



# 采用智能系统模拟技术实现 Agilent 1290 Infinity UHPLC 中基于 QbD 的方法开发以及到 HPLC 的无缝方法转移

## 应用简报

制药 QA/QC

### 作者

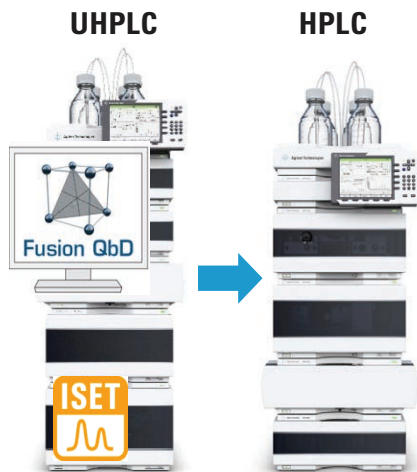
Vinayak A.K  
安捷伦科技公司  
Bangalore, India

### 摘要

本应用简报采用质量源于设计 (QbD) 原则在亚 2  $\mu\text{m}$  粒径色谱柱上开发了一套方法，并将其转换为传统 HPLC 方法。采用安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 实现不同液相色谱系统间之的无缝方法转移。初始方法开发在 Agilent Infinity 1290 系统中进行，其中包括在不同色谱条件（涉及洗脱液、流速、梯度斜率和温度等多重组合）下对不同亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱进行固定相筛选。采用实验设计 (DOE) 原理对性能最佳的固定相系统进行后续优化，以便建立 ICH 设计空间。安捷伦方法转换软件用于将亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱填料方法转换为传统色谱柱填料方法。Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与 ISET 技术结合使用以模拟 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统。这样可以为 HPLC 方法建立设计空间。随后在 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统中对转移后方法的重现性和分离度进行验证。结果清晰表明 ISET 与 Fusion QbD 方法开发与验证软件 (S-Matrix) 的结合使用能够在 QbD 原则下将 UHPLC 方法有效转换为 HPLC 方法。



**Agilent Technologies**



## 前言

现今，满足 ICH Q8 (R2) 和 ICH Q2 (R2) 指导原则的基于质量源于设计 (QbD) 的方法开发及验证是制药行业分析研发领域的热点话题。QbD 原则中建立了关键方法属性 (CMA)，并利用多变量统计分析和建模方法对关键方法参数 (CMP) 之间的相互作用对这些 CMA 产生的影响进行了表征。满足 QbD 原则液相色谱方法的开发目标为建立稳定设计空间，即方法参数在 CMP 多维（联合）工作范围中发生改变不会造成一个或多个 CMA 的分析结果不合格。实验设计 (DOE)、实验自动化和多变量分析可用于构建上述稳定设计空间，从而减少现场方法错误与超标研究结果<sup>1</sup>。这一原则有助于在方法开发过程中确保方法稳定性。

方法开发、验证与向 QA/QC 实验室的转移是制药行业中的常规流程<sup>2</sup>。使用传统的长时间 HPLC 方法根据 QbD 原则进行固定相筛选和正式方法开发非常耗时。

进行固定相筛选时，在亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱中使用 UHPLC 方法可极大提高筛选效率<sup>3</sup>。开发完成后需要将最终方法转移至 QA/QC 部门，而该部门中的大部分液相色谱系统为 HPLC 系统。在不影响 CMA 的前提下从 UHPLC 向 HPLC 进行方法转移是一个具有挑战性的过程。由于系统延迟体积和梯度混合精度存在差异，因此即使在 UHPLC 系统中采用传统色谱柱开发的方法，在转移至 HPLC 系统后仍无法确保方法性能完全相同。为克服这一难题，我们采用 ISET 技术对方法开发过程中的目标系统属性进行了模拟。

## 实验部分

### 仪器

包括以下模块和组件的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱方法开发系统：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 12 位/13 通溶剂选择阀 (G4235A)
- 利用恒温箱 (G1330B) 维持 4  $^{\circ}\text{C}$  恒温的 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- 带 8 位/9 通阀 (G4230B) 的 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C) 组
- 四种溶剂的溶剂选择管线工具包（部件号 5067-4601）
- Agilent 1290 Infinity DAD (G4212A)

Agilent 1260 Infinity 系统用于对转移后方法的重现性进行验证。该系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器 (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B)

### 软件

- Fusion QbD 自动化液相色谱方法开发软件 (S-Matrix) (版本：9.6.22, Build 42)
- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版工作站 (C.01.05, [38])
- ISET 3 (驱动程序版本 A.02.09)

### 试剂与样品

所有溶剂均为 HPLC 级 (RCI Labscan Ltd, Thailand)。利拉利汀制剂购自当地药店，过氧化氢购自当地供应商 (Bangalore, India)。

### 降解步骤

将利拉利汀片剂研碎并准确称取 150 mg 药剂粉末。加入 1000  $\mu\text{L}$  3% 过氧化氢溶液，涡旋振荡后在室温下避光温育 30 min。然后将溶液置于旋转蒸发器中 30 min 以蒸发去除所有过氧化氢残留。加入 1000  $\mu\text{L}$  稀释溶液 (50% 乙腈/50% 水) 并涡旋振荡后，将溶液以 13000 rpm 的转速离心 5 min。随后采用玻璃微纤维过滤器对上清液进行过滤。将过滤后的溶液与等量稀释液混合并以 13000 rpm 的转速离心 5 min，随后进样至 HPLC 中。

## 工作流程

方法开发工作流程的第一步是在 2 种有机溶剂以及 5 个不同 pH (水溶液) 中对 6 种亚 2 μm 短色谱柱进行筛选。采用 Fusion QbD 软件在 Agilent 1290 Infinity 液相色谱方法开发系统中进行这一固定相系统筛选实验 (图 1)。对最初筛选出的固定相作进一步优化以得到稳定 UHPLC 方法并为该方法建立稳定设计空间之后, 色谱条件将达到最佳状态<sup>3</sup>。

随后采用安捷伦方法转换软件将新建 UHPLC 方法转换为 HPLC 方法。在所有后续步骤中, 1290 Infinity 系统均在模拟模式下运行, 通过 ISET 将其模拟为 1260 Infinity 系统。采用包括温度、梯度斜率和 pH 在内的 DOE 实验设计对转移后的方法进行优化。HPLC 方法优化完成后, 将得到的设计空间与之前生成的 UHPLC 设计空间进行比较。将设计空间中的经验证可接受范围 (PAR) 在两套系统中分别进行验证。随后在 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统中运行最终 HPLC 方法, 并通过 API 峰面积重现性、保留时间和分离度对其性能进行验证。

## 结果与讨论

### UHPLC 筛选与优化

这一步骤利用亚 2 μm 色谱柱快速方法对多种色谱柱固定相、宽 pH 范围以及有机溶剂 (乙腈和甲醇) 进行了筛选。固定相系统筛选实验确定出的最佳整体色谱条件为 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 色谱柱、pH 7 以及 10 min 的梯度时间。基于 DOE 的方法优化实验中还包括了梯度终

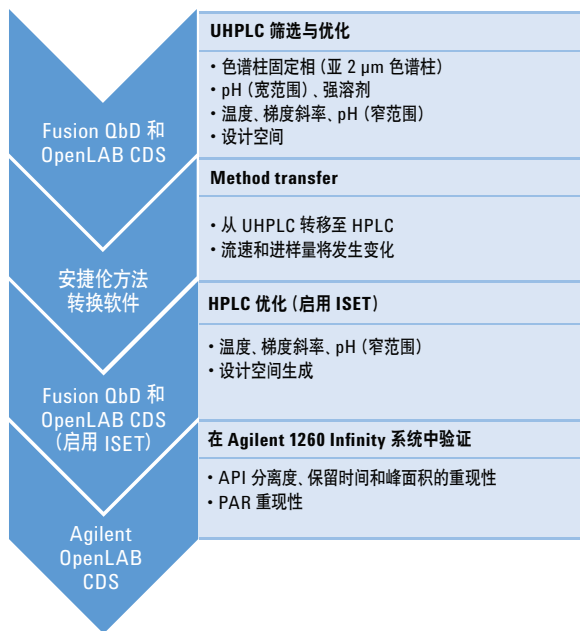


图 1 本研究采用的整体工作流程。流程图左侧显示所使用的软件包, 右侧显示工作流程的详细步骤

点强溶剂百分比、更精确的 pH 范围以及柱温等附加色谱参数。条件优化后的最佳总体结果为 pH 7.7、45 °C, 90.5% 的强溶剂最终百分比以及 15 min 的梯度时间。随后围绕这一方法为上述 CMP 建立了设计空间。Fusion QbD 中的点预测功能用于在液相色谱系统中自动执行验证。本研究的更多详情在先前的出版物中有详细描述<sup>3</sup>。

### 使用安捷伦方法转换软件进行方法转移

使用安捷伦方法转换软件将快速 UHPLC 方法转换为 HPLC 方法。全新 HPLC 参数列于表 1 中。方法转换软件能够根据 HPLC 色谱柱尺寸预测新的梯度时间、进样量和流速。随后通过将基于 DOE 的优化实验用于这一转换后的方法从而体现出 QbD 原则。

表 1. UHPLC 和转移后的 HPLC 参数

参数	UHPLC	HPLC																												
流速	0.6 mL/min	1.4 mL/min																												
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm																												
进样量	1 μL	5 μL																												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td></tr> <tr><td>0.1</td><td>5</td></tr> <tr><td>15.1</td><td>90.5</td></tr> <tr><td>16.3</td><td>95</td></tr> <tr><td>16.4</td><td>5</td></tr> <tr><td>18.4</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	时间	%B	0	5	0.1	5	15.1	90.5	16.3	95	16.4	5	18.4	5	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td></tr> <tr><td>0.21</td><td>5</td></tr> <tr><td>45.3</td><td>90.5</td></tr> <tr><td>48.9</td><td>95</td></tr> <tr><td>49.2</td><td>5</td></tr> <tr><td>55.2</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	时间	%B	0	5	0.21	5	45.3	90.5	48.9	95	49.2	5	55.2	5
时间	%B																													
0	5																													
0.1	5																													
15.1	90.5																													
16.3	95																													
16.4	5																													
18.4	5																													
时间	%B																													
0	5																													
0.21	5																													
45.3	90.5																													
48.9	95																													
49.2	5																													
55.2	5																													

## HPLC 方法优化 (启用 ISET)

1290 Infinity 系统在模拟模式下作为 1260 Infinity 系统运行。通过方法转换软件得到的基本 HPLC 方法进一步采用基于 DOE 的实验设计进行优化。由于 CMP 各不相同，因此根据先前定义的 CMA 建立了 HPLC 设计空间 (表 2)。图 2 显示优化实验中所采用的 pH 和有机溶剂最终百分比的结合实验范围图，左图为 UHPLC，而右图则为 HPLC。在这些图中，每个 CMA 对应于一种颜色，图形区域中被相应颜色涂为阴影的部分对应于未能满足该 CMA 性能要求的方法。图 2 中的设计空间对应于未涂为阴影的区域 (白色区域)，该区域满足对所有 CMA 的性能要求。请注意，与 UHPLC 方法相比 HPLC 方法的设计空间更大。这表明 HPLC 方法优化可使整体方法性能得到提高。HPLC 方法中更为广泛的 CMA 安全运行范围能够满足更加严格的方法性能要求。这有助于在不影响方法稳定性的前提下提升色谱性能。例如，如表 3 所示，API 分离度目前可实现 > 4.0 (之前为 > 1.5)，而峰拖尾因子则可实现 < 1.3 (之前为 < 1.5)。

表 2. UHPLC 设计空间中所使用的关键方法属性和其他参数

关键方法参数 (CMP)	值	经验证的可接受范围 (PAR)	关键方法属性 (CMA)
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm		峰数 > 40 API 分离度 > 1.5 峰纯度 ≥ 98% 峰拖尾因子 < 1.5
强溶剂	甲醇		
强溶剂百分比	90.5 %	± 1.5 %	
水相溶剂 pH	7.7	± 0.1	
梯度范围	5 % to 90.5 %		
柱温箱温度	45 °C		
梯度时间	15 min		
流速	0.6 mL/min		
波长	292 nm		
优化后梯度	时间 %B		
	0 5		
	0.1 5		
	15.1 90.5		
	16.3 95		
	16.4 5		
	18.4 5		

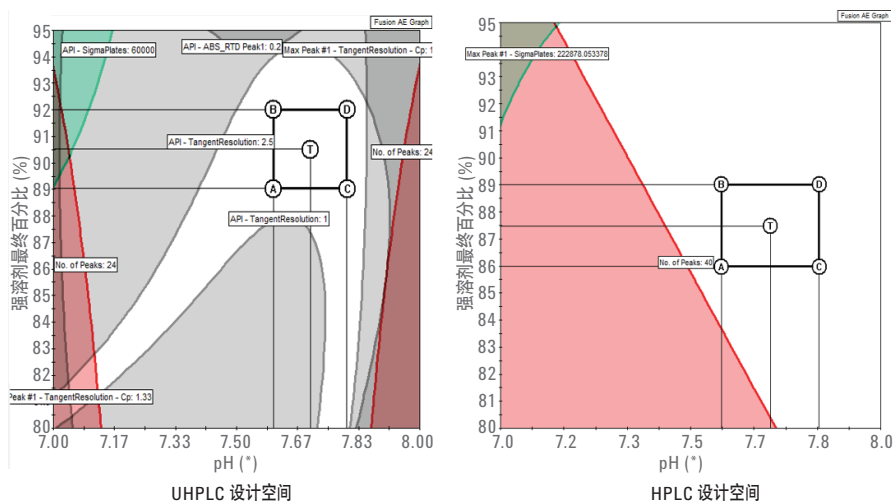


图 2. 相同 CMA 性能要求下的 UHPLC 设计空间图和 HPLC 设计空间图。与 UHPLC 相比，HPLC 的设计空间 (如图中白色非阴影区域所示) 有所扩大

Fusion QbD 利用更严格的 CMA 性能要求生成了全新设计空间图 (图 3)。在图 3 的设计空间图中, pH 和有机溶剂最终百分比的 PAR 均以矩形表示。各个 PAR 矩形的顶点与中心点代表可通过实验验证 PAR 的方法。验证运行结果如中图所示 (温度 = 37 °C), 所有验证方法结果均满足 CMA 性能要求。这些验证结果对应的色谱图如图 4 所示。色谱图表明当 CMP 处于设计空间内时, 关键色谱峰对的分离度和保留时间偏差均极其微小, 因此表明该方法的稳定性极高。

表 3. 改良后的 HPLC 设计空间中所使用的关键方法属性和其他参数。表中还显示了 HPLC 的优化后梯度

关键方法参数 (CMP)	值	经验证的可接受范围 (PAR)	关键方法属性 (CMA)
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm		峰数 > 40 API 分离度 > 4.0 峰纯度 ≥ 98% 峰拖尾因子 < 1.3
强溶剂	甲醇		
强溶剂百分比	87.5 %	± 1.5 %	
水相溶剂 pH	7.7	± 0.1	
梯度范围	5% - 87.5 %		
柱温箱温度	37 °C	± 4 %	
梯度时间	45 min		
流速	1.4 mL/min		
波长	292 nm		
优化后梯度	时间 %B		
	0.3 5		
	45.6 87.5		
	49.2 87.5		
	49.5 95		
	49.8 95		
	50.1 5		
	53.1 5		

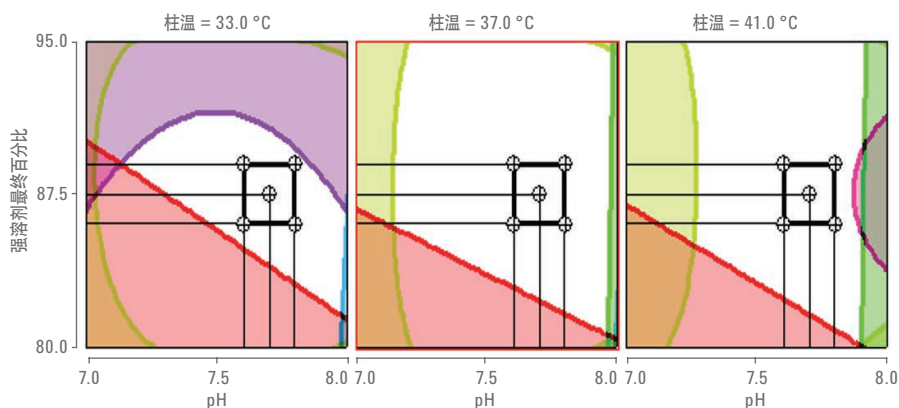


图 3. 三幅张图中的 HPLC 设计空间表明温度可在 33 - 41 °C 范围内进行变化。该图反映出更加严格的方法性能要求 (CMA)。图示设计空间中的矩形区域表示图中变量在 PAR 温度范围内的不同 PAR。各 PAR 矩形的顶点与中心点代表可通过实验验证 PAR 的方法。在这种情况下, PAR 验证中不包括温度范围

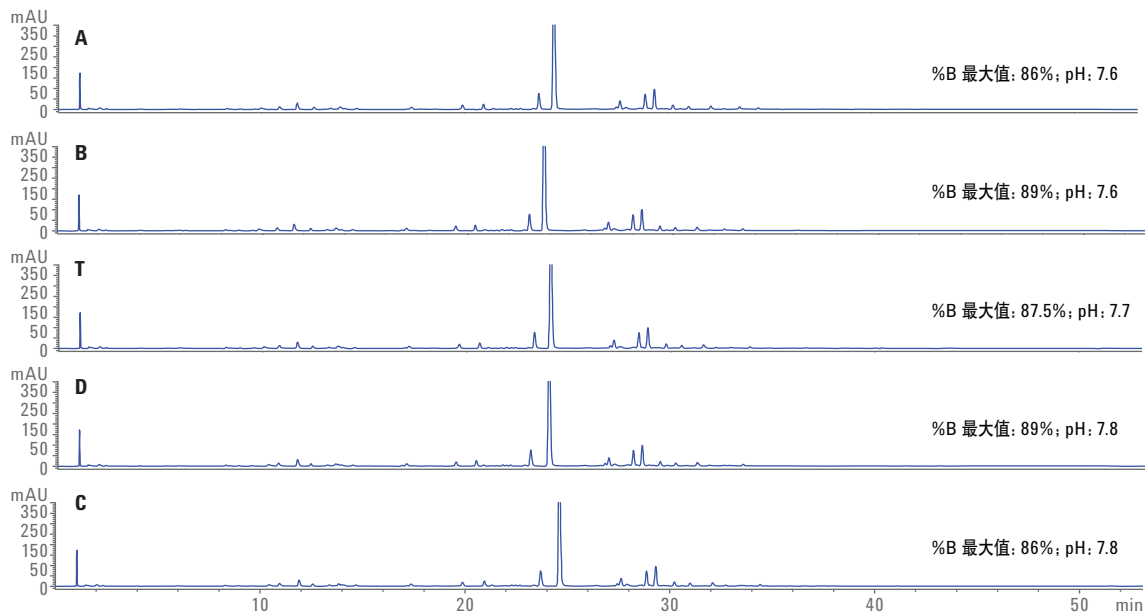


图 4. 经验证可接受范围 (PAR) 验证色谱图。PAR 矩形区域的四个顶点 (A、B、D 和 C) 和中心点 (T) 对应于生成色谱图的方法条件。所有色谱图均满足 CMA 性能要求 (API 分离度 > 4 以及 API 拖尾因子 < 1.3)

### Agilent 1260 Infinity 系统验证

将优化后的 HPLC 方法复制到 1260 Infinity 系统中。两幅色谱图的 API 保留时间 (RT) 和分离度差异均处于可接受限值以内 (图 5)。通过六次重复实验对方法重现性进行验证, 得出 API 峰面积、保留时间和分离度的 RSD 均处于可接受限值以内 (图 6)。将 PAR 复制到 1260 Infinity 系统中以确认是否满足 CMA 性能要求。结果表明该方法完全满足 CMA 性能要求, 并与模拟 1260 Infinity 得出的结果十分相似 (表 4)。

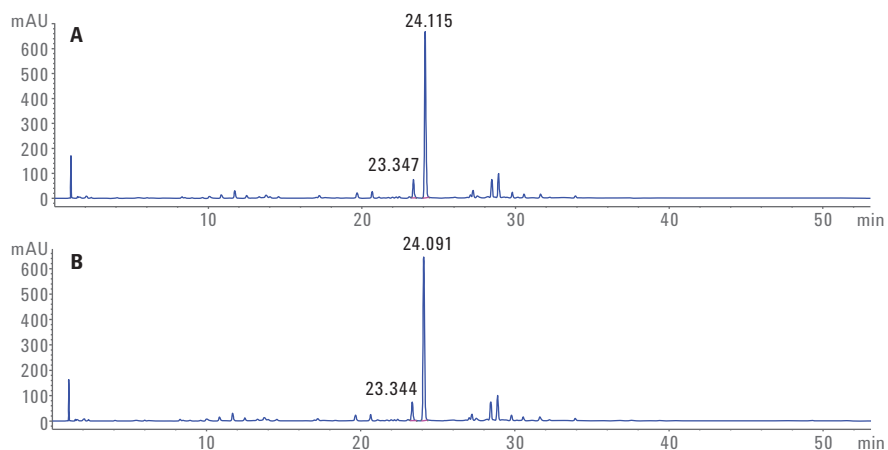


图 5. 模拟为 Agilent 1260 Infinity 系统的 Agilent 1290 Infinity 系统 (A) 以及 Agilent 1260 Infinity 系统 (B) 的最佳方法色谱图。API 分离度和保留时间的偏差百分比分别为 4.2 和 0.1, 均处于可接受偏差限值以内



## 亚 2 μm 色谱柱在筛选中的优势

筛选和优化实验所需的总时间如表 5 所示。在筛选实验中采用传统长色谱柱时虽然可跳过 UHPLC 优化步骤，但采用传统色谱柱的色谱柱筛选将消耗较长运行时间与较多溶剂。因此亚 2 μm 色谱柱是固定相系统筛选的最佳选择。虽然采用亚 2 μm 色谱柱的筛选工作流程需要额外的 HPLC 优化步骤，但相比之下仍能够缩短 19 小时的方法开发实验运行时间。

## 结论

本应用简报采用 Agilent 1290 Infinity 方法开发系统、亚 2 μm 色谱柱（用于固定相系统筛选）以及 Fusion QbD 软件平台对 QbD 原则的应用展示了一套高效的方法开发流程。随后将最终 UHPLC 方法转移至传统 HPLC 方法和色谱柱中。依次利用 ISET 模拟模式的 1290 Infinity UHPLC 与 Agilent 1260 Infinity 系统针对 CMA 性能和稳定性对方法进行优化。使用亚 2 μm 色谱柱可在筛选步骤中节省 19 个小时。

HPLC 方法的设计空间与 UHPLC 方法相比得到了扩展，同时所有 CMA 的性能均得到了提升。这表明 HPLC 方法更加稳定，CMP 偏差更小。HPLC 方法经最终优化后，API 分离度和拖尾因子分别可达到 > 4 和 < 1.3。重复运行结果表明 API 峰面积和保留时间的 %RSD ≤ 1.5%，API 分离度的 %RSD ≤ 2%。将最终方法转移至 Agilent 1260 Infinity 常规 QA/QC 系统以进行验证。结果表明方法重现性非常好。两台系统的 API 分离度与保留时间偏差百分比均处于允许限值以内。

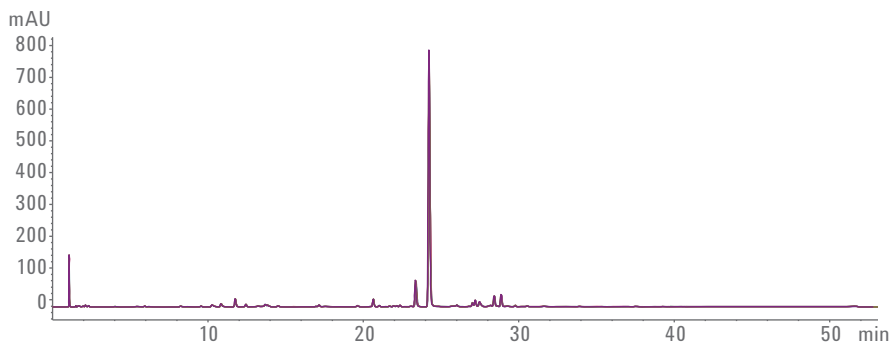


图 6. Agilent 1260 Infinity 系统中最佳方法六次运行得到的叠加色谱图。API 峰面积、保留时间和分离度 RSD 分别为 1.55%、0.03% 和 2.09%

表 4. Agilent 1260 Infinity 系统的 CMA 性能复制。1260 Infinity 模拟系统满足 CMA 性能要求（API 分离度 > 4 且 API 拖尾因子 < 1.3），实际的 1260 Infinity 系统同样满足上述要求

经验证的性能模拟		
CMA	Agilent 1260 Infinity HPLC	Agilent 1260 Infinity HPLC
分离度	> 4	> 4
USP 拖尾因子	1.2	1.2

表 5. 使用亚 2 μm 色谱柱和传统色谱柱的工作流程之间的用时比较

实验	亚 2 μm 色谱柱 (小时)	传统色谱柱 (小时)
筛选	20	47
优化*	28*	20
总体	48	67

\*使用亚 2 μm 色谱柱的工作流程中包含额外的 HPLC 优化时间

## 参考文献

1. Vinayak A. K, Syed Lateef. Automated QbD-Based Method Development and Validation of Oxidative Degraded Atorvastatin (氧化降解阿托伐他汀基于 QbD 的自动方法开发与验证), *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-4944EN, **2014**
2. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET (通过 Agilent 1290 Infinity LC 对流动相与固定相进行快速筛选并利用 ISET 实现到 Agilent 1200 系列液相色谱的无缝方法转移), *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-0989EN, **2012**
3. Syed Lateef, Vinayak A. K. Stability Indicating Method Development for Linagliptin Drug Product using Quality by-design (利用质量源于设计原则进行利拉利汀药品的稳定性方法开发), *安捷伦科技公司*, 出版号 5591-3834EN, **2014**
4. Huesgen, A. G. Agilent 1290 Infinity Binary LC with ISET – Emulation of the Waters Alliance 2695 LC System Analyzing Analgesics (采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱 – 模拟 Waters Alliance 2695 液相色谱系统分析镇痛药), *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-2792EN, **2013**

查找当地的安捷伦客户中心:

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)**

免费专线:

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们:

**[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价:

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2015

2015 年 5 月 1 日, 中国出版

5991-5701CHCN



**Agilent Technologies**