

在QbD框架内实现具备耐用性LC方法的快速自动化开发

Peter G. Alden, Dana Yurach, Warren Potts
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

应用效益

本工作旨在证实，通过采用基于实验的“质量源于设计”(QbD)的方法设计来开发HPLC和/或 UPLC[®]方法可加速方法开发的途径。最终形成的方法经过性能和耐用性方面的优化，从而确保最终方法验证的成功，并最终成功实现方法引入。

引言

在药物开发过程中有各种具有特定分析需求且复杂度不同的样品。整个制药组织所进行的与方法开发相关的工作可能既花钱又耗时。简化方法开发的过程可能使这些组织的产品更快上市，并更具成本效益。

大量方法均可用于色谱分析方法的开发，包括人工试错法(单次单因子)、基于软件的第一性原理方法、单纯形寻优法及试验设计法(DOE)。其中，只有DOE可识别并量化方法变量之间复杂的相互影响，并与ICH Q8(R2)药品开发保持一致。



图1. Fusion AE 方法开发软件、Empower 2 色谱数据软件及用于方法开发的ACQUITY UPLC系统。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC[®] 系统

ACQUITY UPLC BEH
和 HSS 色谱柱

Empower[™] 2

Fusion AE

关键词

方法开发
方法优化、QbD

采用由Fusion AE方法开发软件、Empower 2 色谱数据软件 (CDS)、和带有二极管阵列(PDA)检测器、色谱柱管理器及溶剂选择阀的ACQUITY UPLC系统组成的全自动集成系统进行方法开发示例研究。该系统配置允许在同一试验中筛选多达4种不同填料的色谱柱、6种不同的缓冲液/pH及2种不同的有机流动相(图1)。

Fusion AE是内置耐用性指标的，基于“质量源于设计(QbD)”原理的LC方法开发软件。Fusion AE与控制ACQUITY UPLC系统的Empower 2 CDS联用，利用来自Empower 2 CDS的色谱分析结果，Fusion AE可管理复杂的统计信息并自动进行方法筛选和优化。它可创建试验、分析数据，并以目视法和数值法预测呈现结果。

[应用纪要]

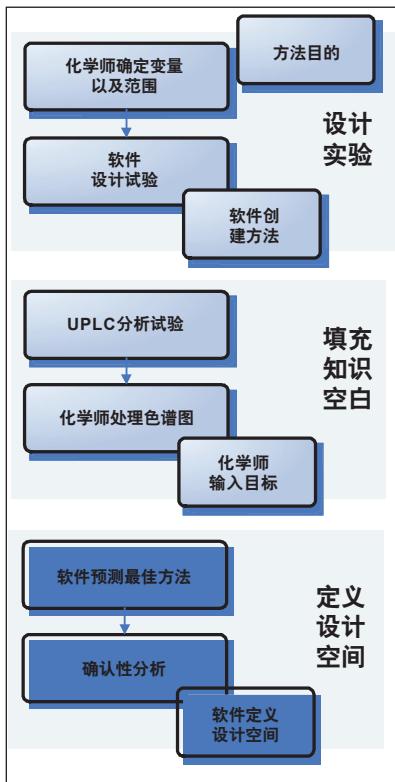


图 2. 方法开发工作流。

Fusion AE 采用条理井然的工作流(图2)，在设计实验并以已定义的设计空间获取最优分析方法的整个开发过程中引导用户。

第一步，Fusion AE自动创建试验，使用标准或用户定制的模板开发并优化LC方法。预研究的仪器参数的任何组合均可从获取的变量清单中选出(图3)。软件设计试验范围，并选择最有效的统计学试验设计。然后，Fusion AE将试验设计导出至Empower 2 CDS，自动创建所有仪器方法、方法组、及进行试验并填充知识空白所需的样品集。

使用ACQUITY UPLC系统运行并处理所采集的色谱数据，并将结果导回至Fusion AE，Fusion AE统计分析并模拟定量设计空间中的方法性能响应。以报告和图表的形式迅速诠释数据，从而便于方法结果和变量间相互作用的直观显示。

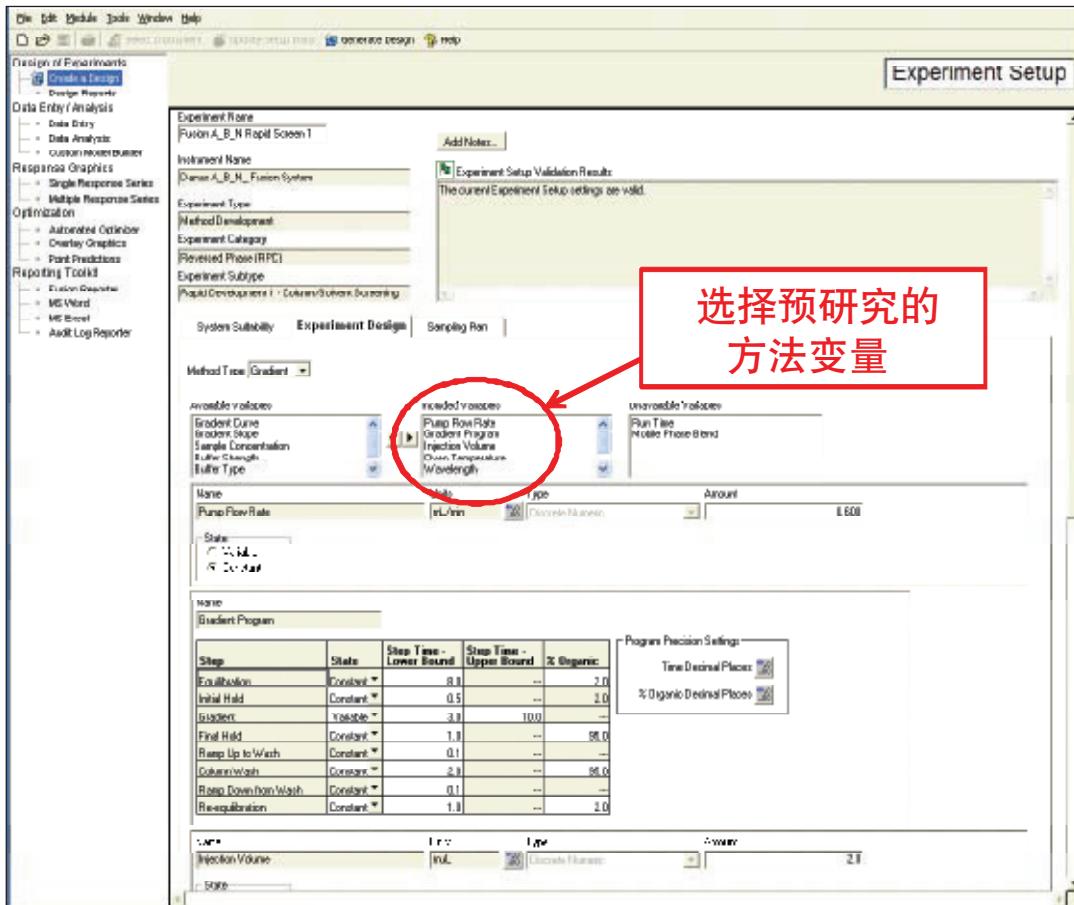


图 3. 快速筛选的设计。

利用Fusion AE的方法开发通过以下两个阶段实现：

- 在第1阶段，通常进行快速筛选试验以研究色谱方法的主要选择性效应因子，包括色谱柱化学品、流动相pH/组成、有机流动相及一般梯度条件。
- 在第2阶段，从第1阶段确定的色谱柱和流动相条件开始，外加范围较小的选择性次级效应因子(柱温、流速、特定梯度条件等)，进行方法优化实验以确定最佳的LC方法。

Fusion AE无需通过进行额外其它实验即可定量评估方法的耐用性，并识别出在平均性能和方法耐用性上均最优的方法。按照ICH QZA指南的建议，在方法开发阶段对其耐用性加以考虑，不仅可节省大量的时间和资源，还可确保该方法通过验证/或实现方法传递。

结果和讨论

为示范本方法开发工作流，配制了11种酸性、碱性和中性化合物的混合物，并利用Fusion AE进行UPLC方法开发。同时进行快速筛选实验以评价4种色谱柱化学品、3个缓冲液pH、2种有机流动相及梯度时间。

在对ACQUITY UPLC系统进行试验设计后，将结果导入Fusion AE并予以分析。全自动优化程序使用为方法设定的目标，并确定最佳条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱，pH 9.0的缓冲液、作为有机流动相的乙腈及3分钟的梯度时间(图4)。利用叠加图，即可轻易直观地呈现C₁₈ 色谱柱的结果(图5)。非阴影区表示该处条件实现了所有平均性能目标。

Optimization Search Results - Fusion A_B_N Rapid Screen 1						
Optimizer Answer #1: 23 of 34						
Study Variable Data						
Study Variable Name	Optimizer Answer Level Setting					
Column Type	300					
Cap. Condition	未设置					
pH	9.0					
Column Type	BEH C ₁₈ , 2.6mm, 7um					
Predicted Response Data						
Response Variable Name	Target	Optimizer Answer Predicted Response	3 Sigma Confidence Limit	±2 Sigma Confidence Limit	Relative Rank	
Q ₁₀ Purity	大于 95%	95.5	1.2	19.30	1.0	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.70</td><td>1.2</td><td>19.30</td><td>1.0</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.70	1.2	19.30	1.0	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.14</td><td>1.7</td><td>18.40</td><td>0.9</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.14	1.7	18.40	0.9	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.02</td><td>1.2</td><td>19.30</td><td>0.8</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.02	1.2	19.30	0.8	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.36</td><td>1.2</td><td>19.30</td><td>0.7</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.36	1.2	19.30	0.7	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.25</td><td>1.2</td><td>19.30</td><td>0.6</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.25	1.2	19.30	0.6	
4- <alpha-phe-2'-oh-dgat< td=""><td>大于 95%</td><td>95.10</td><td>1.2</td><td>19.30</td><td>0.5</td><td></td></alpha-phe-2'-oh-dgat<>	大于 95%	95.10	1.2	19.30	0.5	

快速筛选的
最佳结果

图 4. 快速筛选优化程序的结果。

试验

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	ACQUITY BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m
	ACQUITY BEH Shield RP18, 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m
	ACQUITY BEH Phenyl, 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m
	ACQUITY HSS C ₁₈ SB, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m
缓冲液:	100 mM甲酸铵, pH 3.0
	10 mM醋酸铵, pH 6.5
	10 mM碳酸氢铵, Bicarbonate, pH 9.0
有机流动相:	乙腈 甲醇
梯度:	2% B to 95% B
梯度时间:	下限3分钟 上限10分钟

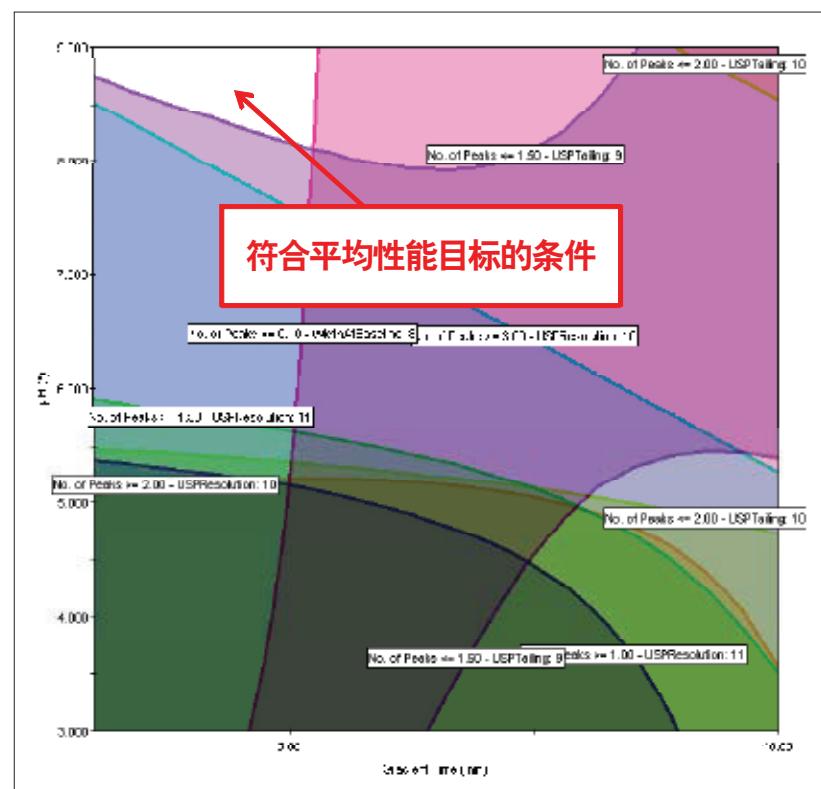


图5. 快速筛选叠加图, C₁₈色谱柱/乙腈。

下一阶段为使用由快速筛选确定的色谱柱和流动相选择进行方法优化。创建试验设计实现选择性的二次效应优化。

流速:	0.25 ~ 0.60 mL/min
柱温:	35 °C ~ 60 °C
梯度范围:	下限2% B ~ 80% B 上限2% B ~ 95% B
梯度时间:	下限2分钟 上限6分钟

[应用纪要]

针对本优化分析获取的UPLC的结果在Fusion AE中进行了分析。利用多反应曲面图和多反应效应图(图6和7)观察变量之间的多种相互作用，包括线性累加效应、简单作用和复杂作用。方法的目标设定为色谱峰数量、色谱峰的USP分离度、峰宽、USP拖尾因子、最后一个峰的保留时间，以及对以上响应的耐用性指标。全自动优化程序计算出达到我们平均性能目标和稳健性标准的最佳条件，并识别出这些条件下的预期结果(图8)。

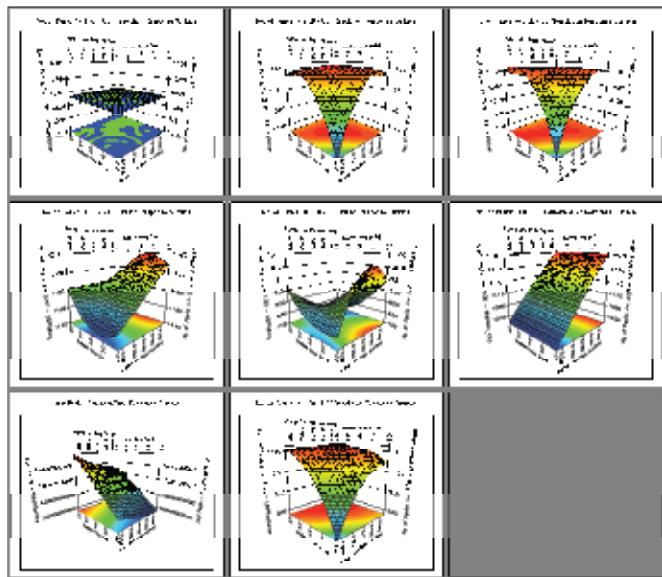


图 6. 方法优化，多反应曲面图。

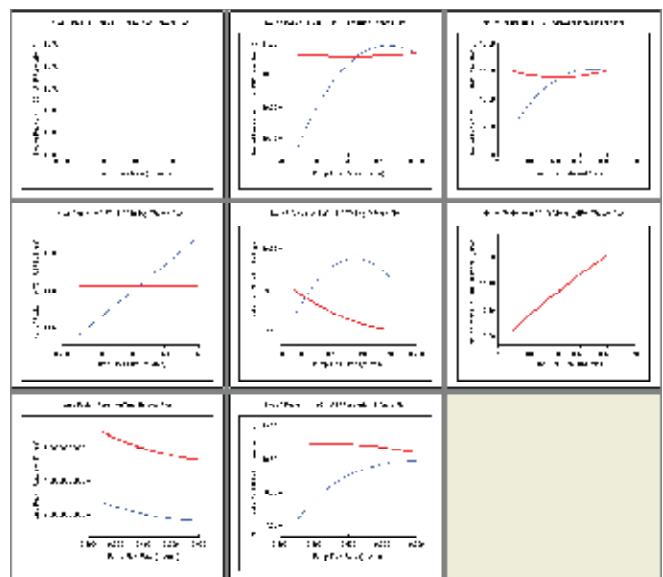


图 7. 方法优化，多反应效应图。

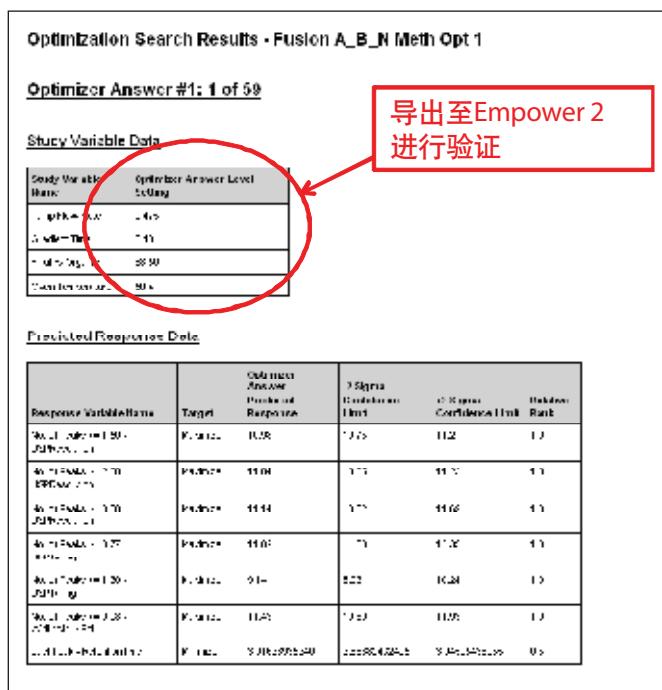


图 8. 方法优化，优化程序的结果。

[应用纪要]

叠加图(图 9)在非阴影区内清楚地呈现出满足我们平均性能目标和耐用性标准的条件，并将该区定义为设计空间。在设计空间内，可选定一正方形区域定义为操作空间，基于我们ICH Q2A的解释，该空间内条件的任何变化均不视为色谱分析方法的改变。

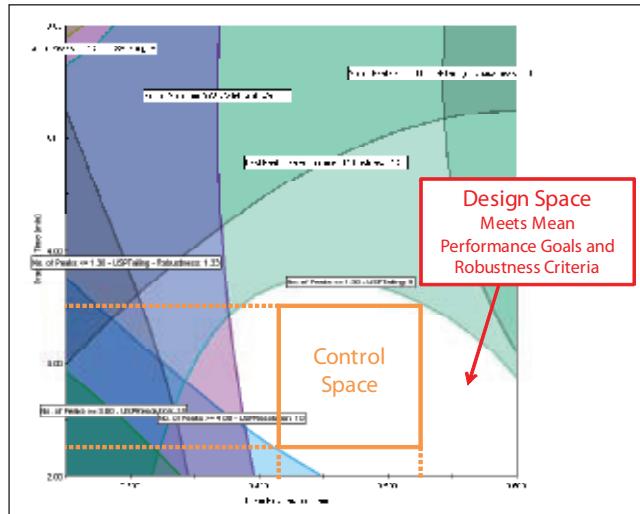


图 9. 方法优化，叠加图。

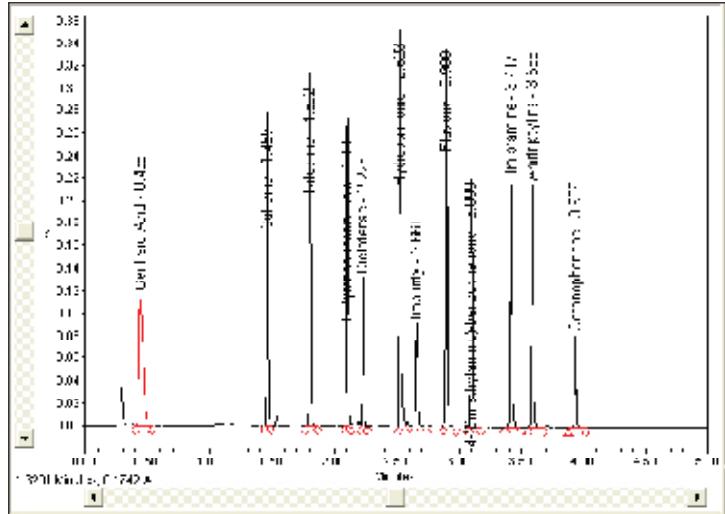


图10. 导出并在ACQUITY UPLC系统上运行的最佳方法。

为验证最佳方法如预期表现，将全自动优化程序的预测结果导出至Empower 2并在ACQUITY UPLC系统上运行。最终形成的色谱图(图10)显示分离性能极佳，分离时间不超过5分钟，所有11种化合物(包含杂质)间均有良好的分离度并具较好峰形。将最终结果表(图11)与全自动优化程序预测结果比较表明，实验结果均满足或超出最佳方法的预期结果。

整个方法开发过程，包括快速筛选和方法优化，需要2天时间即可获取最终方法。

Chromatographic Results					Experimental Results vs Predicted		
Compound	Rt	USP Rs	USP Tailing	Width @ 4.4%		Experimental	Predicted
Gentisic Acid	0.438		1.7	0.078	# of Peaks USP Rs = 1.5	11	10.98
Caffeine	1.459	23.73	1.16	0.025	# of Peaks USP Rs = 2.0	11	11.04
Ritodrine	1.802	16.69	1.18	0.028	# of Peaks USP Rs = 3.0	11	11.14
1-Pyrenesulfonic Acid	2.103	13.63	1.19	0.029	# of Peaks USP Tailing = 0.77	12	11.82
Diclofenac	2.228	5.42	1.22	0.029	# of Peaks USP Tailing = 1.30	10	9.14
Hydroquinidine	2.523	11.56	1.55	0.039	# of Peaks Width@4.4% = 0.08	12	11.43
Impurity	2.661	5.1	1.12	0.035	Last Peak Rt	3.936	3.916
Flavone	2.9	9.27	1.08	0.032			
4-(Dimethylamino)-benzophenone	3.099	7.78	1.07	0.033			
Imipramine	3.417	11.45	1.22	0.039			
Amitriptyline	3.588	5.74	1.19	0.039			
Octanophenone	3.936	12.33	1.04	0.034			

图 11. 在ACQUITY UPLC系统上运行的最佳方法的结果。

结论

Fusion AE方法开发软件与Empower 2 CDS和ACQUITY UPLC联用，通过将QbD与试验方法设计相结合，为方法开发过程提供了理想化的平台，从而使科学家们有更有信心地应用更多的方法知识更快地开发出最佳方法。

将Fusion AE结合ACQUITY UPLC使用，可使开发出具备最佳耐用性LC方法所需的时间从数周/月缩短至几天。ACQUITY UPLC或ACQUITY UPLC H-Class系统的使用，在大大提升方法开发过程速度的同时，还减少了溶剂消耗，并实现了整体生产效率的增加及实验室成本的降低。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.[™]



Waters、ACQUITY UPLC和UPLC是沃特世公司的注册商标。
Empower 和 The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。
Fusion AE是S-Matrix公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2010年 沃特世公司 中国印刷
2010年11月 720003463ZH

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 6555
成都: 028 - 6554 5999
香港: 852 - 2964 1800

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