

使用Empower™方法验证管理器软件辅以Empower样品组生成器自动创建方法，进行方法稳定性测试

Margaret Maziarz

Waters Corporation

摘要

稳定性测试是衡量分析方法不受色谱参数细微变化影响能力的量度。本研究使用Empower方法验证管理器(MVM)软件考察了盐酸萘甲唑啉、非尼拉敏及相关物质的分析方法稳定性。研究创建了稳定性多变量实验设计(DoE)用以评估各个参数及其相互作用对色谱峰之间分离度的影响。Empower样品组生成器(SSG)用于自动创建样品组方法或进样序列、仪器方法以及通过一次运行执行整个研究所需的方法组。Empower MVM软件生成的效应图清晰展示了哪些参数对方法性能的影响最大，并针对建立一组控制措施以确保方法在常规使用过程中满足预期标准提供了明确信息。

优势

- 藉由使用Empower方法验证管理器(MVM)软件的多变量DoE进行方法稳定性测试，加深对方法的理解并确定可接受的操作条件
 - 使用Empower样品组生成器(SSG)工具可自动创建色谱方法进行稳定性测试
 - 使用Empower MVM软件生成的效应图可确定方法参数及其相互作用对性能的影响
-

简介

稳定性测试是一项重要工作，用以证明分析方法不受色谱参数细微变化的影响，确保其在常规使用中的可靠性^{1,2}。方法开发阶段中应对方法的稳定性加以考虑，在开发过程中识别并优化影响方法性能的关键参数。需要进行实验测试的参数和相应的适用范围应根据过往经验和风险评估进行选择²。对稳定性进行风险评估有助于识别各参数影响方法生成数据的相关风险。根据获得的稳定性结果，可以制定相应的控制策略，定义方法的可接受操作范围，从而尽可能减小并控制差异性来源。

确定方法稳定性的方法通常是每次考察一种因素(OFAT)或使用多变量方法进行实验设计(DoE)³。使用OFAT方法时，仅会针对性研究一种因素（或色谱参数）的变化影响，其他因素则保持不变。这是一个耗时的过程，并且通常无法确定变量之间的重要相互作用，例如无法确定温度随流速发生的变化。多变量DoE方法可同时显示每个独立参数和多个参数的影响。

本研究使用Empower MVM软件考察了盐酸萘甲唑啉(HCl)、马来酸非尼拉敏及相关物质的分析方法稳定性，并辅以Empower SSG进行自动化方法创建。实验创建了稳定性DoE用以评估多变量效应，并使用效应图确定对方法性能影响最大的参数。

实验

化合物（表1）购自Sigma-Aldrich和Toronto Research Chemicals (TRC)。质谱级试剂和溶剂购自Honeywell。

样品描述

标准品溶液

使用甲醇配制浓度为4.0 mg/mL的单标储备液。用80:20的水/甲醇稀释剂稀释储备液，制备用于稳定性测试的混标溶液，其中盐酸萘甲唑啉和马来酸非尼拉敏活性成分的浓度为0.1 mg/mL，相关物质的浓度为10 µg/mL。本研究使用的化合物列表如表1所示。

化合物	名称	化学式
马来酸非尼拉敏	PHE API	$C_{20}H_{24}N_2O_4$
2-苄基吡啶	PHE杂质A	$C_{12}H_{11}N$
4-苄基吡啶	PHE杂质B	$C_{12}H_{11}N$
盐酸萘甲唑啉	NAPH API	$C_{14}H_{15}ClN_2$
N-(2-氨基乙基)-2-(萘-1-基)乙酰胺	NAPH杂质A	$C_{14}H_{16}N_2O$
1-萘乙酸	NAPH杂质B	$C_{12}H_{10}O_2$
1-萘乙腈	NAPH杂质C	$C_{10}H_7CH_2CN$
β -萘甲唑啉	NAPH杂质D	$C_{14}H_{14}N_2$

表1.本研究中使用的化合物列表

最终方法

液相色谱系统:	Arc™ Premier系统, 带主动预加热功能的色谱柱管理器, PDA检测器
样品瓶:	LCMS最大回收样品瓶, 容积2 mL, P/N: 600000670CV
检测:	UV 260 nm
色谱柱:	XSelect™ Premier CSH C ₁₈ , 4.6 x 150 mm, 2.5 μ m (部件号: 186009874)
柱温:	44°C
样品温度:	10°C
进样体积:	5.0 μ L

流速: 1.2 mL/min

流动相A: 0.1%甲酸水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的甲醇溶液

梯度表

时间 (min)	%A	%B	曲线
初始	93.0	7.0	6
1.00	93.0	7.0	6
15.00	15.0	85.0	6
16.00	15.0	85.0	6
16.10	93.0	7.0	6
21.00	93.0	7.0	6

数据管理

色谱软件: Empower 3 Feature Release 5 Service Release 5
(FR5 SR5)

结果与讨论

利用Empower MVM软件执行多变量DoE研究，评估盐酸萘甲唑啉、马来酸非尼拉敏及相关物质分析方法的稳定性。研究人员使用XSelect Premier CSH C₁₈基于之前介绍的方法⁴进行色谱分离，但对其中的色谱条件进行了一些修改。梯度开始和结束时的柱温、流速、有机溶剂组成均经过优化，实现了稳定的分离。使用最终方法条件获得的代表性色谱图如图1所示。

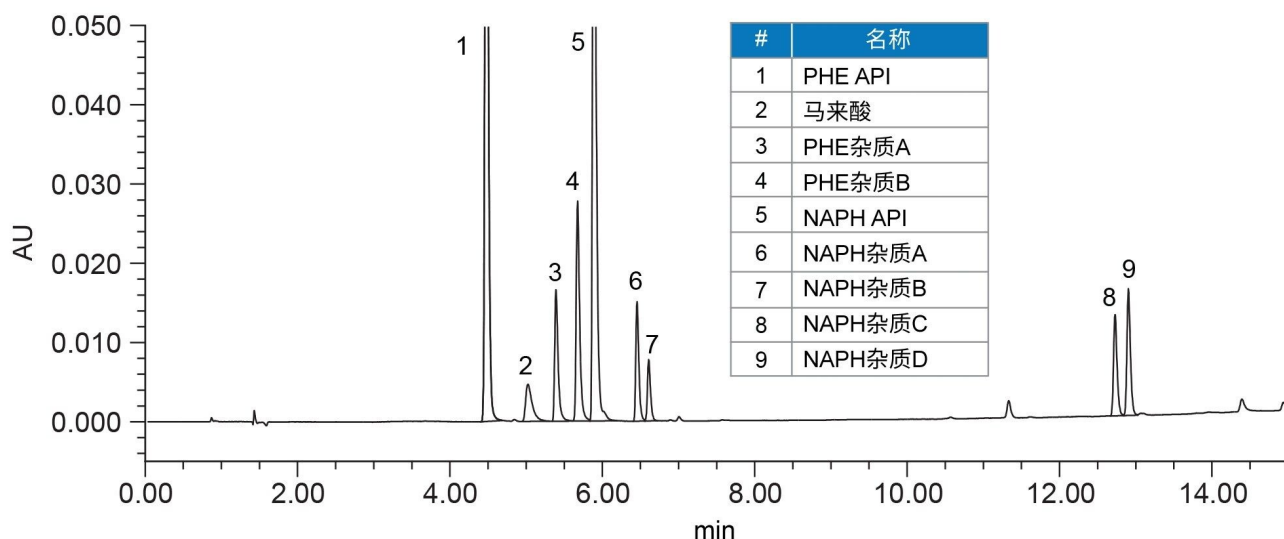


图1.使用最终方法分离盐酸萘甲唑啉、非尼拉敏及相关物质的结果。

关于Empower MVM

Empower方法验证管理器(MVM)是一款符合法规要求的软件，能够完成自动简化的方法验证工作流程^{4,5}。整个方法验证过程在一个软件应用程序中即可完成，涵盖创建验证方案方法到采集、审查、分析、批准和报告验证数据（包括完整的统计结果）。在研究期间，通过安全的数据存储和审计追踪功能，可以检查验证测试和数据是否符合验证要求及可接受标准。

关于Empower SSG

Empower样品组生成器(SSG)工具可自动创建仪器方法、方法组和样品组方法，同时更改色谱参数⁵。根据实验设计，在样品组方法中自动创建和构造Empower方法组和仪器方法，作为准备运行的进样序列。色谱方法的自动创

建可大幅减少手动过程中可能出现的转录错误，并缩短生成方法所需的时间，确保所有色谱分析运行均以正确创建的方法完成。

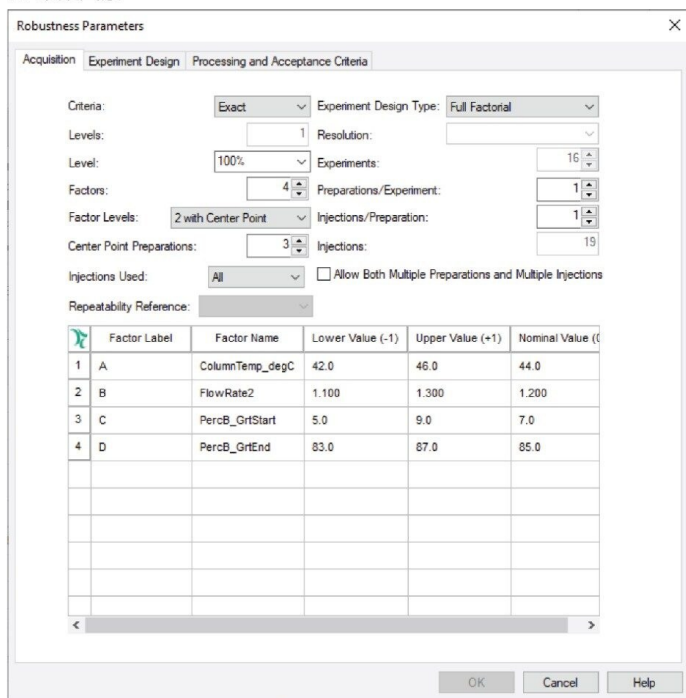
稳定性研究

首先，在风险评估中，根据已有的过往经验确定可能对方法性能影响最大的参数。本研究考察了四个参数（影响因素），包括柱温、流速、梯度开始和结束时的有机溶剂组成(%)（表2）。研究人员使用Empower MVM软件中的稳定性测试通过实验评估了这些参数及其范围的影响。评估中创建了DoE研究用以考察多变量对色谱峰之间分离度的影响，可接受标准设置为USP分离度 ≥ 1.5 。稳定性研究采用4因素、2水平（低和高）的全因素分析，创建了16个采用不同仪器条件组合的设计点或实验（图2）。

影响因素	参数	中心点(CP)	低水平	高水平
A	柱温(°C)	44.0	42.0 °C	46.0 °C
B	流速(mL/min)	1.200	1.100	1.300
C	梯度开始时的%B	7.0	5.0	9.0
D	梯度结束时的%B	85.0	83.0	7.0

表2.使用Empower MVM软件进行稳定性研究的因素（色谱参数）。

A. 采集因素



B. 实验设计

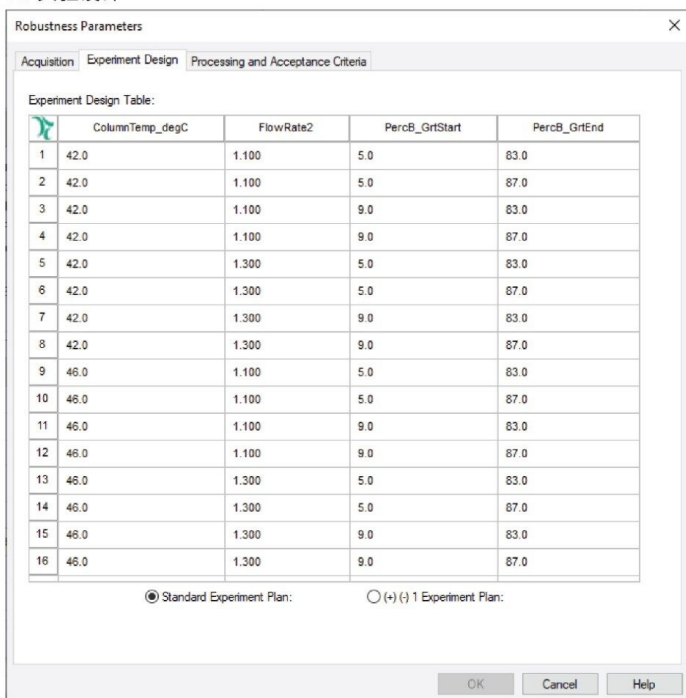


图2.设置Empower MVM软件进行稳定性研究。用户可定义采集中的研究因素选择(A)，Empower将自动创建实验

设计(B)。

运行整个研究所需的色谱方法由Empower SSG软件自动创建。Empower SSG会根据实验设计自动创建样品组方法，用作准备运行的进样序列（图3）。样品组方法包括实验名称、方法组以及每个实验的仪器方法。整个运行过程中的空白进样和平衡步骤均按照用户要求进行。

Apply Table Preferences: Robustness										
	SampleName	Sample Preparation	Experiment Name	Function	Method Set / Report or Export Method	Robustness	ColumnTemp degC	Flow Rate2	PercB GrtStart	PercB GrtEnd
1				Equilibrate	Robust_Study5_CP					
2	Blank			Inject Samples	Robust_Study5_CP	<input type="checkbox"/>				
3	APIs w/10ug/mL_RS_CP1	Preparation 1	Center Point	Inject Samples	Robust_Study5_CP	<input checked="" type="checkbox"/>	44.0	1.200	7.0	85.0
4	APIs/RS 10ug/mL_CP2	Preparation 2	Center Point	Inject Samples	Robust_Study5_CP	<input checked="" type="checkbox"/>	44.0	1.200	7.0	85.0
5	APIs 100ug/mL_CP3	Preparation 3	Center Point	Inject Samples	Robust_Study5_CP	<input checked="" type="checkbox"/>	44.0	1.200	7.0	85.0
6				Equilibrate	Robust_Study5_1					
7	APIs w/10ug_RS_1	Preparation 1	Experiment 1	Inject Samples	Robust_Study5_1	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.100	5.0	83.0
8	APIs w/10ug_RS_2	Preparation 1	Experiment 2	Inject Samples	Robust_Study5_2	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.100	5.0	87.0
9				Equilibrate	Robust_Study5_3					
10	APIs w/10ug_RS_3	Preparation 1	Experiment 3	Inject Samples	Robust_Study5_3	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.100	9.0	83.0
11	APIs w/10ug_RS_4	Preparation 1	Experiment 4	Inject Samples	Robust_Study5_4	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.100	9.0	87.0
12				Equilibrate	Robust_Study5_5					
13	APIs w/10ug_RS_5	Preparation 1	Experiment 5	Inject Samples	Robust_Study5_5	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.300	5.0	83.0
14	APIs w/10ug_RS_6	Preparation 1	Experiment 6	Inject Samples	Robust_Study5_6	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.300	5.0	87.0
15				Equilibrate	Robust_Study5_7					
16	APIs w/10ug_RS_7	Preparation 1	Experiment 7	Inject Samples	Robust_Study5_7	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.300	9.0	83.0
17	APIs w/10ug_RS_8	Preparation 1	Experiment 8	Inject Samples	Robust_Study5_8	<input checked="" type="checkbox"/>	42.0	1.300	9.0	87.0
18				Equilibrate	Robust_Study5_9					
19	APIs w/10ug_RS_9	Preparation 1	Experiment 9	Inject Samples	Robust_Study5_9	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.100	5.0	83.0
20	APIs w/10ug_RS_10	Preparation 1	Experiment 10	Inject Samples	Robust_Study5_10	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.100	5.0	87.0
21				Equilibrate	Robust_Study5_11					
22	APIs w/10ug_RS_11	Preparation 1	Experiment 11	Inject Samples	Robust_Study5_11	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.100	9.0	83.0
23	APIs w/10ug_RS_12	Preparation 1	Experiment 12	Inject Samples	Robust_Study5_12	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.100	9.0	87.0
24				Equilibrate	Robust_Study5_13					
25	APIs w/10ug_RS_13	Preparation 1	Experiment 13	Inject Samples	Robust_Study5_13	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.300	5.0	83.0
26	APIs w/10ug_RS_14	Preparation 1	Experiment 14	Inject Samples	Robust_Study5_14	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.300	5.0	87.0
27				Equilibrate	Robust_Study5_15					
28	APIs w/10ug_RS_15	Preparation 1	Experiment 15	Inject Samples	Robust_Study5_15	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.300	9.0	83.0
29	APIs w/10ug_RS_16	Preparation 1	Experiment 16	Inject Samples	Robust_Study5_16	<input checked="" type="checkbox"/>	46.0	1.300	9.0	87.0

图3.使用Empower SSG软件生成的稳定性测试样品组方法。

稳定性数据表明，该方法满足USP分离度限值（大部分化合物 ≥ 1.5 ），萘甲唑啉峰除外（图4）。实验9、10和12中萘甲唑啉峰的分度均低于1.5，软件对此进行了标记。通过观察效应图中的影响级别，可确定对分离度影响最大的因素。对于NAPH API峰，因素A（柱温）对分离度有显著负面影响，提示分离度随柱温升高而降低（图5）。此外，因素B（流速）对NAPH API具有积极影响，流速增加时分离度提高。对于相关物质，单个因素会表现出正面和负面影响，多变量的相互作用对分离度的影响很小（图6）。



Summary_USP Rs_Components

Sample Set ID: 1108 Result Set ID: 1816
 Processed Channel Descr.: 2998 PDA 260.0 nm (2998 (210-400)nm)

USP Resolution Summarized by Name Channel: 2998

	SampleName	Maleate	PHE-Imp A	PHE-Imp B	NAPH	NAPH-Imp D	NAPH-Imp A	NAPH-Imp B	NAPH-Imp C
1	APIs w/10ug RS_1	6.2	2.1	3.4	2.7	7.2	2.3	16.0	1.8
2	APIs w/10ug RS_2	6.2	2.0	3.4	2.6	7.1	2.3	15.6	1.8
3	APIs w/10ug RS_3	7.3	1.7	3.4	3.0	7.3	2.3	16.6	1.9
4	APIs w/10ug RS_4	7.2	1.6	3.4	2.8	7.2	2.4	16.0	1.8
5	APIs w/10ug RS_5	5.4	3.0	3.4	3.1	7.4	2.0	16.9	2.0
6	APIs w/10ug RS_6	5.4	2.8	3.4	3.0	7.3	2.0	16.4	2.0
7	APIs w/10ug RS_7	6.8	2.3	3.4	3.3	7.5	2.1	17.4	2.1
8	APIs w/10ug RS_8	6.7	2.2	3.4	3.2	7.4	2.1	17.0	2.0
9	APIs w/10ug RS_9	3.9	3.8	4.0	1.4	7.1	2.2	15.5	2.1
10	APIs w/10ug RS_10	3.9	3.7	4.0	1.2	7.0	2.2	15.1	2.1
11	APIs w/10ug RS_11	5.0	3.2	4.1	1.6	7.2	2.2	16.0	2.2
12	APIs w/10ug RS_12	5.0	3.2	4.1	1.4	7.1	2.3	15.7	2.2
13	APIs w/10ug RS_13	3.0	4.7	4.0	1.8	7.3	1.9	16.5	2.4
14	APIs w/10ug RS_14	3.1	4.5	4.0	1.6	7.2	1.9	16.0	2.3
15	APIs w/10ug RS_15	4.6	3.8	4.1	1.9	7.4	2.0	16.9	2.4
16	APIs w/10ug RS_16	4.5	3.8	4.1	1.8	7.3	2.0	16.5	2.4

图4. Empower软件中的组分汇总报告，展示了稳定性实验中各峰之间的USP分离度。第一个峰未标注分离度。处理方法中指定了分离度限值，不合格(OOS)结果将被标记。

A. 萘甲唑啉峰的验证数据

	Component	Experiment	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Data Faults	Assessed Field	Assessed Field Value
1	NAPH	Experiment 1	42.0	1.100	5.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	2.7
2	NAPH	Experiment 2	42.0	1.100	5.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	2.6
3	NAPH	Experiment 3	42.0	1.100	9.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	3.0
4	NAPH	Experiment 4	42.0	1.100	9.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	2.8
5	NAPH	Experiment 5	42.0	1.300	5.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	3.1
6	NAPH	Experiment 6	42.0	1.300	5.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	3.0
7	NAPH	Experiment 7	42.0	1.300	9.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	3.3
8	NAPH	Experiment 8	42.0	1.300	9.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	3.2
9	NAPH	Experiment 9	46.0	1.100	5.0	83.0	<input checked="" type="checkbox"/>	USP Resolution	1.4
10	NAPH	Experiment 10	46.0	1.100	5.0	87.0	<input checked="" type="checkbox"/>	USP Resolution	1.2
11	NAPH	Experiment 11	46.0	1.100	9.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	1.6
12	NAPH	Experiment 12	46.0	1.100	9.0	87.0	<input checked="" type="checkbox"/>	USP Resolution	1.4
13	NAPH	Experiment 13	46.0	1.300	5.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	1.8
14	NAPH	Experiment 14	46.0	1.300	5.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	1.6
15	NAPH	Experiment 15	46.0	1.300	9.0	83.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	1.9
16	NAPH	Experiment 16	46.0	1.300	9.0	87.0	<input type="checkbox"/>	USP Resolution	1.8

B. 因素和相互作用图

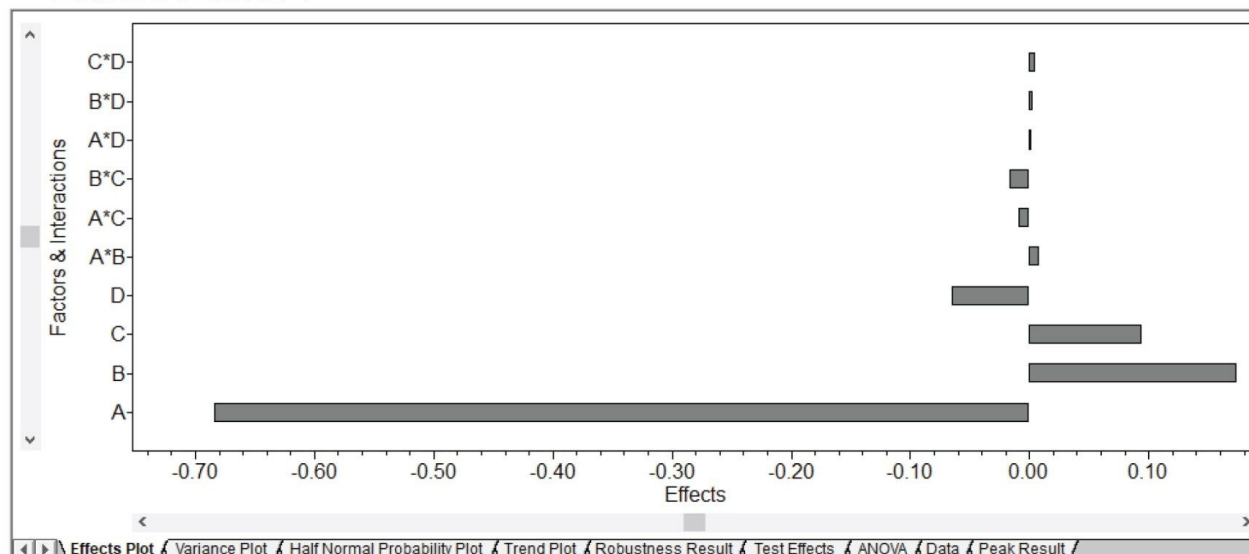


图5.使用Empower MVM软件生成的萘甲唑啉峰验证结果。稳定性实验中的USP分离度结果，其中标记有不合格(

OOS)结果(A)，以及各因素及其相互作用对USP分离度的效应图(B)。



Robustness_Effects Plot_Report

Study Name: Robustness_Study5

Study ID: 1276

Project Name: MVM_Robustness_Naph_Phen

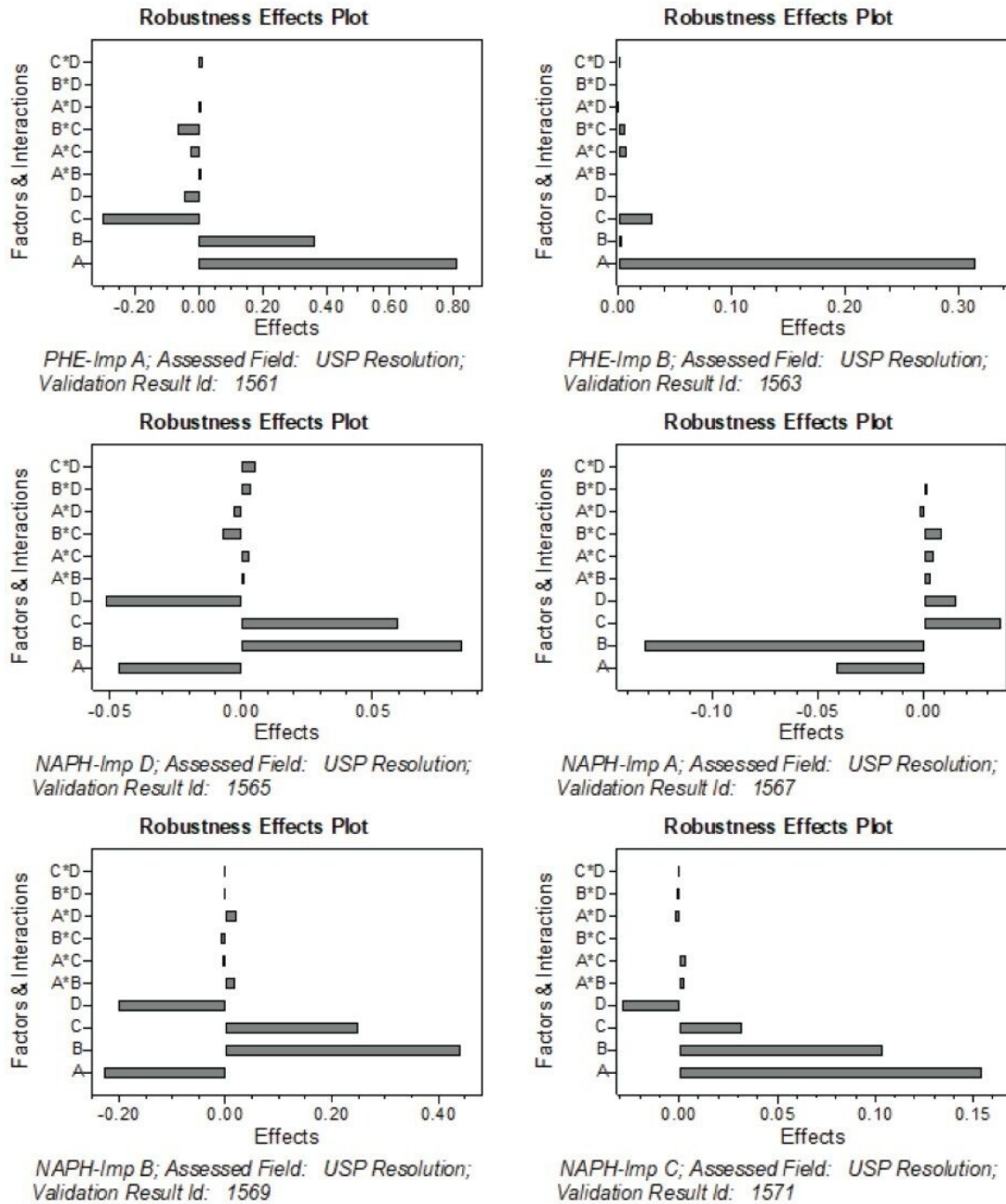


图6.使用Empower MVM软件生成的相关物质的稳定性结果。各因素及其相互作用对各组分分离度的效应图。影响

因素包括A：柱温；B：流速；C：梯度开始时的%B；D：梯度结束时的%B。

控制策略

通过风险评估和稳定性评估对方法性能特征有更深入的了解之后，制定一组控制措施组成控制策略，用以确保分析方法在整个生命周期内的常规使用中表现出预期的性能²。了解对方法性能的影响有助于确定应控制的参数，并相应确定方法的操作范围，使方法性能在该范围内不受影响。

在本研究中，DoE稳定性研究证明了该方法对柱温的敏感性，特别是对最关键的一对峰（PHE杂质A和NAPH API）之间分离度的影响。建议将柱温设置限制为 44.0 ± 1.0 °C，以达到要求的分离度 ≥ 1.5 。其他参数的可接受操作范围包括流速 1.2 ± 0.1 mL/min、梯度开始时的有机溶剂比例 $7.0 \pm 2.0\%$ 和梯度结束时的 $85.0 \pm 2.0\%$ ，在该范围内可满足分离度标准。

结论

利用Empower MVM软件进行多变量DoE研究，评估盐酸萘甲唑啉、非尼拉敏及相关物质分析方法的稳定性。Empower SSG软件可自动生成色谱方法，用以运行整个研究。效应图清晰展示了对方法性能影响最大的参数，有助于定义满足性能标准所需的方法操作条件。

使用多变量DoE评估方法稳定性可帮助确定方法参数的影响和稳定性操作条件，从而促进控制策略的开发，减少和控制常规使用过程中的差异性来源。

参考资料

1. U.S. FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, July 2015.
2. ICH Q14. Analytical Procedure Development, International Conference on Harmonization, 31 March 2022.

3. Swartz ME, Krull IS. Method Validation and Robustness. LCGC North America-05-01-2006, Volume 24, Issue 5 Published on: May 1, 2006.
 4. Maziarz M, Rainville P. 使用系统性筛选策略进行高效方法开发. 沃特世应用纪要, [720007850ZH](#), 2023年.
 5. Maziarz M, Wrona M, McCarthy SM. 利用Empower 3 MVM软件提高盐酸甲氧氯普胺及相关物质的方法验证效率沃特世应用纪要, [720005111ZH](#), 2018年.
 6. [Empower SSG](#) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=1849888&lcid=1849889&type=DWNL.>> .
-

特色产品

[Arc Premier系统](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

[Empower方法验证管理器\(MVM\)](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=534328) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=534328>>

720007870ZH, 2023年3月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号