

案例研究：调查Arc HPLC系统上USP有机杂质分析方法全球实验室间研究的意外结果

Amanda B. Dlugasch, Tran Pham, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

在全球经济形势下，许多实验室需要在世界各地转换方法。方法转换需要采用协调的方案和策略来控制与方法相关的变量，包括仪器可用性、样品前处理、流动相制备等。但是，无论采用哪种策略，可能都难以控制世界各地实验室的差异性，在考虑到地理、环境和语言差异时尤其如此。如果出现任何异常值或意外结果，充分了解可能影响方法的因素对于调查和解决问题非常重要。本应用纪要介绍了在全世界八个地点实施的USP有机杂质分析方法全球实验室间转换。从原地点获得控制策略和方法性能的关键信息，并应用于研究中。有关控制策略的更深入分析可参见应用纪要“在Arc HPLC上使用基于风险的方法成功实现USP有机杂质分析方法的全球跨实验室转换”¹。制定控制策略后，所有实验室都应在日常运行中满足系统适用性要求；但是，了解方法和系统变量可为调查意外结果及其原因提供指导。

优势

- Arc HPLC系统提供了在系统间可轻松重现的高质量数据性能
- 在系统间转换USP噻硫平杂质分析方法时，采用XBridge C₈色谱柱减小了柱间差异
- Empower 3软件中的可追溯性功能提供了一份记录，表明参与研究的每个实验室均符合相应概述的说明

简介

在全球经济形势下，许多实验室需要在世界各地转换方法。方法转换需要采用协调的方案来控制与方法相关的变量，包括仪器可用性、样品前处理、流动相制备等。但是，无论采用哪种策略，可能都难以控制世界各地实验室的差异性，在考虑到地理、环境和语言差异时尤其如此。如果出现任何异常值或意外结果，充分了解可能影响方法的因素对于调查和解决问题非常重要。

本应用纪要介绍了在全世界八个地点实施的USP有机杂质分析方法全球实验室间转换。从原产地获得控制策略和方法性能的关键信息，并应用于研究中。制定控制策略后，所有实验室都应在日常运行中满足系统适用性要求；但是，了解方法和系统变量可为调查意外结果及其原因提供指导。本应用纪要将深入探讨这些意外结果。

实验

实验方法基于USP富马酸喹硫平杂质专论²，未作任何调整。

样品描述

该方法使用系统适应性参比标准品(RS)和富马酸喹硫平RS。系统适应性溶液由USP喹硫平系统适应性RS (USP部件号:1592715) 制得，包含喹硫平、脱乙氧基喹硫平(1-5%)、相关化合物G和相关化合物B的混合物。用稀释剂(86:14流动相A/流动相B) 制备浓度为1 mg/mL的系统适应性溶液。

利用USP富马酸喹硫平RS在稀释剂中制得浓度为0.001 mg/mL的标准溶液。

原料药购自杭州思诺科生物医药有限公司，已过期。用流动相A制备浓度为1.0 mg/mL的样品。

方法条件

色谱柱：	XBridge C ₈ 3.5 μm, 4.6 × 150 mm (沃特世部件号：186003055)
柱温：	45 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	20 μL
检测：	250 nm

数据采集速率:	10 Hz
流速:	1.5 mL/min
运行时间:	70 min
缓冲液:	3.1 g/L醋酸铵水溶液。向每升溶液中加入2 mL 25%氢氧化铵。pH = NLT 9.2
流动相A:	乙腈:缓冲液(25:75)
流动相B:	乙腈
洗针液:	水:乙腈(50:50)
清除溶剂:	水:乙腈(50:50)
密封件清洗液:	水:乙腈(90:10)

Gradient

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0.0	100.0	0.0
25.0	100.0	0.0
60.0	29.3	70.7
60.1	100.0	0.0
70.0	100.0	0.0

数据管理

Empower 3 色谱数据软件

系统配置

系统: Arc HPLC系统 (配备QSM-R、FTN-R和CHC)

检测： 2998 (PDA)或2489 (TUV)

配置： 被动预加热器（首选）

流通池： 分析型

结果与讨论

本研究

在世界各地实施USP富马酸喹硫平杂质分析²的方法转换。发送实验室位于美国马萨诸塞州米尔福德，七个接收实验室则分别位于马萨诸塞州米尔福德（第二实验室）、土耳其、印度、新加坡、中国、法国和美国北卡罗来纳州（表1）。本研究包括验证系统适应性要求和定量分析原料药。所有分析均采用配备可变波长(TUV) 2489检测器或光电二极管阵列(PDA) 2998 检测器的Arc HPLC系统。每次分析均根据专论中所述的系统适应性要求进行评估，分析原料药并比较杂质分析结果。系统适应性标准基于系统适应性溶液中两对关键化合物的分离度以及标准溶液的拖尾、保留时间%RSD和峰面积%RSD。

实验室	被动预加热器	检测器	流通池 - 10 mm	管路内径/类型 (从色谱柱出口至检测器入口)
1 发送实验室： 美国马萨诸塞州	被动预加热器	2489 TUV	分析型	0.009英寸不锈钢*管路
2 美国马萨诸塞州	被动预加热器	2998 PDA	分析型	0.010英寸PEEK管路
3 土耳其	被动预加热器	2489 TUV	分析型	0.009英寸不锈钢管路
4 印度	被动预加热器	2998 PDA	分析型	0.004英寸PEEK管路（非标）
5 新加坡	无被动预加热器	2489 TUV	分析型	0.009英寸不锈钢管路
6 中国北京	无被动预加热器	2489 TUV	分析型	0.009英寸不锈钢管路
7 法国	无被动预加热器	2489 TUV	分析型	0.009英寸不锈钢管路
8 美国北卡罗来纳州	被动预加热器	2998 PDA	分析型	0.010英寸PEEK管路

表1.各实验室的位置和系统配置

在研究中，设置控制策略以确保方法在世界各地的重现性。例如，将一个化学试剂盒寄送至所有参与实验室，其中包括标准品、色谱柱和样品制剂。（注：并非所有色谱柱都来自同一批次。）编写标准操作程序方案并分发至多家实验室。为保持原始USP方法，仔细描述如何制备流动相（包括流动相过滤），以及如何使用方法中新的或最近打开的化学药品（例如氢氧化铵和乙酸铵）容器。有关这些控制策略及其实施方式的更多信息，请参见应用纪

要“在Arc HPLC上使用基于风险的方法成功实现USP有机杂质分析方法的全球跨实验室转换”²。

在发送实验室对喹硫平杂质分析方法进行基线评估，然后将该方法转换至其余实验室。每个实验室都需要处理数据，以确保满足系统适应性要求，但所有定量数据均在发送实验室使用单一处理方法处理。审查所有数据后，需要进一步考察一些不一致和意外结果。

案例研究1：保留时间差异

问题

利用系统适应性溶液测量两对关键化合物喹硫平(API)与脱乙氧基喹硫平以及相关化合物G与相关化合物B的分离度。本研究八个参与实验室得到的两对关键化合物结果均符合要求，色谱图见图1。分析色谱图发现，所有实验室的结果都具有可重现的保留时间（RSD在1%以内）。然而，实验室7与其他实验室相比，色谱保留时间发生明显偏移。尽管实验室7符合系统适应性要求，但仍然开展调查以确定保留时间偏移的可能原因。

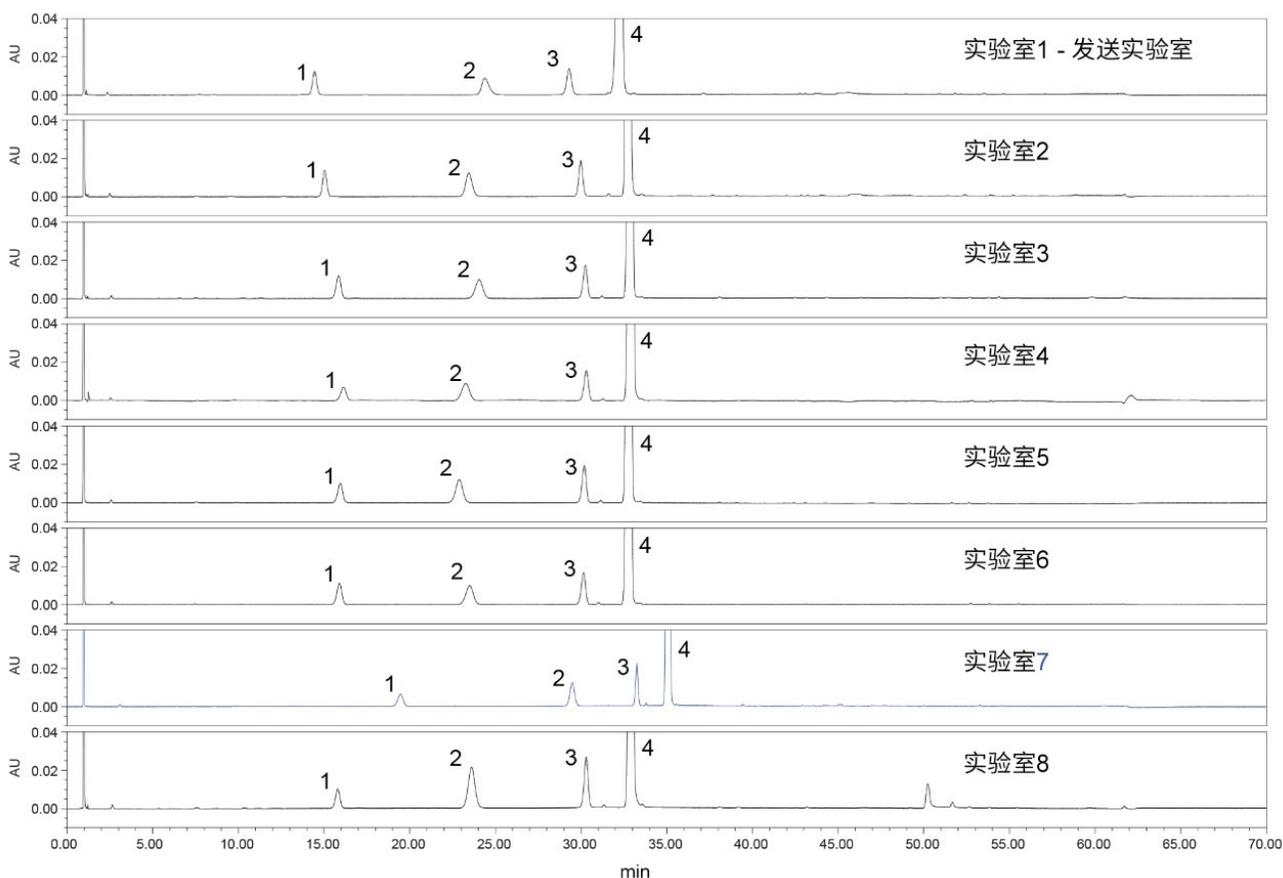


图1.由参与本研究的八个实验室得到的系统适应性溶液分析结果。峰1：相关化合物G；峰2：相关化合物B；峰3：脱乙氧基喹硫平；峰4：喹硫平(API)

调查

- 仪器

绘制所有实验室的喹硫平峰保留时间发现（图2），实验室7的保留时间偏移超过2 min。查找保留时间偏移原因的第一步是查看各系统的系统压力迹线（图3）。如果实验室7的系统压力大于其他实验室，增加的压力可能会影响保留时间。实验室7的系统压力与其他实验室相当，因此引起保留时间偏移的原因并非系统压力。

但是，在调查系统压力时，发现实验室4的Arc HPLC系统反压明显高于所有其他系统和实验室，高出大约20%。通过系统调查发现了系统配置方面的相关性。所有其他实验室均使用0.009英寸或0.010英寸的标准配置管路连接色谱柱出口与检测器，而实验室4的系统在色谱柱出口与检测器之间则配置内径为0.004英寸的非标准管路（见表1）。管路内径较小会导致分离度下降和反压升高。因此，系统压力与峰的保留时间之间无相关性。但是，从整个应用纪要中可以看出，所有系统适应性要求均相当。

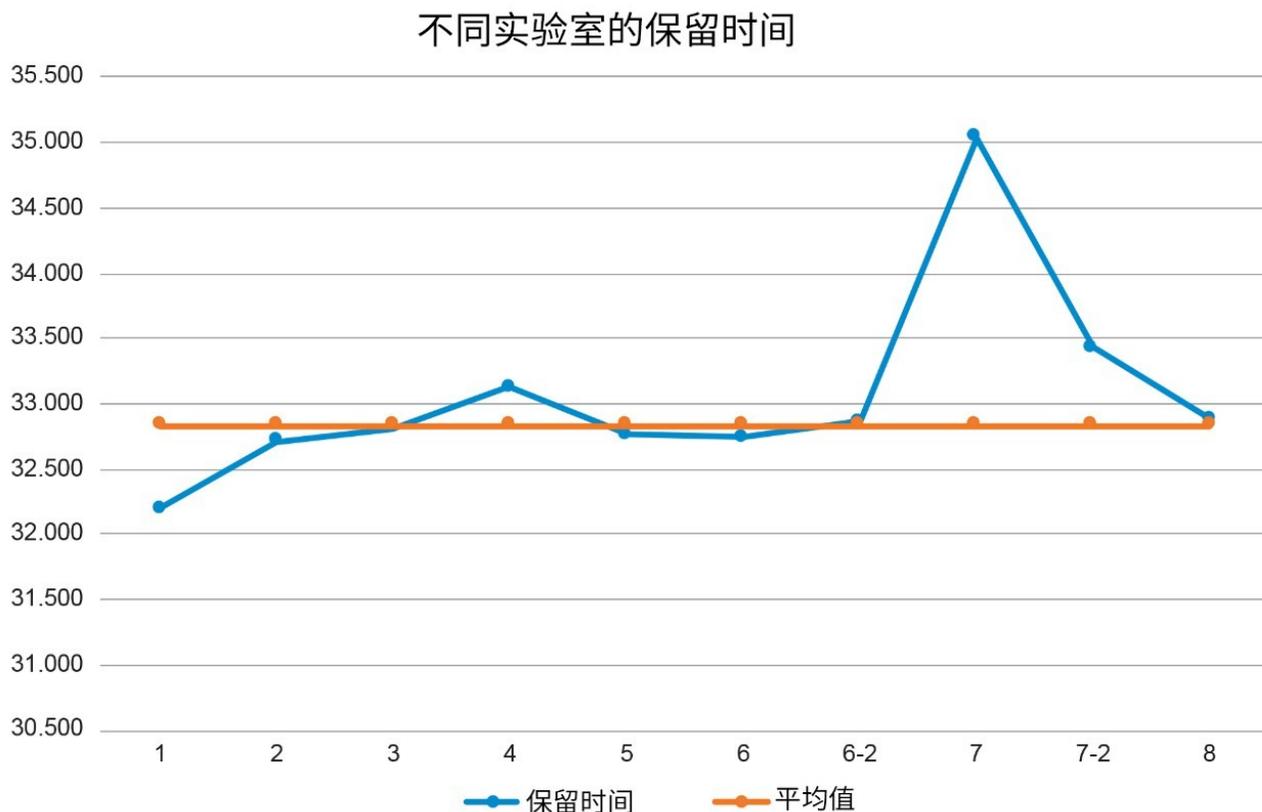


图2.所有八个参与实验室的标准溶液中喹硫平峰保留时间。实验室7的初始保留时间相比其余实验室偏移2 min以上。

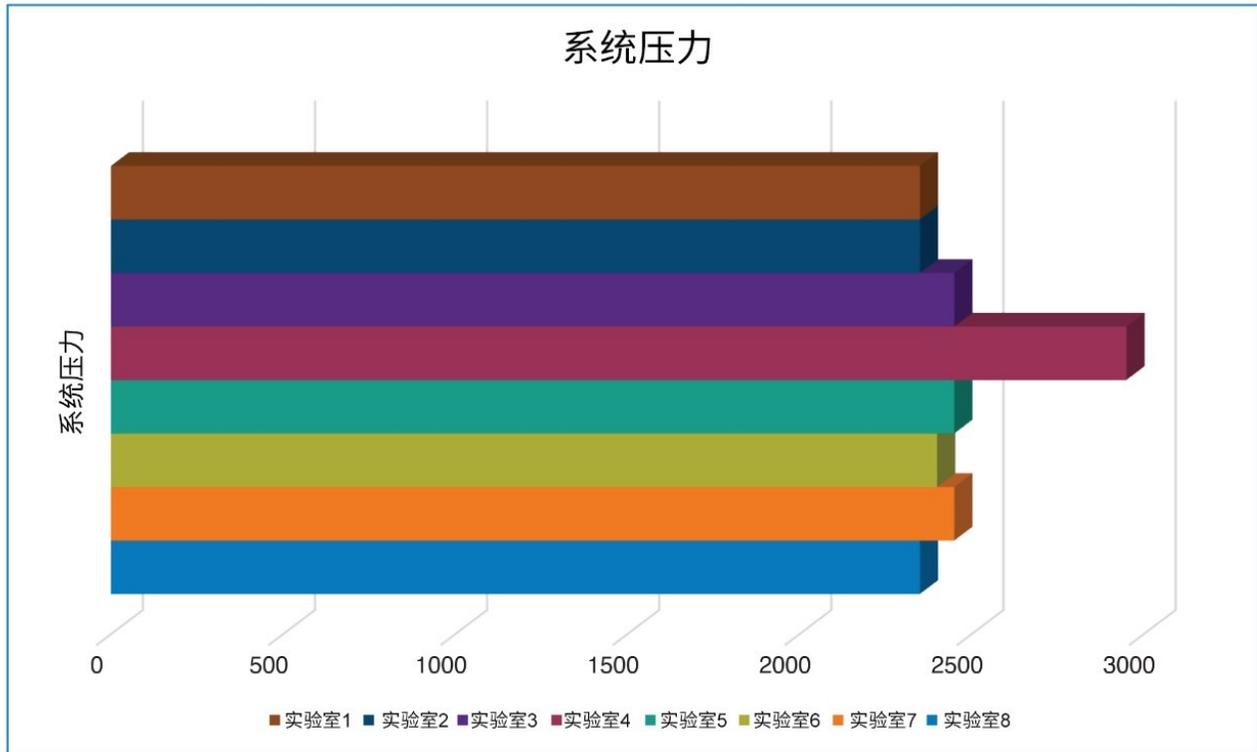


图3.所有八个参与实验室的Arc HPLC系统压力

- 程序/流动相制备

在保留时间偏移的可能原因中排除系统压力后，需要更多信息来确定根本原因；因此，实验室7重复该分析（图4）。在第二次分析中，峰的保留时间更接近其他实验室，如图2中实验室7-2的结果所示，表明流动相是引起保留时间偏移的潜在原因。此外，发现实验室7未采用经校准的pH计；因此，缓冲液的确切pH是未知的。在第一次分析时，实验室7按照SOP的说明加入4 mL氢氧化铵，但在第二次分析时，该实验室向缓冲液中加入了5 mL氢氧化铵，因为分析人员认为pH未达到所需水平(pH 9.2)。因此，缓冲液的pH可能是导致保留时间偏移的原因之一。根据本文未展示的一项之前的研究，另一个潜在原因可能是流动相A的有机相与缓冲液比例。与反相方法的预期一样，乙腈含量的任何相对增加都会导致峰偏移至较早的洗脱时间，而乙腈含量的相对减少则会导致峰偏移至较晚的保留时间。

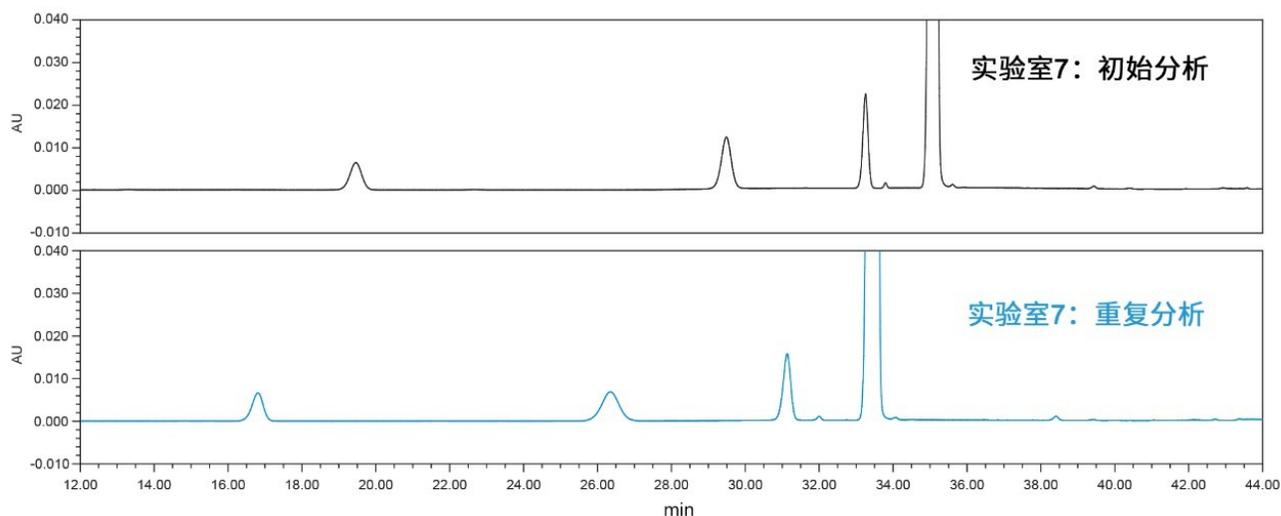


图4.实验室7初始分析（顶部）和实验室7重复分析（底部，保留时间向右偏移）的系统适应性溶液结果

为确定pH是否影响保留时间，发送实验室开展了一项测试，以确定pH对峰保留时间的影响。在发送实验室常规运行该方法的过程中，加入所需的4 mL氢氧化铵后，缓冲液的pH为9.2。发送实验室向缓冲液中加入了5 mL氢氧化铵，实测pH为9.4。制备一份pH为9.8的额外缓冲液，其中需要再添加大约4 mL氢氧化铵。制得各种pH不同的缓冲液后，按照专论中所述的方法制备流动相A，然后分析评估pH 9.2、pH 9.4和pH 9.8对保留时间的影响。在不同pH下运行系统适应性溶液的色谱图见图5。从图5可以看出，pH的确会影响峰的保留时间，但不像实验室7中最初观察到的保留时间偏移那样显著。基于这些信息以及之前对流动相A有机相组成的研究，推测有机相与缓冲液的比例最有可能是导致保留时间偏移的原因。

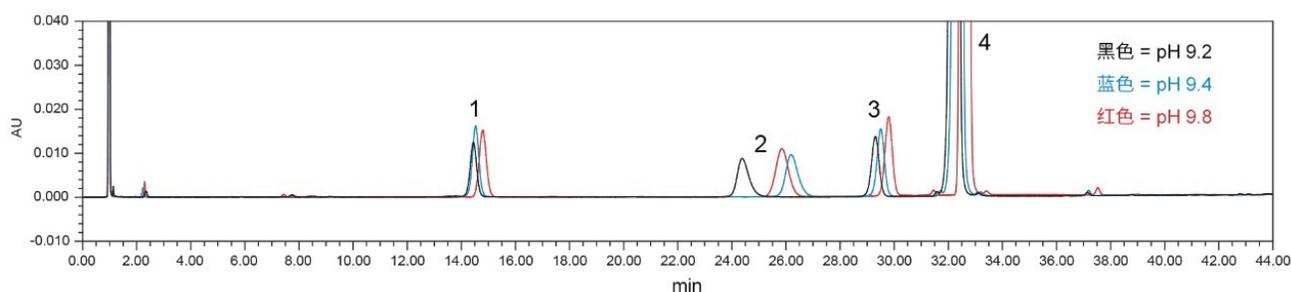


图5.评估流动相pH对系统适应性溶液结果的影响：缓冲液pH 9.2（黑色）、pH 9.4（蓝色）和pH 9.8（红色）。峰1：相关化合物G；峰2：相关化合物B；峰3：脱乙氧基喹硫平；峰4：喹硫平(API)。

■ 解决方案

为减少流动相制备的差异性，必须在喹硫平杂质分析方法的指定仪器中精准测量流动相溶液。虽然无法完全消除分析人员之间的差异性，但可以通过指定流动相制备仪器的确切尺寸和等级来减少一些差异性。尽可能减小溶液间制备的差异性，可提供更出色的重现性。

案例研究2：峰面积%RSD差异

问题

利用标准溶液测量拖尾因子、保留时间%RSD和峰面积%RSD的系统适应性要求。如标题为“在Arc HPLC上使用基于风险的方法成功实现USP有机杂质分析方法的全球跨实验室转换”的应用纪要所述¹，系统适应性评估结果（表2）完全符合系统适应性要求。然而，在审查结果时，有三个数据点似乎为异常值，具体是在实验室2、实验室4和实验室8中观察到更高的峰面积RSD百分比。尽管这些值符合要求，但仍开展调查以更好地了解根本原因。

实验室地点	拖尾因子	保留时间%RSD	峰面积%RSD
1 - 发送实验室	0.91	0.04	0.99
2	1.01	0.01	2.34
3	0.91	0.03	0.24
4	0.88	0.03	1.99
5	0.91	0.02	0.70
6-2	0.92	0.02	0.46
7-2	0.89	0.03	0.26
8	0.92	0.02	1.17
USP标准	NMT 2.0	NMT 5.0%	NMT 5.0%

表2.所有八个实验室中标准溶液的系统适应性评估结果

调查

根据各实验室的系统配置信息，观察到%RSD较高的三个实验室使用的是PDA检测器。将这三个采用PDA检测器得到的色谱图与TUV检测器结果进行比较，发现PDA数据中的干扰多于TUV数据（图6）。鉴于TUV检测器相比PDA灵敏度更高、线性范围更宽，因此TUV得到的基线噪音更低更均匀，这样的结果并不意外。PDA的基线噪音更高，因此导致1 µg/mL标准溶液的峰面积差异性较大。

为验证该假设，利用同一Arc HPLC系统装配两种单独的检测器，测试喹硫平杂质分析方法。先在Arc HPLC系统上使用TUV (2489)检测器执行分析，再将检测器替换为PDA (2998)。比较结果发现（图7），在同一Arc HPLC系统上，PDA检测器的噪音大于TUV检测器。此外，结果（表3）表明峰面积%RSD存在显著差异，而拖尾因子和保留时间%RSD等其他结果相当。数据表明，基线噪音差异由检测器引起，与样品、流动相或系统差异性无关。虽然TUV在本次分析中表现更出色，但两种检测器均符合系统适应性要求规范。

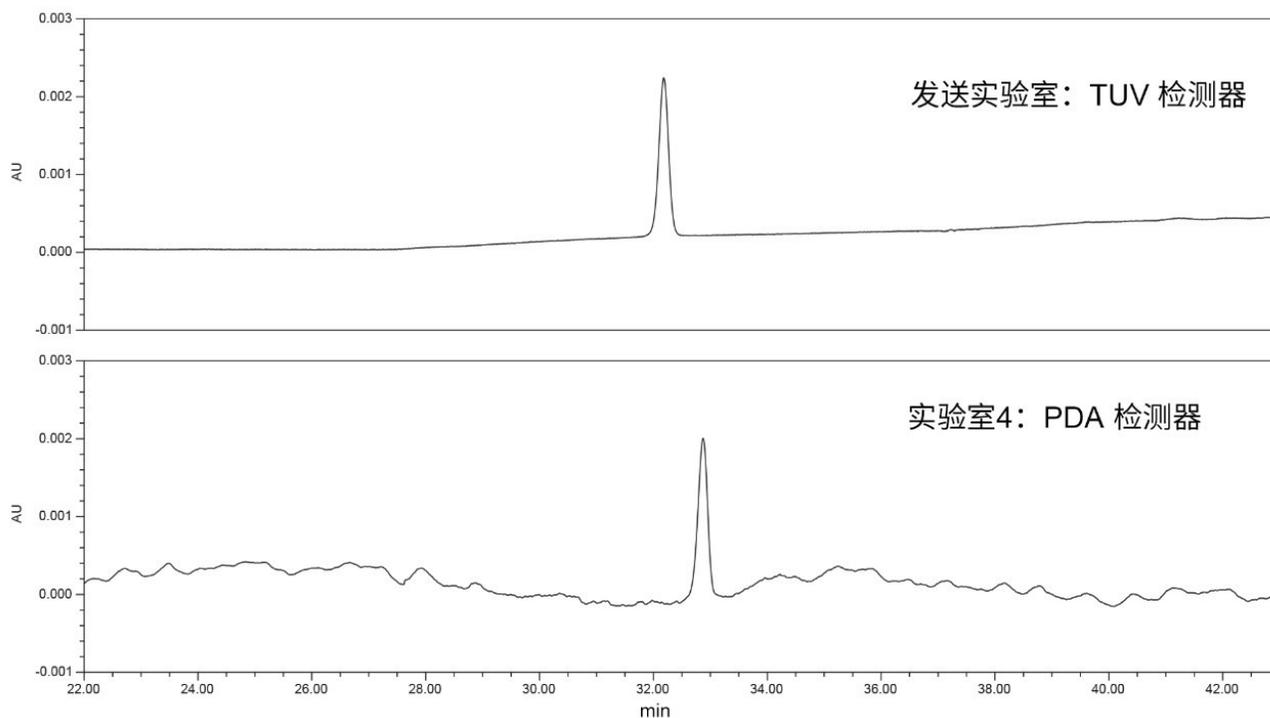


图6.实验室1（发送实验室）利用TUV检测器（上图）以及实验室4利用PDA检测器（下图）得到的标准溶液色谱图

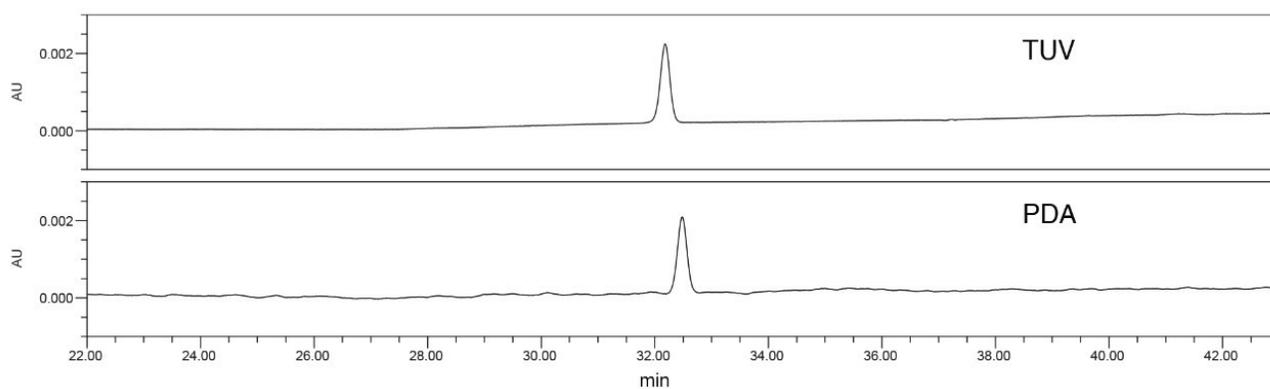


图7.实验室1（发送实验室）利用配备TUV检测器的Arc HPLC（上图）以及配备PDA检测器的同一Arc HPLC系统（下图）得到的标准溶液色谱图

	拖尾因子	保留时间%RSD	峰面积%RSD
发送实验室TUV	0.91	0.04	0.99
发送实验室PDA	1.0	0.03	1.85
USP标准	NMT 2.0	NMT 5.0%	NMT 5.0%

表3.同一Arc HPLC系统上TUV检测器和PDA检测器的标准溶液分析结果

解决方案

在未来的研究中，同时利用TUV和PDA检测浓度较低的样品不失为一种可能的解决方案或方法，以确保两种检测器均满足灵敏度或精密度要求。在本例的正常故障排除实验中，较大的峰面积%RSD通常归因于进样器或其他组件，但通过首先调查系统配置，观察到一个趋势。该示例显示了如何保证对整个系统的调查，无论色谱结果如何。结果还表明，如果不要求使用专属检测器，需要同时采用PDA和TUV评估方法。由此确保（如本例中一样）两种检测器均都可满足方法的系统适应性要求。

案例研究3：定量结果差异

问题

定量分析样品溶液或原料药中的脱乙氧基喹硫平杂质和未知杂质。除实验室1外，所有实验室的定量结果均相当（表4）。在本例中，审查数据后发现，实验室6中两种杂质（脱乙氧基喹硫平和一种未知杂质）的百分比含量明显更低。由于这些结果，我们仔细查看数据以确定杂质值较低的原因。

实验室地点	脱乙氧基喹硫平 (%)	未知杂质 (%)	总杂质 (%)
1 - 发送实验室	0.11	0.08	0.19
2	0.12	0.09	0.21
3	0.10	0.07	0.17
4	0.10	0.07	0.17
5	0.10	0.07	0.17
6	0.06	0.04	0.10
6-2	0.10	0.07	0.17
7-2	0.09	0.06	0.15
8	0.10	0.07	0.17
接受判据	NMT 0.15	NMT 0.10	NMT 0.50

表4.所有八个参与实验室的样品溶液中脱乙氧基喹硫平和未知杂质峰定量结果

调查

第一步是比较所有实验室的标准品色谱图（图8），并比较每个实验室的标准品峰面积（图9）。调查标准品色谱图的原因在于，样品杂质含量是相对于标准溶液的标准品峰面积百分比计算得出的。观察到实验室6的标准品峰面积大于所有其他实验室。为确定峰面积更大的原因，调查了标准品制备方法。首先，通过审查发送实验室与接收实验室之间的文件，确认标准品浓度在SOP中所述的0.2%以内。在未明确根本原因的情况下，要求实验室重复分析并重新制备标准溶液和样品溶液。第二次分析的标准溶液获得了与其他实验室相当的峰面积，如图9中实验室6-2所示。此外，当使用重新制备的标准溶液和样品溶液数据时，计算得出的杂质百分比与其他实验室获得的值相当（表4）。因此，目前所有系统计算的杂质百分比相当。将标准品制备确定为可能的原因。

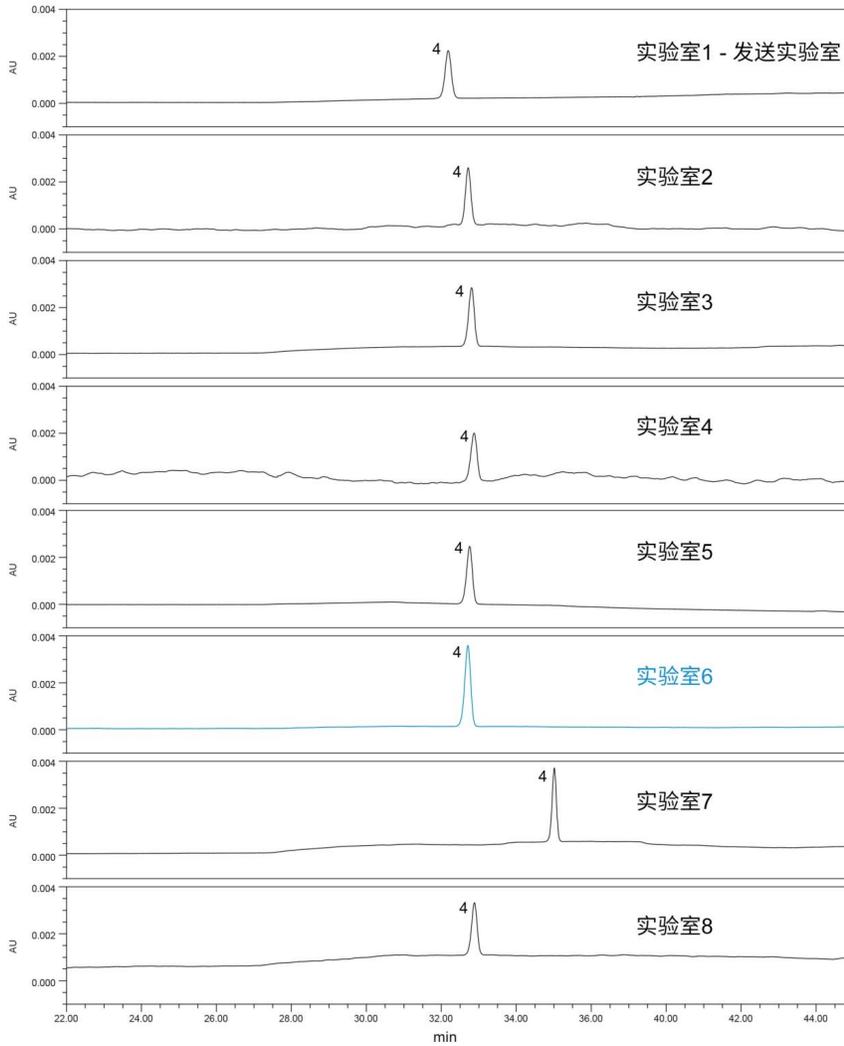


图8.由参与本研究的八个实验室得到的标准溶液结果。峰4：喹硫平(API)。

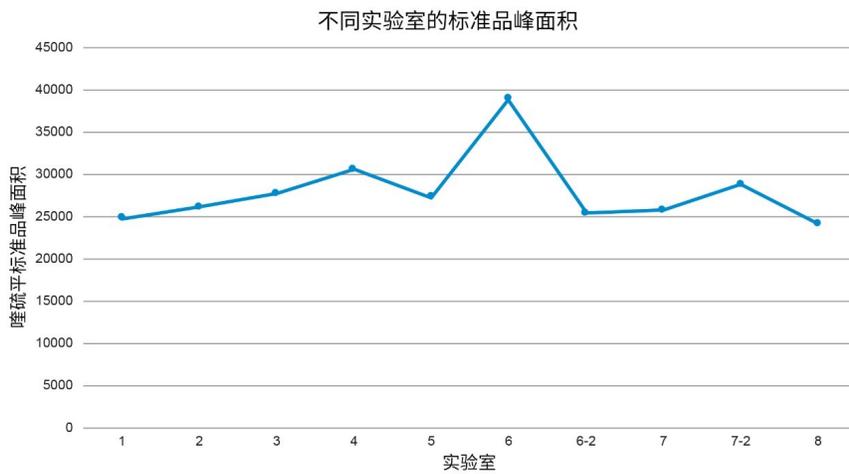


图9.所有八个实验室的标准溶液中喹硫平(API)峰面积

解决方案

针对该错误的解决方案是改变标准储备液制备SOP，尽可能减小本研究中观察到的差异性。原始SOP使用单毫克级重量，这些低重量增加了样品前处理差异性影响定量结果的可能性。增加储备液制备的重量，可减小分析人员之间以及实验室之间的差异性。

结论

富马酸喹硫平的USP杂质分析方法在Arc HPLC系统成功实现全球转换，并且满足所有系统适应性要求。虽然在不同实验室地点观察到的结果存在差异，但调查表明各个异常值的原因各不相同。一些变异归因于样品前处理，而另一些则归因于仪器配置差异。但是，充分了解系统配置和方法对结果的影响，使发送实验室能够采用系统化方法来调查任何异常值。本研究所述的一般步骤包括：

1. 确定异常结果及其对结果的潜在影响
2. 审查系统配置，包括检测器和管路内径
3. 审查分析人员之间的样品和流动相制备程序

本方法也可用于调查任何不合格结果。本研究表明，了解方法的风险并实施控制策略可实现成功的方法转换。

参考资料

1. Dlugasch A, Hong P, Tran P. 在Arc HPLC上使用基于风险的方法成功实现USP有机杂质分析方法的全球跨实验室转换. 沃特世应用纪要, [720007285ZH](#), 2021.
2. USP, Quetiapine Fumarate. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF38) 2020*, (GUID-DBEED03E-7C75-4167-BD21-4E30BA2EFF2B_2_en-US), 3800.

特色产品

- [Arc HPLC系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659)
- [2998光电二极管阵列\(PDA\)检测器 <https://www.waters.com/1001362>](https://www.waters.com/1001362)

- [2489紫外可见光\(UV/Vis\)检测器 <https://www.waters.com/515198>](https://www.waters.com/515198)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007376ZH, 2021年9月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.