

Technical Report

基于分析质量源于设计 (AQbD) 研究提高稳健分析方法的开发效率

Efficient development of robust method based on Analytical Quality by Design

藤崎 真一¹、渡边 觉¹、川濑 智裕¹、藤田 雄一郎¹、松本 惠子¹

摘要：

本文通过研究低分子药品化合物的同步分析条件，介绍了如何运用搭载了分析方法开发支持软件 LabSolutions™ MD 的分析质量源于设计（以下简称“AQbD”）提高稳健分析方法的开发效率。基于 AQbD 的分析方法开发由分析方法的初筛（Screening）、优化（Optimization）和稳健性评价（Validation）等阶段组成。对于以上各个阶段，使用实验设计法进行分析，对分析结果构建设计空间，并在确定最佳分析条件后适用稳健性评价，便能够用 LabSolutions MD 完成一系列分析方法开发的工作流程。

关键词：LabSolutions MD、AQbD、分析方法开发、方法开发、方法搜索、实验设计法

背景

国际人用药注册技术协调会（ICH）就 ICH-Q14 中基于 AQbD 的分析方法开发举措进行了讨论。在基于 AQbD 的分析方法开发中，根据实验设计法等高效实验获得的数据，建议将分析结果参数的有效区域作为设计空间进行可视化。通过基于科学依据和风险的方法，研究不依赖于经验和直觉的综合分析方法，借此开发稳健且低风险的分析方法。

LabSolutions MD 概要

LabSolutions MD 为提高基于 AQbD 的一系列分析方法开发工作流程效率提供支持（图 1）。本软件由对流动相和色谱柱等各种参数进行设置、使用实验设计法进行分析的分析功能（图 2），以及针对所得数据绘制设计空间和预测色谱图的解析功能（图 3）组成。关于分析功能，可通过选择要使用的流动相和色谱柱，自动在切换的同时进行分析。此外，通过对使用了实验设计法的分析次数进行优化，能够进一步提高分析方法开发的效率。只需图 2 中①~⑥的 6 个步骤，即可快速创建使用以上实验设计法的分析计划表。

时的色谱图。此外，还能够通过解析方差分析来判断各种参数对分析结果的影响程度。本文将通过“初筛”、“优化”、“稳健性评价”等各个阶段，介绍将 LabSolutions MD 用于研究低分子药品化合物的同步分析条件的示例。

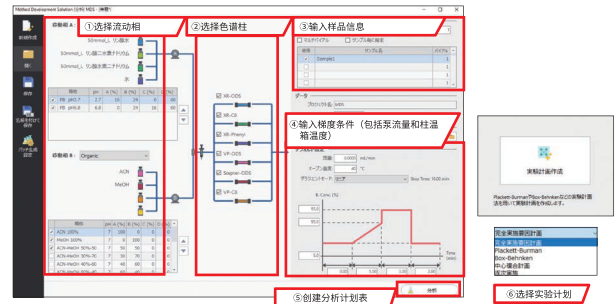


图 2 分析画面

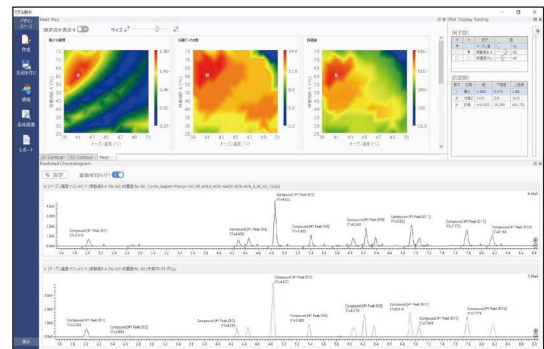


图 3 解析画面

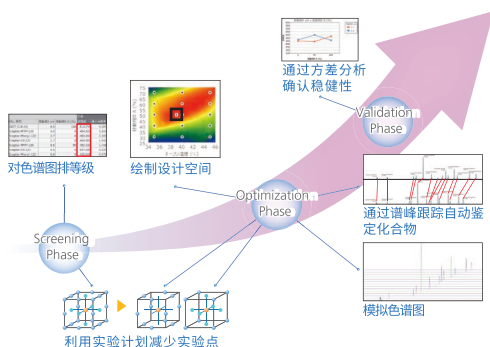


图 1 通过 LabSolutions MD 提高分析方法的开发效率

只需单击一下即可选择要使用的流动相和色谱柱，并自动生成充分考虑色谱柱平衡的综合计划表，此举不仅能够提高作业效率，还能够减少错误。关于解析功能，LabSolutions MD 支持通过谱峰跟踪功能自动鉴定目标化合物，通过设计空间可视化各种参数变化对分析结果造成的影响，并支持模拟使用任意参数分析

分析

3-1. 分析成分

作为同步分析条件研究目标的药品成分和物理性质值如表 1 所示。假设在存在多种分析物条件下开发分析方法，采用具有不同 log P 和 pKa 的各种药品混合品作为模型案例 (model case)。

表 1 成分

No.	Compounds	log P	pKa
1	Probenecid	3.21	3.4
2	(S)-(+)-Naproxen	3.18	4.15
3	Acetylsalicylic acid	1.19	3.49
4	Diclofenac sodium	4.51	4.15
5	Papaverine hydrochloride	3	6.4
6	Dibucaine hydrochloride	4.4	8.85
7	Amitriptyline hydrochloride	4.92	9.4
8	Indometacin	4.27	4.5
9	Antipyrine	0.38	1.4
10	Lidocain	2.44	8.01
11	Quinidine	3.44	8.56
12	Metoclopramide	2.62	9.27

3-2. 分析方法的初筛

在初筛中，就会对保留和分离造成较大影响的参数——即两种水性流动相、3 种有机流动相和 6 种色谱柱的共 36 个点 (全因子实验设计) 进行分析，并实施了流动相和色谱柱的筛选 (分析条件: 表 2)。为使水相流动相的 pH 变为酸性或中性，使用流动相混合功能进行了自动配制。此外，有机流动相的混合也使用相同功能进行了自动配制。由于分析过程中会自动切换流动相和色谱柱，因此与手动变更条件进行分析的情况相比，能够让流动相的配制 / 置换、色谱柱的更换等多项作业实现自动化。

表 2 流动相和色谱柱的初筛条件

Mobile phase:	
Pump A	Buffer ¹
A1	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.7)
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent ²
B1	Acetonitrile
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50
B3	Methanol
Column:	
1	Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*3}
2	Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*4}
3	Shim-pack Scepter C4-300 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*5}
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*6}
5	Shim-pack Scepter PFPP-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ^{*7}
6	Shim-pack GIST C18 AQ HQ (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.0 μm) ^{*8}
Analytical conditions:	
Time program	: B. Conc. 5%(0 min) → 80%(8.01-11 min) → 5%(11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μL
Temperature	: 40 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

*1 水性流动相按照以下组成，通过混合流动相自动制备。

Solvent	A1 ratio	A2 ratio
A 50 mmol/L Phosphoric acid water	16%	0%
B 50 mmol/L Sodium dihydrogen phosphate water	24%	24%
C 50 mmol/L Disodium phosphate water	0%	16%
D Water	60%	60%

*2 有机流动相按照以下组成，通过混合流动相自动制备。

Solvent	B1 ratio	B2 ratio	B3 ratio
A Acetonitrile	100%	50%	0%
B Methanol	0%	50%	100%

*3 P/N 227-31013-03
*4 P/N 227-31034-03
*5 P/N 227-31176-03

*6 P/N 227-31064-03
*7 P/N 227-31054-03
*8 P/N 227-30808-02

3-3. 初筛的色谱图

制得的色谱图示例之一 * (Shim-pack Scepter Phenyl-120) 如图 4 所示。奎尼丁和乙酰水杨酸中含有杂质，最多洗脱出 14 个峰。可以证实通过改变水相流动相的 pH、有机流动相组成和色谱柱，保留和分离会发生显著变化。

* 通过其他色谱柱制得的色谱图另行刊登在 Application News (01-00018-JP) 上。

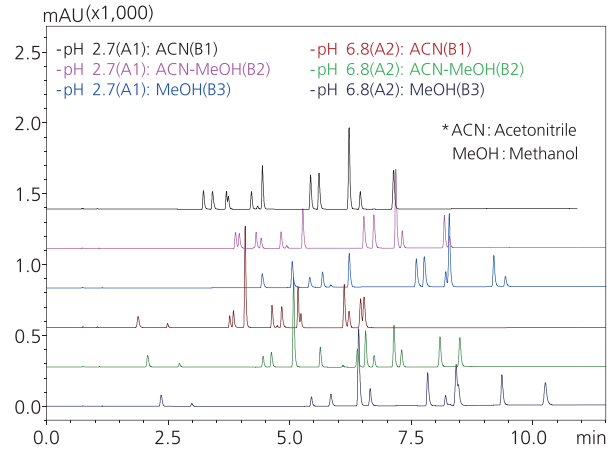


图 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 的色谱图

3-4. 从海量数据中快速确定最优条件

在初筛中可获得研究条件数量的色谱图，因此有必要评价在哪些条件下能够获得所需的分离。目视确认所有色谱图需要耗费大量时间。由于 LabSolutions MD 能够使用以下公式 1 来定量评价各条件下的分离状态并进行排序，因此能够快速轻松地找出最佳条件。

$$(\text{评价値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_P) \dots \dots (\text{公式 1})$$

通过检出的峰数 (P) 与分离度 (Rs: 上限值 3.0) 总和的乘积来计算评价价值。在初筛中获得的评价价值降序显示结果如图 5 所示。确认了在水性流动相使用 pH 6.8、有机流动相使用乙腈 / 甲醇 = 50 : 50、色谱柱使用 Shim-pack Scepter Phenyl-120 时可获得最高评价价值 (图 4: 绿色色谱图)。

カラム 略称	移動相 A pH	移動相 B A (%)	評価値	最小分離度
Scepter-Phenyl-120	6.8	50	546.000	3.224
Scepter-C8-120	6.8	0	469.894	0.093
GIST-C18-AQ	2.7	0	465.124	1.075
GIST-C18-AQ	6.8	50	443.580	1.826
Scepter-C8-120	6.8	50	436.241	0.026
Scepter-Phenyl-120	2.7	50	419.659	1.743
Scepter-C18	2.7	0	419.338	1.518
Scepter-C18	6.8	50	396.000	4.326
Scepter-C4-300	2.7	0	394.239	0.402
Scepter-C18	6.8	100	384.553	2.046

图 5 根据各条件的评价价值进行排序 (按评价价值降序显示)

3-5. 通过方差分析确定对分离影响较大的参数

LabSolutions MD 能够通过使用方差分析来解析各种参数对分离的影响大小。因此，基于方差分析的结果，能够缩小要优化的目标参数的研究范围，有助于进一步提高分析方法的开发效率。针对各种参数的方差分析结果如图 6 所示，根据红框内的因素“流动相 A pH x 流动相 B”和“色谱柱”，可知 p 值均 ≤ 0.05 。由于可以通过各水平的平均值来判断各水平之间是否具有显著性差异，因此可以将 p 值 ≤ 0.05 的因素判断为各水平之间具有不同的分离（对分离的影响较大）。

要因/効果因	要因	平方和	自由度	平均平方	F 値	p 値
<input checked="" type="checkbox"/>	移動相 A pH x 移動相 B (%)	44817.9	2	22408.9	6.72	0.0141
<input checked="" type="checkbox"/>	カラム 略称	66312.0	5	13262.4	3.98	0.0302
<input checked="" type="checkbox"/>	カラム 略称 x 移動相 A pH	35853.2	5	7170.6	2.15	0.142
<input checked="" type="checkbox"/>	カラム 略称 x 移動相 B (%)	50149.0	10	5014.9	1.50	0.265
<input checked="" type="checkbox"/>	移動相 B B (%)	9123.7	2	4561.9	1.37	0.298
<input checked="" type="checkbox"/>	移動相 A pH	3243.6	1	3243.6	0.973	0.347
	誤差	33336.5	10	3333.7		
	合計	242835.8	35			

图 6 各种参数对分离造成影响的分析结果（方差分析）

3-6. 初筛结果

通过初筛获得的评价最高的条件如表 3 所示。确认了在水相流动相使用 pH 6.8、有机流动相使用乙腈 / 甲醇 = 50 : 50、色谱柱使用 Shim-pack Scepter Phenyl-120 时具有最佳的分离。因此，在 3.7 的优化阶段中，我们将基于以上条件，对泵的梯度条件、柱温箱温度等进行进一步的研究，建立稳健性最高的分析方法。

表 3 评价最高的条件

Mobile phase:	
Pump A	Buffer
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50
Column:	
4	Shim-pack™ Scepter Phenyl-120
Analytical conditions:	
Time program	: B.Conc. 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μ L
Temperature	: 40 $^{\circ}$ C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-7. 分析方法的优化

对于在初筛中选择的水性流动相的 pH 和色谱柱，将有机流动相组成设置为 5 个点（30%、40%、50%、60%、70%），将柱温箱温度设置为 3 个点（35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C），并将梯度终浓度设置为 3 个点（75%、80%、85%），然后实施分析方法的优化。此外，纵轴取有机流动相组成、横轴取柱温箱温度，并将以上参数的变化对最小分离度的影响作为设计空间，如图 7 所示。

通过构建设计空间，能够在整个分布区域内将各种参数变化对最小分离度的影响进行可视化。此外，LabSolutions MD 能够在各种参数的整个分布区域内给出最稳健的条件（图 7 黑框内的点），因此无需依赖直觉和经验即可构建稳健的分析方法。根据优化结果，可知具有良好分离度和高稳健性的条件如下：有机溶剂的混合比例为 50%、柱温箱温度为 39 $^{\circ}$ C、梯度最高浓度为 80%。因此，通过单击设计空间内的任意点（图 7 内的点 A），还可直观地预测各种参数发生变化时的色谱图变化（图 8），并可将其用于确认在分析前任意更改条件时的分离行为等。

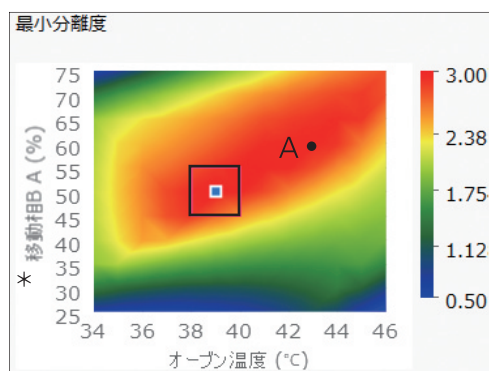


图 7 最小分离度的分布（梯度最高浓度为 80% 时）
*“流动相 B A”：乙腈

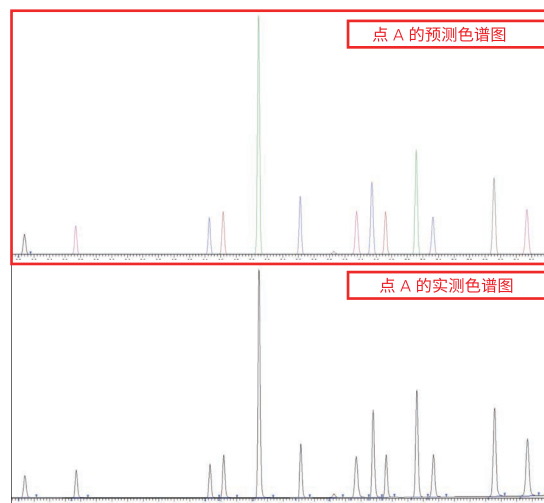


图 8 点 A（图 7）的预测色谱图和实测色谱图

3-8. 通过谱峰跟踪自动鉴定化合物

改变有机流动相组成和柱温箱温度等各种参数后，化合物的保留时间也会发生变化，这使得每次分析的鉴定都非常耗时。对于化合物保留时间的变化，LabSolutions MD 能够通过使用光谱的相似度和面积值等任一指标来自动进行鉴定（谱峰跟踪）（图 9）。在峰的洗脱位置因各种参数的变化而发生改变时，也会迅速地自动识别所有数据的峰，因此能够大幅减少鉴定时间。

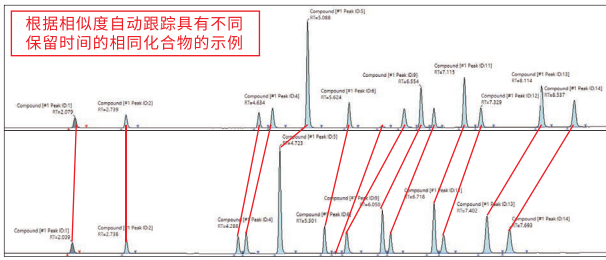


图9 通过谱峰跟踪功能自动鉴定化合物

3-9. 优化结果

通过优化确定的条件如表4所示。通过设计空间，可确认当有机流动相为乙腈/甲醇 = 50:50、柱温箱温度为39°C、梯度终浓度为80%时，具有良好的分离度和高稳健性。在3.10的稳健性评价阶段，针对该条件，通过确认在小范围内变化各种参数时对分离的影响来评价分析方法的稳健性。

表4 通过优化确定的条件

Mobile phase:	
Pump A	Buffer
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50
Column:	
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁶
Analytical conditions:	
Time program	: B.Conc. 5%(0 min) → 80%(8.01-11 min) → 5%(11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μL
Temperature	: 39 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-10. 分析方法的稳健性评价

在各种参数发生变化时，稳健性评价对理解该变化对测定值造成的影响、确保分析方法的可靠性而言十分重要。LabSolutions MD 通过采用序贯实验设计，对于通过优化确定的条件，能够自动生成在小范围内改变各种参数时的分析批处理表，并评价其对分离造成的影响。具体而言，通过以1%为单位改变有机流动相组成(49%、50%、51%)、以1%为单位改变柱温箱温度(38°C、39°C、40°C) (图10中的白圈)，确认了各种参数变化对保留时间和分离度的影响。稳健性评价中制得的色谱图如图11所示。对于通过优化确定的条件，能够确认在改变各种参数时，分离度和保留时间的变化极小，表明根据设计空间推导的分析方法具有高稳健性。因此，通过使用高稳健性的分析方法，有助于提高典型分析性能参数—准确度及精密度的评价等分析方法验证的效率。

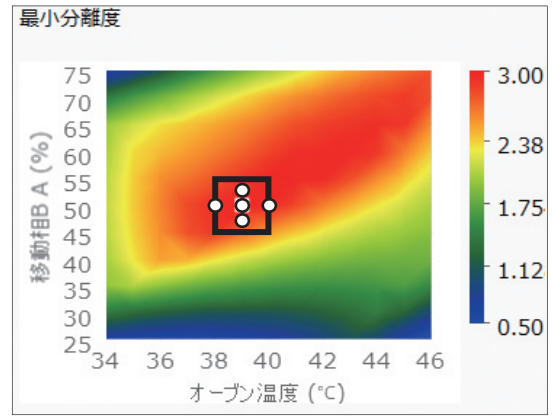
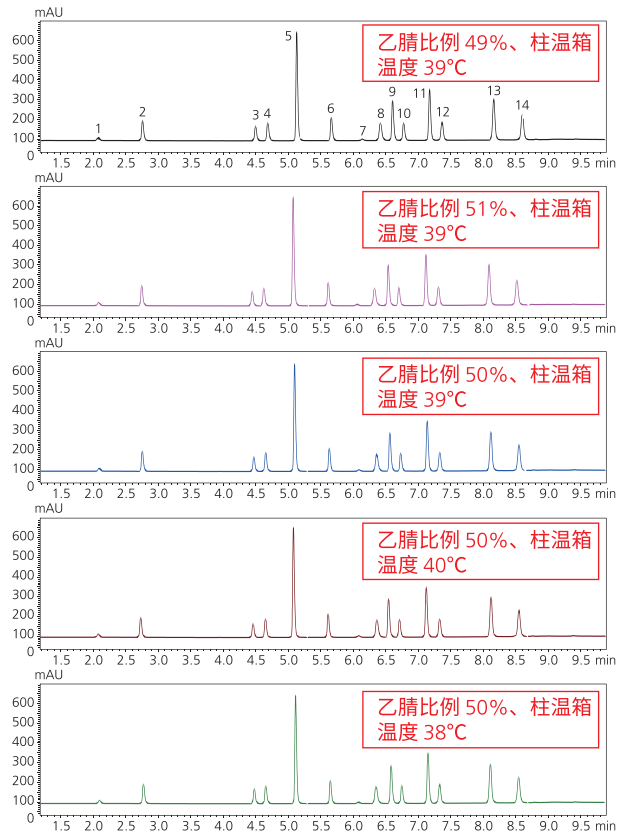


图10 稳健性评价的实验点
*“流动相A”: 乙腈



- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1 : Acetylsalicylic acid | 8 : Quinidine |
| 2 : Impurity of acetylsalicylic acid | 9 : Diclofenac sodium |
| 3 : Antipyrine | 10 : Indometacin |
| 4 : Metoclopramide | 11 : Papaverine hydrochloride |
| 5 : (S)-(+)-Naproxen | 12 : Lidocain |
| 6 : Probenecid | 13 : Dibucaine hydrochloride |
| 7 : Impurity of quinidine | 14 : Amitriptyline hydrochloride |

图11 稳健性评价的各个实验点 (图10中的白圈) 的色谱图和对象成分

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022年1月