

使用基于质量源于设计 (QbD) 原则的 LC 方法开发软件提高中药指纹图谱分析方法开发效率

熊亮 张艳海 秦旭阳 金燕 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

方法开发, QbD, 人参, 指纹图谱

摘要

本文使用基于质量源于设计 (QbD) 原则的 LC 方法开发软件 Fusion QbD, 搭配 Thermofisher UltiMate3000 高效液相色谱系统和 CDS 变色龙色谱数据软件进行人参指纹图谱分析方法的开发, 并对比不同种类和来源人参指纹图谱的差异。结果表明使用 Fusion QbD 软件能够显著提高中药分析方法开发效率, 开发出的方法对人参样品分离效果较好。

前言

质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念由美国著名质量管理专家朱兰 (Joseph M. Juran) 博士提出, 并最早被应用于汽车工业, 用于提高汽车产品质量。2004 年 9 月, 美国 FDA 在《21 世纪药品生产质量管理规范——一种基于风险的方法》中正式采用 QbD 理念, 将其扩展至药品的研发、生产和商业应用。而 ICH Q8 指南中明确指出, QbD 理念同样可用于分析方法开发、评估、转移以及验证等方面。2015 年 7 月, FDA 颁布《药品和生物制品分析规程和方法验证指南》, 鼓励在分析方法开发阶段运用 QbD 理念。现如今, 满足 ICH Q8 (R2) 和 ICH Q2 (R2) 指导原则的基于 QbD 的方法开发是制药行业分析研发领域的热点。

中药是一个复杂多组分体系, 所含化学物质复杂。因此中药的质量评价一直是中药研究与应用的重点和难点问题。目前在国际上, 色谱指纹图谱分析被认为是鉴别中药真实性及评价质量一致性和产品稳定性的实际可行的模式。通过中药指纹图谱能有效鉴别样品的真伪或产地, 通过主要特征峰的面积或比例,

能有效确保产品质量的相对稳定。在有效成分不完全明确的前提下, 制定中药材的指纹图谱, 对于控制中药材或中成药的质量有重要意义。

要想获得中药材的指纹图谱, 需要开发高效的色谱分离方法。常规方法开发费时费力, 借助液相方法开发软件, 可以大大提高中药分析方法开发的效率。本文以人参为例, 使用基于 QbD 原则的 LC 方法开发软件 Fusion QbD, 搭配 Thermofisher UltiMate3000 高效液相色谱系统和 CDS 变色龙色谱数据软件进行人参的指纹图谱分析方法开发, 并对比不同种类和来源的人参指纹图谱的差异。

实验方法

1、样品前处理

精密称取研磨后的人参粉末 200mg, 置于 20mL 称量瓶中, 用 10mL 超纯水浸泡过夜后, 在 60°C 下超声 45 分钟并离心处理。取 2ml 的上清液经过已甲醇活化和水平衡后的 SPE 小柱, 先以 5 倍量水洗脱, 去除水洗脱液; 再以 2mL 甲醇洗脱, 收集用甲醇洗脱的液体, 过滤后进样分析。

2、仪器与试剂

2.1 仪器

Thermofisher UltiMate3000 高效液相色谱系统, 配有带在线脱气单元的四元梯度泵; 自动进样器; 带两个 6 位 7 通阀的柱温箱; 紫外检测器以及 Chromeleon 7.2.8 变色龙色谱数据软件。Fusion QbD 自动化液相色谱方法开发软件 (S-Matrix) (版

本: 9.8.1.135)

2.2 试剂

乙腈(色谱级, Fisher公司), 去离子水(18.2MΩ, Millipore纯水机), 磷酸(色谱纯, 上海安谱实验科技有限公司); 不同种类和来源的18种人参药材, 其中鲜人参4种, 生晒参6种, 红参8种。

3、软件

Chromeleon 7.2.8变色龙色谱数据软件用于采集色谱数据;

Fusion QbD 自动化液相色谱方法开发软件 (S-Matrix)用于方法开发;

SIMCA 13.0 P+ software (Umetrics, Umea, Sweden), 用于做PCA和偏最小二乘法判别分析。

工作流程

Fusion QbD是基于质量源于设计(QbD)原理的LC方法开发软件。Fusion QbD与控制U3000高效液相系统的Chromeleon CDS 联动, 利用来自Chromeleon CDS的色谱分析结果, Fusion QbD可管理复杂的统计信息并自动进行方法筛选和优化(图1所示)。



图1 Fusion QbD、Chromeleon CDS色谱数据软件以及U3000高效液相系统

方法开发工作流程的第一阶段, Fusion QbD自动创建实验, 设计实验范围, 并选择最有效的统计学实验设计, 然后软件将实验设计导出至Chromeleon CDS, 自动创建仪器方法开展实验。本实验是在6根不同类型色谱柱和3个不同柱温条件下进行快速筛选。

方法开发工作流程的第二阶段, 从第一阶段确定的色谱柱、柱温和一般梯度条件开始, 对梯度进行优化实验, 以确定最佳的LC方法。

最后, 将确定的最佳实验方法应用于人参指纹图谱的研究, 对比不同种类和来源的18种人参指纹图谱的差异。



图2 方法开发工作流程

实验结果和讨论

1、色谱柱及柱温确定

本实验通过三种结构类型共15种不同极性的人参皂苷(NG-R1, G-Rg1, G-Re, G-Rf, G-Rh1, G-Rb1, G-Rc, G-Rb2, G-Rb3, G-Rd, G-F2, G-Rg3, G-CK, G-Rh2, 以及PPD)来筛选适宜的色谱柱和柱温条件。在6根不同类型的色谱柱和3个不同柱温条件下, 利用Fusion QbD来进行方法开发。Fusion QbD针对每根色谱柱均给出一个最优结果, 色谱图如图3所示。设定峰总数和分离度大于1.5的峰个数作为筛选条件, 最终确定的最佳条件如表1所示, 快速快选的最佳色谱图如图4所示。

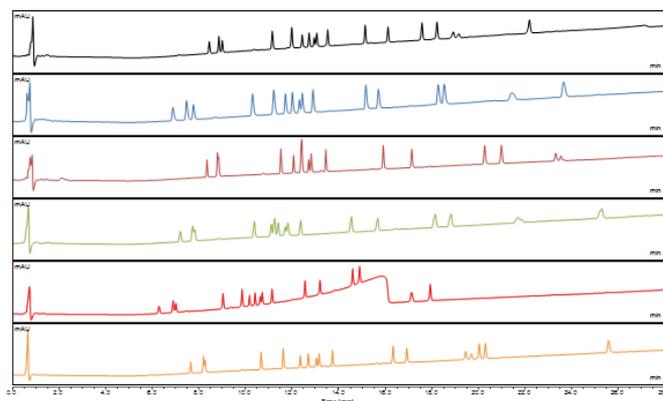


图3 每根色谱柱最佳色谱图

最佳色谱条件	
色谱柱	Accucore Phenyl Hexyl, 150x2.1 mm, 2.6μm
柱温	25°C
流动相	A相为乙腈, B为0.05% (V/V) 磷酸
检测波长	203nm
进样量	5 μL

表1 最佳色谱条件

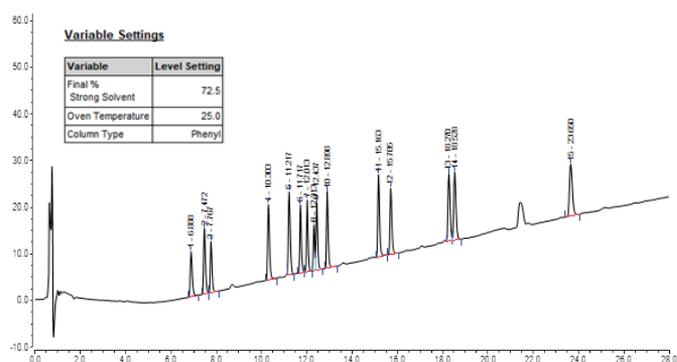


图4 第一阶段快速筛选最佳色谱图

2、梯度优化后结果

从第一阶段确定的色谱柱、柱温和一般梯度条件开始, 对梯度进行优化实验, 以确定最佳的LC方法。最终确定的分析方法为33分钟, 色谱图见图5所示, 具体梯度条件见表2所示, 具体峰结果见表3所示。从峰结果可知, 15种不同极性的人参皂苷分离度均大于1.5, 分离效果较好。应用Fusion QbD来进行方法开发后, 整个过程只需要3天即可获取最终方法, 大大提高了方法开发的效率。

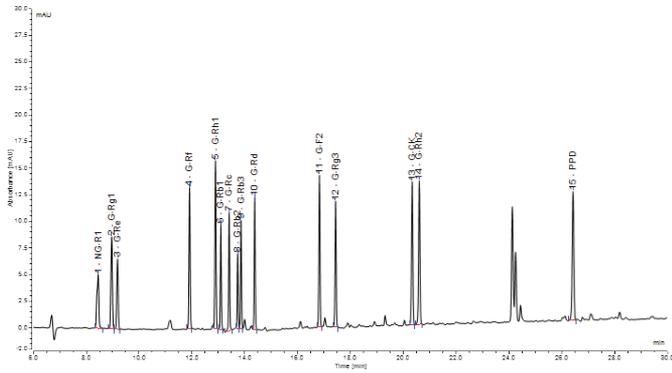


图5 梯度优化后最佳方法色谱图

时间min	A相	B相
0	15	85
2	15	85
28	72	28
29	95	5
32	95	5
32.5	15	85
33	15	85

表2优化后最佳梯度条件

Peak Results			
Peak Name	Ret. Time	Asym. EP	Resol. EP
NG-R1	8.450	0.80	4.06
G-Rg1	8.963	0.92	2.10
G-Re	9.183	0.92	30.20
G-Rf	11.910	1.02	12.41
G-Rh1	12.893	0.98	2.72
G-Rb1	13.093	1.03	4.64
G-Rc	13.410	1.06	4.69
G-Rb2	13.730	1.05	1.86
G-Rb3	13.857	1.05	7.53
G-Rd	14.377	1.00	33.66
G-F2	16.830	0.97	7.89
G-Rg3	17.440	1.02	34.40
G-CK	20.337	0.99	3.00
G-Rh2	20.607	0.95	57.46
PPD	26.427	0.95	4.06

表3 最佳方法峰结果

3、不同种类和来源的18种人参的指纹图谱对比结果

采用指纹图谱方法，结合主成分分析（Principal component analysis, PCA）对红参和人参进行差异表征分析。结果Q2(cum)值为71%，表示PLS-DA模式的预测能力较好。图6的PCA结果显示红参和人参总体上区分明显，其中人参个体差异较大。分别挑选一个红参和人参样品的色谱图进行对比，如图7所示，可以看出，红参相比人参，保留时间在16~32分钟范围内的大部分色谱峰面积归一化含量都明显升高（图7中绿框标出），具体归一化结果见表4所示，说明红参在蒸制过程中，多种人参皂苷发生了结构转化，后续会采用LC-MS对其中进行变化明显的差异成分进行定性。

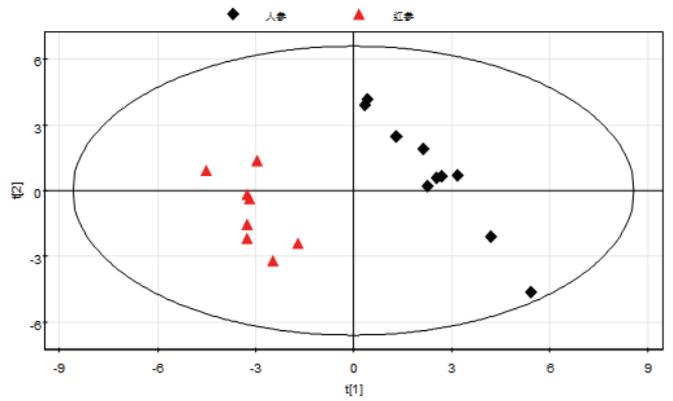


图6 红参和人参的PCA图

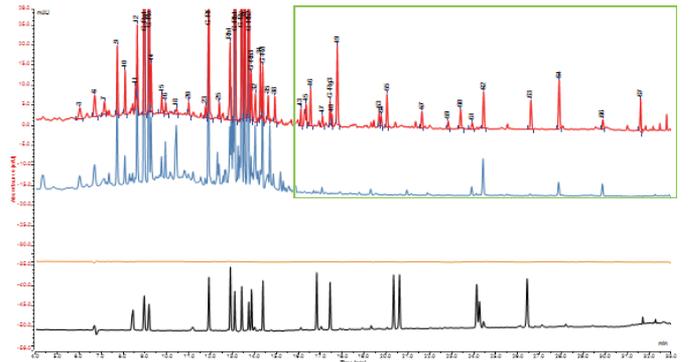


图7 红参、人参、空白及人参皂苷标准品的色谱图对比（红色为红参，蓝色为人参，黄色为空白，黑色为人参皂苷标准品）

峰名称	人参	红参
峰43	0	0.46
峰45	0	0.34
峰46	0	1.03
峰47	0	0.36
峰G-Rg3	0	0.56
峰48	0	0.22
峰49	0	2.41
峰53	0	0.37
峰54	0	0.26
峰55	0	1
峰57	0	0.55
峰59	0	0.26
峰60	0	0.7
峰61	0.38	0.26
峰62	1.55	1.29
峰63	0	1.1
峰64	0.58	1.76
峰65	0.53	0
峰66	0	0.31
峰67	0	0.81

表4 最佳方法峰结果

结论

本文使用基于质量源于设计（QbD）原则的LC方法开发软件 Fusion QbD，搭配ThermoFisher UltiMate3000 高效液相色谱系统和CDS变色龙色谱数据软件，建立了人参指纹图谱的分析方法。整个方法开发过程只需要3天，大大提高了方法开发的效率。开发出的方法对人参样品中组分的分离效果较好，同时发现红参和人参样品有明显差异。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com