Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用系统化筛查方案提高方法开发的效率

Margaret Maziarz, Sean M. McCarthy和Mark Wrona
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 稳定的UPLC®方法开发方案
- 采用ACQUITY® QDa® 质谱检测器，通过质谱检测实现快速准确的样品组分鉴定
- 最大程度减少通过单独进样样品组分确认谱峰的需求

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ACQUITY UPLC色谱柱

ACQUITY QDa质谱检测器

ACQUITY UPLC PDA检测器

Empower® 3软件

沃特世质量控制标准品(QCRM)基准标准品

关键词

UPLC，方法开发，ApexTrack™集成，Auto•Blend Plus™，盐酸甲氧氯普胺，亚2 µm颗粒色谱柱，质谱

简介

在方法开发过程中，我们需要筛查一系列的色谱参数才能使方法达到足够的分离度并实现稳定的分离。 进行方法开发的途径多种多样，例如每次更改一个因子的方法、系统化方法、质量源于设计(QbD)法等等，而采用这些方法优化分离时，需要考虑的因子以及最终的目标都是相同的。在所有的因子中，我们要调整的参数主要包括色谱柱填料、有机溶剂、pH、梯度斜率、流速和温度。

在方法开发过程中，我们需要系统地评估修改这些参数之后产生的影响。每一轮优化之后，我们都要依照具体的标准(例如保留性、分离度和拖尾值满足特定标准的目标峰的最大数量)对新方法进行评估，然后从每个步骤中选出最佳方法以待进一步研究，直至获得最适用的方法。整个开发过程的重点是要确保每个步骤都能选出最佳条件，而且所做的选择必须有理有据。

无论选择何种优化策略，在所研究的实验条件下鉴定和追踪关键样品组分都具有重要意义。由于峰洗脱顺序可能发生变化且相关物质的UV光谱可能发生重叠，因此如果条件允许，我们可采用相同的实验条件，通过依次进样标准品来简化分析。尽管这种方法最终能够给出有效的结果，但其过程相当耗时。而使用质谱检测替代光学检测可实现明确鉴定，还有助于分析人员监测样品组分，快速鉴定和追踪共洗脱组分以及洗脱顺序的变化。

本应用纪要介绍了盐酸甲氧氯普胺及其相关物质的UPLC分析方法的开发过程。我们将UV(PDA)和质谱检测相结合，应用了用户友好的ACQUITY QDa质谱检测器。方法开发过程采用了系统化方案，包括探索、筛查和优化三个步骤。我们利用自定义计算功能分析每个步骤的结果并对其进行排序，然后在Empower 3色谱数据软件中进行报告，最大程度降低了制定决策时由于分析人员造成的偏差，确保实现总体目标。

实验

沃特世参比标准品

采用样品瓶包装: LCMS质量控制标准品 (QCRM, 部件号186006963)

方法开发条件

LC系统: 配备色谱柱管理器和溶剂选择阀 (SSV) 的ACQUITY UPLC H-Class

色谱柱: 规格为2.1x 50 mm的所有色谱柱:
ACQUITY UPLC CSH™ C_{18}, 1.7 µm (部件号186005296)
ACQUITY UPLC CORTECS C_{18}+, 1.6 µm (部件号186007114)
ACQUITY UPLC CSH苯己基, 1.7 µm (部件号186005406)
ACQUITY UPLC HSS五氟苯基 (PFP), 1.8 µm (部件号186005965)

柱温: 40、45和50 °C
进样体积: 1.0 µL
流速: 0.6 mL/min
流动相A: 125 mM甲酸的水溶液
流动相B: 125 mM氢氧化铵的水溶液
流动相C: 水
流动相D1: 乙腈
流动相D2: 甲醇

分离: 采用标准梯度, 5 min内有机溶剂从5%升至90%
清洗溶剂: 清除/样品清洗: 50:50水/甲醇
密封清洗液: 90:10水/乙腈
PDA检测器: ACQUITY UPLC PDA
PDA设置: 210-400 nm (在270 nm下检测)
MS检测器: ACQUITY QDa (扩展性能)
扫描模式: 100-400 m/z
电离模式: ESI+, ESI-
探头温度: 600 °C
采样速率: 10 pts/s
毛细管电压: 0.8 kV (正/负)
锥孔电压: 15 V
数据: 质心

系统控制、数据采集和分析:

Empower 3 FR2 CDS软件

在本应用纪要中，我们展示了如何在方法开发过程中结合UV和质谱数据准确追踪所有组分，以确保最终方法的峰纯度。总体而言，采用系统化的方案并借助质谱检测技术，能够更快、更有效地开发出符合USP方法稳定性和性能验证标准的方法[1]。

溶液制备

含API及相关化合物的样品溶液

使用甲醇配制浓度为1.0 mg/mL的分离储备液。将等体积的各种储备液移至同一样品瓶中，用水稀释，使工作样品中每种分析物的最终浓度均为0.06 mg/mL。本研究中使用的化合物如表1所示。

化合物	常用名	单同位素质量数(Da)
API	甲氧氯普胺	299.14
杂质A	4-乙酰氨基-5-氯-N-(2-(二乙氨基)乙基)-2-甲氧基苯甲酰胺	341.15
杂质B	4-乙酰氨基-5-氯-2-甲氧基苯甲酰胺	257.05
杂质C	4-氨基-5-氯-2-甲氧基苯甲酸	201.02
杂质D	4-乙酰氨基-2-甲氧基苯甲酸甲酯	223.08
杂质F	4-氨基-5-氯-N-(2-(羟基苯甲酰胺基))-2-羟基苯甲酰胺	
杂质G	2-(4-氨基-5-氯-2-羟基苯甲酰胺基)-N,N-二乙基乙酰胺氧化物	315.14
杂质H	4-乙酰氨基-2-羟基苯甲酸	195.05
杂质9	4-氨基-2-甲氧基苯甲酸甲酯	181.07

表1. UPLC方法开发中的USP指定盐酸甲氧氯普胺相关物质列表。

结果与讨论

系统化的方法开发方案

采用系统化方案可以对主要选择性参数进行连续评估，以确保开发出稳定且可重现的方法；在此我们使用UPLC以实现更快的分析速度和更高的灵敏度。

本研究选用了不同基质颗粒和键合相的色谱柱填料，以扩大选择性的范围。

如图1所示，该方案包括一系列的步骤，每个步骤都是为了系统性地解决分离度问题而设计的。方案的第一步包括定义样品、成功标准、色谱系统和验证系统性能。

对于甲氧氯普胺及其USP指定相关物质，我们的目标是成功分离这些组分，使得每个峰至少达到≥2.0的USP分离度以及≤1.5的USP拖尾因子，并且获得≥ 3.0的保留因子(k*)。在梯度分离中，峰的保留因子被定义为k/(k+1)。

为了使方法开发达到最大的灵活性，我们采用了配备色谱柱管理器和溶剂选择阀的ACQUITY UPLC H-Class系统。鉴定所有组分和可能存在的共洗脱物时，我们使用ACQUITY PDA进行光学检测，使用ACQUITY QDa进行质谱检测。在开始研究之前，我们使用LCMS质量控制标准品(QCRM)验证了系统性能，以确认系统运行正常[3]。

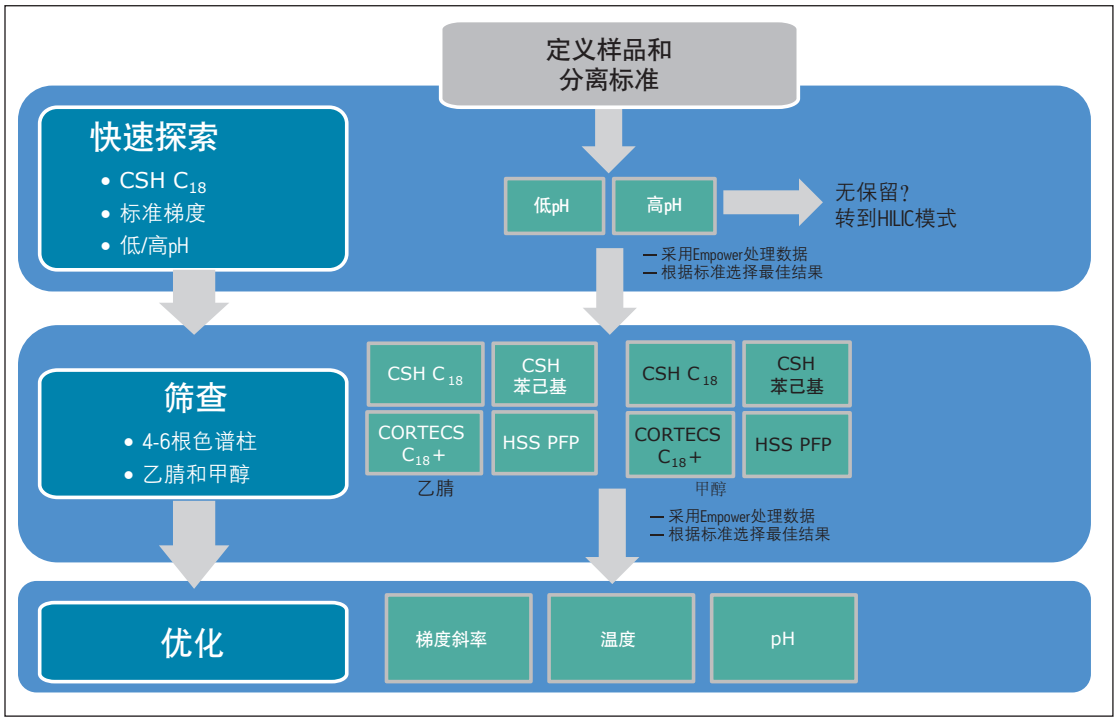


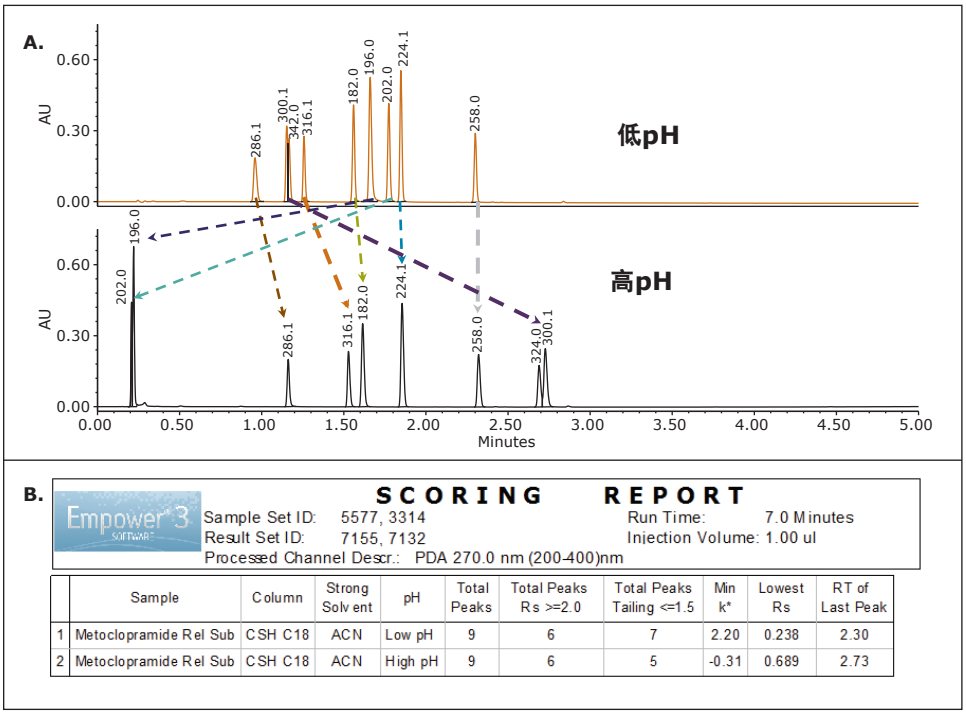
图1. 用于开发色谱方法的系统化方案。

快速探索

定义样品、分析标准和系统之后，我们将快速探索作为系统化方案的第一步，目的是快速筛查出适用的分离条件。快速探索的目标是选出能够实现最佳的样品组分保留性能的酸性或碱性条件，并确定最佳分离模式(反相或HILIC)。

分别使用125 mM甲酸和125 mM氢氧化铵的储备液进行低pH和高pH分离。反相分离使用标准梯度 — 乙腈在5分钟内从5%增加至90%。这一碱性样品混合物的分离结果与我们预期的一致，低pH和高pH条件下的分离表现出显著的保留性变化(图2)。我们还通过质谱数据追踪到了受pH影响最大的组分。色谱数据由Empower自动处理，利用ApexTrack集成技术检测色谱峰。

为了确定最佳条件以便执行下一步的方法优化，我们在Empower软件中定义了自定义计算并创建了自定义报告，通过追踪达到指定标准的峰的数量对最佳条件下的方法进行评分，进而完成选择。在本研究中，所有组分的保留性在低pH条件下更好，因此，我们继续采用低pH条件进行下一步的研究。



	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	Low pH	9	6	7	2.20	0.238	2.30
2	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	High pH	9	6	5	-0.31	0.689	2.73

图2. 采用低pH和高pH条件进行快速探索。A.展示低pH和高pH条件对甲氧氯普胺及相关化合物的分离影响的色谱数据。利用质谱数据追踪受pH影响最大的样品组分。B. Empower 3评分报告。在Empower中将成功标准定义为自定义计算结果，然后根据计算结果创建报告。对标准进行了排序，将最佳方法列于首位。

筛查

通过探索步骤选出能实现最佳保留性能的分离条件(低pH条件)并未完全达到我们的成功标准。接下来，我们进入了方案的筛查阶段，目的是实现所有样品组分的分离。利用色谱柱管理器，无需任何用户干预，我们即可对每根色谱柱进行筛查。每次分离均使用与探索实验相同的标准梯度，但要研究甲醇和乙腈这两种不同的洗脱液。

然后，我们再次使用Empower评分报告分析色谱数据并选择最佳分离条件(图3)。如图所示，使用ACQUITY UPLC CSH C_{18}色谱柱，以甲醇为流动相时，能够获得数量最多的色谱峰，分离度≥ 2.0且拖尾因子≤ 1.5的色谱峰数量也最多。因此，我们选择该条件用于系统化方案的最后一个步骤 — 优化。

SCORING REPORT

Sample Set ID: 4001 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7073 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Lowest Rs	Min k*	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.283	3.22	3.11
2	Metoclopramide Rel Sub	CORTECS C18+	ACN	Low pH	9	7	5	0.769	1.98	2.15
3	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	Low pH	9	5	7	2.308	2.15	2.30
4	Metoclopramide Rel Sub	CORTECS C18+	MeOH	Low pH	8	7	3	2.094	2.99	2.98
5	Metoclopramide Rel Sub	CSH Phenyl Hexyl	MeOH	Low pH	8	6	8	1.690	2.30	3.13
6	Metoclopramide Rel Sub	CSH Phenyl Hexyl	ACN	Low pH	8	5	5	0.654	0.98	2.21
7	Metoclopramide Rel Sub	HSS PFP	MeOH	Low pH	8	2	2	1.870	6.86	3.44
8	Metoclopramide Rel Sub	HSS PFP	ACN	Low pH	7	2	2	0.108	4.51	2.61

图3. 筛查不同色谱柱和有机溶剂的Empower 3评分报告。使用ACQUITY UPLC CSH C_{18}色谱柱和甲醇的方法排名最高，表明该分离获得的分离度≥ 2.0且拖尾因子≤ 1.5的色谱峰数量最多。

优化

尽管我们已经离方法开发的目标更近了一步，但是筛查步骤所得的结果仍然不能完全满足成功标准。我们需要继续执行优化步骤以改善分离效果。在优化步骤中，我们研究了梯度斜率、柱温和pH的影响。完成每一步之后都利用评分报告选出最佳条件。

我们研究的第一个参数是梯度斜率，具体方法是保持梯度时间不变，改变梯度的终点。评分报告表明，有机溶剂在5分钟内从5%增加至60%的梯度可实现最佳分离(图4)。为了让所有的峰都能达到分离度标准，接下来我们利用相同的系统设置对柱温进行了优化。结果表明，在45 °C的条件下，所有组分均可实现最佳分离，满足我们在开发初期设定的所有目标，如图5所示。

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5181 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7285 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Lowest Rs	Min k*	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub, 60%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	1.727	3.56	4.01
2	Metoclopramide Rel Sub, 70%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	8	1.592	3.43	3.63
3	Metoclopramide Rel Sub, 80%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.463	3.31	3.34
4	Metoclopramide Rel Sub, 90%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.346	3.21	3.11

图4. 梯度斜率优化。研究不同的梯度斜率，将梯度终点的有机溶剂百分比从90%依次降至80%、70%和60%(梯度时间为5 min，起始百分比为5%)。甲醇在5分钟内从5%增加至60%的梯度评分最高，即该梯度下分离度≥ 2.0且拖尾因子≤ 1.5的色谱峰数量最多，分离效果最佳。

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5325, 5232 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7236, 7205 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub, 45C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	8	9	3.27	2.280	3.87
2	Metoclopramide Rel Sub, 50C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	3.04	1.816	3.79
3	Metoclopramide Rel Sub, 40C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	3.54	1.757	3.99

图5. 柱温优化。我们研究的温度包括40 ℃、45 ℃和50 ℃。采用45 ℃的方法得分最高，分离度≥ 2.0的色谱峰数量最多，表示其分离效果最好。

至此，所有标准均已达到，我们接下来又继续研究了pH对色谱分离的影响。一般而言，即使非常细微的pH变化也会极大地影响可电离化合物的保留性。我们采用方案中所定义的流动相，在2.15、3.0和4.0的pH条件下执行了分离，结果如图6所示。实验采用pH3.0和4.0的条件，通过Auto•Blend Plus技术混合系统中已有的甲酸和氢氧化铵溶液、甲醇和水，获得pH稳定的流动相。结果表明，随着pH升高，选择性发生了显著变化，最终，pH 2.15的条件实现了最佳分离效果，如图7所示。

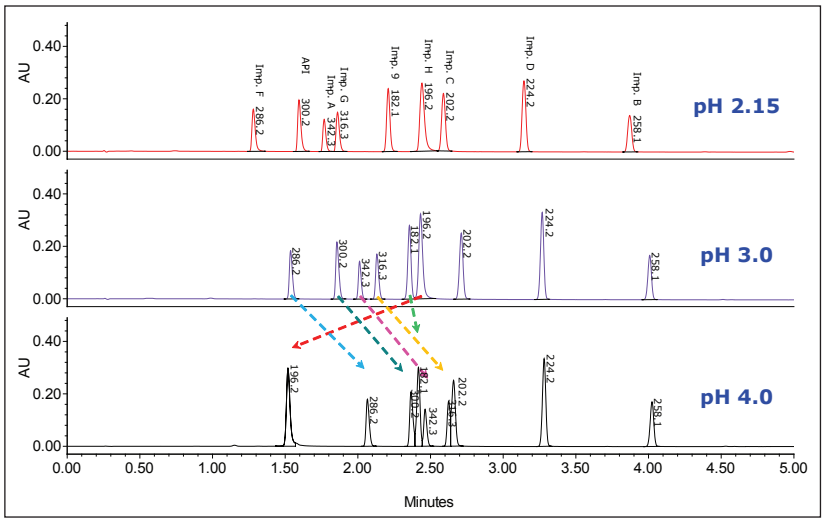


图6. 通过优化pH研究pH对甲氧氯普胺及相关化合物分离的影响。使用ACQUITY QDa质谱检测器，通过质谱检测进行峰追踪。最佳分离条件为pH 2.15。

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5325, 6461 Run Time: 7.5, 7.0 Minutes
Result Set ID: 7263, 7273 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	MeOH	Low pH	9	8	9	3.27	2.280	3.87
2	Metoclopramide Rel Sub, pH 3.0	CSH C18	MeOH	pH = 3.0	9	7	9	4.12	1.687	4.01
3	Metoclopramide Rel Sub, pH 4.0	CSH C18	MeOH	pH = 4.0	9	5	4	4.06	0.632	4.02

图7. pH优化。流动相pH为2.15的方法得分最高，为最佳的分离条件。

最终的UPLC方法条件

LC系统: ACQUITY UPLC H-Class
色谱柱: ACQUITY UPLC CSH C_{18}, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm
柱温: 45 °C
进样体积: 1.0 µL
流速: 0.6 mL/min
流动相A: 125 mM甲酸的水溶液
流动相C: 水
流动相D2: 甲醇
分离: 梯度

步骤	时间 (minutes)	溶剂A (%)	溶剂C (%)	溶剂D2 (%)
1	初始	10	85.0	5.0
2	5.0	10	30.0	60.0
3	5.5	10	30.0	60.0
4	5.6	10	85.0	5.0
5	7.0	10	85.0	5.0

清洗溶剂: 清除/样品清洗: 50:50水/甲醇
密封清洗液: 90:10水/乙腈
PDA检测器: ACQUITY UPLC PDA
PDA设置: 210-400 nm(在270 nm下检测)
MS检测器: ACQUITY QDa(扩展性能)
扫描模式: 100-400 m/z
电离模式: ESI+, ESI-
探头温度: 600 °C
采样速率: 10 pts/s
毛细管电压: 0.8 kV(正/负)
锥孔电压: 15 V
数据: 质心

系统控制、数据采集和分析:

Empower 3 FR2 CDS软件

最终UPLC方法

为了验证新开发的UPLC方法的性能，我们对样品重复进样的结果重复性进行了评估。根据USP通用章节<621>色谱2中定义的规范确定五次重复进样的系统适应性。每种组分的方法系统适应性结果如表2所示。

保留时间和峰面积重复性远低于USP的规定限值(2.0% RSD以下)。所有峰之间的USP分离度均≥ 2.5，高于通用USP≥ 1.5的分离度要求。通过重复进样得到的系统适应性结果都非常良好。使用Empower方法验证管理器(MVM)软件还可自动执行进一步的验证检测。

Empower 3 SOFTWARE
Report Method: System Suit_Sum Report
Sample Set ID: Sample Set Id 2622
Result Set ID: Result Set Id 2660
Channel Name: PDA 270

	Name	# of Inj.	%RSD RT	%RSD Peak Areas	Ave USP Resolution	Ave USP Tailing
1	Imp. F	5	0.07	0.19		1.2
2	API	5	0.06	0.22	6.7	1.3
3	Imp. A	5	0.06	0.21	3.4	1.2
4	Imp. G	5	0.07	0.23	2.5	1.2
5	Imp. 9	5	0.06	0.19	9.2	1.1
6	Imp. H	5	0.06	0.19	4.2	1.4
7	Imp. C	5	0.06	0.31	2.5	1.1
8	Imp. D	5	0.05	0.21	9.0	1.1
9	Imp. B	5	0.04	0.21	13.0	1.1

表2. 使用ACQUITY UPLC H-Class系统采集五次重复进样的数据所得的系统适应性结果。

结论

我们采用系统化方案成功地开发了甲氧氯普胺及相关化合物的UPLC分离方法。该方法达到了预设的成功标准，即完全分离全部共9种组分，而且所有色谱峰的分离度≥ 2.0，拖尾因子≤ 1.5，保留因子(k*) ≥3.0。

将ACQUITY QDa质谱检测器与UV检测和ACQUITY UPLC H-Class系统配合使用，无需通过多次色谱运行来确证根据保留时间得到的色谱峰鉴定结果，极大简化了方法开发过程。

在方法开发研究中，我们仅通过单次进样(而不是9次单独进样)就快速完成了组分的鉴定以及色谱峰洗脱顺序的追踪。

最后，Empower软件的ApexTrack功能可连续地对色谱图进行评估，从而确保整个开发过程中的数据对比都公平公正。Empower的自定义计算和报告功能还能生成评分报告，帮助我们轻松确定方案中每个步骤的最佳条件。

总而言之，采用指定的系统化方案，配合UPLC系统、检测器及相应的色谱柱填料，有助于分析实验室快速高效地开发色谱方法。采用这种方式开发的方法通常具有更出色的重现性，可有效提高实验室的验证成功率。

参考文献

1. General Chapter, <1226>, Verification of Compedial Method, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 1, 2013.
2. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 1, 2013.
3. Berthelette KD, Summers M, Fountain KJ. Ensuring Data Quality by Benchmarking System Performance Using Waters Neutrals Quality Control Reference Material. Waters Corp. 2013; 720004622en.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY, ACQUITY UPLC, UPLC和Empower是沃特世公司的注册商标。
QDa, ApexTrack, Auto•Blend Plus和CSH是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司 中国印刷 2014年4月 720005026ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com