

Technical Report

采用 LabSolutions™ MD 软件进行基于分析质量源于设计的高效方法开发

Shinichi Fujisaki¹, Satoru Watanabe¹, Tomohiro Kawase¹, Yuichiro Fujita¹, Keiko Matsumoto¹

摘要：

本文介绍了使用 LabSolutions MD 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 的方法开发由 3 个阶段组成，包括筛选、优化和验证。LabSolutions MD 的专用功能为每个阶段提供支持，例如实验设计、通过自动峰跟踪功能构建设计空间以及耐用性评估，从而实现高效的方法开发。

关键词： LabSolutions MD, AQbD, 方法开发, 方法筛选, 实验设计

1. 背景

人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 建议采用 AQbD 方法进行方法开发。建议通过高效实验获取数据，例如，进行实验设计并验证对分析结果有较大影响的参数，然后构建设计空间，以了解参数相对于分析结果的有效范围。基于风险评估的方法可确保开发出耐用性好、风险性低的分析方法，而不是依赖于用户的经验。

点击软件中的图标可以直接选择流动相和色谱柱，自动生成包括色谱柱平衡的批处理表，LabSolutions MD 软件还支持不同的实验设计模型，这不仅提高了实验效率，还减少了人为错误。数据分析功能支持峰跟踪自动鉴别目标化合物，可视化设计空间以确定最佳条件，并且可预测不同的分析条件下模拟色谱图。此外，通过方差分析，可以确定对分离有较大影响的参数。本文以小分子药物为例描述了方法开发的工作流程，包括筛选、优化和验证。

2. LabSolutions MD 概述

LabSolutions MD 支持基于 AQbD 各阶段的高效方法开发 (图 1)。该软件包括几个功能，用于根据实验设计创建批处理分析 (图 2) 和数据分析，如构建设计空间和模拟色谱图 (图 3)。可以生成自动切换流动相和色谱柱进行筛选的批处理分析。此外，采用实验设计，可以用更少的分析次数找到最佳条件。在图 2 中，步骤 (1) 至 (6) 展示了如何简单快速地创建批处理分析。



图 2 创建批处理分析功能

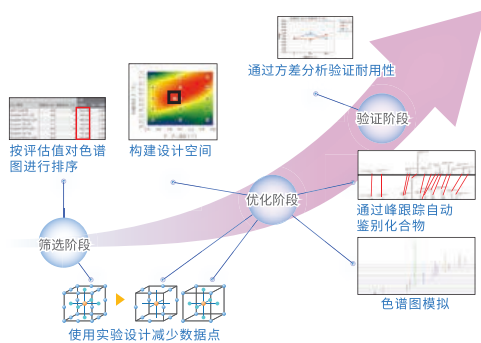


图 1 使用 LabSolutions MD 的高效方法开发

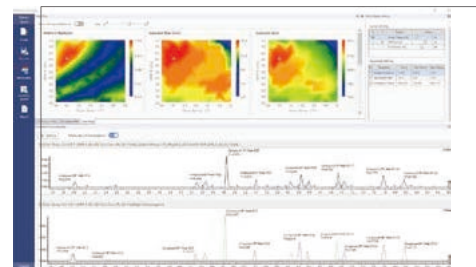


图 3 数据分析功能

3. 分析

3-1. 样品信息

表 1 为用于方法开发的小分子药物及其物理性质。作为典型案例，选择具有不同 log P 和 pKa 的小分子药物。

表 1 样品信息

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

3-2. 筛选阶段

对于筛选阶段，由于流动相和色谱柱通常对分离有很大影响，所以在方法开发的初始阶段对这些因子进行筛选。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，共获得 36 (2×3×6) 个数据（表 2）。每种缓冲液（泵 A）的 pH 值以及有机溶剂的比例（泵 B）由溶剂混合功能自动调节。流动相选择和色谱柱切换在分析过程中自动进行，大大提高了方法开发阶段的整体效率。

表 2 筛选阶段的流动相和色谱柱

流动相：	
泵 A	缓冲液 1
A1	20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 2.7)
A2	20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)
泵 B	有机溶剂 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 x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*3}
2	Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*4}
3	Shim-pack Scepter C4-300 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*5}
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*6}
5	Shim-pack Scepter PFPP-120 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*7}
6	Shim-pack GIST C18 AQ HQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.0 μm) ^{*8}
分析条件：	
时间程序	: B 浓度 5%(0 min) → 80%(8.01-11 min) → 5%(11.01-15 min)
流速	: 0.7 mL/min
进样量	: 1.0 μL
柱温	: 40° C
检测	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

*1 下面的流动相水相通过溶剂混合功能自动制备。

溶剂	A1 比例	A2 比例	
A	50 mmol/L 磷酸水溶液	16%	0%
B	50 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液	24%	24%
C	50 mmol/L 磷酸氢二钠水溶液	0%	16%
D	水	60%	60%

*2 下面的流动相有机相是通过溶剂混合功能自动制备。

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

*3 P/N 227-31013-03 *6 P/N 227-31064-03

*4 P/N 227-31034-03 *7 P/N 227-31054-03

*5 P/N 227-31176-03 *8 P/N 227-30808-02

3-3. 筛选阶段的色谱图

图 4 显示了 Shim-pack™ Scepter Phenyl- 120 获得的色谱图。洗脱出 14 个峰，包括奎尼丁和乙酰水杨酸的杂质。经证实，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。

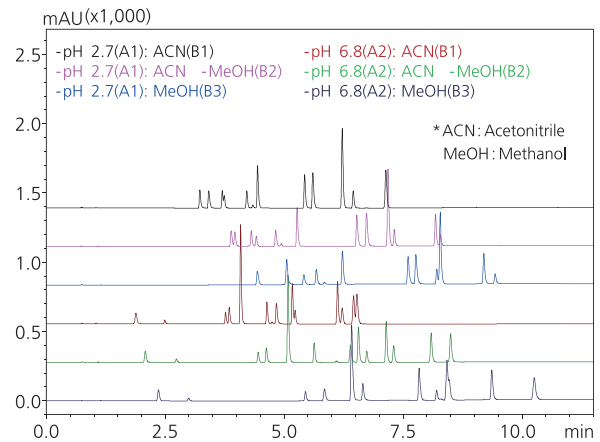


图 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 的色谱图

3-4. 快速找到最佳条件

因为筛选阶段生成的色谱图与分析条件数量一样多，所以必须对它们进行评估，以确定哪一个分析方法是最佳的。如果必须逐一检查所有色谱图，将会花费大量时间和成本。LabSolutions MD 可以使用下面的公式 (1) 快速轻松地找到最佳条件，以定量评估色谱分离。

$$(\text{评估值}) = P \times (R_{s1} + R_{s2} + \dots + R_{sp}) \quad (\text{公式 1})$$

评估值 (E) 的计算方式为检出峰数 (P) 乘以所有峰的分离度 (Rs) 之和。图 5 以从最高到最低的顺序显示了筛选阶段各分析条件获得的评估值。结果表明，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 以及色谱柱为 Shim-pack Scepter Phenyl-120 时，获得了最高的评估值 (图 4: 绿色色谱图)。

色谱柱名称	MPA pH	MPBA (%)	响应值	评估值	最低分离度
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	

图 5 按评估值对分析条件（流动相和色谱柱）的排序（从最高到最低显示）

3-5. 使用方差分析确定对分离有重大影响的参数

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的参数有助于决定在优化阶段应进一步考虑哪些参数，从而提高方法开发的效率。

图 6 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 MPB 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	0.347
	错误	33336.5	10	3333.7		
	总计	242835.8	35			

图 6 方差分析结果

3-6. 筛选结果

表 3 显示了在筛选阶段获得的具有最高评估值的最佳条件。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 获得了最佳条件。在优化阶段（3.7），对方法进行进一步优化，包括泵的梯度程序和柱温箱温度。

表 3 评估值最高的条件

流动相：	
泵 A	缓冲液
A2	20 mmol/L（钠）磷酸盐缓冲液（pH 6.8）
泵 B	有机溶剂
B2	乙腈 / 甲醇 = 50: 50
色谱柱：	
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120
分析条件：	
时间程序	: B 浓度 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)
流速	: 0.7 mL/min
进样量	: 1.0 μL
柱温	: 40° C
检测	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-7. 优化阶段

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。设计空间显示了这些参数对分离的影响，纵轴为有机流动相的混合比，横轴为柱温箱温度。

构建设计空间使得能够全面可视化参数对最小分离度的影响。LabSolutions MD 可以在设计空间的整个区域（图 7 中的黑色方框）中预测最佳的条分析件，而不依赖于用户经验。根据设计空间，确定最佳的分析条件是有机溶剂混合比为 50%，柱温箱温度为 39°C，梯度程序的最终浓度为 80%。此外，通过点击设计空间中的任意点（如图 7 中的点 A），可以显示模拟的色谱图（图 8）。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情况。

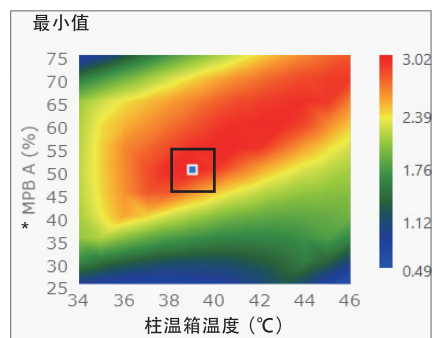


图 7 最小分离度的设计空间（最终梯度浓度为 80%）
* 流动相 B A: 乙腈

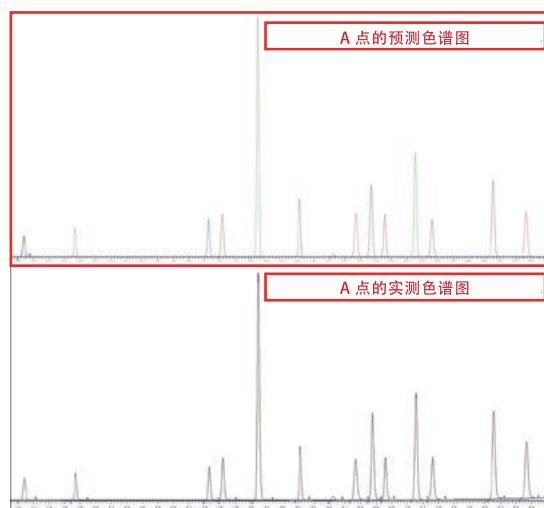


图 8 A 点的模拟色谱图和实际色谱图（图 7）

3-8. 使用峰跟踪自动鉴别化合物

当流动相、柱温箱温度、泵梯度程序等分析条件改变时，每种化合物的保留时间也可能不同。通过所有获得的数据人工鉴别每种化合物是一个耗时的过程。LabSolutions MD 可通过峰跟踪功能自动鉴别所有数据中的目标化合物（图 9）。例如，紫外光谱、峰面积和其他参数的相似性可用于自动跟踪每种化合物，有助于通过所有数据快速识别峰，无需任何额外的人工工作。

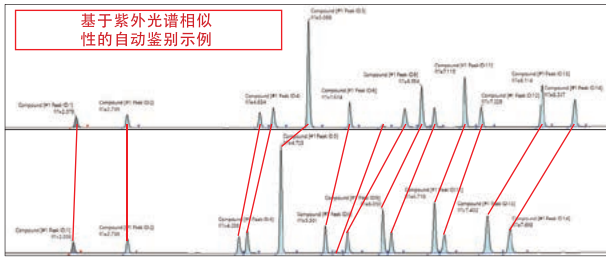


图9 使用峰跟踪功能自动鉴别目标化合物

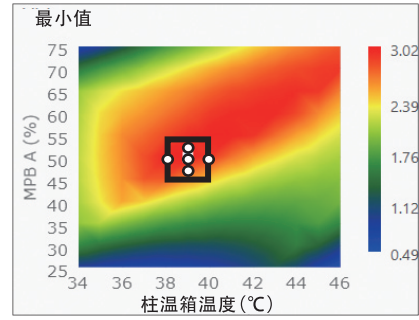


图10 耐用性允差范围

3-9. 优化结果

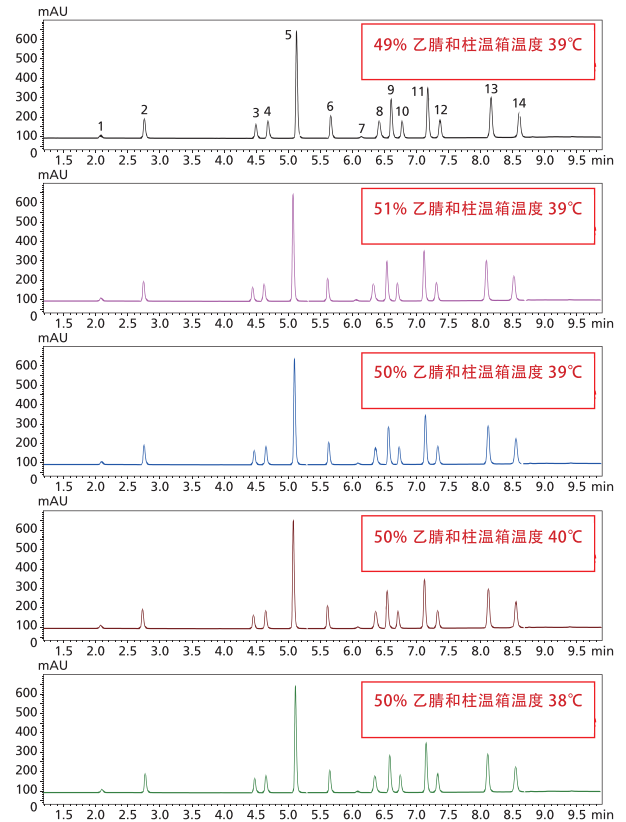
表4显示了通过优化阶段确定的条件。通过构建设计空间，确定最佳条件为：50:50 乙腈 / 甲醇作为有机相，柱温箱温度为 39°C，梯度程序的最终浓度为 80%。在 3.10 的验证阶段，当每个参数在小范围内变化时，通过检查分离模式评估优化方法的耐用性。

表4 优化条件

流动相：	
泵 A	缓冲液
A2	20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)
泵 B	有机溶剂
B2	乙腈 / 甲醇 =50:50
色谱柱：	
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm 内径, 1.9 μm) *6
分析条件：	
时间程序	: B 浓度 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)
流速	: 0.7 mL/min
进样量	: 1.0 μL
柱温	: 39° C
检测	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-10. 验证阶段

在验证阶段，LabSolutions MD 可以创建序贯实验设计来执行耐用性评估。耐用性评估对于研究参数变化如何影响结果以及确保方法的可靠性非常重要。LabSolutions MD 通过在小范围内改变优化方法的参数来自动创建序贯实验设计，以评估耐用性。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 10 中的白色圆圈)，以验证对分离的影响。图 11 显示了耐用性评估获得的色谱图。参数变化对分离的影响非常小，表明了由设计空间构建的优化方法的耐用性良好。基于 AQbD 方法的优化分析方法将有利于下一阶段的方法开发。



- | | |
|--------------------|-----------|
| 1: 乙酰水杨酸 | 8: 奎尼丁 |
| 2: 乙酰水杨酸的杂质 | 9: 双氯芬酸钠 |
| 3: 安替比林 | 10: 吡罗美辛 |
| 4: 甲氧氯普胺 | 11: 盐酸罂粟碱 |
| 5: (S) - (+) - 萘普生 | 12: 利多卡因 |

图 11 每个数据点的耐用性评估色谱图 (图 10 中的白色圆圈)

LabSolutions 和 Shim-pack 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 地区的商标。



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>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022 年 04 月

岛津应用云

