的 AI 算法支持，LabSolutions MD 还能自动优化调整梯度条件，无需人工干预即可实现最佳实验参数设置。

特别值得一提的是，对于手性化合物的研究，LabSolutions MD 方法开发系统同样表现出色，能够有效完成手性拆分任务，为药物开发等领域提供了强有力的技术支持。无论是常规分析还是复杂的手性分离，LabSolutions MD 均能提供卓越的解决方案。

总之，LabSolutions MD 这款多功能的方法开发系统极大地推动了科学研究的进步与发展，是现代实验室中不可或缺的重要组成部分。它不仅简化了实验流程，提高了工作效率，更为科研人员提供了可靠的数据支持，助力他们在各自领域取得突破性进展。



使用 LabSolutions MD 提高手性化合物的分离效率

技术特点：

- ❖ 使用超临界流体色谱法，能够在短时间内分离手性化合物。
- ❖ 通过 LabSolutions MD，能够高效构建新化合物的分析条件。
- ❖ 分析酸性和碱性化合物时，在改性剂中加入适当的添加剂，能够改善色谱峰峰型。

手性化合物是一种分子中含有不对称碳原子，互为镜像且不能叠加的化合物。HPLC一直是分离手性化合物的主流方法，但近年来，超临界流体色谱分析法（Supercritical Fluid Chromatography: SFC）的应用引起了人们的关注。SFC使用的流动相主要是超临界二氧化碳，具有低极性、低粘度、高扩散性的特点。在流动相中添加极性有机溶剂（改性剂）可以抑制目标化合物与固定相之间的相互作用。手性化合物通常使用HPLC正相条件进行分离，但上述SFC的独特性质使SFC分析更具优势，分离速度更快、有机溶剂使用量更少，从而降低成

本并减少对环境的影响。

在此背景下，制药领域在新药研究合成的过程中广泛使用SFC进行手性化合物光学拆分。但是，从种类繁多手性色谱柱中寻找适合分析物的分析柱和流动相（改性剂）组合需要花费大量的精力和时间，因此需要更快、更精简的方法，用于手性化合物的分离。

本文将介绍使用Nexera UC手性筛选系统及分析方法开发软件LabSolutions MD开发手性化合物分离条件的工作流程。

1. 实验部分

1.1 仪器

本文使用 Nexera UC 手性分离筛选系统，Nexera UC 手性筛选系统由 SFC 系统、溶剂切换阀和色谱柱切换阀组成，能够自动连续在最多 12 根色谱柱，最多 7 种改性剂之间切换，研究各种分离条件，全面收集数据。与其他系统相比，Nexera UC 在各种分离条件下进行分析，可以更快地确定手性化合物的高效分离条件，从而节省劳动力。



图 1. Nexera™UC 手性筛选系统

1.2 分析条件

表 1. 改性剂和色谱柱的考察条件

系	统	: Nexera UC 手性筛选系统
色	谱	柱 : CHIRALPAK® IA-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm) CHIRALPAK® IB-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm) CHIRALPAK® IC-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm) CHIRALPAK® ID-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm) CHIRALPAK® IE-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm) CHIRALPAK® IF-3 (100 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm)
流	动	相 A : CO ₂
流	动	相 B : 甲醇 乙腈 乙醇 异丙醇 丙酮 0.1%甲酸甲醇溶液 0.1%甲酸铵甲醇溶液
流	速	: 3.0 mL/min
时	间	程 序 : B 浓度 20% (0-8 min) → 40% (8.01-10.0 min) → 20% (10.01-12.0 min)
柱	温	: 40°C
进	样	量 : 2 μL (溶剂: 乙醇)
BPR	压	力 : 10 MPa
检	测	: 220 nm (氯美扎酮) 245 nm (氟比洛芬) 260 nm (丙吡胺) (带高压流通池的 PDA)

2. 结果与讨论

2.1 目标分析样品

本文优化了三类目标的分析条件，即氯美扎酮（中性化合物）、氟比洛芬（酸性化合物）丙吡胺（碱性化合物）（图 2）。所有化合物均有 1 个不对称碳元素，存在 2 种异构体。

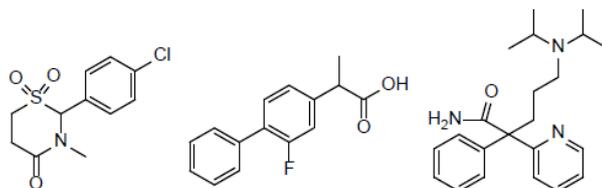


图 2. 各化合物的结构式

(从左向右依次为氯美扎酮、氟比洛芬、丙吡胺)

2.2 创建色谱柱筛选设计

通过使用 LabSolutions MD，可通过简单操作自动批量创建多种分析条件，高效地进行筛选。设置改性剂和色谱柱时，可选择预先在软件的数据库中注册的内容进行研究（图 3）。手动变更条件进行考察时，需要更换改性剂和色谱柱，创建分析方法及分析批次等大量工作，而使用 LabSolutions MD，可通过简单的操作设置实现完全自动化。

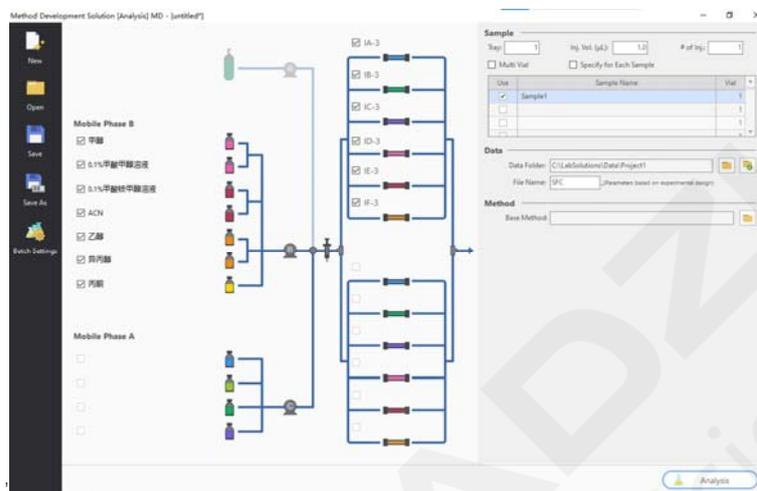


图3. 实验设计创建画面

本文对各种化合物进行了筛选，包括 6 种改性剂和 7 种色谱柱，合计 42 种条件。筛选条件见表 1。

2.3 通过筛选结果快速预测最佳条件

本文使用氯美扎酮作为样品进行筛选的结果如图 4 所示。



图4. 通过筛选得到的氯美扎酮色谱图

(红框：评价价值最高的色谱图)

由于色谱柱筛选阶段中获得的色谱图数量与考察条件数量相同，因此需要评估在何种条件下可获得目标物的最佳分离效果。但是，该工作需要对象谱法具有一定知识，同时会耗费大量精力。LabSolutions MD 能够根据各条件下目标谱峰之间的分离度进行排序，不再单一依靠分析人员的直觉和经验，而是结合大数据分析，任何人都可以快速、轻松地预测最佳条件（图 5）。

样品名	流动相	色谱柱简称	响应
			最小分离
氯美扎酮	甲醇	IA-3	11.049
氯美扎酮	0.1%甲酸铵甲醇溶液	IF-3	10.872
氯美扎酮	0.1%甲酸铵甲醇溶液	IA-3	10.727
氯美扎酮	乙醇	IF-3	10.629
氯美扎酮	0.1%甲酸甲醇溶液	IA-3	10.628
氯美扎酮	乙醇	IA-3	10.445
氯美扎酮	甲醇	ID-3	10.193
氯美扎酮	0.1%甲酸铵甲醇溶液	ID-3	10.005
氯美扎酮	0.1%甲酸甲醇溶液	ID-3	9.928
氯美扎酮	甲醇	IF-3	8.102

图5. 各条件通过评价价值排序
(按照评价价值从高到低的顺序显示前10的条件)

在预计检测到大量谱峰的情况下，例如当分离目标具有多个不对称碳时，除根据目标谱峰之间的分离度之外，还能够根据谱峰检测数、或从谱峰检测数 (P) 与分离度 (Rs) 的总和计算的评价价值 (公式 1) 进行排序。

$$(\text{评价价值}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{P-1}) \dots \dots \quad (\text{公式 1})$$

评价价值最高的色谱图如图 4 中红框所示。根据筛选结果可知，对氯美扎酮进行手性分离时，当改性剂为甲醇，色谱柱为 CHIRALPAK®IC-3 时，可以获得最佳分离效果。

2.4 通过添加剂调整分离，改善峰形

使用 HPLC 进行分析时，有时会在流动相中添加缓冲剂、离子对试剂等进行分离，以改变分离选择性或改善峰形，而在 SFC 中也会出于同样目的使用添加剂。SFC 中使用的添加剂将添加剂加入到改性剂中，而不是超临界二氧化碳。通过添加酸（如甲酸）或碱（如胺类）等，能够抑制目标组分的电离或掩蔽固定相上的二级官能基团，由此达到改善峰形的效果。

2.5 氟比洛芬及丙吡胺的最佳条件

我们还以与中性化合物氯美扎酮相同的方式，预测了酸性化合物氟比洛芬和碱性化合物丙吡胺的最佳分析条件。各化合物具有代表性的色谱图如图 6 所示。

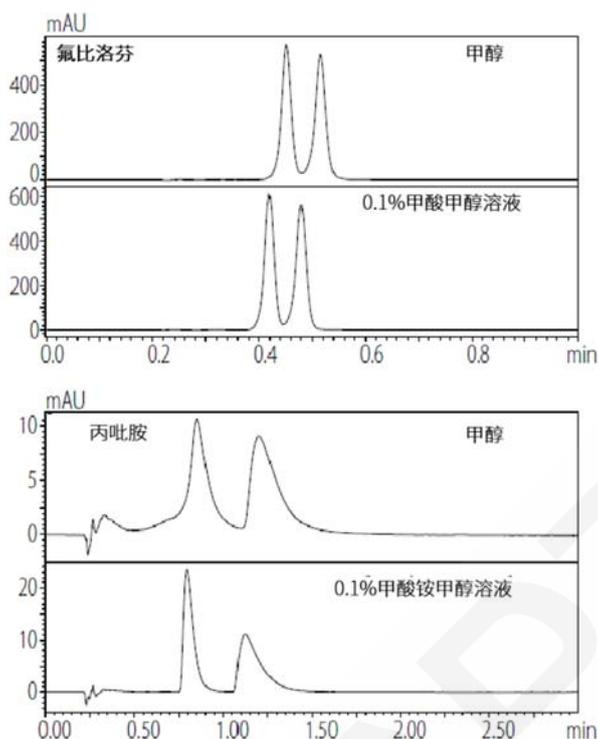


图6. 氟比洛芬（上）及丙吡胺（下）具有代表性的色谱图

即使是不在改性剂中添加酸性添加剂的条件下，酸性化合物氟比洛芬仍呈现出良好的峰形。与 LC 不同，由于 SFC 采用二氧化碳作为流动相，因此流动相仅稍显酸性，在分析多个酸性化合物时，不加入添加剂仍能呈现良好的峰形。但是，不同的化合物，也存在通过添加甲酸或三氯乙酸等添加剂，使峰形得到改善的情况。

另一方面，碱性化合物丙吡胺在改性剂中添加了碱性添加剂，可以通过抑制目标组分的电离或掩蔽二级官能基团的官能基来抑制非特异性吸附，从而达到改善分离及峰形的效果。

3. 结论

本文介绍了使用 Nexera UC 手性筛选系统及分析方法开发软件 LabSolutions MD 预测手性化合物分离条件的工作流程。通过使用 LabSolutions MD，可以节省分析条件研究的时间和精力，提升研究效率。

SFC 流动相为二氧化碳，稍显酸性，在分析多个酸性化合物时，不加入添加剂仍能呈现良好的峰形。此外，分析碱性化合物时，通过在改性剂中添加适当的添加剂，也能够获得良好的分离效果。Nexera UC 手性筛选系统可以在最多 7 种改性剂之间切换并进行分析，不仅可以有效检查有机溶剂的种类，还可有效检查添加剂。

此外，SFC 所使用的二氧化碳比 HPLC 所使用的许多有机溶剂价格更为便宜，而且无需花费废液处理成本，因此有望降低分析的运行成本。SFC 分析还可应用于分馏纯化处理。从分析到分馏纯化，SFC 具有广泛的适应性，能够为提高手性纯化业务的效率做出贡献。

科学创建设计空间 高效筛选色谱柱

技术特点

- ❖ Shim-pack Arata™ C18 具有独特的分离选择性，可改善其他 C18 色谱柱难以实现的分离。
- ❖ LabSolutions MD 通过绘制设计空间，可将多种色谱柱的分离选择性差异进行可视化。
- ❖ 对多种色谱柱最小分离度的设计空间进行比较，高效筛选最佳色谱柱。

在分析方法开发中，色谱柱的选择会对分析物的保留行为造成很大影响。因此，为获得最佳分离，较为理想的方法是对多种具有不同保留行为的色谱柱进行研究。LabSolutions MD 是一款基于分析质量源于设计 (AQbD) 的方法开发软件，其充分依据科学、考虑风险，为高效的分析方法开发提供了支持。基于 AQbD 的分析方法开发是由分析方法的

筛选、优化和耐用性评价等阶段组成。本文以绘制多个品牌的 C18 色谱柱的设计空间高效筛选色谱柱为例进行了考察，考虑不同的流动相组成和不同的梯度程序，对六种 C18 柱创建设计空间，明确了可良好分离的区域，以更少的分析次数筛选出最佳色谱柱。结果表明，与其他 C18 色谱柱相比，Shim-pack Arata C18 具有独特的分离选择性。

1. 实验条件

通过设计空间将 6 个不同品牌的 C18 色谱柱之间的分离选择性差异进行可视化，对分析条件进行评价 (分析条件: 表 1)。为评价色谱柱之间的分离选择性差异，将碱性化合物 (阿米替林)、酸性化合物 (苯甲酸) 和中性化合物 (苯酚) 作为目标成分。水相流动相使用 0.1% 甲酸水溶液、有机流动相使用乙腈和甲醇的混合溶液，通过等度洗脱进行分析。将有机流动相中的乙腈比例以 20% 为步长在 30% 到 70% (3 个级别) 的范围内变化、将有机流动相的初始浓度以 5% 为步长在 40% 到 50% (3 个级别) 的范围内变化，共 9 (3 × 3) 次的分析，绘制各色谱柱的分离度设计空间。

表 1. 分析条件

仪 器	: Nexera™ X3 方法开发系统		
化 合 物	: 阿米替林、苯甲酸、苯酚		
流 动 相	:		
	A 相	: 0.1% 甲酸水溶液	
	B 相	: 乙腈/甲醇 = 30/70, 50/50, 70/30 (3 个级别)	
色 谱 柱	:		
1	Shim-pack Arata C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm), P/N:227-32802-03		
2	色谱柱 A C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μm)		
3	色谱柱 B C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.5 μm)		
4	色谱柱 C C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)		
5	色谱柱 D C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)		
6	色谱柱 E C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)		
分 析 条 件	: (等度洗脱)		
	B 相 浓 度	: 40, 45, 50% (3 个级别)	
	流 速	: 0.5 mL/min	进 样 体 积 : 1 μL (80 mg/L)
	柱 温	: 40°C	检 测 波 长 : 254 nm (SPD-M40, UHPLC 池)

2. 结果与讨论

2.1 通过设计空间对分离度进行可视化

如图 1 所示，以有机流动相的初始浓度为纵轴，有机流动相中的乙腈比例为横轴，绘制了阿米替林、苯甲酸、苯酚 3 种化合物在 6 种不同色谱柱之间的最小分离度设计空间。图中的红色区域表示分离度较大，蓝色区域表示分离度较小。

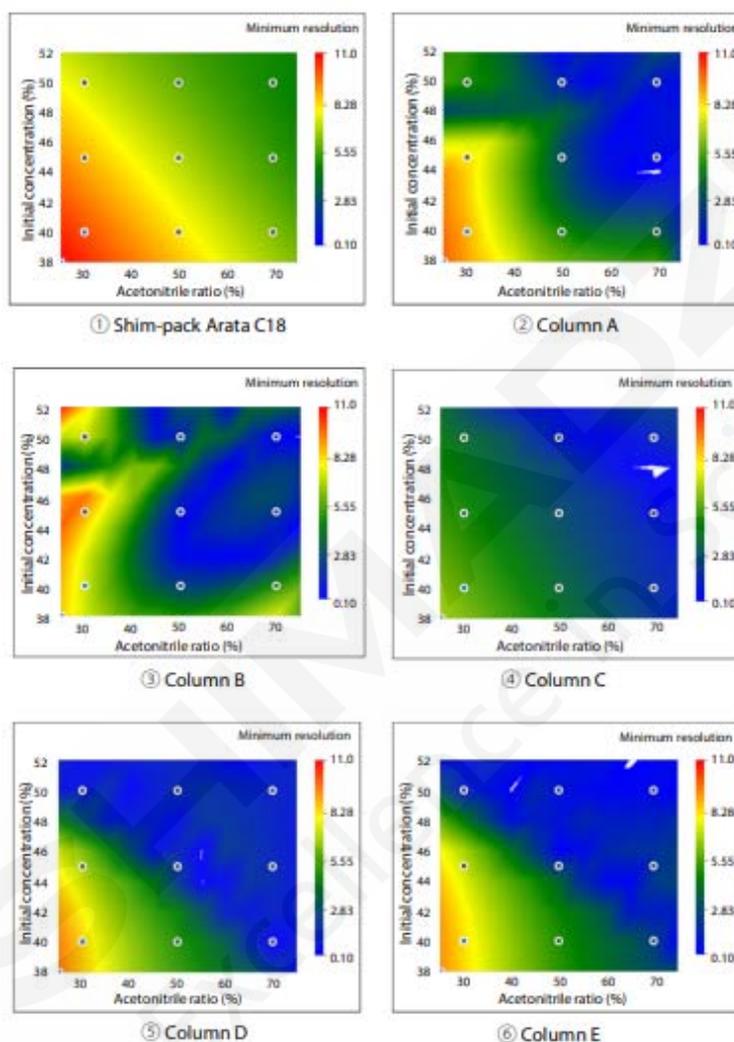


图 1. 6 个品牌色谱柱的最小分离度设计空间

*图中 (②、④、⑥) 白色区域为分离度低于下限值 (0.1) 的区域

由图可知，与其他品牌的色谱柱相比，①的 Shim-pack Arata C18 的设计空间中分离度较大的区域（红色）更宽，整个设计空间内不存在分离度较小的区域（蓝色）。这表明，不同有机流动相的混合比例和初始浓度等参数的整个变化区域，Shim-pack Arata C18 与其他色谱柱相比具有不同的分离选择性，能够提供良好的分离。因此，通过设计空间对色谱柱的分离选择性进行可视化，便能够轻松掌握各色谱柱的分离选择性差异，高效筛选出最佳的色谱柱和分析条件。

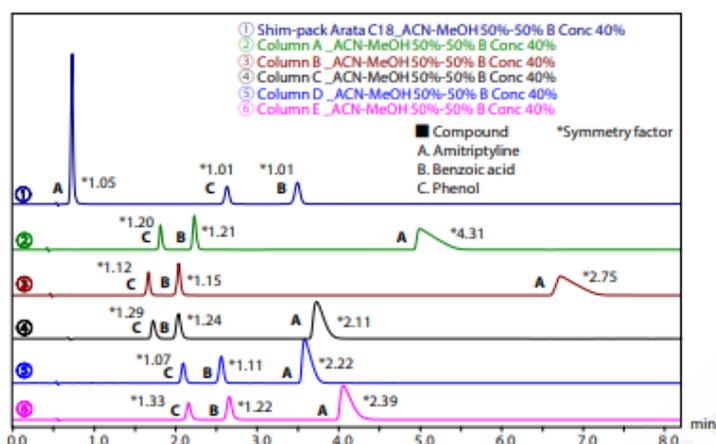


图 2. 不同色谱柱的色谱图 (有机流动相: 乙腈/甲醇 = 50/50、初始浓度: 40%)

当有机流动相中乙腈比例为 50%、初始浓度为 40% 的条件下的色谱图如图 2 所示。针对化合物阿米替林 (峰 A), Shim-pack Arata C18 具有良好的峰形 (对称因子: 1.05), 而其他色谱柱因与硅胶填充剂表面的硅烷醇基相互作用导致的峰对称性变差 (对称因子: 2.11 ~ 4.31)。对苯甲酸 (峰 B) 和苯酚 (峰 C) 而言, Shim-pack Arata C18 也表现出与其他色谱柱同等或更佳的峰对称性。实验表明 Shim-pack Arata C18 具有碱性化合物洗脱较快、酸性化合物洗脱较慢的特性, 与其他色谱柱相比具有不同的分离选择性。由图 3 可知, Shim-pack Arata C18 这种独特的分离选择性, 即使增加有机流动相的乙腈比例, 也能保持良好的分离, 有效缩短分析时间。

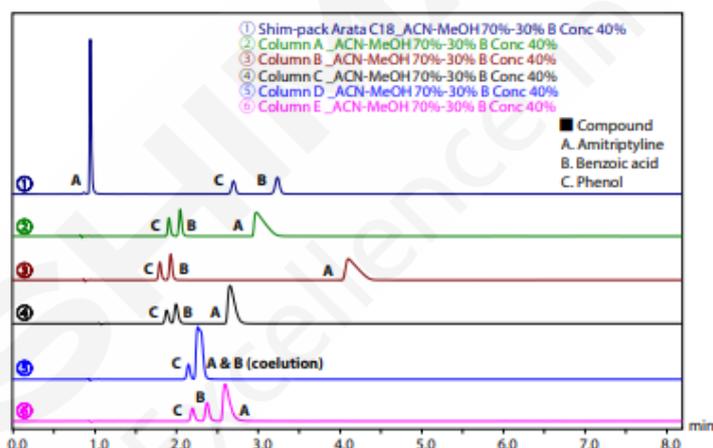


图 3. 不同色谱柱的色谱图 (有机流动相: 乙腈/甲醇 = 70/30、初始浓度: 40%)

有机流动相中乙腈比例为 70%、初始浓度为 40% 时的色谱图如图 3 所示。与图 2 相比, 在②~⑤的色谱柱中, 苯甲酸 (峰 B) 和苯酚 (峰 C) 随着乙腈比例的增加分离度显著变小, 而 Shim-pack Arata C18 色谱峰分离度依旧良好。因此, 与其他 C18 色谱柱相比, 由于 Shim-pack Arata C18 独特的分离选择性, 可使碱性化合物获得良好的峰形, 并且可提高化合物的分离度。

2.2 提高最佳分析条件的搜索效率

LabSolutions MD 通过重叠设计空间来提高最佳分析条件的搜索效率。图 4 显示了各色谱柱最小分离度 ≥ 6 , 且与阿米替林最为接近的峰之间的分离度 ≥ 18 的分析条件区域。在①的 Shim-pack Arata C18 中, 图中蓝线内的区域表示最小分离度 < 6 , 红线内表示阿米替林的分离度 < 18 的区域, 其余区域 (黑色影线) 为满足以上 2 个条件区域。结果表明在 6 种品牌的色谱柱中, 具有独特分离选择性的 Shim-pack Arata C18, 满足上述标准的区域最大。因此, 重叠的设计空间能够快速而简单地搜索同时满足为多个峰值任意分离度

的区域。

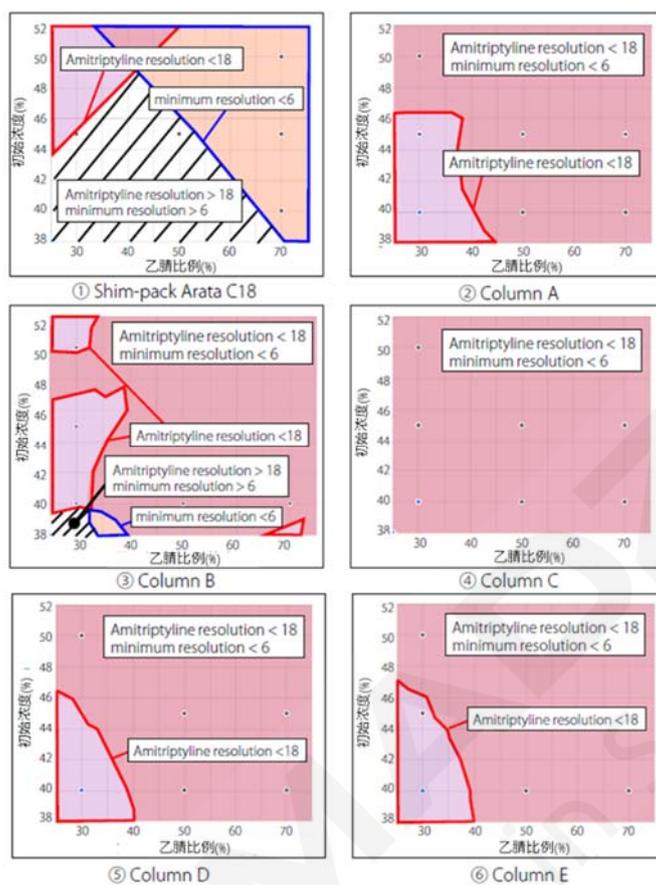


图 4. 重叠最小分离度<6 和阿米替林分离度<18 的区域的设计空间

3. 总结

LabSolutions MD 通过对多种色谱柱创建设计空间，对色谱柱之间的分离选择性差异进行可视化比较，能够不依赖分析员的直觉和经验，高效筛选出最佳色谱柱和分析条件。

*本文在撰写时参考了浅川直树先生（原卫材株式会社）的意见。

基于 AI 算法的 LC 方法开发自动梯度优化

摘要：在方法开发过程中，梯度优化不仅需要创建大量的分析计划，还需要人工干预，根据分析结果探索最佳条件。LabSolutions MD 是一款支持方法开发的专用软件，具有独特的 AI 算法，可自动优化梯度条件，并通过设置分离度标准，自动搜索符合标准的梯度条件。本文介绍了自动优化梯度功能在儿茶素、茶黄素和没食子酸（15 种化合物）同时分析中的应用。

关键词：方法开发 梯度优化 AI 自动 LabSolutions MD

传统的 LC 方法开发过程从“准备”开始，包括配制流动相、安装色谱柱、创建分析批表，然后运行分析。然后对数据结果进行分析判断，以便为后续的改进进行“准备”。方法开发就是通过一遍又一遍地重复这些过程来筛选理想条件，但除了重复创建分析计划所需的大量时间外，基于数据的分析判断还需要色谱方面的专业知识。换言之，传统的方法开发需要“人工干预”。因此，将方法开发

过程自动化，减少人工干预，对于提高整体工作效率是非常有帮助的。LabSolutions MD 拥有独特的 AI 算法，通过重复“AI 改进梯度条件”和“改进条件的校正分析”的过程来自动优化梯度条件。这使得任何人都可以在没有“人工干预”的情况下探索梯度条件，只需进行流动相和色谱柱的初始制备，并确认最终结果。

1. LabSolutions MD 自动梯度条件优化介绍

图 1 为梯度优化的正常工作流程和 LabSolutions MD 使用 AI 算法的自动化工作流程的对比图。自动梯度条件优化的工作流程包括以下三个阶段。

- 1) 初始设置（图 1 中的①）
- 2) 利用 AI 探索梯度条件（图 1 中的②）
- 3) 确定最佳条件（图 1 中的③）

在“初始设置”阶段，设置几条梯度曲线和分离度标准（图 2 和 3）。在“利用 AI 探索梯度条件”阶段，LabSolutions MD 根据初始分析结果来探索梯度条件，以提供更好的分离度（图 1 ②中的条件搜索和校正分析）。此过程重复进行，直到满足分离度标准为止。在“确定最佳条件”阶段，检查 AI 建议的梯度条件是否充分满足标准。



图 1. 正常工作流程和 LabSolutions MD 自动化工作流程对比

使用 LabSolutions MD 自动优化梯度条件的优势如下所示。

- 1) 无需“人工干预”，显著提高梯度优化效率。
- 2) 任何人，无论色谱经验如何，都可以利用 LabSolutions MD 的 AI 算法优化梯度条件。

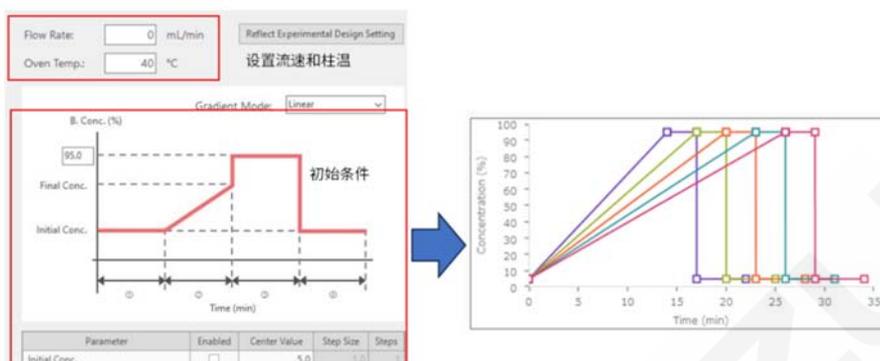


图 2.梯度优化的初始设置



图 3.分离度标准设置

2. 实验条件

使用过 LabSolutions MD 自动梯度优化功能对 10 种儿茶素、4 种茶黄素和没食子酸(共 15 种化合物)进行了 LC 分析，分析条件和目标化合物如表 1 所示。

表 1. 分析条件

仪器	: Nexera™ X3 方法开发系统		
化合物	: C1 没食子儿茶素、C2 表没食子儿茶素、C3 儿茶素、C4 表儿茶素、C5 表没食子儿茶素没食子酸、C6 没食子儿茶素没食子酸酯、C7 表没食子儿茶素 3-(3'-O-甲基)没食子酸酯、C8 表儿茶素没食子酸酯、C9 儿茶素没食子酸酯、C10 表儿茶素 3-O-(3'-O-甲基)没食子酸酯、T1 茶黄素、T2 茶黄素 3-没食子酸酯、T3 茶黄素 3'-没食子酸酯、T4 茶黄素 3,3'-双没食子酸酯、G1) 没食子酸 (共计 15 种化合物)		
流动相	: A 相 : 0.2%磷酸水溶液 B 相 : 乙腈		
色谱柱	: Shim-pack™ GISS C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm), P/N:227-30049-02		
初始条件	: (梯度洗脱) B 相 : 15%(0 min) → 45%(X min) → 15%(X~X+5 min) 浓度 *X = 6、8、10、12、14 (5 个级别) 流速 : 0.6 mL/min 进样体积 : 5.0 μL 柱温 : 55°C 检测波长 : 240-280 nm (SPD-M40, UHPLC 池)		

最低分离度标准 : 1.5
优化的梯度模型 : 线性

3. 结果与讨论

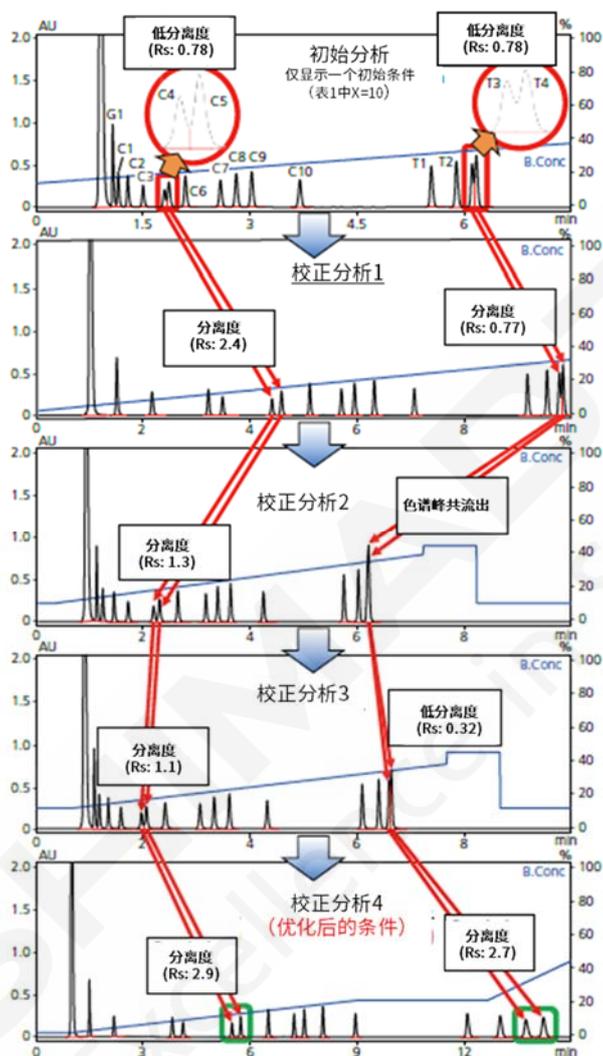


图 4. 梯度条件的自动优化 (蓝线表示梯度曲线)

初始分析的结果显示峰 C4 和 C5 之间以及峰 T3 和 T4 之间的分离度不足 (如图 4 顶部的红框所示)。然而, 通过使用 AI 算法重复执行校正分析, 最终发现了满足标准 (最低分离度为 1.5) 的梯度条件 (如图 4 底部的绿框所示)。在此例中, 通过在 9 分钟后应用等度洗脱成功分离 T3 和 T4。通常情况下, 探索这种梯度条件需要具有专业色谱分析的人员进行干预。相比之下, LabSolutions MD 的 AI 算法使任何人都可以轻松找到满足指定标准的梯度条件, 而脱离对分析者个人专业的依赖。

4. 总结

在优化方法开发的梯度条件时, 通常每次都需要人工干预来创建分析计划和数据分析。因此, 亟需梯度条件的自动优化。LabSolutions MD 结合了独特的 AI 算法, 可自动探索满足分离度标准的梯度条件, 有望显著提高方法开发的效率。

pH 自动筛选实现高效分析方法开发

摘要：由于流动相的 pH 值会影响离子化合物的保留时间，因此确定最佳 pH 值是开发 LC 方法的重要组成部分。pH 筛选需要配制多种不同 pH 值的流动相，手动配制这些流动相不仅耗时，而且很容易出现错误。自动 pH 筛选过程提高了方法开发的效率和分析的可靠性。本文介绍了 LabSolutions MD（支持方法开发的专用软件）的使用示例，对流动相 pH 值（pH2.5 至 8.5）自动进行了筛选，评估出分离 12 种小分子药物的最佳 pH。

关键词： pH 筛选 AQbD 分析方法开发 方法建立

1. 实验部分

本实验采用岛津方法开发系统结合LabSolutions MD软件对12种小分子药物进行了方法开发，分析条件参见表1。

表 1. 分析条件

系统：Nexera™ X3（方法开发系统）		
样品：12种小分子药物（见图1）		
流动相：		
泵A - 20 mmol/L磷酸钠水溶液 ¹		
A1) pH 2.5	A6) pH 5.0	A11) pH 7.5
A2) pH 3.0	A7) pH 5.5	A12) pH 8.0
A3) pH 3.5	A8) pH 6.0	A13) pH 8.5
A4) pH 4.0	A9) pH 6.5	
A5) pH 4.5	A10) pH 7.0	
泵B - 乙腈		
色谱柱：		
Shim-pack Scepter C18-120（100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm），P/N: 227-31012-05		
分析条件：		
B相浓度：5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)		
柱温：40°C		
流速：0.7 mL/min		
进样体积：1.0 μL		
检测器：Max plot 220-400 nm（SPD-M40，UHPLC流通池）		

*1 流动相混合功能用于自动混合如下三种类型的流动相（储备液）来自动制备不同的pH（A1至A13）。

- 1) 20 mmol/L磷酸水溶液
- 2) 20 mmol/L磷酸二氢钠水溶液
- 3) 20 mmol/L磷酸氢二钠水溶液

2. pH 筛选结果和汇总

含有 12 种小分子药物的样品在不同 pH 值 (pH2.5 至 8.5) 下的色谱图如图 1 所示。由于乙酰水杨酸 (峰 1) 含有一种杂质 (峰 2)，所以共计 13 个色谱峰。结果表明，部分化合物在 pH 2.5 时共流出，但所有化合物在 pH 7.0、7.5 和 8.5 时均分离。LabSolutions MD 可以不依赖用户经验，根据以下公式 1 对每个 pH 值的分离模式进行定量评估和排序，以确定最佳 pH。

$$(\text{评价值}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_P) \dots (\text{公式 1})$$

评价值的计算方式为检出峰数 (P) 乘以所有峰的分离度 (Rs) 之和。图 2 按从高到低的顺序列出了通过 pH 筛选获得的评估值。结果显示 pH 7.5 为最高值。

使用 pH 筛选功能进行方法开发不仅能够检查不同 pH 值流动相下每种化合物的保留行为变化，还能够推测未知化合物的 pKa 值。因此，可以根据每种化合物的估计 pKa 值来设置 pH 值，从而开发出耐用性好的分析方法，这也有助于提高之后方法开发各个阶段的效率，如优化阶段和耐用性评估阶段。本文仅展示了方法开发过程中自动流动相 pH 筛选过程，但 LabSolutions MD 也可用于提高优化阶段和耐用性评估阶段的的分析效率。

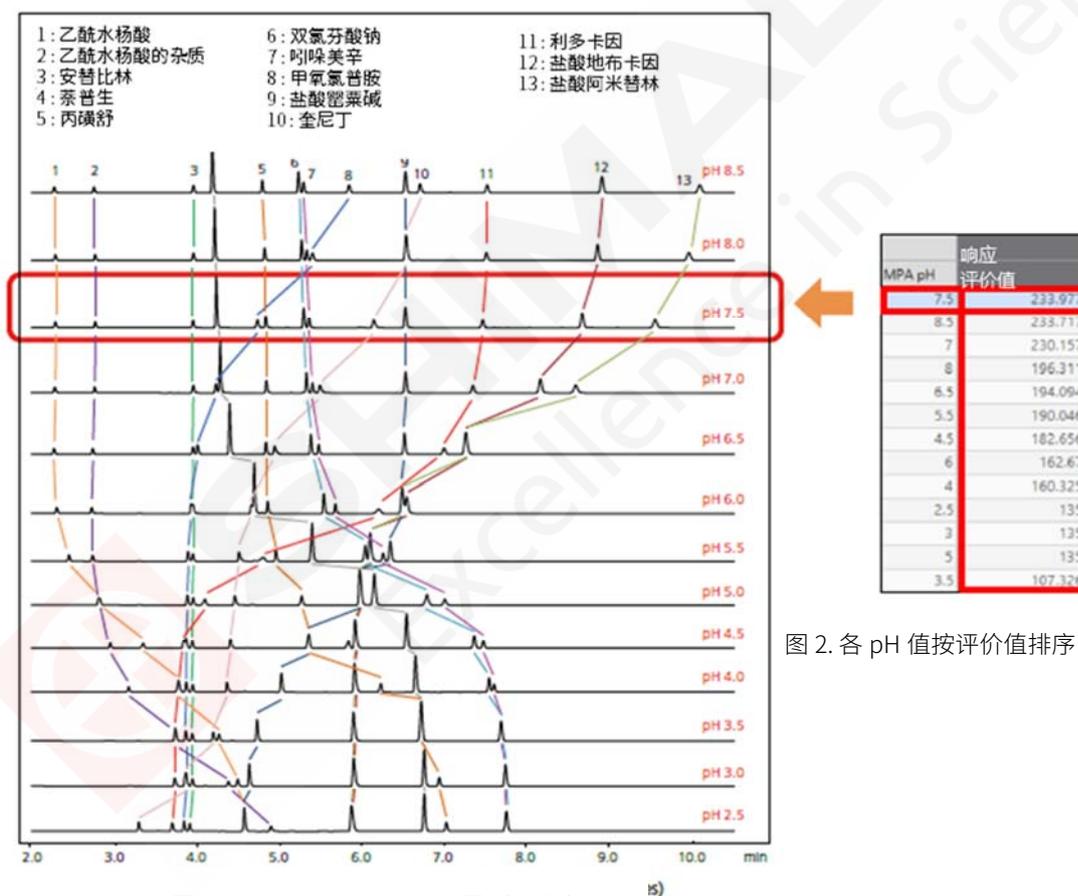


图 1. 小分子药物 pH 筛选结果 (12 种)

图 2. 各 pH 值按评价价值排序

附录 LabSolutions MD 操作步骤

一、分析操作步骤

1、运行 LabSolutions MD 软件



双击桌面图标，打开 MD 程序。

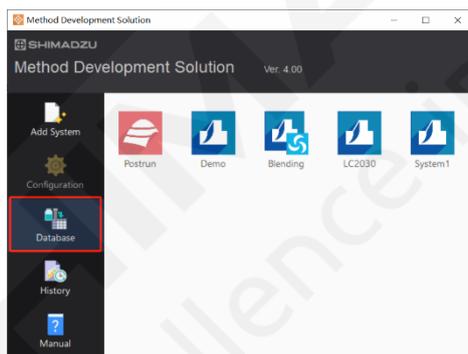
登入窗口点击 OK，初始账户名：Admin；密码：无。



2、创建实验设计

2.1 色谱柱和流动相数据库编辑

单击主窗口的 [Database] 图标，可添加、删除或编辑色谱柱和流动相。



2.1.1 色谱柱

单击数据库编辑窗口内的 [Add]、[Copy] 或 [Edit]，对色谱柱进行设置，输入色谱柱相关信息。

提示：Nickname 处输入色谱柱的简称，用于分析窗口内的名称显示和数据文件名的设置。

General Information	
Name:	<input type="text"/>
Mode:	SFC & LC
Nickname:	<input type="text"/>
P. Max in Use (MPa):	40.0
Serial Number:	<input type="text"/>
<input type="checkbox"/> Flow Rate (mL/min):	0.0000
Comment:	<input type="text"/>
Maximum Temperature (°C):	60
Identifier:	<input type="text"/>

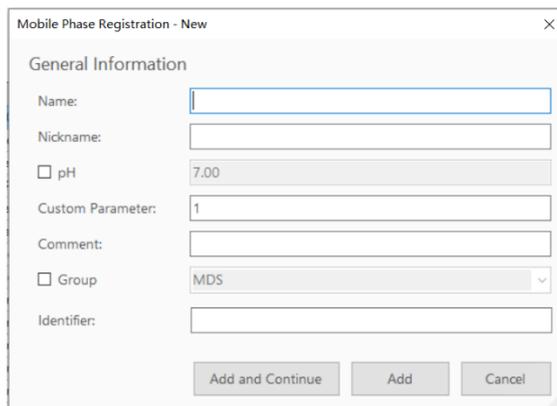
Column Specification	
Brand:	<input type="text"/>
Particle (µm):	2.2
Phase:	<input type="text"/>
I. D. (mm):	3.00
Maximum Pressure (MPa):	40.0
Length (mm):	150
<input type="checkbox"/> pH Range:	1.00 - 10.00

Pattern Generation Settings	
<input type="checkbox"/> Restrict mobile phase groups	
Available Groups:	Any

Buttons: Add and Continue, Add, Cancel

2.1.2 流动相

单击数据库编辑窗口内的 [Add]、[Copy] 或 [Edit]，对流动相进行设置。

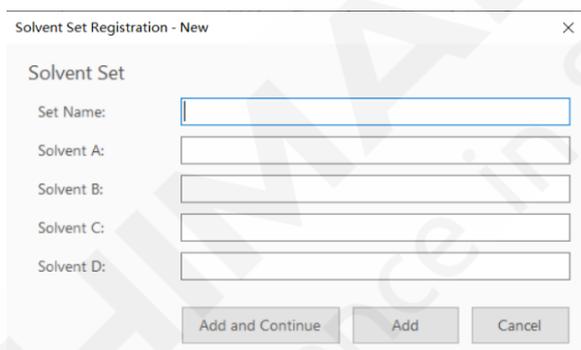


提示：Nickname 输入流动相的简称，在分析窗口内显示简称或在数据文件名内应用简称。

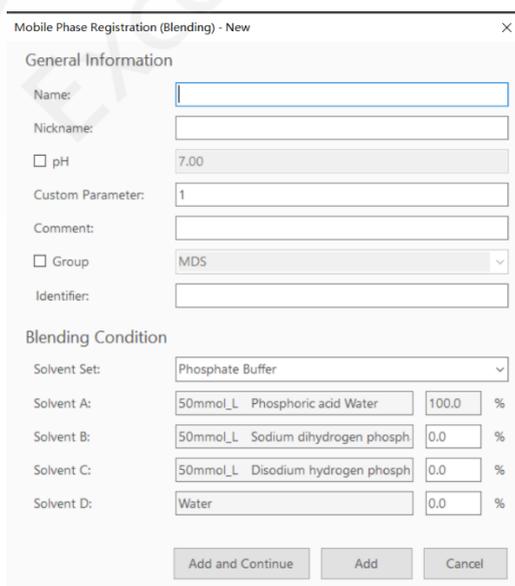
2.1.3 混合流动相

创建溶剂集：溶剂集表示各泵所用溶剂 A、溶剂 B、溶剂 C 和溶剂 D 的组合。

输入溶剂集名称，分别输入流动相 A、B、C、D 的名称；



创建混合流动相：输入流动相名称，进行设置。选择溶剂集“Solvent Set”，分别输入溶剂 B、C、D 的比例。



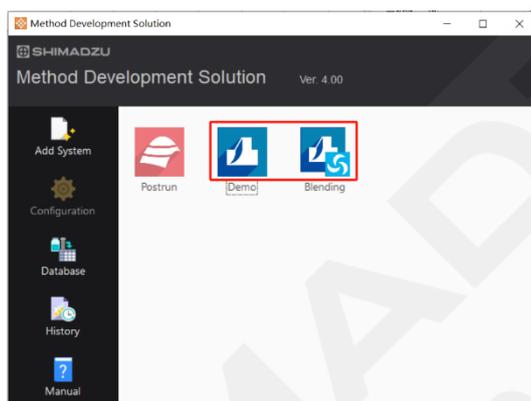
2.2 创建基本分析方法 Base Method

在 LabSolutions 中设置基本分析方法 Base Method。LabSolutions MD 根据实验设计，边更改分析方法的参数边执行分析。

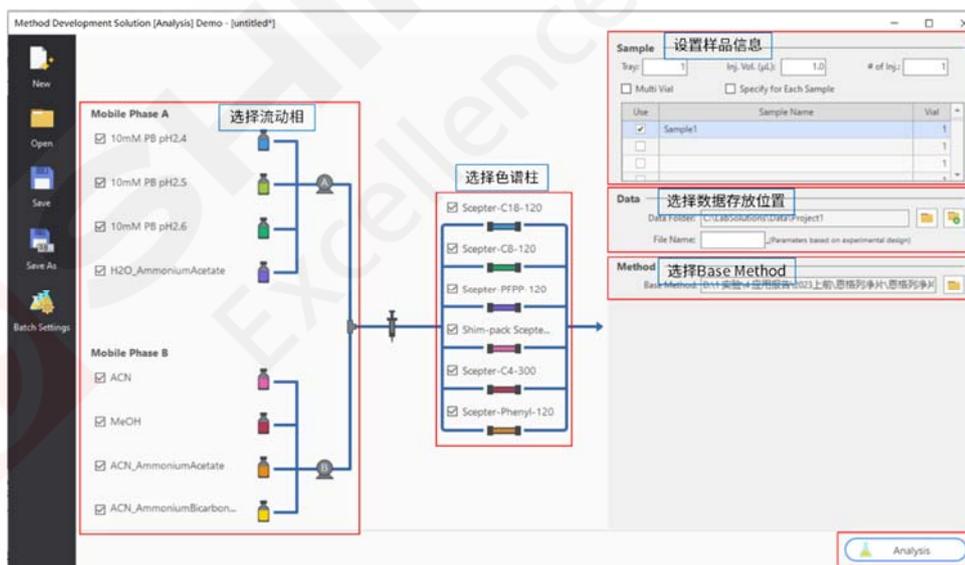
Base Method 中包含分析参数和数据处理参数两部分。分析参数设置：Base Method 中设置由样品直接确定的参数（比如检测波长等）、并且勾选泵自动排气。其他参数如梯度、流动相切换阀、柱温等分析时自动应用 MD 分析窗口中的设置；数据处理参数主要确保色谱峰被积分上，以便于后期 MD 软件中色谱峰追踪功能，可以使用 i-PeakFinder 算法，无需特殊设置，进行高精度的峰检测。

2.3 设置基本条件

Step1 双击要使用的仪器图标，自动联动 LabSolutions，弹出“分析”界面。

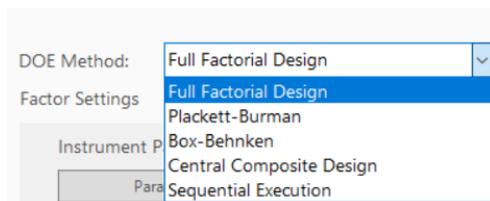


Step2 选择要考察的色谱柱和流动相，设置样品信息，选择数据存放位置和 Base Method，点击“Analysis”。



Step3 选择实验设计模型：

Full Factorial Design 全因子设计，所有因子均进行实验；Plackett-Burman 设计，使用两水平进行实验的实验设计，适合筛选，主要用于调查影响分析的因子；Box-Behnken 设计和中心组合设计，使用三水平进行实验的实验设计，适合优化，主要用于设计空间构建实验；序贯设计以基准条件为基础，创建逐次使每个因子的水平发生变化的实验，主要用于稳健性评价实验。根据方法开发的不同阶段进行选择。



Step4 设置影响因子:

流速、柱温设置有效时[Enabled 勾选✓]，以中心值为基准，根据步数和步长创建模型。设置无效时，不会创建模型，且所有分析均使用中心值；进样体积设置有效时[Enabled 勾选✓]，以中心值为基准，根据步数和步长创建模型。设置无效时，使用分析窗口内的进样体积。通常情况筛选阶段不启用，优化阶段按照需求启用。

Factor Settings

Instrument Parameters

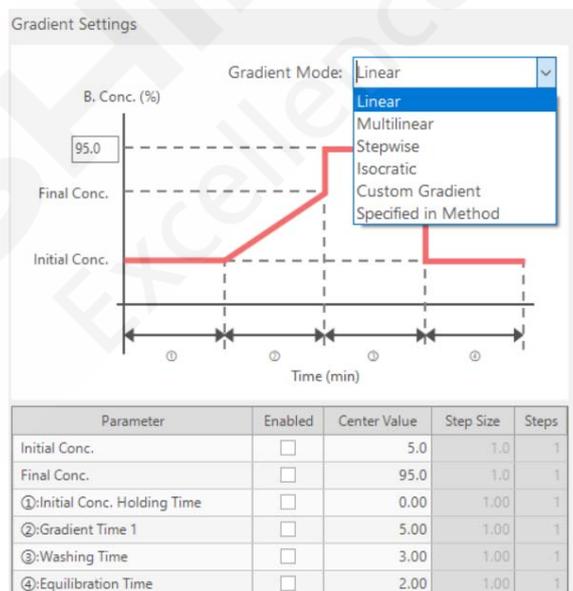
Parameter	Enabled	Center Value	Step Size	Steps
Flow Rate (mL/min)	<input type="checkbox"/>	0.0000	0.1000	1
Oven Temp. (°C)	<input type="checkbox"/>	40	10	1
Inj. Vol. (μL)	<input type="checkbox"/>		1.0	1

Step5 梯度条件设置:

设置梯度模式，梯度模式可以从线性、多元线性、梯度、等度、用户自定义或者在方法内指定中选择。

以线性梯度模式为例介绍设置梯度条件设置。输入梯度的初始浓度、梯度的最终浓度、清洗色谱柱时的浓度、梯度的初始浓度保持时间、梯度时间、色谱柱清洗时间、在梯度末尾以初始浓度进行色谱柱平衡处理的时间。

在优化阶段，对梯度条件进行细致优化时，设置有效[Enabled 勾选✓]，以中心值为基准，根据步数和步长创建模型，进行梯度条件的优化。

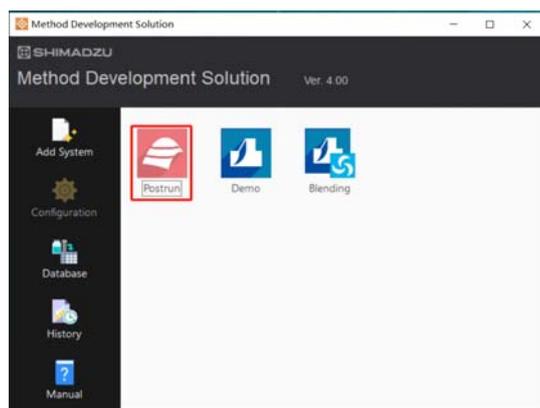


Step6 单机 “  ” 图标，将显示预览窗口。确认创建的分析序列没有问题后，点击

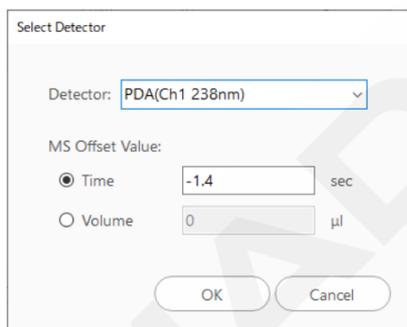
“  ”，自动在 LabSolutions 中生成批处理文件及实验设计文件，进样分析即可。

3、解析

双击 [Postrun] 图标。进入数据解析界面。



加载实验设计文件。单击解析窗口内工具栏上的 [Open] 按钮。选择此前创建的实验设计文件。选择检测器的通道。使用 MS 检测器时，输入 MS 校正时间。



3.1 筛选阶段的解析

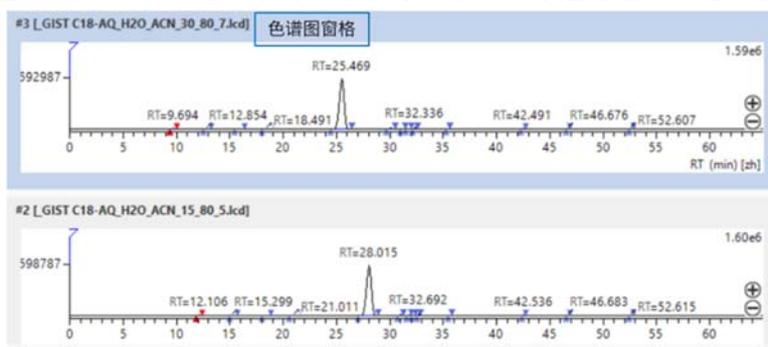
在解析窗口确认各条件下采集的色谱，以确认影响分离的要因。

3.1.1 综合评估值

实验设计窗格显示实验设计的列表和各数据内的峰数等峰信息，可以进行基于评价值及最小分离度进行综合评价。单击页眉，将按排名顺序进行显示。通常情况下评估值越高，整体色谱分离越好，以此确认筛选阶段的色谱条件，以此为基础进行下一步优化实验。

#	Data File Name	Response (%)	Response			
			Minimum Resolution	Peak Count	Separated Peak Count	Evaluation Val
3	.GIST C18-AQ_H2O_ACN_30_80_7.lcd	30	1.991	13	13	677.618
2	.GIST C18-AQ_H2O_ACN_15_80_5.lcd	15	1.975	13	13	674.392
1	.GIST C18-AQ_H2O_ACN_0_80_3.lcd	0	1.979	13	13	669.241
8	.Xbridge Shield RP C18_H2O_ACN_15_80_16.lcd	15	2.396	13	13	656.216
9	.Xbridge Shield RP C18_H2O_ACN_30_80_18.lcd	30	2.414	13	13	651.216
7	.Xbridge Shield RP C18_H2O_ACN_0_80_15.lcd	0	2.406	13	13	645.262
5	.Scepter PFFP-120_H2O_ACN_15_80_10.lcd	15	1.954	13	13	615.669
4	.Scepter PFFP-120_H2O_ACN_0_80_8.lcd	0	1.927	13	13	612.530
6	.Scepter PFFP-120_H2O_ACN_30_80_12.lcd	30	1.906	13	13	610.594
15	.Scepter PFFP-120_H2O_MeOH_30_80_30.lcd	30	1.082	11	8	361.928
14	.Scepter PFFP-120_H2O_MeOH_15_80_28.lcd	15	1.07	11	8	360.676

色谱图窗格显示色谱图和峰表，确认分离状态，可以通过鼠标拖动范围进行缩放色谱图。

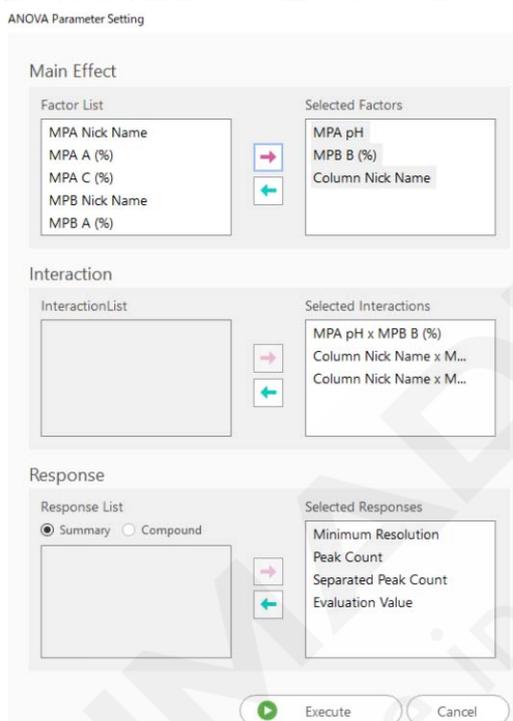


3.1.2 方差分析

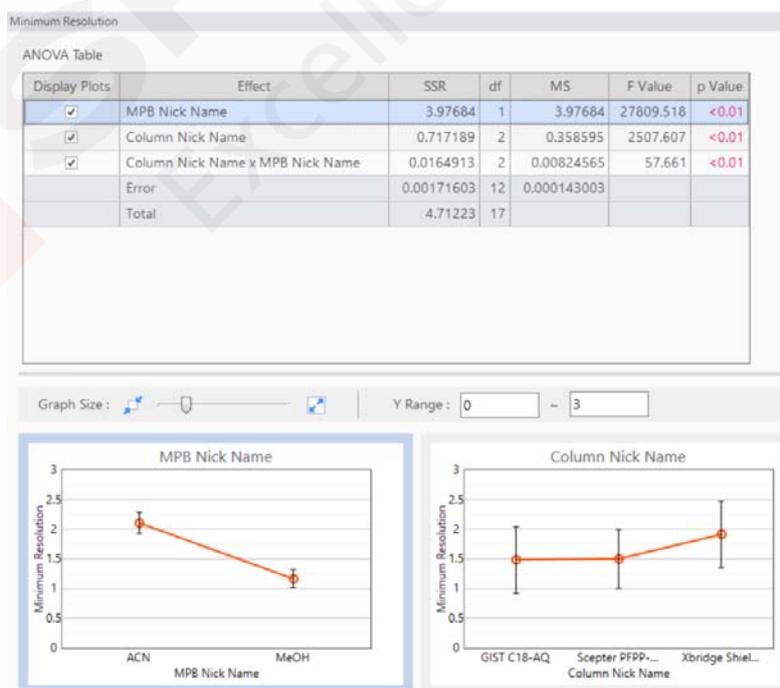
按照全因子设计或 Plackett-Burman 设计进行实验的数据可以执行方差分析，确定因子和因子间的相互作用。

Step1 从左侧工具栏处，单击 [ANOVA] 按钮。

Step2 在方差分析参数设置窗口内选择主因子、交互作用和响应。单击 [Execute]，执行方差分析。



Step3 通过方差分析表及因子效应图确认方差分析结果。因为对于 p 值小于 0.05 的要因，可以判断为要因引起的偏差比误差引起的偏差足够大，所以如果要因的值发生变化，分析结果的变化将明显大于误差，即可以判断对分离的影响大。

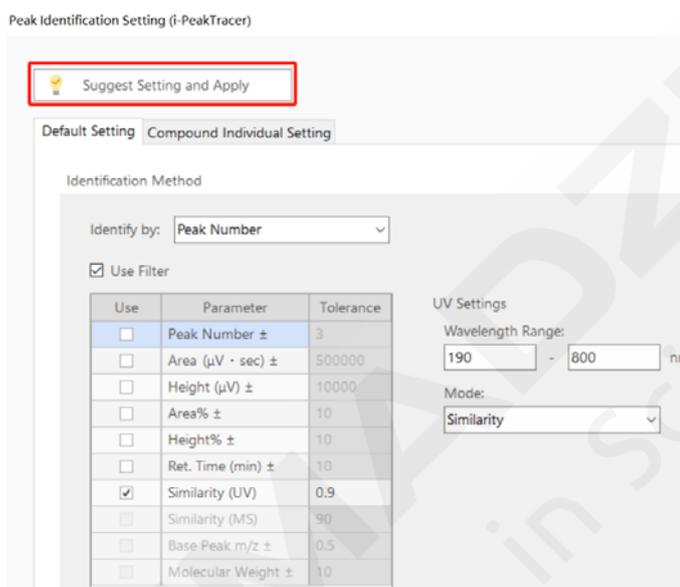


3.2 优化阶段的解析

3.2.1 峰识别

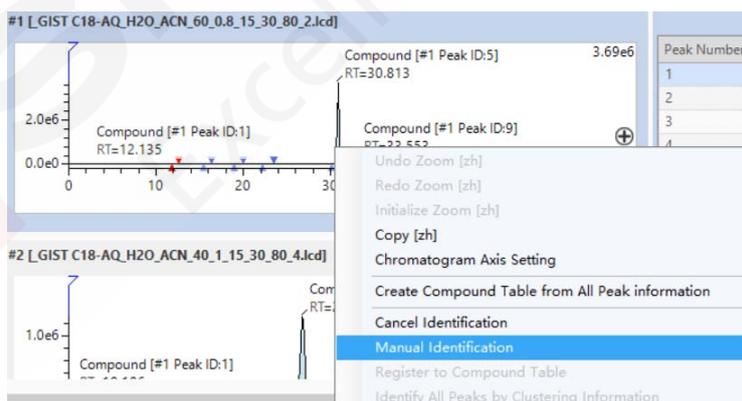
Step1 选择分离比较好的色谱图，右击 [Creat Compound Table from All Peak information] 创建化合物表。

Step2 左侧工具栏处，单击 [Peak Identification] 按钮。单击 [Suggest Setting and Apply]，应用推荐的识别设置，单击 [Analyze] 按钮。也可以针对色谱峰分离情况，通过 [Compound Individual Setting] 标签进行特定化合物的设置。



Step3 根据色谱图及实验设计窗格内的化合物信息确认是否已经正确地识别。

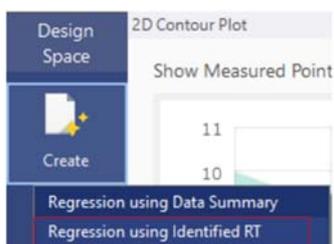
如果未被识别时，更改识别设置如 UV 光谱相似度等，再次进行峰识别，或进行手动识别。手动识别时，首先化合物表内选中需要识别的化合物，然后再点击色谱图上的色谱峰，右击选择 [Manual Identification] 即可。



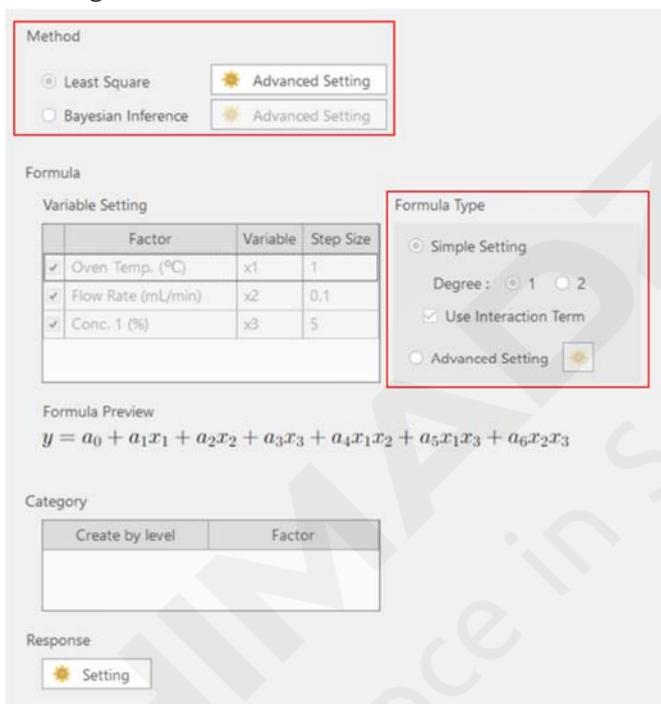
3.2.2 模型解析

Step1 左侧工具栏处，单击 [Model Analysis] 按钮。

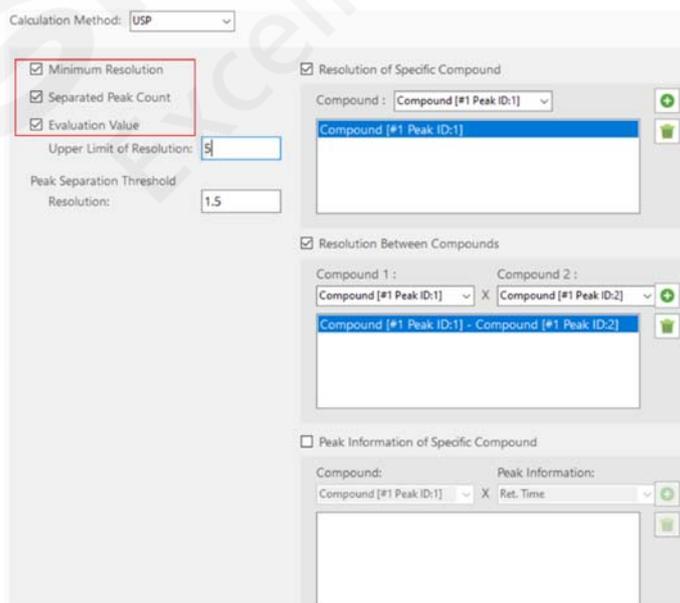
Step2 在模型解析窗口内按下 [Create] 按钮，选择 [Regression using Identified RT]，创建预测保留时间和峰宽的模型。



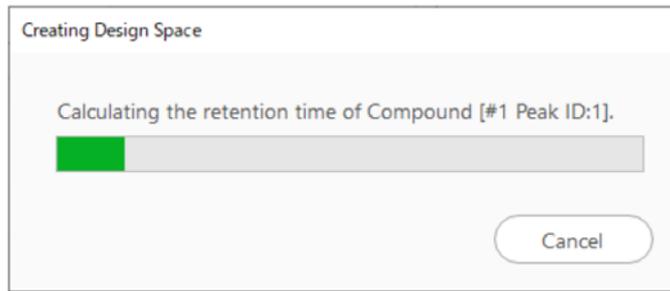
Step3 选择模型解析方法，使用二次多项式模型或指数表达式创建模型公式，如需构建复杂的模型公式，也可通过 [Advanced Setting] 按钮进行设置。



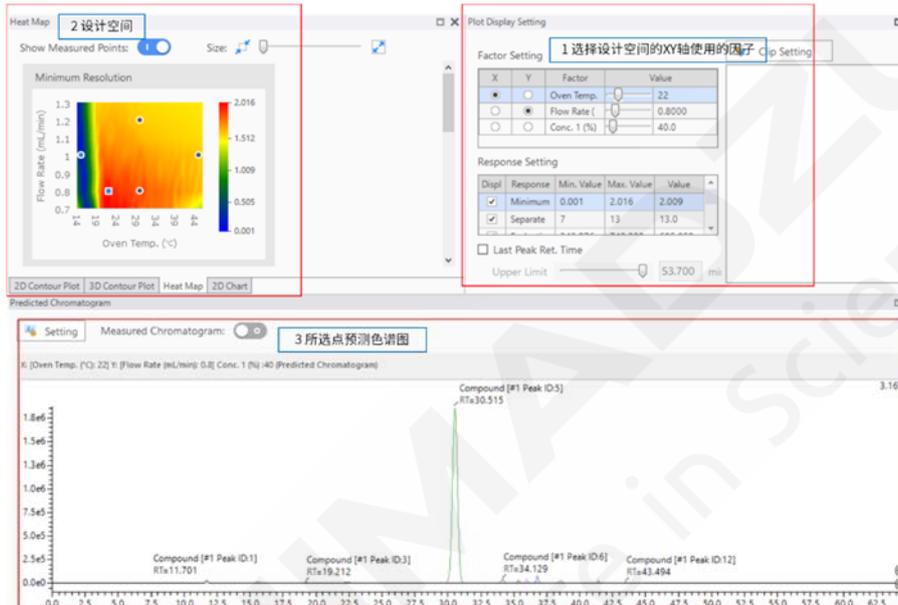
Step4 单击 [Response Setting] 按钮，选择创建的最小分离度、色谱峰的个数或最小评估值的模型。也可以根据需要，选择性的创建某一化合物或特定化合物之间分离度的模型。



Step5 单击[OK]，按下 [Create] 按钮，创建模型。模型创建完毕，模型解析窗口内显示解析结果。



Step6 确认模型解析结果。在谱图显示设置内选择设计空间的 X 轴及 Y 轴所使用的因子。在二维等高线、三维等高线及热图窗格内确认设计空间。

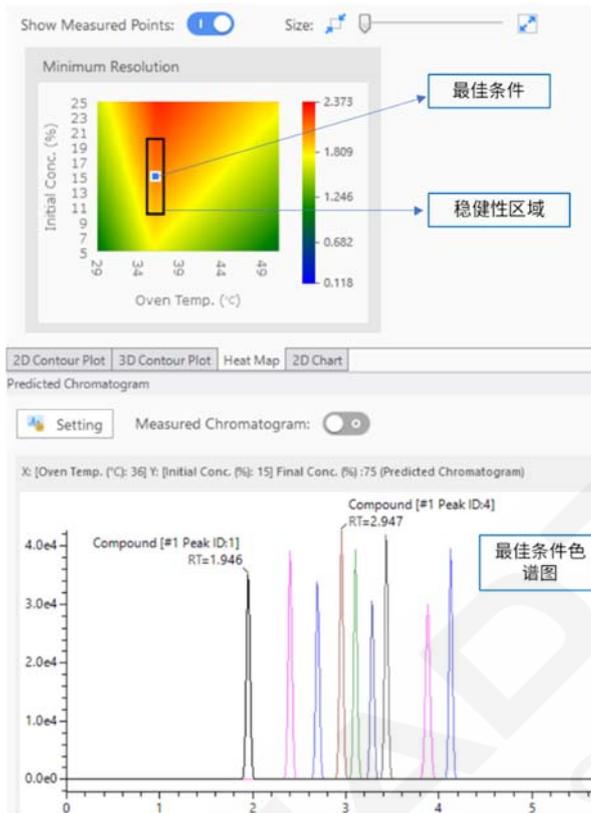


Step7 在左侧工具栏中单击 [Condition Search]，探索最佳条件或显示满足稳健性且响应最大的区域。单击 [Execute] 即可。

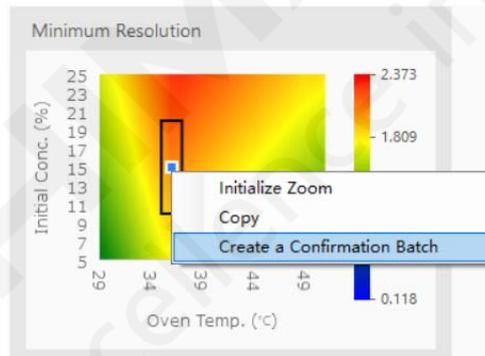
Search for the Optimum Point 探索最佳条件
 Search for Point that Satisfy Robustness 稳健性最大区域

Factor	Tolerance (\pm)
Oven Temp. ($^{\circ}$ C)	1
Flow Rate (mL/min)	0.1
Conc. 1 (%)	1

Step8 最佳条件、预测最佳条件色谱图及稳健性区域查看。



Step9 探索最佳条件后，热力图右击，选择[Create a Confirmation Batch]，可以创建验证用实验设计。



3.3 稳健性评价阶段的解析

选择稳健性评价阶段的实验设计进行方差分析。通过方差分析表及因子效应图确认方差分析结果。对于 p 值小于 0.05 的要因，可以判断为实验设计中指定的变动对分离度有很大影响，很难维持稳健性。

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容,以本版本为准,资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考,如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。