

应用纪要

## 基于“分析方法质量源于设计”理念开发使用Arc Premier MaxPeak高性能表面(HPS)技术分析磷酸地塞米松及相关化合物的方法

---

Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation



---

摘要

我们依托“分析方法质量源于设计(AQbD)”理念开发出一种分析金属螯合与非螯合物混合物的超高效液相色谱方法。方法开发过程使用DryLab、Empower和沃特世系统自动完成。比较Arc Premier系统结合MaxPeak Premier色谱柱与标准不锈钢硬件的性能发现，在Arc Premier系统上使用MaxPeak Premier色谱柱与不锈钢硬件相比，对分离金属螯合物具有更出色的性能。最终方法选择MaxPeak Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱(10 cm × 4.6 × 2.5 μm)，流动相为0.1%甲酸的乙腈溶液（有机溶剂）和10 mM甲酸铵水溶液（水性溶液）。该方法表现出优异的峰间分离度、理想的峰形、高回收率和良好的重现性。例如，所有峰（包括磷酸化化合物）的USP拖尾因子均≤1.1。这些结果表明，使用MaxPeak高性能表面(HPS)技术分析金属螯合物非常有利于减少与金属表面的不良相互作用，达到理想的分离效果。

## 优势

- Arc Premier系统的MaxPeak HPS技术在磷酸化化合物分析中表现出显著优势
- Arc Premier系统与Empower 3色谱数据系统(Empower CDS)和DryLab4软件结合使用提高了方法开发效率
- DryLab与Empower无缝集成，实现全自动方法开发

---

## 简介

不锈钢具有耐腐蚀性<sup>1</sup>、可制造性并对多种化合物有惰性，因此一直是常用的液相色谱仪器和色谱柱结构材料。但是，某些类别的分析物（例如金属螯合物/路易斯碱）仍有可能与金属氧化物膜发生相互作用，因为这些金属离子具有缺电子性。例如，磷酸基团和羧酸基团等富电子分析物可能很容易吸附到色谱系统流路内不锈钢的缺电子表面。此类相互作用可能导致色谱峰形状不佳、分析物严重损失和定量误差严重<sup>2,3</sup>。

之前解决该问题使用的一种方法是向流动相中添加金属螯合剂（例如EDTA、柠檬酸和丙酮）<sup>4-7</sup>。这些添加剂虽有可能发挥作用，但螯合剂的使用会对色谱选择性和质谱检测灵敏度产生不利影响。之前还有另一种方法用来解决金属表面与金属敏感化合物之间的相互作用，就是使用不含金属的色谱柱，例如聚醚醚酮(PEEK)色谱柱。在液相色谱柱中使用PEEK管路虽然已被证明有用，但这种方法存在严重的缺点。首先，PEEK具有的机械强度不足以承受超高性能液相色谱(UPLC)通常所需的超高压（即>5000 psi）<sup>8</sup>。其次，PEEK管路与多种有机溶剂（例如四氢呋喃(THF)、二甲基亚砷(DMSO)和氯代烃类）不兼容<sup>9,10</sup>。

沃特世针对这些问题开发出一系列技术，并将其称为MaxPeak高性能表面(HPS)。这种MaxPeak HPS液相色谱表面由高度交联层组成，化学性质与亚乙基桥杂化颗粒(BEH)相似，能够减少分析物与金属表面的不良相互作用，进而提高分析物回收率、灵敏度和重现性。

在本应用纪要中，我们开发出一种使用MaxPeak HPS系统和色谱柱分析对金属敏感的药物/相关化合物的

UHPLC方法。分析的化合物包括两种磷酸化活性药物成分（磷酸氢化可的松三乙胺和地塞米松磷酸钠）以及三种磷酸地塞米松相关化合物。这五种化合物的化学结构和名称如图1所示。方法开发过程秉持“分析方法质量源于设计(AQbD)”原则，这些原则在别处有详细描述<sup>11,12</sup>。简单来讲，AQbD是一种系统性理念，在开发方法时结合风险评估和实验设计(DoE)来考察相互作用对方法性能的影响。DoE输出确定了方法的稳定操作条件区域，称之为方法操作设计区域(MODR)。

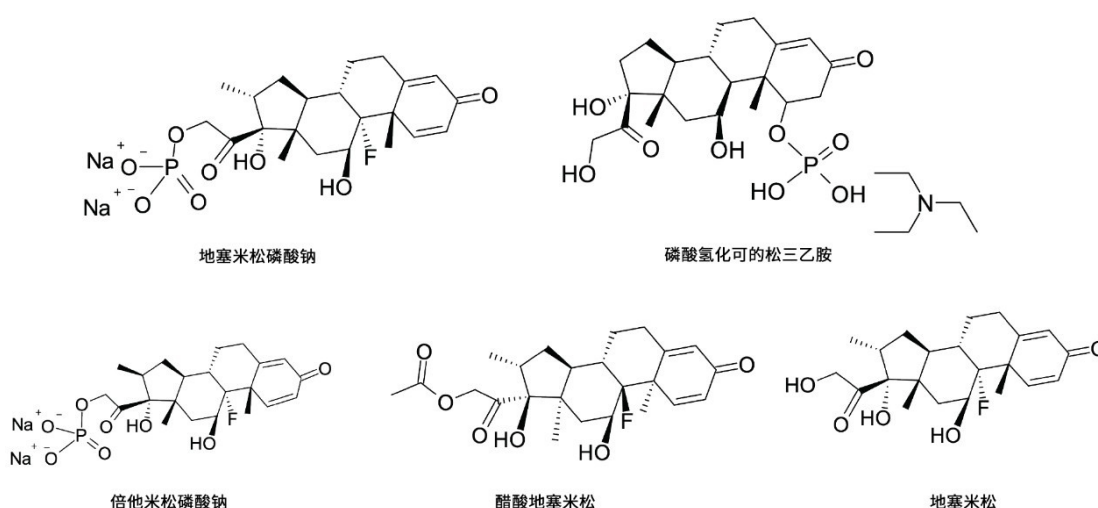


图1.地塞米松磷酸钠、磷酸氢化可的松三乙胺和磷酸地塞米松相关化合物的化学结构

实验采用装配色谱柱管理器和溶剂选择阀的Arc Premier系统，以便自动考察较宽的条件范围。本研究使用了DryLab4方法开发软件，以根据AQbD原则自动完成方法开发过程。

## 实验

### 参比物质和标准品制备

磷酸氢化可的松三乙胺、地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠、地塞米松和醋酸地塞米松均购自美国药典(USP)委员会（美国马里兰州洛克维尔）。准确称量所需量的各标准品并将其溶于50/50 (v/v)水/乙腈溶剂中，制备上述化合物的储备液。然后利用储备液制备包含两种API和三种磷酸地塞米松相关化合物的测试混合物。使用90/10 (v/v)水/乙腈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<sup>-1</sup>（磷酸氢化可的松三乙胺、地塞米松磷酸钠）和0.07 mg mL<sup>-1</sup>（各种相关化合物）。

### 液相色谱条件

液相色谱系统:	Arc Premier系统, 配备四元溶剂管理器(rQSM)、样品管理器(rFTN)、色谱柱管理器、一台CM Aux、PDA检测器、ACQUITY QDa质谱检测器
检测器:	PDA
色谱柱:	1. HSS T3, 2.5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 100 mm, pH范围: 1-8 2. BEH C <sub>18</sub> , 2.5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 100 mm, pH范围: 1-8
柱温:	30-60 $^{\circ}$ C
样品温度:	10 $^{\circ}$ C
进样体积:	3 $\mu$ L
流速:	0.5
流动相A:	0.1% (v/v)甲酸水溶液
流动相B:	乙腈和甲醇 (0.1%甲酸)
梯度:	流动相B在5 min或15 min内从10%增至90%梯度从t=0开始, 最终保持2 min, 然后返回初始条件。
UV检测波长:	254 nm

\*本实验探索了两种梯度: 5 min和15 min。

## 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DryLab 4
-------	--------------------------

---

## 结果与讨论

为全面评价高性能表面技术在金属螯合物分析中的优势，我们认为有必要对高性能表面液相色谱系统与标准不锈钢系统进行比较。因此，并行使用这两种系统开发用于分离上述金属螯合物混合物的方法，在方法开发过程的不同阶段展示两种系统之间的比较（如果适用）。

方法开发过程秉持早前所述的AQbD原则，采用这些原则可以更好地理解各种色谱因素对方法性能的影响，还有助于确定稳定的设计空间，方法在此空间内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，无需实施“批准后监管过程”<sup>13</sup>。DryLab是一款市售AQbD软件，可结合Empower开发符合AQbD原则的方法，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2所示。各步骤的详细描述见下文。

## DryLab's Empower-自动化AQbD建模工作流程



图2. DryLab - Empower AQbD方法开发工作流程，其中包含多个步骤

### 分析目标轮廓特征

方法目标是描述方法预期性能目标和测量用性能标准的分析目的。对于磷酸地塞米松/磷酸氢化可的松和相关物质，方法性能目标包括：

- 关键分析物对的USP分离度应 $\geq 1.5$ 。关键分析物对的分离度代表色谱图中两种组分之间由计算得出的最低分离度。
- 方法必须在兼容MS的条件下操作，以便采用质谱法鉴定分析物。
- 方法必须满足系统适应性标准：
  - USP峰拖尾因子 $\leq 1.5$
  - 峰面积%RSD $\leq 2.0$
  - 保留时间%RSD $\leq 1.0$

### 风险评估

在AQbD方法开发过程中，此阶段会确定和评估关键方法参数(CMP)对方法生成的数据质量的影响<sup>14</sup>，并根据可靠的色谱科学原理和过往经验评价对方法达到所需性能目标具有高风险的参数。

对于磷酸地塞米松/磷酸氢化可的松和相关物质，根据文献<sup>15</sup>中的分析物信息和科学经验评价方法参数。色谱柱填料、与金属表面的相互作用、温度、梯度时间和有机溶剂组成等参数被认为对选择性、分离度、保留性和峰形有较大影响，因此在方法开发的探索阶段研究了这些变量。流速、进样体积在内的其他色谱参数会影响分



析物分离度，但这些参数很容易控制，因此认为其并非关键参数。

## 实验设计

此研究阶段采用DOE理念来开发符合AQbD原则的方法。上一步确定的CMP定义为包含在DOE中。根据研究变量的类型/数量，DryLab软件中提供了多种实验设计用于方法开发。本研究选择三变量(3D)实验设计，选择梯度时间、三元改性剂组成（甲醇）和温度作为探索变量。本DOE总共包含12次实验，这些实验分别在使用两种固定相（HSS T3和BEH C<sub>18</sub>）的色谱系统上进行。选择的DOE会自动导出至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。此阶段研究的所有方法参数均列于表1中。

输入参数	设置		
		标准ACQUITY Arc	Arc Premier
色谱柱类型	可变参数	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 标准BEH C<sub>18</sub> 2.5 μm × 4.6 × 100 mm (pH范围: 1-12)</li> <li>▪ 标准 HSS T3 2.5 μm × 4.6 × 100 mm (pH 范围: 2-8)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Max Peak™ HPS BEH C<sub>18</sub> 2.5 μm × 4.6 × 100 mm (pH范围: 1-12)</li> <li>▪ Max Peak™ HPS HSS T3 2.5 μm × 4.6 × 100 mm (pH范围: 2-8)</li> </ul>
水性流动相和pH	恒定参数	10 mM甲酸铵溶液 (不调节pH)	10 mM甲酸铵溶液 (不调节pH)
柱温	可变参数	30–60 °C	30–60 °C
梯度时间	可变参数	5–15 min	5–15 min
流速	恒定参数	0.5 mL min <sup>-1</sup>	0.5 mL min <sup>-1</sup>
进样体积	恒定参数	3 μL	3 μL

表1.探索实验中研究的色谱条件范围汇总

## 峰追踪

在两套系统上完成所有实验后，在Empower中处理数据，然后将其导入DryLab软件。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、USP拖尾因子和对称性。然后针对每个DOE自动追踪12张不同色谱图上的峰。对两套系统执行四次该操作，如表1所详述。DryLab软件根据峰面积追踪不同色谱图上的峰，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。该软件还有另一项重要功能可实现更准确的追踪，即自动导入所有峰的Apex m/z（ACQUITY QDa质谱检测器）值，帮助确认峰得到准确追踪。

此步骤的结果清楚表明，与标准ACQUITY Arc系统/不锈钢色谱柱相比，Arc Premier系统与HPS MaxPeak色谱柱的组合表现出更出色的性能。例如，从图3中可以看出，初步探索条件中，使用MaxPeak HPS与不锈钢色谱柱得到的峰形和峰面积表现出极端性能差异。这里需要注意的是，与标准ACQUITY Arc系统上的不锈钢HSS T3色谱柱相比，Arc Premier系统上的HSS T3 MaxPeak Premier色谱柱同样表现出更出色的性能。因此，决定仅在使用MaxPeak Premier色谱柱的Arc Premier系统上执行方法开发过程的后续步骤。

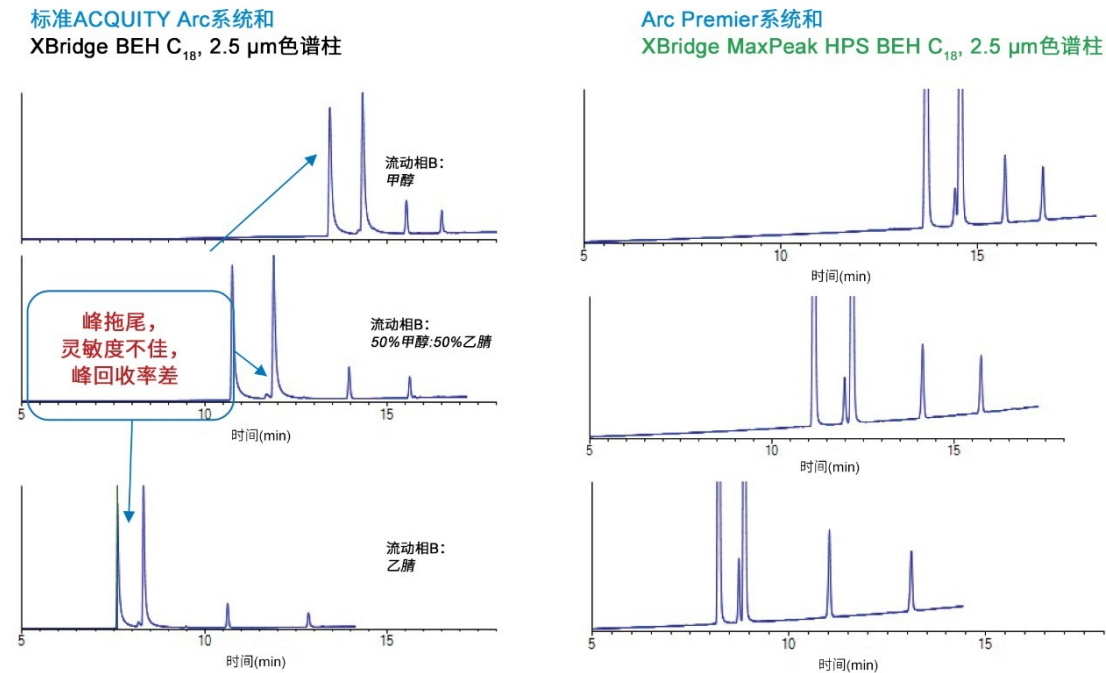


图3.12次DOE运行得到的代表性色谱图。A表示采用标准ACQUITY Arc系统在不同探索条件下执行的三次实验，B表示采用Arc Premier系统在与标准系统相同的条件下执行的三次实验。所有色谱图之间的共同条件是：流动相A：10 mM甲酸铵的水溶液，流速0.50 mL/min，柱温30 °C，线性梯度：流动相B在0.0-15 min内从10%增至90%。图中详细展示了条件的变化。

## 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。由于初步探索条件中两种MaxPeak HPS色谱柱（HSS T3和BEH C<sub>18</sub>）均表现出良好的分离，因此在Arc Premier系统上针对这两种色谱柱创建了两幅分离度图进行比较。图4即为采用这两种色谱柱运行12次实验得到的分离度图对比。从图4可以看出，针对两种色谱柱使用原始线性梯度曲线10→90%B（0.1%甲酸的乙腈溶液）和t<sub>G</sub>=15 min时，所有峰均实现良好分离（关键分析物对分离度 $R_{S,crit.} = 2.1$ ）。从图中还可以看出，在非常宽的实验条件范围内（当前方法条件周围的红色区域），关键分析物对均可实现最低基线分离。尽管两种MaxPeak色谱柱的结果非常相似，但MaxPeak Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱还是表现出略胜一筹的峰形和关键分析物对分离度。例如，采用MaxPeak HPS BEH C<sub>18</sub>色谱柱时，所有分析物的



USP拖尾因子均小于1.2，而采用HSS T3 MaxPeak色谱柱时该值小于1.4。

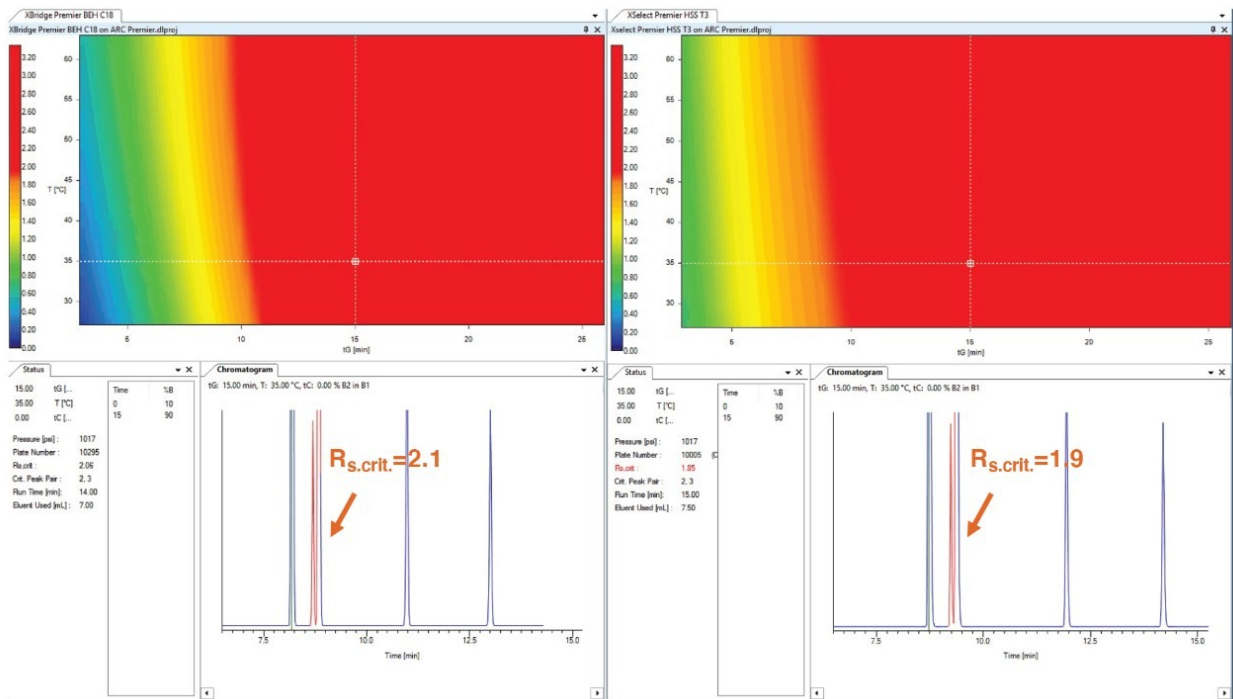


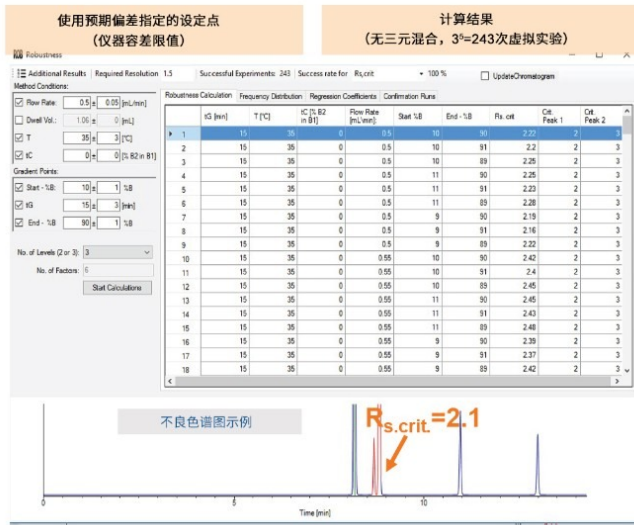
图4. DryLab屏幕图像展示了Arc Premier系统上两种Premier色谱柱的分离模型。在彩色分离度图的轴上绘制实验参数（x轴：柱温(T)，y轴：梯度时间(tG)）。颜色编码描述了在一组特定的tG和T条件下获得的色谱图中的关键分析物对分离度。分离度图中的光标指向“工作点”的条件。

## 稳定性评估和控制策略

此研究阶段负责评估从之前实验（图5）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5A展示了Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱上最终方法的稳定性评估。从评估结果可以看出，该方法始终能够使5个峰的最低分离度全都达到2.1。

还根据稳定性和风险评估的结果提出了控制策略，以确定获得一致性所需实施的控制措施。稳定性评估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较大的所有方法参数。例如，本研究发现影响分离度的两种关键参数是流速和梯度时间（图5B）。鉴别关键分离参数有助于采取更高效的方法控制策略，使用仪器方法可以设置并轻松控制这些参数。另一种显著影响方法性能的关键因素是金属螯合物与不锈钢表面的相互作用。因此，使用能够消除或减少此类相互作用的表面将大大降低这一风险。

A



B

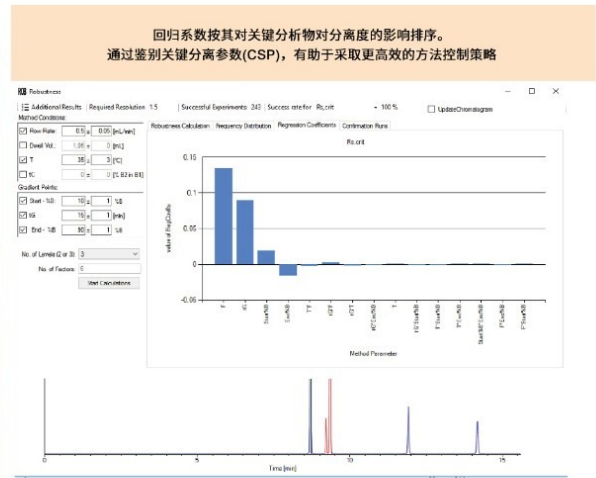


图5.Drylab稳定性评估模块屏幕图像。A表示243次虚拟实验的计算结果, 其中预期偏差基于仪器容差; B表示回归系数, 按其对关键分析物对分离度的影响排序。

## 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相当吻合。例如, 如图6所示, 有关工作点条件将导致关键分析物对分离度达到2.1的预测在实践中得到验证。此外, 发现所开发的方法具有非常出色的重现性, 在6次重复运行中得到的保留时间、峰面积和分离度的%RSD值均 $\leq 0.5\%$ 。还观察到所有峰的USP拖尾因子 $\leq 1.1$ , 表明Arc Premier系统与MaxPeak Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱的组合为磷酸化化合物提供了良好的峰形。

## 在XBridge Premier BEH C18, 2.5 $\mu\text{m}$ 色谱柱和Arc Premier系统上开发的最终方法

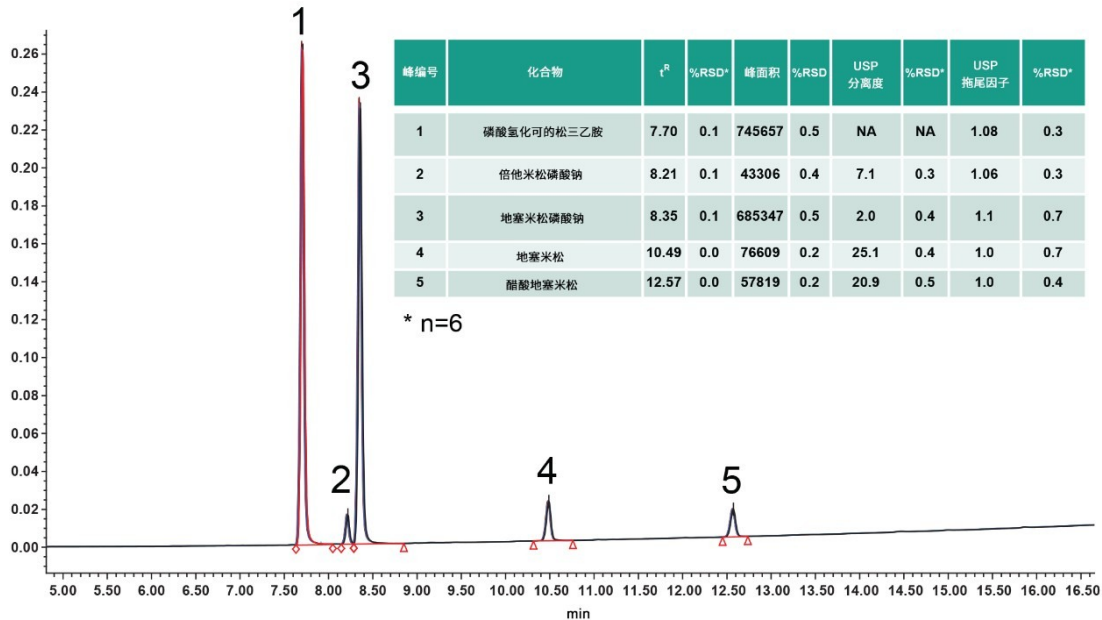


图6.采用最终方法在柱温35 °C和流速0.50 mL·min<sup>-1</sup>的“工作点”条件下进行的6次重复进样。梯度曲线为：在15 min内乙腈10%~90%的线性梯度。溶剂为流动相的初始条件。色谱柱：10 cm × 4.6 mm XSelect Premier BEH C<sub>18</sub>, 2.5  $\mu\text{m}$ ，采用Arc Premier系统。

## 结论

- 与不锈钢硬件相比，使用Arc Premier系统与MaxPeak Premier色谱柱的组合为磷酸化合物分析提供了更出色的色谱性能。
- 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。
- 方法开发过程非常高效，仅需运行12次实验。
- 在分析方法开发中采用AQbD原则有助于获得稳定且可重现的方法。

## 参考资料

1. S.F. Cogan, G.S. Jones, D.V. Hills, J.S. Walter, L.W. Riedy, Comparison of 316LVM and MP35N Alloys as Charge Injection Electrodes, *J. Biomed.Mater.Res.*28(2) (1994) 233–40.
2. T.H.W. M. Lauber, M. DeLano, C. Boissel, M. Gilar, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger, and K. Wyndham Low Adsorption UPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces, Waters Corporation, Milford, MA, USA, 2020.
3. K.E. Collins, C.H. Collins, C.A. Bertran, Stainless-steel Surfaces in LC Systems, Part II: Passivation and Practical Recommendations, *LCGC North America* 18(7) (2000) 688–692.
4. J.C. Heaton, D.V. McCalley, Some Factors that can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic Interaction Chromatography, and Possibilities for their Remediation, *J. Chromatogr.A* 1427 (2016) 37–44.
5. K.T. Myint, T. Uehara, K. Aoshima, Y. Oda, Polar Anionic Metabolome Analysis by Nano-LC-MS with a Metal Chelating Agent, *Anal.Chem.* 81(18) (2009) 7766–7772.
6. D. Winter, J. Seidler, Y. Ziv, Y. Shiloh, W.D. Lehmann, Citrate Boosts the Performance of Phosphopeptide Analysis by UPLC-ESI-MS/MS, *Journal of Proteome Research* 8(1) (2009) 418–424.
7. D. Siegel, H. Permentier, R. Bischoff, Controlling Detrimental Effects of Metal Cations in the Quantification of Energy Metabolites via Ultrahigh Pressure-Liquid Chromatography–Electrospray-Tandem Mass Spectrometry by Employing Acetylacetone as A Volatile Eluent Modifier, *J. Chromatogr.A* 1294 (2013) 87-97.
8. J.A.R. Anspach, S.; Rivera, B. , *LCGC* 36 (2018) 24–29.
9. W.J. Lough, M.J. Mills, J. Maltas, Analyte Adsorption in Liquid Chromatography Valve Injectors for Samples in Non-Eluting Solvents, *J. Chromatogr.A* 726(1-2) (1996) 67–75.
10. P. Hambleton, W.J. Lough, J. Maltas, M.J. Mills, Unusual Analyte Adsorption Effects on Inert LC Components, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 18(16) (1995) 3205–3217.
11. R. Peraman, K. Bhadraya, Y. Padmanabha Reddy, Analytical Quality by Design: a Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics, *International Journal of Analytical Chemistry* 2015 (2015).
12. 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).

13. S. Fekete, I. Molnár, Software-Assisted Method Development in High Performance Liquid Chromatography, World Scientific 2018.
14. T. Tome, N. Štigart, Z. Šasar, A. Obreza, Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances, Organic Process Research and Development 23(9) (2019) 1784–1802.
15. R.S.P. Nikunj Tanna, Lauren Mullin. 使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱改善磷酸类固醇药物定量分析的灵敏度.沃特世应用纪要, 720007095ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/improvements-in-sensitivity-for-quantification-of-steroid-phosphate-drugs-using-acquity-premier-lc-and-maxpeak-hps-columns.html>> , 2021.

---

## 特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

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

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007272ZH, 2021年6月