

应用纪要

基于“分析方法质量源于设计”的理念开发 缬沙坦和亚硝酸杂质的UPLC-MS分析方法

Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation



摘要

使用“分析方法质量源于设计(AQbD)”的理念开发出用于分析缬沙坦和六种基因毒性杂质混合物的超高效液相色谱方法。利用DryLab、Empower和沃特世系统自动完成方法开发过程。最终方法使用HSS T3色谱柱(10 cm × 2.1 × 1.7 μm)，以甲醇作为有机溶剂流动相，以0.1%甲酸水溶液作为水性流动相。所开发的方法表现出优异的稳定性和重现性。例如，在三天的分析中，混标的峰保留时间相对标准偏差百分比(%RSD)为0.9%。上述结果表明，使用AQbD理念和自动化软件有助于获得对方法的深入了解，从而开发出非常稳定且可重现的方法。

优势

- ACQUITY UPLC H-Class系统结合Empower 3色谱数据系统(Empower CDS)和DryLab4软件能够简单地完成方法开发
- DryLab与Empower无缝集成，实现全自动方法开发
- 开发出用于分析缬沙坦和六种基因毒性杂质混合物的高性能稳定方法

简介

ICH S2 (R1)指南将基因毒性杂质定义为经证实通过各种机制导致遗传物质发生有害变化的物质¹。此类杂质的主要问题在于，即使在极低浓度下，它们也可能与人细胞相互作用引起突变和癌症。因此，在药品生产过程中应尽量避免基因毒性杂质，如果不能避免，应将其浓度减少至规定水平以下。这些杂质在缬沙坦、氯沙坦和厄贝沙坦等各种血管紧张素受体阻滞剂药物(ARB)中的出现已经导致有关药物从市场上大规模召回，并使该问题成为包括FDA和欧洲药品管理局(EMA)在内的监管机构关注的焦点之一。为符合法规要求，必须使用准确、稳定、灵敏的方法分析这些化合物。在方法开发过程中采用“分析方法质量源于设计(AQbD)”理念是开发稳定且准确的方法的一种有效手段。AQbD是一种系统性方法开发理念，它以明确方法目标为起点，使研究人员合理了解色谱因素对方法性能的影响²。该理念要求研究人员筛选多种变量，从而更全面地了解所研究因素对方法性能的影响。了解的这些知识可用于确定方法操作设计区域(MODR)，该区域对应于经验证满足方法性能标准的多维组合。利用这种理念可以获得一种适用性强、设计合理、易于理解且稳定的方法，使方法能够在整个生命周期内提供预期性能^{3,4}。

本研究采用软件辅助AQbD理念开发出一种用于分析缬沙坦标准品和六种基因毒性杂质（NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA和NDBA）的方法。

实验采用装配色谱柱管理器和溶剂选择阀的ACQUITY UPLC H-Class系统，以便自动考察较宽的条件范围。

本研究使用DryLab4方法开发软件作为AQbD软件。已有文献介绍了有关在ACQUITY UPLC H-Class PLUS系

统上使用AQbD理念进行方法开发的详细信息。⁵

实验

参比物质和标准品制备

缬沙坦和六种亚硝胺（基因毒性杂质）均购自Toronto Research Chemicals（加拿大安大略省北约克）。准确称量所需量的各标准品并将其溶于甲醇（溶剂）中，制备上述化合物的储备液。然后利用储备液制备包含缬沙坦和所有杂质的测试混合物。使用80/20 (v/v)水/甲醇作为样品溶剂稀释各种标准品的储备液，制备该混合物。测试混合物中各分析物的最终浓度约为：0.1 mg mL⁻¹（缬沙坦）和0.07 mg mL⁻¹（各种杂质）。这些化合物的详细信息（例如名称和分子量）见下方表1。

分析物	常用名	单同位素质量数(Da)
NDMA	N-亚硝基二甲胺	75.05
NMBA	N-硝基-N-甲基-4-氨基丁酸	146.07
NDEA	N-亚硝基二乙胺	102.08
NEIPA	N-亚硝基乙基异丙胺	116.09
NDIPA	N-亚硝基二异丙胺	130.11
NDBA	N-亚硝基二丁胺	158.14
API	缬沙坦	435.22

表1.本研究中分析的基因毒性杂质和活性药物成分(API)

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class系统，配备四元溶剂管理器(QSM)、样品管理器(FTN)、色谱柱管理器、两个CM Aux、PDA检测器、QDa质谱检测器
检测器：	PDA和QDa
色谱柱：	HSS T3色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm pH范围：1~8

柱温:	30~60 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	3 μL
流速:	0.4
流动相A:	0.1% (v/v)甲酸水溶液
流动相B:	乙腈和甲醇
梯度:	流动相B在5 min或15 min内从2%增至98%梯度从t=0开始, 最终保持2分钟, 然后返回初始条件。
UV检测波长:	245 nm

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式:	ESI+
采集范围:	100~500 Da
毛细管电压:	0.8 kV
离子源温度:	600 °C
锥孔电压:	15 V

数据管理

色谱软件：

Empower 3 色谱数据系统和 DryLab4

质谱软件：

Empower 3

结果与讨论

如前所述，“分析方法质量源于设计”是一种系统性方法开发理念，它以明确方法目标为起点，并以可靠的科学理论为基础。在分析方法开发中采用AQbD理念可以更好地理解各种色谱因素对方法性能的影响。此外还有助于确定稳定的设计空间，在该区域中，方法能够满足所有性能目标。该设计空间能够灵活满足法规要求，因为在该空间内进行的任何修改均不视为变更，无需进行“批准后监管过程”⁶。DryLab是一款市售AQbD软件，可结合Empower开发符合AQbD理念的方法，通过在CDS (Empower)中创建所有必需方法，自动完成整个方法开发过程。DryLab - Empower的自动化方法开发工作流程包括多个步骤，如图1所示。各步骤的详细描述见下文。



图1. DryLab - Empower AQbD方法开发工作流程，其中包含多个步骤。

实验设计

ICH将“实验设计”(DOE)定义为“一种结构化、有组织的方法，用于确定影响过程的因素与该过程的输出结果之间的关系”。DryLab使用DOE开发符合AQbD理念的稳定的液相色谱方法。AQbD方法开发在这一阶段选择线性梯度工作方法，并确定需要优化的变量。根据研究变量的类型/数量，软件中提供了多种可用于方法开发的实验设计。本研究选择三变量(3D)实验设计。在该DOE梯度时间中，均选择三元改性剂组成(甲醇)和温度作为研究变量。本研究中包括的实验总数为图2中详细展示的12次实验。选择DOE后，将其导出至

Empower，以创建这些运行所需的所有方法和方法组。该软件还可创建并导出所有必要的活化/平衡方法和方法组。用户只需在DryLab软件中单击鼠标即可自动无缝地完成此操作。该自动化功能只能在Empower CDS和沃特世系统中使用。该功能的作用非常大，可以避免研究人员花时间手动生成这些实验的方法和方法组，大幅缩短方法开发时间。此外，还可以避免发生任何数据转录错误。

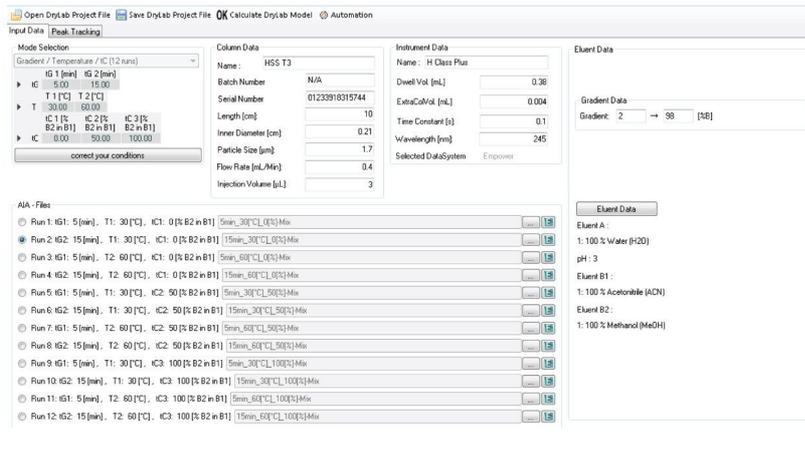


图2. DryLab软件截图，展示了3D DOE以及本研究中考察的所有变量

峰追踪

完成所有实验后，在Empower中处理数据，然后将其导入DryLab软件中。Empower中的处理包括，仅对所得色谱图中所有感兴趣的峰进行积分，并计算一些相关的色谱参数，例如这些峰的分离度、拖尾因子和对称性。然后自动追踪12张不同色谱图上的峰。DryLab软件中的峰追踪功能主要基于峰面积。该功能虽然在峰追踪方面非常准确，但有时需要手动干预来分配峰。例如，如果发生共流出，该软件允许用户手动“分裂”共流出峰并对峰位置进行重新排序/转换，使峰追踪更加准确。软件的另一项重要功能是通过提供分析物的分子量来增加峰追踪的准确度。此外，还可以对所有峰自动导入Apex m/z (ACQUITY QDa质谱检测器) 值，帮助确认峰得到准确追踪。

设计空间建模

接下来，完成数据处理并且正确追踪所有峰之后，软件将自动构建模型以创建分离度图，展示各色谱峰之间达到理想分离度所需的条件组合。这里需要注意的是，除混合物中所含分析物对应的七个峰以外，还观察到另外三个未知杂质峰。因此，创建两幅分离度图，其中一幅图包含10个峰，另一幅图仅包含7个峰。图3即为12次运行实验获得的分离度图。从图3A中可以看出，使用原始线性梯度曲线（以100%甲醇作为流动相B从2%增加至98%）和 $t_G=25$ min的条件时，所有峰均实现良好分离（关键分析物对的分离度 $R_{s,crit}=1.6$ ）。但是，如果仅考虑七个目标峰，会发现在非常宽的实验条件范围内，所有分析物均实现基线分离，如图3B所示。此外，在相同条件下仅考虑对七个分析物峰进行建模时，预计关键分析物对的分离度至少达到17.6。由于本研究的

目标是分离缬沙坦与六种GTI，因此决定后续实验将仅关注这些分析物的分离。

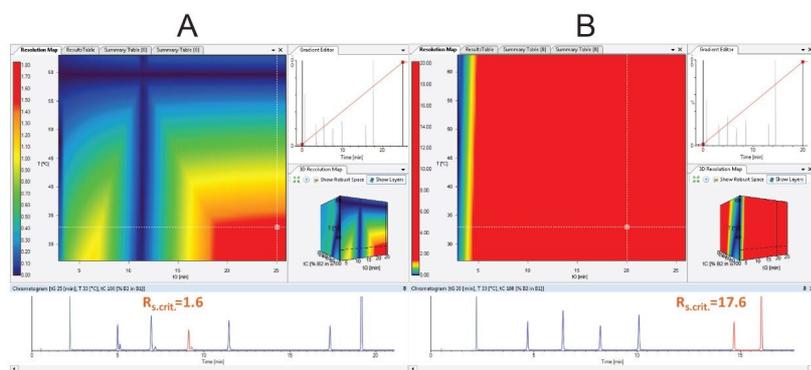


图3.显示分离度图的DryLab屏幕截图。A表示用于分离十个峰（包括三种未知杂质）的MODR，B表示仅七个目标峰的MODR。红色表示所有峰达到最低分离度（在本例中为1.5）的设计空间。相应图形中的十字光标位置表示工作点条件。

稳定性评估

此方法开发阶段负责评估从之前实验（图3B）中的模型所获得的最终方法的稳定性。评估因素有：所选工作点的仪器容差限以及可能因方法变量和参数波动导致的失败情况。图4A展示了最终方法的稳定性评估结果以及不同色谱参数的仪器容差。从图中可以看出，评估结果表明，该方法始终能够使所有7个峰的最低分离度达到16。

此外，稳定性评估还显示了常规应用中可以预期的分离度值范围以及对分离影响最大的所有方法参数。例如，从图4B中可以看出，影响分离度的两种最关键参数是流速和梯度时间。鉴别关键分离参数有助于采取更高效的方法控制策略。

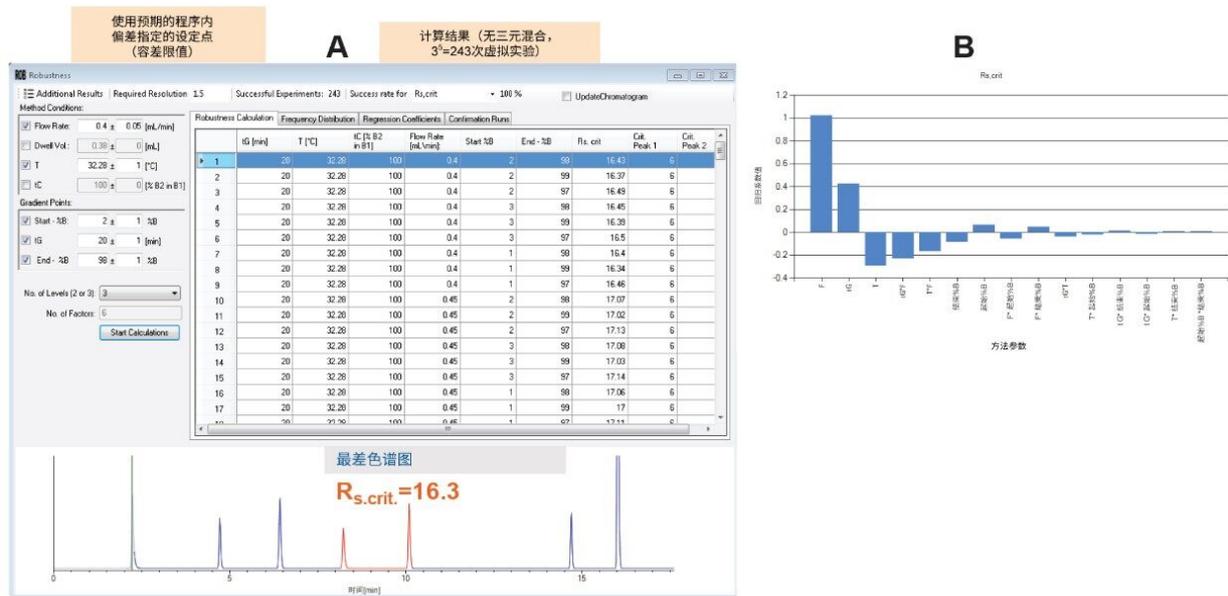


图4. Drylab稳定性评估模块的屏幕截图。A表示243次虚拟实验的计算结果，其中预期偏差基于仪器容差；B表示回归系数，按其的关键分析物对分离度的影响排序。

DryLab模型验证

为验证基于稳定性评估预测的结果，务必要将这些结果与分析物的实际运行结果进行比较。因此，利用由稳定性评估获得的最终条件运行多次验证实验。实验结果表明，预测性能与实测性能一致。例如，如表2所示，有关工作点条件将导致关键分析物对分离度达到17.6的预测在实践中得到验证。在三天内将该实验重复15次，测试方法的重现性。结果发现，所开发的方法具有非常出色的重现性，在所有运行中得到的保留时间、峰面积和分离度的%RSD值均小于1%。三天内获得的所有结果汇总于表2中。图5展示了该实验第一天获得的五次重复进样的结果。

分析物	平均R	RSD%	平均峰面积	RSD%	Rs	RSD%	平均R	RSD%	平均峰面积	RSD%	Rs	RSD%	平均R	RSD%	平均峰面积	RSD%	Rs	RSD%
NDMA	1.82	0.23	186390	0.87	NA	NA	1.83	0.22	181919	0.50	NA	NA	1.81	0.37	183171	0.62	NA	NA
NDBA	3.52	0.09	88159	0.08	17.8	0.1	3.56	0.82	88344	0.26	18.2	0.8	3.48	0.32	89054	0.31	19.0	0.1
NDEA	5.45	0.05	171360	0.14	26.4	0.1	5.49	0.73	170085	0.20	26.3	0.4	5.41	0.20	168783	0.22	26.2	0.2
NEIPA	7.53	0.07	106297	0.18	25.1	0.1	7.57	0.62	104908	0.20	24.9	0.5	7.50	0.13	103670	0.43	24.7	0.1
NDIPA	9.60	0.06	155434	0.29	23.3	0.1	9.63	0.49	153998	0.20	23.2	0.2	9.56	0.10	152567	0.16	23.1	0.2
NDBA	14.52	0.04	121057	0.82	57.0	0.0	14.60	0.24	119285	0.25	56.7	0.3	14.50	0.08	117344	0.26	56.3	0.2
磺沙坦	15.95	0.02	961622	0.08	17.7	0.0	16.06	0.12	966832	0.04	17.8	0.8	15.84	0.13	974682	0.06	17.6	0.7

表2.在图5所示的工作点条件下分析得到的混合物中七种分析物的峰面积、保留时间和分离度(Rs)汇总

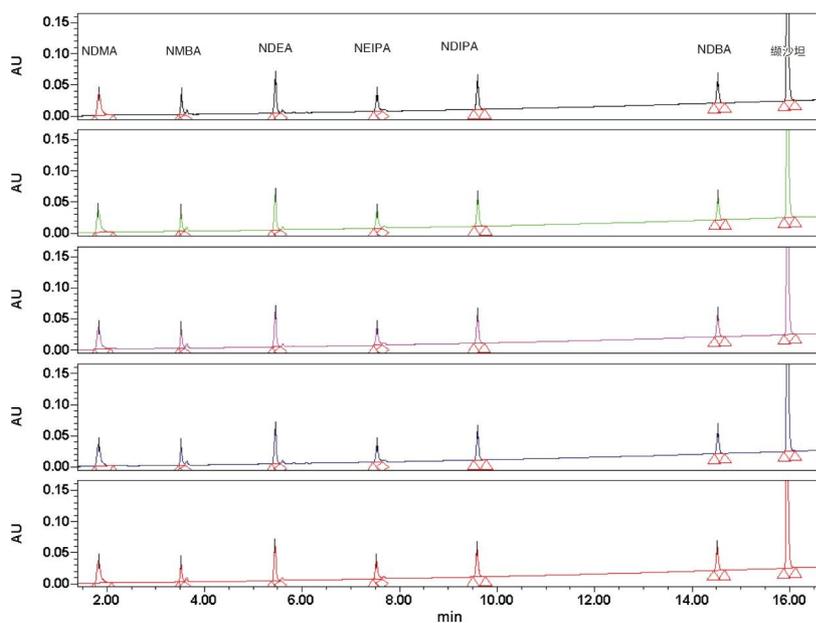


图5.在工作点条件下重复进样五次得到的缬沙坦和六种GTI的分析结果。
 实验条件为：温度 = 33 °C，流速 = 0.40 mL min⁻¹。梯度曲线为线性梯度：
 甲醇在25分钟内从2%增至98%。色谱柱：100 mm × 2.1 mm HSS T3,
 1.8 μm

结论

- 系统性AQbD方法开发结果表明，缬沙坦与NDBA之间的分离在很大程度上取决于梯度时间
- 将DryLab与Empower和沃特世系统结合使用，对于实现整个方法开发过程的自动化非常有利
- 在分析方法开发中采用AQbD理念有助于获得稳定且可重现的方法
- ACQUITY QDa质谱检测器是方法开发的一大利器，它有助于追踪不同色谱图中的峰

参考资料

1. ICH S2 (R1), Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for

- Human Use, 2012.
2. International Conference on Harmonization (ICH), Q8(R2): *Pharmaceutical Development* (August 2009).
 3. G.L. Reid, J. Morgado, K. Barnett, B. Harrington, J. Wang, J. Harwood, D. Fortin, Analytical Quality by Design (AQbD) in Pharmaceutical Development, *American Pharmaceutical Review* 144191 (2013).
 4. M.A.K.B.M. Chatfield, E.H.P.J.S. Karmarkar, A.M.A.M.P. Andy, R.D.S.M.D. Trone, Q.W.Z.W.Y. Zhao, Evaluating Progress in Analytical Quality by Design, (2017).
 5. F.L. Alkhateeb, P. Rainville, Applying a Software-Assisted Analytical Quality by Design Approach for the Analysis of Formoterol, Budesonide, and Related Compounds by UPLC-MS, Waters, August 2019, 720006654EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006654en.pdf>> .
 6. S. Fekete, I. Molnár, Software-Assisted Method Development in High Performance Liquid Chromatography, *World Scientific*, 2018.
-

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/513188>>

720007033ZH, 2020年12月