

应用纪要

使用“分析方法质量源于设计”自动开发稳定性方法

Catharine Layton, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

人们正在迅速开发具有更高疗效、更大的耐药性基因屏障以及更高的长期安全性和耐受性的新型抗病毒疗法，以治疗新型冠状病毒病(COVID-19)等疾病。采用色谱稳定性方法(SIM)监测这些治疗化合物的含量、降解产物和杂质。在使用强制降解样品制备物开发方法时，利用自动化且可靠的AQbD方法开发色谱SIM可提供稳定性和效率优势¹。

优势

- 可使用Fusion QbD方法开发软件以自动化方式开发稳定性方法。
- Fusion QbD方法开发软件中的强制降解功能提供了在自动化方法开发设计中纳入多个强制降解样品的能力。

简介

有关活性药物成分(API)稳定性的知识对于合适的制剂、包装选择和保质期确定至关重要^{2,3}。开发稳定且可重现的分析方法可能棘手、耗时且复杂。常规采用的策略包括：单因素轮换试验(OFAT)、系统化方案和“分析方法质量源于设计”(AQbD)。

AQbD最近引起了监管机构的关注，因为通过这种方法获得的信息支持基于知识的决策制定。通过执行风险评估，使用AQbD原则收集的数据将生成一个称为方法操作设计区域(MODR)的设计空间。在该空间内，可接受的性能区域(APR)进一步定义了方法变量（即温度、梯度时间、流速等）满足规定的系统适用性要求的工作边界¹。在该范围内的方法操作可大幅提高色谱稳定性，同时尽可能降低由于日常色谱变异性导致异常、不合格(OOS)或超趋势(OOT)结果的可能性。

在本研究中，将Fusion QbD方法开发软件与Empower 3结合使用以开发稳定性方法(SIM)。利用该方法监测富马酸丙酚替诺福韦(TAF)，这是一种抗病毒前药和有效的病毒逆转录抑制剂，适用于治疗慢性乙型肝炎和HIV⁴。Fusion QbD软件中内置的“强制降解”功能用于在单个设计空间中包含多个强制降解样品制备物。

实验

材料和强制降解前处理

富马酸丙酚替诺福韦(TAF)有证标准物质(CAS 379270-37-8) (图1) (Selleckchem.com, 美国得克萨斯州休斯顿市) 用稀释剂 (50/50水/甲醇) 制成浓度约0.5 mg/mL。制备

四种独特的TAF强制降解样品制备物，其分别包含最终浓度为5 mM的HCl（酸）、0.025 mM甲酸铵(pH 8.5)（碱）、5% H₂O₂（氧化）和样品稀释剂（对照）。将对照样品和氧化样品在60 °C下暴露3 h，而包含酸和碱的样品则在分析前于室温下储存3 h。

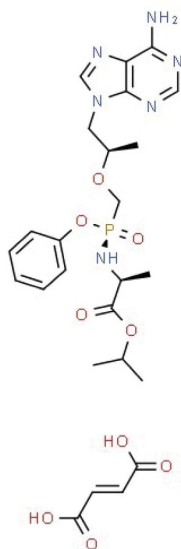


图1.富马酸丙酚替诺福韦的结构
(5)

液相色谱条件

液相色谱系统： 装配四元溶剂管理器(rQSM)、样品管理器(rFTN)、色谱柱管理器(rCM)的ACQUITY Arc系统

检测： ACQUITY光电二极管阵

列检测器(PDA), UV
260 nm

色谱柱:

XBridge Premier BEH
Shield RP₁₈, 2.5 μm,
4.6 × 150 mm (部件号
: 186009923)

XBridge Premier BEH
C₁₈, 2.5 μm, 4.6 × 150
mm (部件号
: 186009849)

XSELECT Premier CSH
苯己基柱, 2.5 μm, 4.5
× 150 mm (部件号
: 186009888)

XSELECT Premier CSH
C₁₈ XP, 2.5 μm, 4.5 ×
150 mm (部件号
: 186009874)

样品温度: 20 °C

进样体积: 5.0 μL

流速: 1.3 mL/min

水性流动相: 10 mM甲酸铵, pH 4.0
10 mM甲酸铵, pH 6.4
10 mM甲酸铵, pH 8.4

有机流动相: 乙腈

数据管理

数据管理： Empower 3 色谱软件以及S-Matrix Corporation开发的 Fusion QbD 软件

结果与讨论

使用AQbD原则的方法开发包括一系列系统阶段。在本研究中，针对四种强制降解样品制备物开发并执行了初始设计（快速筛选）。在对MODR中生成的色谱图进行积分和统计处理后，开发并执行了第二个设计以探讨更集中的变量（方法优化）。根据这些结果定义了APR并对该区域内的方法性能进行了验证，以最终确定SIM的条件。下文进一步详细描述了系统方法开发阶段。

第1阶段：快速筛选

Fusion QbD快速筛选方法开发设计中包括流动相pH、色谱柱和梯度时间变量。采用Replication Settings（复制设置）/Forced Degradation Study（强制降解研究）功能（图2），在筛选过程中纳入所有四种强制降解样品制备物（酸、碱、氧化、对照）。然后将该设计导入Empower 3以付诸实施。

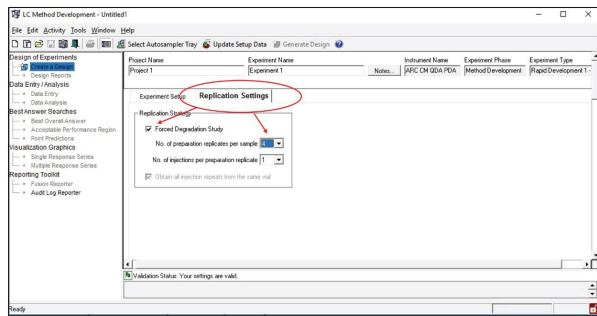


图2. Fusion QbD软件中的液相色谱方法开发设置。通过 *Replication Settings*（复制设置）选项卡将四种强制降解样品制备物纳入研究设计中。

第2阶段：将数据导入Fusion QbD中并开发知识空间

运行完成后，使用通用处理方法对所有色谱图进行积分。对于在设计中执行的第一组变量，将四个降解样品制备物色谱图叠加。虽然这四种制备物之间存在许多共同的降解产物，但氧化样品制备物表现出额外、独特的降解产物。选择氧化样品制备物进行统计分析和进一步方法开发，用作潜在峰数量的“最糟糕”情形。

将氧化样品制备物进样得到的积分色谱图导入Fusion QbD中进行统计处理。选择“峰计数”性能目标以获得趋势响应信息。由此，软件基于所导入的色谱图中存在的峰轮廓自动建立数学模型。Fusion QbD预测将产生“总体最佳答案(BOA)”或最大峰计数的方法变量组合（pH、色谱柱、梯度时间）。完成快速筛选研究后，将这些变量用于方法优化。

第3阶段：方法优化 – 温度和梯度时间

方法优化设计旨在探讨40~50 °C之间的柱温，并进一步调节梯度时间。在设计执行、色谱图积分和数据导入Fusion QbD之后，通过在大幅减小USP拖尾因子的同时尽可能提高

色谱系统适用性性能目标（包括峰计数、USP分离度和 k' ），定义可接受的性能区域(APR)（图3）。

APR预测，7~9 min的梯度时间和41.5~43.5 °C的柱温将提供稳定的色谱分离。峰计数、USP分离度、 k' 和USP拖尾因子的系统适用性标准均在APR区域内得到满足。

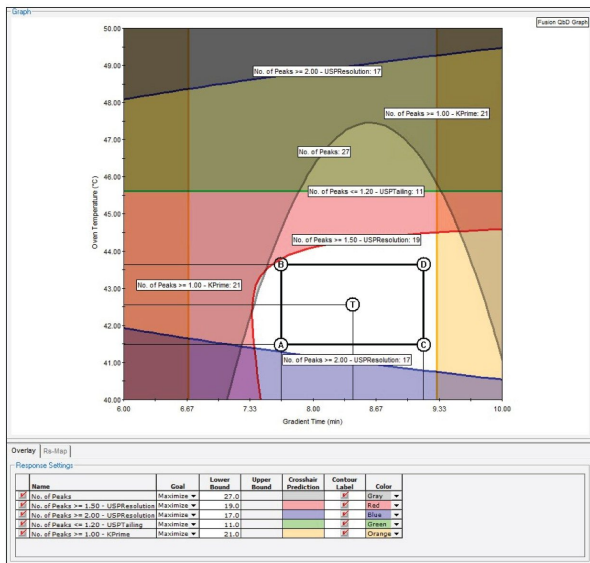


图3. Fusion QbD设计空间图以及由方法优化实验获得的APR区域。图下方的表格展示了此设计所实现的用户指定的性能目标

第4阶段：验证

通过在APR中心点定义的变量下分析所有四种强制降解样品制备物来进行方法验证。按照快速筛选结果，XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱与10 mM甲酸铵pH 4.0一起使用，并且按照方法优化研究，运行柱温为43 °C，流动相B在2%下保持2 min。梯度为流动相B在8.5 min内增加到95%。在整个研究过程中，流速、进样体积和UV检测波长保持不变，分别为1.3 mL/min、5 μL和260 nm（图4）。

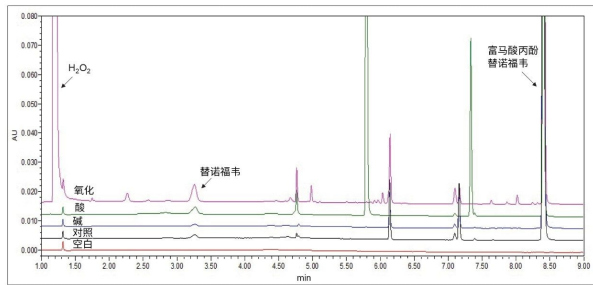


图4.富马酸丙酚替诺福韦强制降解样品制备物的最终SIM色谱图

结论

本研究展示了一种稳定性方法的开发，该方法用于监测暴露于强制降解条件后的富马酸丙酚替诺福韦原料药。利用Fusion QbD方法开发软件，采用了一种自动化统计方法。该方法能够在自动化方法开发设计中探索针对多种样品制备物的色谱性能。

参考资料

1. Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville. “Analytical Quality by Design Based Method Development for the Analysis of Formoterol, Budesonide, and Related Compounds Using UHPLC-MS” .Waters Application Note, 2019, 720006696 <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2019/analytical-quality-by-design-based-method-development-for-the-analysis-of->

[formoterol-budesonide-and-related-compounds-using-uhplc-ms.html](#)> .

2. “Guidance for Industry #5, Drug Stability Guidelines, FDA Code of Federal Regulations Title 21, Volume 4 (21CFR211), accessed 11/16/21.
3. ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference on Harmonization, 2003.
4. Vijaya Madhyanapu Golla, Moolchand Kurmi, Karimullah Shaik, Saranjit Singh. “Characterization of Degradation Products of Tenofovir Alafenamide Fumarate and Comparison of Its Degradation and Stability Behaviour With Tenofovir Disoproxil Fumarate” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 131 (2016) 146–155.
5. 2D Structure Database, [www.ChemSpider.com](#) <<http://www.chemspider.com/>> , accessed 10/20/21.

特色产品

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

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower 3方法验证管理器(MVM) <<https://www.waters.com/534328>>

Fusion方法开发软件 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10137325>>

>

基于UNIFI的筛查平台解决方案 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134682903>

>

720007480ZH, 2021年12月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)