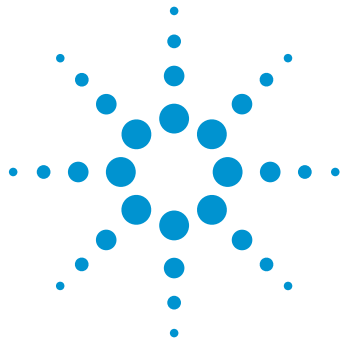




利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪进行基于质量源于设计的方法开发

在 Waters Empower 3 CDS 控制下与 ISET 参与的方法转移相结合的高效方法开发工作流程

应用简报

药物开发与 QA/QC

作者

Vinayak A.K 和 Andreas Tei
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了基于质量源于设计 (QbD) 原则分离氨氯地平及其已知 EP 杂质的 UHPLC 方法。第二步，将该方法转换并转移到 HPLC 系统中。利用安捷伦仪器控制框架 (ICF) 作为接口，通过 Waters Empower 3 色谱数据处理系统 (CDS) 控制 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪。系统集成了 Fusion QbD (S-Matrix Corp, Eureka, CA) 软件，以实现基于 QbD 的方法开发过程。

使用免费方法转换工具将 UHPLC 条件下在亚 2 μm 色谱柱上开发的方法转移至利用 HPLC 系统的常规 QA/QC 工作流程。在进一步优化和评估过程中，使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发系统上的安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 对目标 HPLC 系统的性能特点进行模拟。在转移至目标系统后，满足所有关键方法属性 (CMA)，并对重现性进行了验证。



Agilent Technologies

前言

满足 ICH Q8 (R2) 和 ICH Q2 (R2) 指导原则的基于质量源于设计 (QbD) 的方法开发及方法验证越来越受到制药分析研发领域的关注²。在不同色谱柱固定相的筛选过程中, 在较短的亚 2 μm 色谱柱上使用 UHPLC 方法可显著提高柱效。然而, 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传统 HPLC 系统。在不影响关键方法属性 (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²。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 HPLC 色谱柱开发的方法, 在转移至 HPLC 系统后仍无法确保性能完全相同。为克服这些问题, 安捷伦开发出安捷伦智能系统模拟技术 (ISET), 以模拟常用目标系统的特性³。

本应用简报展示了作为基于 QbD 的稳定方法开发过程的通用 UHPLC 解决方案的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪的使用, 以及第三方 QbD 软件 (Fusion QbD) 与 Waters Empower 3 CDS 控制下的 1290 Infinity II 液相色谱仪的使用。最后, 还展示了安捷伦 ISET 如何模拟 QA/QC 环境下常用的处于第三方软件控制下的不同目标液相色谱系统的性能特点。

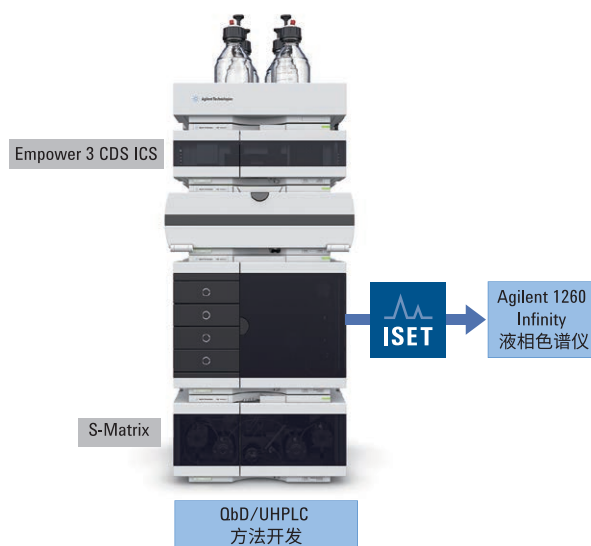


图 1. 在 Waters Empower 3 CDS 控制下的安捷伦智能系统模拟技术参与的方法转移

实验部分

仪器

利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法开发系统进行方法开发。1290 Infinity II 方法开发解决方案的各个模块和组件包括:

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 12 位/13 通溶剂选择阀 (G4235A)
- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), 保持在 4 °C
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B), 配备 8 位/18 通色谱柱选择阀 (5067-4233)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)

所有 Agilent 1290 Infinity II 模块的最低固件要求为: B、C 和 D.06.70

利用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪对转移后方法的重现性进行验证。1260 Infinity 液相色谱仪的各个模块包括:

- 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 二极管阵列检测器 (G4212B)

软件

- Fusion QbD 自动化液相色谱方法开发软件 (S-Matrix Corp, Eureka, CA) (版本: 9.7.1, Build 458)
- Waters Empower 软件 (版本 3 build 3471), 配备系统适用性测试包
- 沃特世仪器控制软件 (ICS) 2.1 HF1 包括安捷伦 ICF 和驱动程序包 (A.02.03 DU1 HF2)
- ISET 4 (驱动程序版本 A.02.11)

试剂与样品

所有溶剂均为 HPLC 级 (RCI Labscan Ltd, Thailand)。苯磺酸氨氯地平 (API) 标准品以及已知的 EP 杂质 A、B、D、E、F 和 G 购自印度 Anant Pharmaceuticals Pvt Ltd。在整个实验中，按照欧洲药典 (EP) 规定的苯磺酸氨氯地平样品前处理方案进行操作，其中在 API 中加入已知杂质⁴。

工作流程

方法开发工作流程以筛选过程作为起始，通过筛选七种短亚 2 μm 色谱柱组合两种有机溶剂和七种不同 pH 值水相溶剂的液相，确定苯磺酸氨氯地平标准品和杂质分析的最佳色谱分离条件。使用在 Empower 3 控制下的 1290 Infinity II 液相色谱方法开发系统和 Fusion QbD 软件，进行该色谱柱固定相的筛选实验（图 2）。对于初始筛选阶段发现的最佳色谱条件（满足筛选阶段的分析目标概况 (ATP) 要求），通过多变量统计实验根据 QbD 原理创建设计空间来进一步完整优化，从而形成稳定的 UHPLC 方法（满足优化阶段的 ATP 要求）。

第二步，将该 UHPLC 方法转移至填料粒径不同的两根 HPLC 色谱柱上。为了模拟目标系统的性能特点，Agilent 1290 Infinity II UHPLC 在启用 ISET 工具后，即在模拟模式下运行。模拟 Agilent 1260 Infinity 系统的梯度混合行为和自动进样器延迟体积。

将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪在模拟模式下的性能结果与目标系统的结果进行比较。确定系统适用性杂质（杂质 B 和 G）和 API 的保留时间 (RT)、峰面积和分离度的重现性。

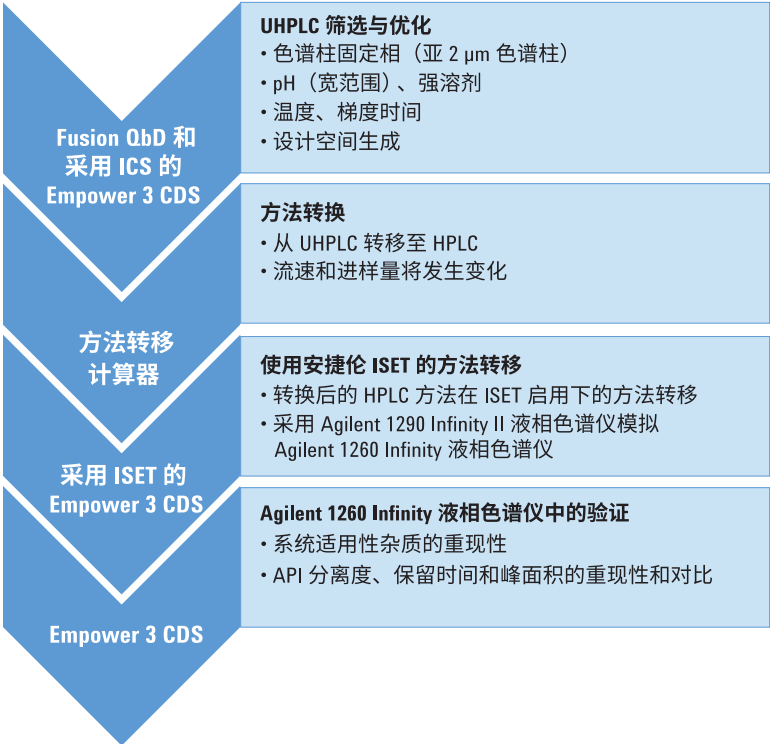


图 2. 本研究采用的整体工作流程。流程图左侧显示所使用的软件包，右侧显示工作流程的详细步骤

结果与讨论

UHPLC 筛选与优化

筛选阶段的 ATP 旨在开发满足 EP 方法的系统适用性标准（氨氯地平杂质 B 和 G 之间的分离度应高于 2.0）的快速 UHPLC 方法。表 1 显示，为实现这一目标，对各种亚 2 μm 色谱柱固定相、各种 pH 和有机溶剂（乙腈和甲醇）进行了筛选。表 2 列出了提供最佳总体色谱条件的色谱柱固定相筛选实验。实验结果证明这一条件下的色谱性能令人满意，可满足所有 ATP 标准（图 3）。

表 1. 筛选阶段实验中所用的关键方法参数 (CMP)。对七种 pH 缓冲液、七根色谱柱、三种不同流速和两种强有机溶剂进行了筛选

CMP	范围/水平
强溶剂类型	甲醇，乙腈
泵流速 (mL/min)	0.8、1.0、1.2
pH	2.00-10 mM 三氟乙酸 3.00-20 mM 甲酸 4.00-5 mM 甲酸 + 10 mM 甲酸铵 5.00-5 mM 乙酸 + 10 Mm 乙酸铵 7.00-10 mM 乙酸铵 8.00-10 mM 碳酸氢铵 9.00-10 mM 乙酸铵+ 5 mM 氨水
色谱柱类型 (3.0 × 50 mm, 1.8 μm)	Agilent ZORBAX Eclipse plus c18 Agilent ZORBAX Eclipse plus c8 Agilent ZORBAX SB Aq Agilent ZORBAX Eclipse Plus phenyl hexyl Agilent ZORBAX SB CN Agilent ZORBAX SB C18 Agilent ZORBAX Bonus RP*

* Bonus RP 色谱柱的色谱柱内径为 2.1 mm

表 2. 筛选阶段实验中 CMP 的最佳条件

CMP	水平设置
强溶剂类型	乙腈
泵流速 (mL/min)	1.200
pH	2.00
色谱柱类型	Agilent ZORBAX Eclipse plus C8

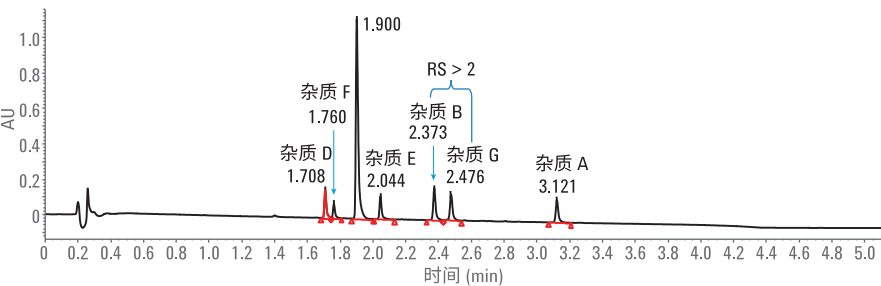


图 3. 杂质 B 和 G 之间的分离度高于 2，满足筛选阶段的 ATP 标准

优化阶段的 ATP 旨在缩短筛选阶段最佳条件的分析时间，同时不影响 EP 方法的系统适用性标准以及 API 与其他杂质的分离度。如表 3 所列，实验中改变了泵流速、梯度时间和柱温等关键方法参数 (CMP)。对这些实验进行数据分析后得到了稳定的设计空间 (图 4)，这一空间满足先前确定的 ATP 标准。在设计空间中绘制满足 ATP 目标的经验证的可接受区域 (PAR)。针对 PAR (表 4) 及相应色谱图 (图 5) 中的五种不同条件绘制系统适用性杂质的分离度值。Fusion QbD 的点预测工具可预测关键方法属性 (CMA) 值以及经过比较和验证的实验值 (表 5)。对优化后的最终 UHPLC 方法的重现性进行验证，绘制了六次重复测定的叠加图 (图 6)。

表 3. 优化阶段中改变的 CMP

CMP	范围/水平
泵流速 (mL/min)	1.200-1.500
梯度时间 (min)	1.0 ≤ 梯度时间 ≤ 4.0
最终保持时间 (min)	0.5 ≤ 最终保持时间 ≤ 1.5
柱温箱温度 (°C)	25.0、30.0、35.0

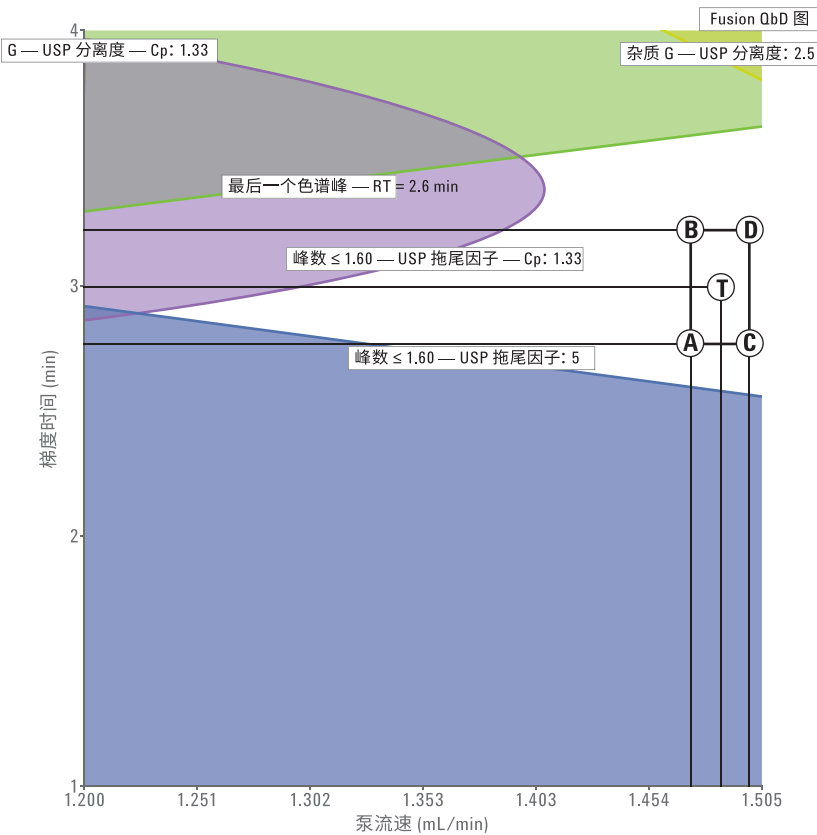


图 4. 显示 PAR 的最终设计空间

表 4. 反映了 PAR 五个点的系统适用性杂质的 CMP 和分离度

条件	流速	梯度时间	最终保持时间	柱温箱温度	杂质 B 和 G 之间的分离度
A	1.47	2.76	0.5	30	3.28
B	1.47	3.08	0.5	30	3.16
T — 中心点	1.48	2.92	0.5	30	3.20
C	1.50	3.08	0.5	30	3.22
D	1.50	2.92	0.5	30	3.10

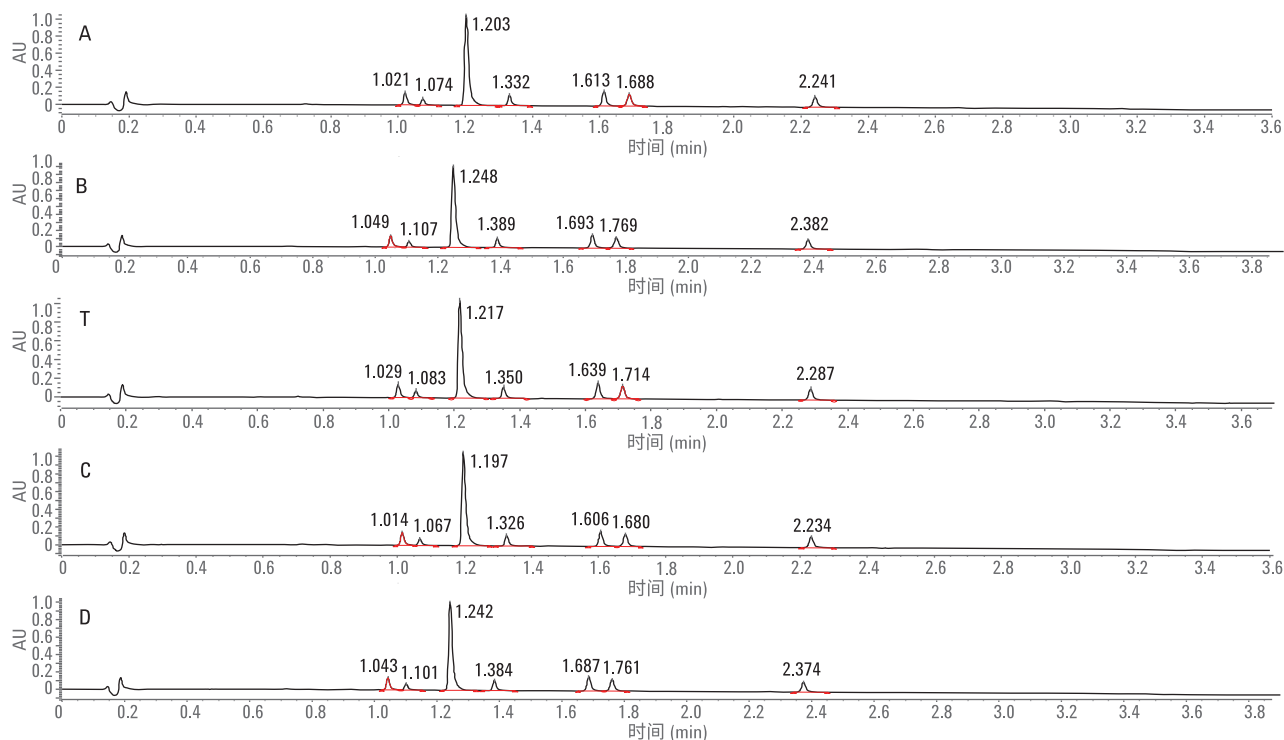


图 5. 反映 PAR 中五个点 (A、B、T、C、D) 条件的色谱图

表 5. Fusion QbD 软件根据 PAR 的中心点 (T) 预测的响应 CMA 值。将实验结果与预测值进行比较，结果处于 σ 置信限内

CMA	预测值	实验值	-2 σ 置信限	+2 σ 置信限
峰数 ≥ 2.00 — USP 分离度	6.14	6.00	5.68	6.60
峰数 ≤ 1.60 — USP 拖尾因子	5.80	6.00	5.06	6.65
最后一个色谱峰 — 保留时间	2.28	2.28	2.28	2.29
杂质 B 和 G 之间的 USP 分离度	2.97	3.20	2.90	3.20

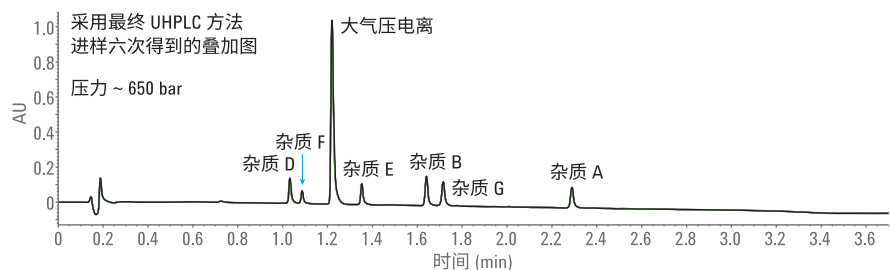


图 6. 使用六幅色谱图叠加得到的最终 UHPLC 方法的重现性

方法转换与转移

将亚 2 μm 色谱柱上开发的 UHPLC 方法转换至使用传统填料粒径的三种不同的 HPLC 方法。利用瑞士日内瓦大学开发的 Microsoft Excel 方法转换计算器实现这一目的⁵。首先，将 UHPLC 方法转换至具有 27 分钟合理分析时间的 HPLC 方法（采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm 作为色谱柱 1，表 6）。使用目标系统（Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪）的 ISET 模拟模式对 1290 Infinity II 系统上的方法进行评估，然后利用 1260 Infinity 液相色谱系

统的结果进行验证（图 7）。模拟的溶剂输送模块和自动进样器为 G1312B v1.0 和 G1367E 100 μL 注射器 v1.0。在不降低 ATP 标准的情况下实现了方法向色谱柱 1（HPLC 方法 1）的转移，且分析时间合理，而观察到的压力范围为 300 bar 左右（传统 HPLC 泵压力限值的 70%）。这可能是受压力限制的传统 HPLC 系统用户的一个关注点。因此，将 UHPLC 方法转移至采用大填料粒径色谱柱（色谱柱 2 为 ZORBAX Eclipse Plus, 4.6 × 150 mm, 5 μm）的 HPLC 方法 2，有助于降低反压（表 6）。方

法转换计算器建议采用 1.2 mL/min 的较低流速和 37 分钟的较长分析时间。在 HPLC 方法 3 中，将流速提高至 1.8 mL/min 缩短了分析时间，且不损失分离度。同样用 1260 Infinity 液相色谱系统上的结果对 HPLC 方法 3 进行验证（图 8），该方法可用于存在压力限制的系统。表 7 和表 8 汇总了相应方法在模拟系统与实际系统上的 RT 和分离度偏差。采用 HPLC 方法 1 和 3 进行六次重复测定，以检查相应方法的重现性以及 API 的分离度、RT 和峰面积的 RSD 值，结果表明系统适用性杂质的 RSD 值 ≤ 1.1%（表 9）。

表 6. UHPLC 及所有其他转换后 HPLC 方法的方法参数

参数	UHPLC 方法	HPLC 方法 1	HPLC 方法 2	HPLC 方法 3
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 3.0 × 50 mm, 1.8 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm, 3.5 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm, 5 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4.6 × 150 mm, 5 μm
流速 (mL/min)	1.5	1.8	1.2	1.8
进样量 (μL)	2	14	14	14
梯度	时间 %B 0.00 25 0.30 25 3.20 95 3.70 95 3.80 25 4.30 25	时间 %B 0.00 25 2.87 25 19.79 95 22.71 95 23.29 25 26.21 25	时间 %B 0.00 25 4.10 25 28.27 95 32.44 95 33.27 25 37.44 25	时间 %B 0.00 25 2.87 25 19.78 95 22.70 95 23.28 25 26.20 25
压力 (bar)	~650	~300	~130	~180

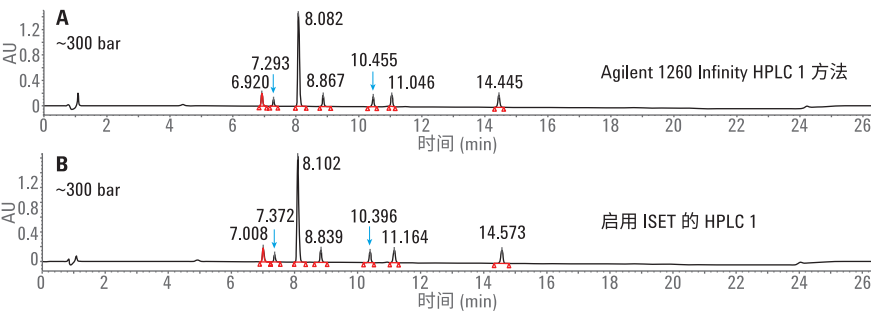


图 7. 叠加色谱图，示出对于 HPLC 方法 1，ISET 模拟的方法在 Agilent 1290 Infinity II 系统和 Agilent 1260 Infinity 系统上的相似性

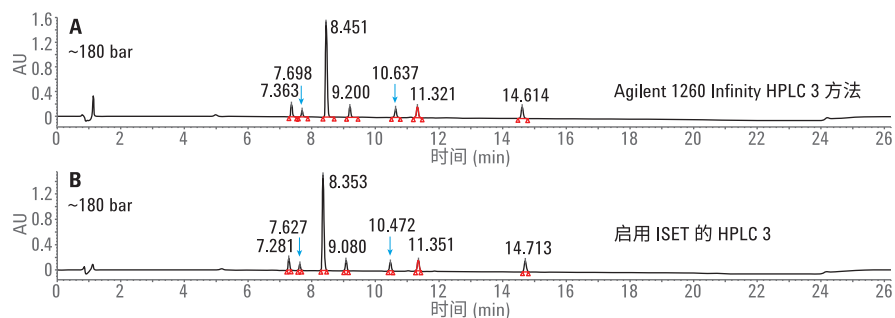


图 8. 叠加色谱图，示出对于 HPLC 方法 3，ISET 模拟的系统与 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统的相似性

表 7. 计算得到的 HPLC 方法 1 的百分比偏差。发现所有偏差均处于可接收标准的允许限度内 (分离度 -5% 和保留时间 $\pm 5\%$)

	API 分离度	API RT (min)	杂质 B RT (min)	杂质 G RT (min)	杂质 G 分离度
Agilent 1260 Infinity HPLC 1	8.01	8.08	10.45	11.05	5.63
启用 ISET 的 HPLC 1	8.46	8.06	10.38	11.07	6.52
百分比偏差 (%)	+4.3	-0.24	-0.6	+0.1	+13.6

表 8. 计算得到的 HPLC 方法 3 的百分比偏差。发现所有偏差均处于可接收标准的允许限度内 (分离度 -5% 和保留时间 $\pm 5\%$)

	API 分离度	API RT (min)	杂质 B RT (min)	杂质 G RT (min)	杂质 G 分离度
Agilent 1260 Infinity HPLC 3	7.63	8.45	10.63	11.35	5.9
启用 ISET 的 HPLC 3	7.32	8.35	10.47	11.32	7.3
百分比偏差 (%)	-4.2	-0.24	-0.6	+0.1	+13.6

表 9. 表明 HPLC 方法 1 和 3 重现性的 RSD 值

	杂质 G Rs	杂质 G RT	API RT	API Rs	杂质 G 峰面积	API 峰面积
HPLC 方法 1						
平均值 (min)	5.46	11.03	8.07	8.05	748439	5778226
SD	0.05	0.008	0.008	0.01	2951.619	5852.5
RSD	0.96	0.07	0.10	0.14	0.39	0.10
HPLC 方法 3						
平均值 (min)	5.52	11.04	8.07	8.07	752041.8	5784162
SD	0.06	0.005	0.004	0.01	3421.39	4937.24
RSD	1.13	0.04	0.05	0.16	0.45	0.08

结论

利用安捷伦仪器控制框架 (ICF) 软件作为接口，通过 Waters Empower 3 色谱数据处理系统、Waters ICS 和 Fusion QbD 软件控制 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪，可开发出快速而稳定的 UHPLC 方法。根据 QbD 原理，在优化后生成设计空间。根据可接受标准对五点设计空间进行验证，结果表明空间满足所有标准。CMA 的预测值与实验值相符。方法满足系统适用性要求（杂质 B 和 G 的分离度 >2 ），且所有色谱峰在 3.7 分钟的梯度时间内均达到了基线分离。最终 UHPLC 方法具有重现性（API 和杂质 G 峰面积 RSD <0.5 ）与稳定性。

使用安捷伦 ISET 技术实现了从 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统到 Agilent 1260 Infinity 系统的无缝方法转换。该方法可适应目标系统的压力限值。对模拟模式下的结果与目标系统的结果进行了比较。结果证明，将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪、ISET、ICF 以及第三方 CDS 和 Fusion QbD 相结合，可实现方法开发、QbD 原理和方法转移。

参考文献

1. Metzlaff, M. Agilent 1290 Infinity II LC with ISET – Emulation of the Agilent 1100 Series LC Through Waters Empower Software（采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪 — 通过 Waters Empower 软件模拟 Agilent 1100 系列液相色谱仪）。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6541EN，**2016**
2. Vinayak, A. K. 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。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5701CHCN，**2015**
3. 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 液相色谱仪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）。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0989EN，**2012**
4. European pharmacopeia 8.7, 04/2016:1491, pg: 5703
5. HPLC 计算器：用于色谱柱性能评估和 HPLC 方法转移的软件
<http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/telechargement-en.htm>

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 3 月 1 日，中国出版

5991-7505CHCN



Agilent Technologies