

Technical Report

Analytical Quality by Designアプローチに基づく頑健な分析法開発の効率化

Efficient development of robust method based on Analytical Quality by Design

藤崎 真一¹、渡辺 覚¹、川瀬 智裕¹、藤田 雄一郎¹、松本 恵子¹

Abstract:

本稿では、分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions™ MDを用いたAnalytical Quality by Design (以下: AQbD) に基づく頑健な分析法開発の効率化について、低分子医薬品化合物の一斉分析条件の検討を通して紹介します。AQbDに基づいた分析法開発は、分析法の初期スクリーニング (Screening)、最適化 (Optimization)、頑健性評価 (Validation) というフェーズから成り立っています。これら各フェーズに対して、実験計画法を用いた分析の実施、分析結果に対するデザインスペースの構築、最適な分析条件決定後の頑健性評価を適用することで、一連の分析法開発のワークフローをLabSolutions MDで完結できます。

Keywords: LabSolutions MD、AQbD、分析法開発、メソッド開発、メソッドスカウティング、実験計画法

1. 背景

医薬品規制調和国際会議 (ICH) より、ICH-Q14にてAQbDに基づいた分析法開発への取り組みが議論されています。AQbDに基づいた分析法開発では、実験計画法等の効率的な実験により得られたデータに基づき、分析結果に対するパラメーターの有効領域をデザインスペースとして可視化することが推奨されています。科学的な根拠とリスクをベースとしたアプローチにより、経験と勘に頼らない網羅的な分析法の検討がなされ、頑健で低リスクの分析法が開発可能となります。

2. LabSolutions MDの概要

LabSolutions MDは、AQbDに基づく一連の分析法開発のワークフローの効率化を支援します (Fig. 1)。本ソフトウェアは、移動相やカラムといった各種パラメーターの設定を行い、実験計画法を用いて分析を行う分析機能 (Fig. 2) および得られたデータに対してデザインスペースや予測クロマトグラムの描画を行う解析機能 (Fig. 3) により構成されます。分析機能に関しては、使用する移動相およびカラムを選択することで、自動でそれらを切替えながら分析を実施可能です。さらに、実験計画法を用いた分析回数の最適化により、分析法開発の更なる効率化が可能です。これら実験計画法を用いた分析スケジュール作成に関しては、Fig. 2の①～⑥の6つのステップだけで素早く実行できます。

使用する移動相やカラムは1クリックで選択でき、カラム平衡化も考慮した網羅的なスケジュールが自動で生成されるため、作業の効率化だけでなく、ミスの低減も可能です。解析機能に関しては、ピークトラッキング機能による対象化合物の自動同定、デザインスペースによる各種パラメーターの変動が分析結果に与える影響の視覚化、さらに、任意のパラメーターで分析した際のクロマトグラムのシミュレーションに対応しています。また、分散分析により分析結果に与える各種パラメーターの影響度合いの解析も可能です。本稿では、「初期スクリーニング」、「最適化」、「頑健性評価」といった各フェーズを通して、LabSolutions MDを低分子医薬品化合物の一斉分析条件の検討に適用した事例についてご紹介します。

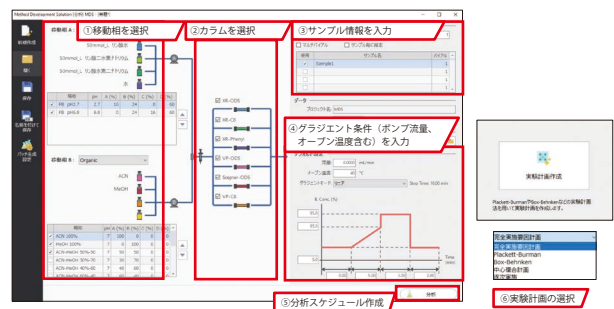


Fig. 2 分析画面

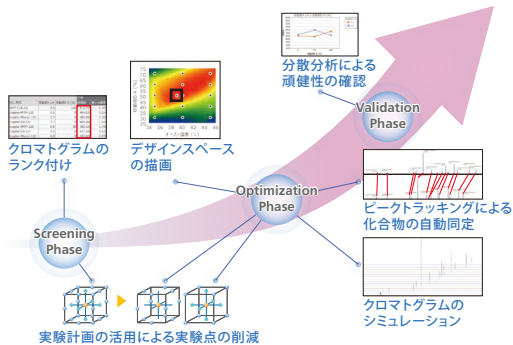


Fig. 1 LabSolutions MDによる分析法開発の効率化

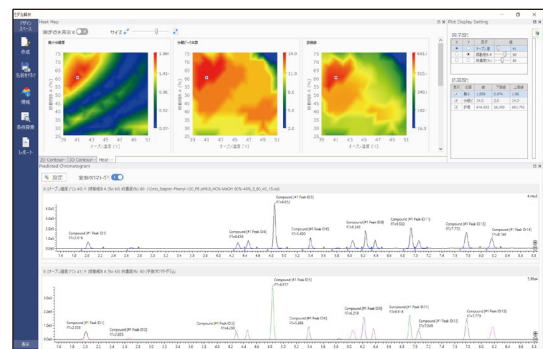


Fig. 3 解析画面

3. 分析

3-1. 分析対象成分

一斉分析条件の検討で対象とした医薬品成分と物性値を Table 1 に示します。複数の分析種が存在する条件にて分析法開発を実施することを想定し、log P および pKa が異なる各種医薬品の混合物をモデルケースとして採用しました。

Table 1 対象成分

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. 分析法の初期スクリーニング

初期スクリーニングでは、保持や分離に大きく影響を及ぼすパラメーターである水系移動相2種類、有機系移動相3種類、カラム6種類の計36点（完全実施要因計画）で分析を実施し、移動相およびカラムのスクリーニングを実施しました（分析条件：Table 2）。水系移動相のpHは酸性又は中性となるように移動相ブレンド機能を用いて自動調製しました。また、有機系移動相の混合も、同様の機能で自動調製しました。分析中に移動相およびカラムの切換も自動で実施されるため、手動で条件を変更して分析する場合に比べて、移動相の調製・置換、カラムの交換といった多くの作業を自動化可能です。

Table 2 移動相とカラムの初期スクリーニング条件

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 水系移動相は以下の組成にて移動相ブレンドにより自動調製しました。

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 有機系移動相は以下の組成にて移動相ブレンドにより自動調製しました。

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. 初期スクリーニングのクロマトグラム

得られたクロマトグラムの一例* (Shim-pack Scepter Phenyl-120) を Fig. 4 に示します。Quinidine と Acetylsalicylic acid に不純物が含まれており、最大で14本のピークが溶出しています。水系移動相のpH、有機系移動相組成、カラムが異なることで、保持や分離が大きく変わることが確認できます。

*その他のカラムで取得したクロマトグラムはアプリケーションニュース (01-00018-JP) に別途掲載しています。

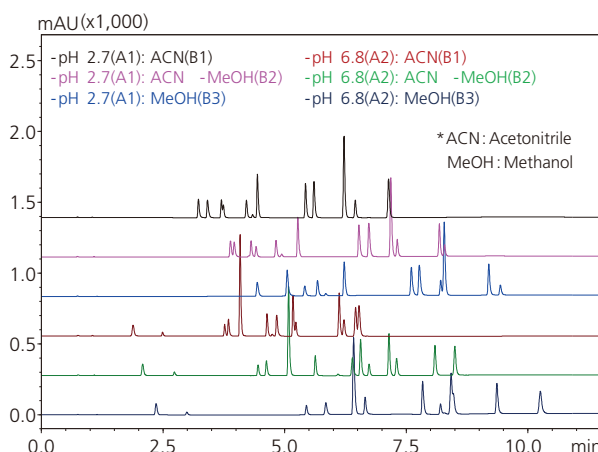


Fig. 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 のクロマトグラム

3-4. 膨大なデータから迅速に最適条件を特定

初期スクリーニングでは検討した条件の数だけクロマトグラムが得られるため、どの条件で目的の分離が得られているかを評価する必要があります。クロマトグラムを全て目視にて確認すると多くの時間がかかります。LabSolutions MDでは、各条件における分離の状態を以下の式1を用いて定量的に評価し、順位付けできるため、素早く簡単に最適な条件を探し出すことができます。

$$(\text{評価値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_p) \dots (\text{式1})$$

評価値はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs: 上限値 3.0) の総和の積により算出されます。Fig. 5 に初期スクリーニングで得られた評価値を高い順に表示した結果を示します。水系移動相には pH 6.8、有機系移動相にはアセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムには Shim-pack Scepter Phenyl-120 を用いた場合に最も高い評価値が得られることが確認できました (Fig 4: 緑色クロマトグラム)。

カラム 略称	移動相 A pH	移動相 B A (%)	応答	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

Fig. 5 各条件の評価値による順位付け (評価値が高い順に表示)

3-5. 分散分析による分離に大きな影響を与えるパラメーターの特定

LabSolutions MDでは、分散分析を用いることで、各種パラメーターが分離に与える影響の大きさを解析することが可能です。そのため、分散分析の結果をもとに、最適化する対象パラメーターの絞り込みの検討ができ、分析法開発の更なる効率化につながります。Fig. 6には各種パラメーターに対する分散分析の結果を示しており、赤枠内の要因である「移動相A pH×移動相B」および「カラム」に関しては、共にp値が0.05以下であることが分かります。p値が0.05以下である要因は、各水準の平均値が水準間で有意に異なると判断できるため、各水準ごとに異なる分離が得られている（分離に与える影響が大きい）と判断できます。

要因効果図	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 (%)	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			

Fig. 6 各種パラメーターが分離に与える影響の解析結果（分散分析）

3-6. 初期スクリーニング結果

初期スクリーニングにより得られた、評価値が最も高い条件をTable 3に示します。水系移動相にはpH 6.8、有機系移動相にはアセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムにはShim-pack Scepter Phenyl-120を用いた場合に最も良い分離が得られることが確認されました。そのため、3.7の最適化フェーズでは、これらの条件をもとに、ポンプのグラジエント条件やカラムオープン温度を含めた更なる検討を実施し、最も頑健性が高くなる分析法構築を行います。

Table 3 評価値が最も高かった条件

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 µL
Temperature	: 40 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-7. 分析法の最適化

初期スクリーニングで選択された水系移動相のpHおよびカラムに対して、有機系移動相組成を5点（30%、40%、50%、60%、70%）、カラムオープン温度を3点（35 °C、40 °C、45 °C）、グラジエント終濃度を3点（75%、80%、85%）設定し、分析法の最適化を実施しました。また、これらパラメーターの変動が最小分離度に与える影響を、縦軸を有機系移動相組成、横軸にオープン温度をとり、デザインスペースとしてFig. 7に示します。

デザインスペースを構築することで、各種パラメーターの変動が最小分離度に与える影響を分布領域全体にわたって可視化できます。また、LabSolutions MDでは、各種パラメーターの分布領域全体の中で最も頑健な条件を提示することが可能（Fig. 7内の黒枠内の点）なため、勘と経験に頼らない頑健な分析法の構築が可能です。最適化の結果、良好な分離度と高い頑健性を有する条件は有機溶媒の混合比率が50%、カラムオープン温度が39 °C、グラジエント終濃度が80%であることが分かりました。ここで、デザインスペース内の任意の点（Fig. 7内の点A）をクリックすると、各種パラメーターを変更した際のクロマトグラムの変化を視覚的に予測することも可能（Fig. 8）であり、分析前に条件を任意に変更した際の分離挙動の確認等に活用できます。

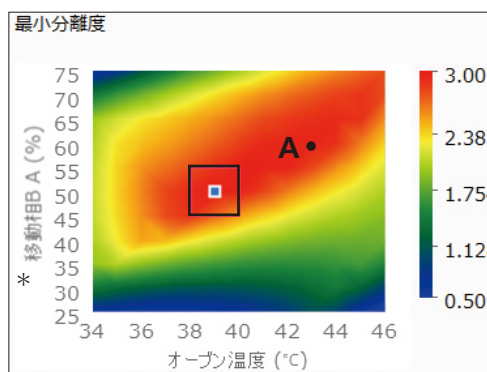


Fig. 7 最小分離度の分布（グラジエント終濃度80%時）
*「移動相 B A」:アセトニトリル



Fig. 8 点A (Fig. 7) における予測クロマトグラムおよび実測クロマトグラム

3-8. ピークトラッキングによる化合物の自動同定

有機系移動相組成やカラムオープン温度といった各種パラメーターを変動させると、化合物の保持時間も変動するため分析ごとに同定を実施する手間がかかります。LabSolutions MDでは、化合物の保持時間の変動に対して、スペクトルの類似度や面積値といった任意の指標を用いることで自動同定（ピークトラッキング）が可能です（Fig. 9）。各種パラメーターの変動により、ピークの溶出位置が変わった際も、すべてのデータに対して素早く、自動でピークを認識するため、同定の手間を大幅に削減することができます。

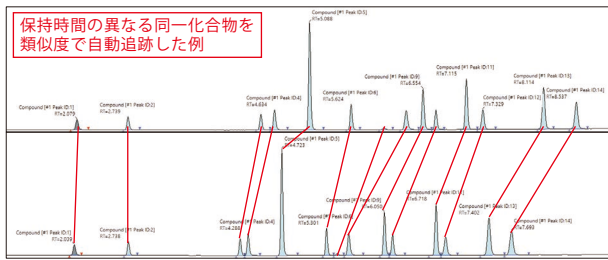


Fig. 9 ピークトラッキング機能による化合物の自動同定

3-9. 最適化結果

最適化により決定された条件をTable 4に示します。デザインスペースにより、有機系移動相はアセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムオープン温度は39℃、グラジエント終濃度は80%を用いた場合に良好な分離度と高い頑健性を有すると判断できました。3.10の頑健性評価フェーズでは、この条件に対して、各種パラメーターを小さい範囲で変動させた際の分離に与える影響を確認することで、分析法の頑健性を評価します。

Table 4 最適化により決定された条件

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 × 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. 分析法の頑健性評価

頑健性の評価は、各種パラメーターが変動した際に、測定値へ与える影響を理解し、分析法の信頼性を確保するために重要です。LabSolutions MDでは、逐次実験計画を用いることで、最適化で決定された条件に対して、各種パラメーターを小さい範囲で変動させた際の分析スケジュールを自動生成し、分離に与える影響を評価可能です。具体的には、有機系移動相組成を1%刻み(49%、50%、51%)で、カラムオープン温度を1℃刻み(38℃、39℃、40℃)で変動させる(Fig. 10の白丸)ことで、各種パラメーターの変動が保持時間および分離度に与える影響を確認しました。Fig. 11に頑健性評価において得られたクロマトグラムを示します。最適化で決定された条件に対して各種パラメーターを変動させた際の分離度および保持時間の変動が極めて小さいことが確認でき、デザインスペースにより導かれた分析法の頑健性の高さが示されました。このように、頑健性の高い分析法を用いることで、典型的な分析能パラメーターである真度や精度の評価といった分析法バリデーションの効率化にも貢献します。

LabSolutionsおよびShim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

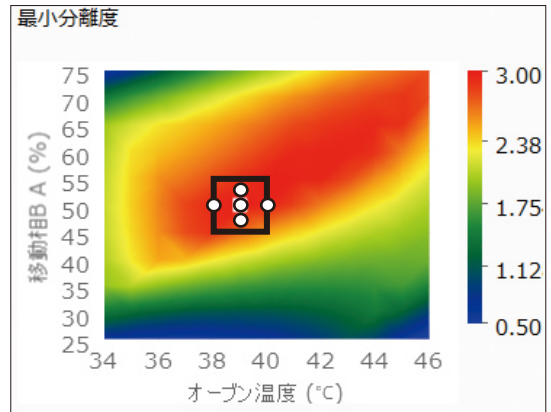


Fig. 10 頑健性評価の際の実験点
*「移動相B A」:アセトニトリル

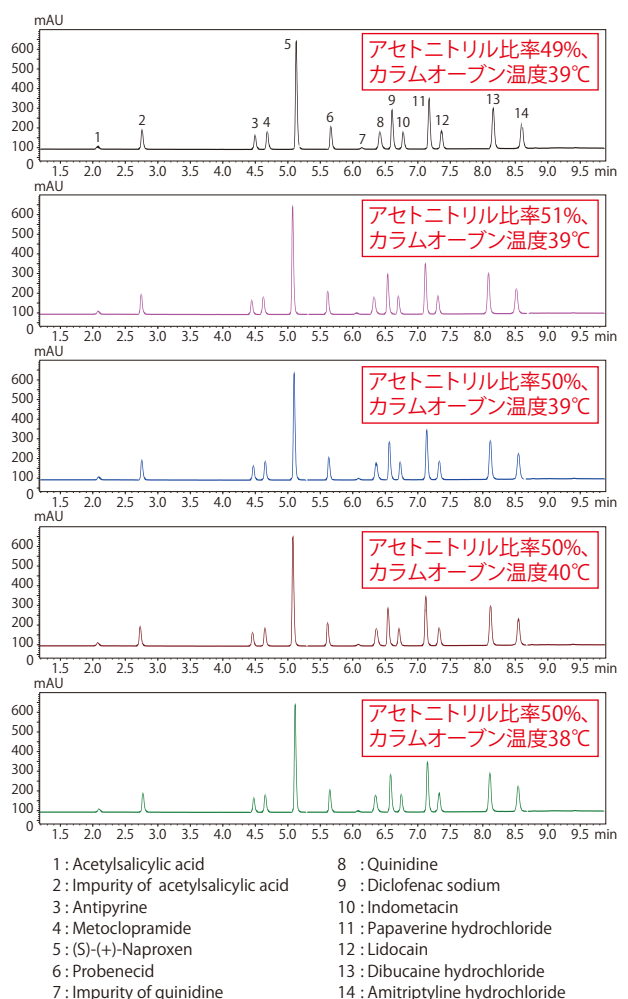


Fig. 11 頑健性評価の各実験点 (Fig. 10の白丸) でのクロマトグラムと対象成分

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 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 |