

# Разработка автоматизированного метода на основе подхода QbD и валидация окисленного аторвастатина

## Методическая информация

Контроль качества в фармацевтике

### Аннотация

В подходе встроенного качества (QbD) особое внимание уделяется управлению рисками и научным принципам. Применение этого подхода при разработке аналитических методов позволяет повысить их надежность по сравнению с традиционными подходами. В данном исследовании для разработки аналитического метода с целью достижения максимальной чистоты пика активного фармацевтического ингредиента (АФИ) окисленного лекарственного средства аторвастатина применялся подход QbD. Разработанный метод валидирован, включая многовариантное исследование надежности, с использованием ПО для разработки и валидации автоматизированного метода Fusion QbD (S-Matrix) в системе разработки методов для ВЭЖХ Agilent серии 1200 Infinity. Было определено, что чистота АФИ составляет 99,8%, и разработанный метод обеспечивал хорошее отделение от примесей.

### Авторы

Винаяк А. К. и Саед Салман Латиф  
Agilent Technologies Inc,  
Бангалор, Индия



**Agilent Technologies**

## Введение

В требованиях Международной конференции по гармонизации ICH Q8(R2) QbD определяется как «системный подход к разработке, который начинается с предварительного определения параметров и делает акцент на продукте, а также процессе и его контроле, на основании научных принципов и управления рисками»<sup>1</sup>. Требования ICH предполагают, что закладка качества в процесс снижает риски отказов в работе, давая возможность производить продукт высокого качества. Аналитический метод для лекарства также представляет собой процесс, и принципы качества в требованиях ICH могут быть внедрены в создание метода<sup>2,3</sup>. Целью аналитического подхода QbD является достижение высокого качества измерений. Эта цель достигается предварительным определением критических параметров методов (CMA), выполнением многофакторного исследования пространства проектных решений, окружающего выбранные условия, и внедрением системного управления рисками для сохранения контроля над процессом<sup>4</sup>. В подходе QbD устанавливаются критические параметры метода, и взаимодействия между критическими переменными метода (CMV) описываются с применением многовариантного статистического анализа и моделирования. Это приводит как к снижению количества отказов в работе метода в полевых условиях, так и к уменьшению числа исследований, не соответствующих техническим условиям.

В данном обзоре мы использовали систему разработки методов для ВЭЖХ Agilent серии 1200 Infinity совместно с ПО для автоматизированной разработки и валидации метода Fusion QbD для того, чтобы разработать и валидировать метод разделения аторвастатина АФИ и продуктов окисления. Разработка метода осуществлялась посредством скрининга и оптимизации параметров метода с помощью отдельных моделей DOE<sup>5, 6, 7</sup>. Валидация метода проводилась с помощью многовариантных надежных моделей.

## Экспериментальная часть

### Оборудование

Приборный комплекс серии 1200 Infinity для разработки методов на основе ВЭЖХ. Отдельные модули и компоненты:

- Бинарный насос Agilent 1290 Infinity (G4220A)
- Привод крана Agilent 1290 Infinity (G1170A) и 12-позиционный/13-портовый кран для выбора растворителя Agilent для быстрого переключения колонок (G4235A)
- Автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A), работающий при температуре 5 °С, поддерживаемой с помощью термостата (G1330B)
- Кластер ТСС Agilent 1290 Infinity (G1316C) с двумя 8-позиционными/9-портовыми кранами Agilent для быстрого переключения колонок (G4230B)
- Набор трубок для выбора растворителя на четыре растворителя (кат. номер 5067-4601)
- ДМД Agilent 1290 Infinity (G4212A)

Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity управлялась с помощью ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Workstation (С.01.05, [38]). Дополнительная информация по оборудованию приводится отдельно<sup>8</sup>.

### Программное обеспечение

Автоматизированная разработка метода Fusion QbD и ПО для валидации от S-Matrix Corporation. Для автоматизированных экспериментов использовалась версия 9.6.22.

### Реагенты и материалы

Кальцинированное лекарственное средство аторвастатин было приобретено у Aldrich, а все растворители, использованные в анализах — у Fluka. Добавки и реагенты были закуплены у Aldrich. Очищенная вода была получена с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore, США). Пероксид водорода был приобретен у местного поставщика.

### Процесс деградации

Для проведения окислительной деградации 1,6 мг лекарственного средства аторвастатина обрабатывалось 400 мкл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Контрольная проба была приготовлена посредством растворения лекарственного средства в 400 мкл воды. Контрольные и обработанные пробы выдерживались при температуре 40 °С 24 часа, затем подвергались вакуумной сушке с помощью концентратора Eppendorf 5301 (Eppendorf, Германия) и растворялись в 1600 мкл диметилформамида (ДМФА). Затем пробы центрифугировали с частотой вращения 13 000 об/мин в течение 10 минут. Для проведения анализа использовалась надосадочная жидкость.

## QbD: определение целей и задач

Два основных элемента разработки методов на основе подхода QbD — **аналитический профиль цели (АТР)** и **критические параметры метода (СМА)**.

АТР является целью метода, описывающей предполагаемое назначение метода и подтверждающей соответствие данных цели. В данном исследовании заданный АТР обладал следующими требованиями:

- Метод должен отделять аналит (активный фармацевтический ингредиент) от продуктов деградации.
- Он должен использовать совместимую с МС подвижную фазу для последующего определения продуктов деградации посредством масс-спектрометрии.
- Разработанный метод должен быть надежным.
- Измерения результатов валидации должны иметь воспроизводимость результатов с ОСО < 5%.

СМА являются показателем эффективности метода, который необходимо измерять, чтобы определить, может ли метод предоставлять данные, подходящие для цели исследований. В данном исследовании были заданы следующие СМА:

- **Тангенциальное разрешение АФИ:**  $\geq 2,00$  для пика АФИ от ближайших пиков примесей до и после элюирования.
- **Значение чистоты:** Пик АФИ должен иметь чистоту  $\geq 99\%$ .
- **Максимальное количество пиков, имеющих небольшую ширину:** Максимальное количество пиков подвергшейся деградации пробы должно иметь разумную ширину пиков и теоретических тарелок.
- **Надежность метода:** Конечный метод должен быть надежным по всем установленным критическим параметрам.

## Процесс

Процесс включал в себя две фазы скрининга для быстрой разработки метода, основанные на подходе QbD, и фазу оптимизации. На основании заданных пользователем переменных, ПО прогнозировало лучший ответ на каждой фазе. Многовариантный подход в этих фазах сужал область знаний до области моделей с гарантированным качеством метода. Разработанный метод прошел дополнительную оптимизацию для достижения наилучшей чистоты пика АФИ и улучшения общего разделения. Результаты многовариантного анализа были смоделированы для получения конечной надежной системы, также называемой «Рабочим методом области конструкций» (MODR). Оптимизированный метод впоследствии был полностью валидирован.

Как часть процесса валидации, надежность метода была верифицирована с помощью DOE для целенаправленного изменения одновременно нескольких CMV вместе с проведением регрессионного анализа, чтобы количественно охарактеризовать индивидуальное и объединенное влияние CMV на надежность метода. Общий процесс с соответствующими переменными в каждой фазе суммирован на рис. 1. Созданные схемы были экспортированы из Fusion QbD в систему OpenLAB (CDS). Хроматограммы обрабатывались в CDS и импортировались обратно в Fusion QbD<sup>®</sup>. Несколько трехмерных кривых отклика показывают индивидуальное и объединенное влияние исследуемых переменных на СМА.



Рис. 1. Общий процесс, использованный в исследованиях. Переменные, использованные в каждой фазе, показаны около каждой фазы. Также показаны CMV, включенные в исследование надежности.

## Переменные и постоянные

Информация о постоянных и переменных, использованных в первом и втором экспериментах фазы скрининга, представлена в таблицах 1 и 2 соответственно. Для достижения оптимального разделения и чистоты АФИ в фазу оптимизации был встроен шаговый градиент с промежуточным временем удерживания. Переменные, использованные в фазе оптимизации, и критические параметры метода (СМР), которые преднамеренно изменяли в течение фазы валидации, представлены в таблицах 3 и 4 соответственно.

Таблица 1. Переменные и постоянные, использованные в фазе 1 скрининга

Переменная	
Колонки	
Agilent ZORBAX RRHD SB Aq., 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 857700-314)	
Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 857768-901)	
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-306)	
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus фенилгексил, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-312)	
Agilent PLRP-S, 4,6×50 мм, 3,0 мкм (кат. номер PL1512-1300)	
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-306)	
Растворители	
A1	pH 3,0, 20 мМ муравьиная кислота в воде
A3	pH 4,0, 5 мМ муравьиная кислота и 10 мМ формиат аммония в воде
A5	pH 5,0, 5 мМ уксусная кислота и 10 мМ ацетат аммония в воде
A7	pH 7,0, 10 мМ ацетат аммония в воде
A9	pH 8,1, 10 мМ бикарбонат аммония в воде
B1	Ацетонитрил
B2	Метанол
Время градиентного элюирования	
от 3 до 10 минут	
Постоянная	
Градиент	
Равновесие	3,0 мин, при 5% В
Начальное удерживание	0,5 мин, при 5% В
Конечное удерживание	0,5 мин, при 95% В
Повторное уравнивание	2 мин, при 5% В
Производительность насоса	0,6 мл/мин
Объем ввода пробы	1 мкл
Температура колонки	40 °С
Длина волны	245 нм ± 4 нм (волны нет)

Таблица 2. Переменные и постоянные, использованные в фазе 2 скрининга

Переменная	
Длина колонки (Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus фенилгексил)	
3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-312)	
3,0 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959964-312)	
Растворители	
A1	pH 4,0, 5 мМ муравьиная кислота и 10 мМ формиат аммония в воде
A2	pH 4,5, получен из pH 5 посредством уксусной кислоты
A3	pH 5,0, 5 мМ уксусная кислота и 10 мМ ацетат аммония в воде
A4	pH 5,5, получен из pH:7 посредством уксусной кислоты
A5	pH 6,0, получен из pH:7 посредством уксусной кислоты
A6	pH 6,5, получен из pH:7 посредством уксусной кислоты
A7	pH 7,0, 10 мМ ацетат аммония в воде
B1	Ацетонитрил
B2	Ацетонитрил: ТГФ (88:12)
Время градиентного элюирования	
9 мин	
15 мин	
Температура колонки	
35 °С	
40 °С	
45 °С	
50 °С	
Постоянная	
Градиент	
Равновесие	1,0 мин, при 5 % В
Начальное удерживание	1 мин, при 5% В
Конечное удерживание	2 мин, при 95% В
Повторное уравнивание	4 мин, при 5% В
Скорость потока	0,6 мл/мин
Объем ввода пробы	1 мкл
Длина волны	245 нм ± 4 нм (волны нет)
Все остальные конечные параметры из фазы 1	

Таблица 3. Переменные, использованные в фазе оптимизации

Переменные параметры	Исследуемый диапазон
Расход насоса (мл/мин)	0,55 0,60 0,65
Время промежуточного удерживания (мин)	от 3 до 7 минут
Профиль градиента (конечный % градиента 1)	30–35%
Температура термостата (°С)	33 36 39
Градиент 1	от 5% В до (30–35)% В
Градиент 2	от (30–35)% В до 90% В

## Результаты и обсуждение

### Фаза 1 скрининга разработки метода

В этой фазе целью было определение условий, обеспечивающих наилучшее отделение АФИ от сопутствующих примесей. Цель (СМА) и результат фазы 1 скрининга обобщены в таблицах 5А и 5В соответственно. Было определено, что наиболее подходящими химическими соединениями для обращенно-фазных колонок и растворителей являются фенилгексил и ацетонитрил. Для определения оптимального диапазона рН для следующих исследований скрининга было использовано несколько кривых отклика (рис. 2А и 2В).

Таблица 4. Критические переменные метода, использованные для валидации метода

CMV	Кодированное название*	Диапазон испытаний
Скорость потока (мл/мин)	А	0,59
		0,60
		0,61
Объем вводимой пробы (мкл)	В	0,9
		1,0
		1,1
Температура термостата (°C)	С	32
		33
		34
рН	D	6,66
		6,76
		6,86
Концентрация буфера (мМ)	E	9,5
		10,0
		10,5

\*В отображениях моделей надежности были использованы кодированные названия.

Таблица 5А. Цели отклика (СМА), заданные для фазы 1 скрининга метода

Цели отклика	Целевое вещество	Нижняя граница	Верхняя граница	Относительный ранг
Количество пиков	Максимально	25	50	1
Количество пиков $\geq 1,50$ (тангенциальное разрешение)	Максимально	22	31	1
Количество пиков $\geq 2,00$ (тангенциальное разрешение)	Максимально	20,0	27,0	1
Макс. пик 1 (тангенциальное разрешение)	Минимально	0,37	6,24	1

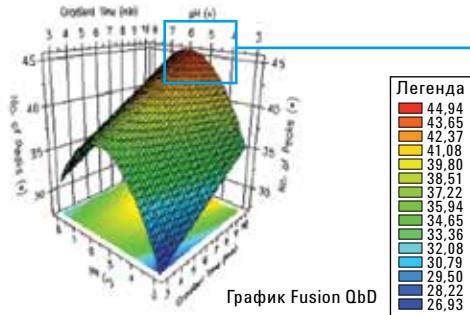
Таблица 5В. Наилучший общий ответ фазы 1 скрининга, спрогнозированный Fusion QbD

Переменная	Настройка уровня
Тип колонки	Фенилгексил
рН растворителя А	6,763
Растворитель В (органический)	Ацетонитрил
Время градиентного элюирования	9,37

**A**

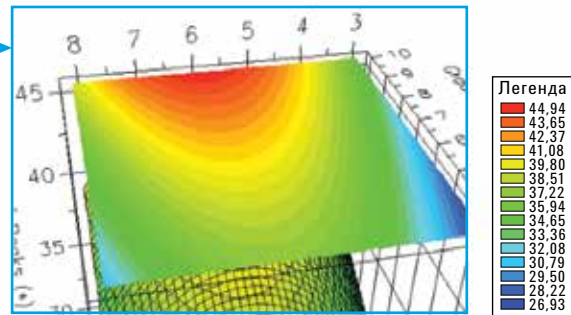
Поверхность отклика нескольких пиков

Вид сильного растворителя — ацетонитрил, тип колонки — фенилгексил



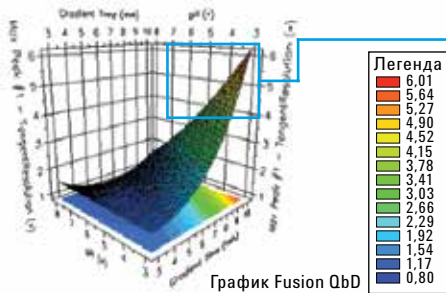
Поверхность отклика нескольких пиков

Вид сильного растворителя — ацетонитрил, тип колонки — фенилгексил

**B**

Макс. пик 1 — поверхность отклика тангенциального разрешения

Вид сильного растворителя — ацетонитрил, тип колонки — фенилгексил



Макс. пик 1 — поверхность отклика тангенциального разрешения

Вид сильного растворителя — ацетонитрил, тип колонки — фенилгексил

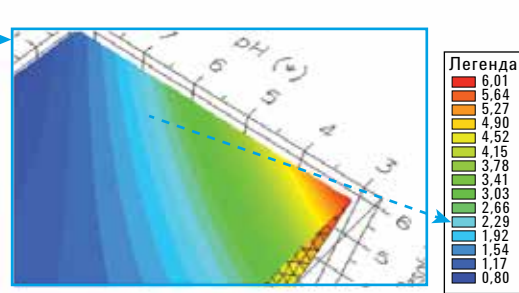


Рис. 2. Графики откликов из Fusion QbD, показывающие влияние взаимодействий между переменными на критические отклики. Увеличенный вид каждого графика представлен с правой стороны. А) Показано изменение отклика (количества пиков) в зависимости от pH. Максимальный отклик наблюдался в диапазоне pH от 4 до 7. В) Показано изменение отклика (тангенциального разрешения АФИ) в зависимости от pH. Максимальный отклик наблюдался при pH, равном 3. Диапазон значений pH от 4 до 7 был принят для следующей фазы, потому что тангенциальное разрешение АФИ было приемлемым даже при pH, равном 7, согласно ФармСША (USP).

## Фаза 2 скрининга разработки метода

Целью этой фазы было сужение диапазона длин колонки, температуры колонки и pH с помощью результатов, полученных в фазе 1. Так как в методе ФармСША в составе подвижной фазы используется тетрагидрофуран (ТГФ), то эффект ТГФ в подвижной фазе также подвергался скринингу. Также был принят во внимание новый отклик — симметрия пиков, что позволило еще больше сузить область знаний. Цель и результат фазы 2 скрининга обобщены в таблицах 6А и 6В. Лучшие результаты получаются при отсутствии ТГФ в подвижной фазе. Положительная динамика в профиле элюирования между фазами скрининга 1 и 2 показана на рис. 3.

Таблица 6А. Цели отклика (СМА), заданные для фазы 2 скрининга метода

Цели отклика	Цель	Нижняя граница	Верхняя граница	Относительный ранг
Количество пиков	Максимально	36	45	1
Количество пиков $\geq 1,50$ (тангенциальное разрешение)	Максимально	28	34	0,9
Количество пиков $\geq 2,00$ (тангенциальное разрешение)	Максимально	21	28	1
Макс. пик № 1 (тангенциальное разрешение)	2,51	1,40	3,62	1
Макс. пик № 1 (симметрия)	Минимально	1,14	1,15	0,9

Таблица 6В. Наилучший общий ответ фазы 2 скрининга метода, спрогнозированный Fusion QbD

Переменная	Настройка уровня
Длина колонки	100 мм
pH растворителя А	7,0
Растворитель В (органический)	Ацетонитрил
Время градиентного элюирования	15 мин
Температура колонки	35,1 °С

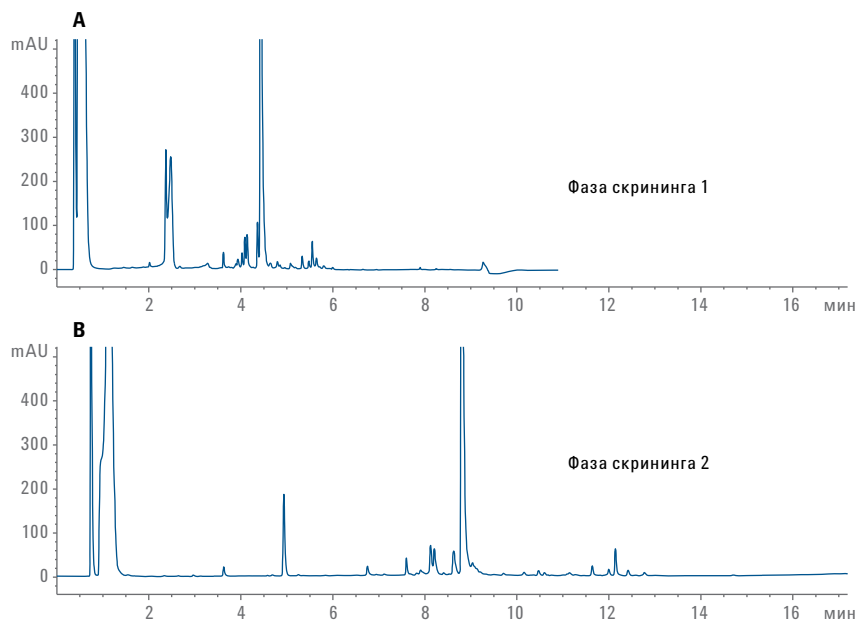


Рис. 3. Хроматограммы, показывающие улучшение профиля элюирования подвергшейся деградации пробы аторвастатина в фазе скрининга 2 (В) по отношению к фазе скрининга 1 (А)



## Фаза валидации метода

Надежность аналитического процесса определяет его способность сопротивляться влиянию небольших, но преднамеренных изменений в параметрах метода и является показателем его безотказности при использовании в нормальных условиях<sup>1</sup>. Обычно надежность разработанного метода проверяется поочередным изменением одного из параметров метода, при сохранении других параметров неизменными. В данном исследовании несколько переменных изменялись одновременно в различных комбинациях с помощью подхода DOE. Надежность метода проверялась на оптимизированном методе разделения аторвастатина АФИ в окисленной пробе. Для определения надежности метода изменяли одновременно пять CMV. CMV и их измеренные отклонения от заданных значений представлены в таблице 9. Метод прошел испытания на надежность для всех ожидаемых отклонений во всех СМА. Обобщенные результаты для всех СМА, полученные с помощью ПО Fusion QbD, представлены в таблице 10. Пример отчета о надежности Fusion QbD показан в таблице 11.

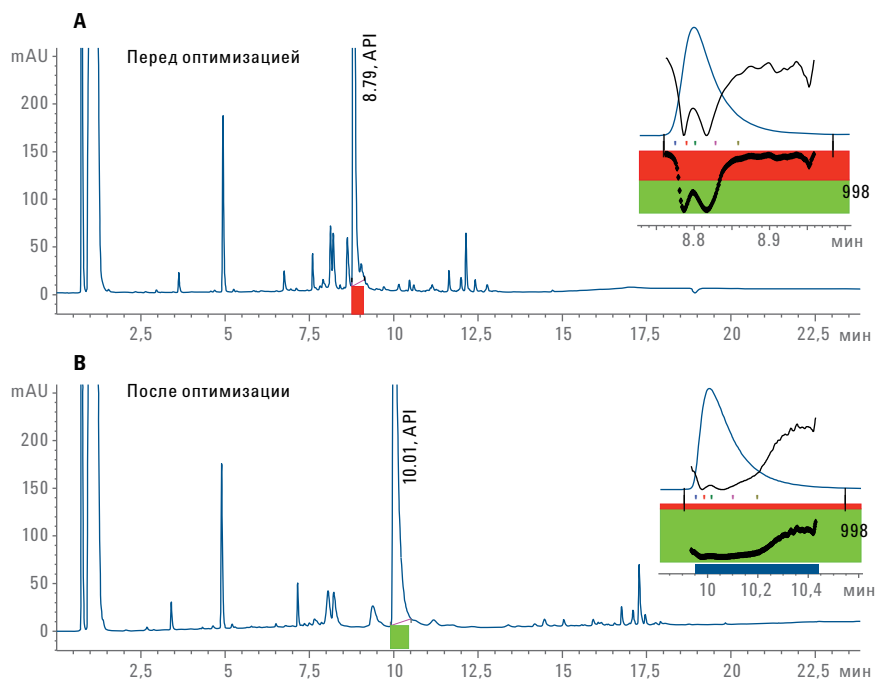


Рис. 5. Для выявления положительной динамики сравнивались хроматографические профили элюирования подвергшегося деградации аторвастатина до и после фазы оптимизации. Соответствующие графики чистоты пиков представлены в виде вставок. Пик АФИ перед этапом оптимизации не прошел испытания на чистоту (обозначено красным под пиком АФИ). После включения оптимизированных параметров методов чистота пиков проходит испытание со значением 99,8% (обозначено зеленым).

Таблица 9. CMV использовались для исследования надежности и измерения отклонений

CMV	Кодированное название*	Номинальный метод	Диапазон надежности
Расход насоса (мл/мин)	A	0,6	±0,01
Температура термостата (°C)	B	33	±1
pH	C	6,76	±0,1
Концентрация буфера (мМ)	D	10	±0,5
Объем ввода пробы	E	1	±0,1

\*В моделях, демонстрирующих несколько взаимодействий, использовались кодированные названия.

Таблица 10. Наблюдавшиеся отклонения всех СМА для исследований надежности

СМА	Средн.	ОСО
Тангенциальное разрешение АФИ	2,7	3,3%
Область АФИ	4504,5	1,9%
ВУ АФИ	10,0	0,7%
ВУ АDPK*	9,2	0,67%

\*Соседний пик

## Выводы

Надежный аналитический метод хроматографического разделения окисленного аторвастатина был разработан и валидирован с помощью системы разработки методов для ВЭЖХ Agilent серии 1200 Infinity и автоматизированного метода на основе подхода QbD и ПО для валидации Fusion QbD (S-Matrix). АФИ был эффективно отделен от пиков сопутствующих примесей при среднем тангенциальном разрешении 2,7 и показал чистоту пиков 99,8%. Разработанный метод подходил для разделения 43 пиков, при этом 35 пиков имели тангенциальное разрешение  $\geq 1,50$ . Спрогнозированные с помощью ПО оптимизированные условия были экспериментально верифицированы. Достигнутая с помощью Fusion QbD надежность включала в себя несколько моделей взаимодействия переменных. Подход к разработке методов QbD помог лучше изучить критические переменные методов, что позволяет снизить риск отказов в работе во время валидации и передачи метода. Автоматизированный подход к разработке методов QbD с применением ПО Fusion QbD позволяет разработать надежный метод значительно быстрее, чем при разработке метода вручную.

Таблица 11. На примере показан отчет о надежности тангенциального разрешения API из Fusion QbD.

Название параметра модели	Уровень испытания надежности (закодирован)	Спрогнозированное влияние поля допуска	Спрогнозированная стандартная ошибка поля допуска	Спрогнозированная статистика поля допуска	Прошел/не прошел
(D) <sup>2</sup>	1,0000	-0,08464231348	0,0712	-1,1894	Прошел
(E) <sup>2</sup>	1,0000	0,05480284456	0,0775	0,7073	Прошел
C*D	1,0000	0,05084585269	0,0739	0,6884	Прошел
D*E	1,0000	-0,03184544154	0,0766	-0,4159	Прошел
D	1,0000	-0,03094020681	0,0712	-0,4348	Прошел
(C) <sup>2</sup>	1,0000	0,02825316236	0,0712	0,3968	Прошел
C*E	1,0000	-0,01662310268	0,0763	-0,2180	Прошел
E	1,0000	0,01558544704	0,0775	0,2011	Прошел
C	1,0000	0,01456864789	0,0712	0,2046	Прошел
A*C	1,0000	0,01253588742	0,0742	0,1688	Прошел
A*E	1,0000	-0,00978673976	0,0767	-0,1276	Прошел
A	1,0000	0,00682243132	0,0731	0,0933	Прошел
(A) <sup>2</sup>	1,0000	0,00567516215	0,0731	0,0776	Прошел
A*D	1,0000	0,00042223391	0,0745	0,0057	Прошел

## Литература

1. International Conference on Harmonization (ICH) Q8 (R2): Pharmaceutical Development 1. (August 2009). <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html/>
2. Vogt, *et al.* Development of Quality-By-Design Analytical Methods. *J. of Pharma. Sci.* March **2011**, *100*, No. 3, pp 797-812.
3. Reid, G.; *et al.* Analytical Quality by Design (AQbD) in pharmaceutical Development. *American Pharmaceutical Review* August **2013**, 144191.
4. Thorsten, V.; *et al.* Quality by design for a vaccine release immunoassay: a case study. *Bioanalysis* **2013**, *5(20)*, pp 2531-2545.
5. Verseput, R.; *et al.* A Quality-by-Design methodology for rapid LC method development, Part 1. *LCGC North America* Dec **2008**.
6. Verseput, R.; *et al.* A Quality-by-Design methodology for rapid LC method development, Part II. *LCGC North America* Jan **2009**.
7. Mcbrien, M. Practical Implications of Quality by Design to Chromatographic Method Development. *Chromatog. Today* May/June **2010**, pp 30-34.
8. Lateef, S.; Vinayak, A. K. Stability Indicating Method Development for Linagliptin Drug Product using Quality-by-design, *Agilent Technologies*, Bangalore, India, publication number 5591-3834EN.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014  
Напечатано в США 1 августа 2014 г.  
5991-4944RU



**Agilent Technologies**