

应用纪要

## 使用统计软件和“质量源于设计”理念开发用于阿司匹林及相关物质分析的稳定方法

---

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville, Tran Pham

Waters Corporation



---

### 摘要

阿司匹林是一类处方或非处方(OTC)药物，用于治疗关节炎、发烧、轻度至中度疼痛以及预防心血管事件。本

研究介绍了软件辅助开发HPLC方法在阿司匹林活性药物成分(API)及其相关物质分析中的应用。所开发的方法在兼容MS的条件下分离出所有目标分析物，因此适用于采用质谱(MS)法鉴定已知和未知组分。新方法能够快速可靠地分析片剂中的阿司匹林及相关物质。

## 优势

- 使用具有实验数据建模功能的统计软件提高所开发方法的稳定性
- 使用ACQUITY Arc系统在单次实验运行中筛选色谱柱和溶剂，以提高方法开发效率
- 使用ACQUITY QDa检测器采集的质谱数据与UV数据相结合，促进快速准确地鉴定样品组分

---

## 简介

分析方法在药品生命周期的所有阶段都起到至关重要的作用。分析方法产生的数据要用于评估药品质量、有效性和安全性，因此对稳定性、精密度、准确度和可靠性有较高要求<sup>1,2</sup>。

方法开发是一个复杂的过程，涉及一系列步骤，目的在于确定实现稳定且可重现的分离的条件。开发过程需要考察不同参数（例如色谱柱填料、有机溶剂、pH、梯度斜率、流速、柱温）对色谱分离的影响。每次改变一种因素(OFAT)的做法通常会导致性能不稳定，而依托“质量源于设计(QbD)”理念能够快速高效地开发稳定方法。QbD概念一开始是针对药品开发推出的，后来进一步扩展至分析方法开发，并被称为“分析质量源于设计(AQbD)”<sup>1-3</sup>。AQbD是一种系统性方法开发理念，通过结合风险评估和实验设计(DoE)来考察相互作用对方法性能的影响。DoE的输出确定了方法的稳定操作条件区域，该区域称为设计空间<sup>1</sup>。应用AQbD理念与统计工具进行DoE和数据建模，能够促进开发适用且高度稳定的方法，由此提高方法验证和方法转移的成功率。

阿司匹林是一种常用药物，可缓解轻微疼痛和发烧症状，还可用于预防心脏病发作和小中风<sup>5</sup>。阿司匹林可以口服片剂提供，每片含81~650 mg阿司匹林。截至目前，文献中仅发现一种方法可以在不兼容MS的条件下同时分离阿司匹林及其六种相关物质<sup>6</sup>。美国药典在有关阿司匹林片的USP专论中只规定了一种杂质<sup>7</sup>。

在本应用纪要中，我们使用Fusion QbD (S-Matrix Corporation, 美国加利福尼亚州尤里卡) 方法开发软件开发出一种兼容MS的方法来分离阿司匹林API及其相关物质。应用Fusion QbD方法开发软件进行DoE研究、统计数据分析和数学建模，以获得理想的稳定方法。实验采用ACQUITY Arc系统，其集成有PDA和ACQUITY QDa检测器并由Empower色谱数据软件(CDS)控制。最终方法使用与兼容MS的流动相分离所有目标分析物，且适用于分析阿司匹林片剂。

## 实验

### 样品描述

#### 包含阿司匹林及相关物质的混合物

使用稀释剂（含0.1%甲酸的60:40水/乙腈）制备浓度分别为1.0 mg/mL和5.0 mg/mL的相关物质及阿司匹林API的独立储备液。用稀释剂将API储备液稀释至0.1 mg/mL，并加标10%的相关物质。本研究使用的欧洲药典中规定的阿司匹林及其相关物质<sup>6</sup>列于表1中。

化合物	名称	分子式	单同位素质量数 (Da)	结构
阿司匹林API	2-乙酰氧基苯甲酸、O-乙酰水杨酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.04	
杂质A	对水杨酸、4-羟基苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.03	
杂质B	4-羟基-1,3-苯二甲酸、4-羟基间苯二甲酸	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	182.02	
杂质C	水杨酸、2-羟基苯甲酸、邻羟基苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.03	
杂质D	乙酰水杨酰水杨酸、2-(乙酰氧基)苯甲酸	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300.06	
杂质E	2-((2-羟基苯甲酰基)氧基)苯甲酸、双水杨酯	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	258.05	
杂质F	2-乙酰氧基苯甲酸酐、O-乙酰水杨酸酐	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	342.07	

表1.用于方法开发的化合物列表

### 阿司匹林药片

超声处理10 min，使磨碎的片剂溶于稀释剂（含0.1%甲酸的60:40水/乙腈）中，阿司匹林的浓度达到1.6 mg/mL。萃取后，将样品测试溶液在3000 rpm下离心10 min，并用稀释剂稀释至0.1 mg/mL。临分析之前，用0.2 μm尼龙注射器（沃特世部件号WAT200524 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat200524-acrodisc-syringe-filter-nylon-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html>>) 过滤溶液。

### 条件

液相色谱系统： ACQUITY Arc系统，带制热/冷功能的柱温箱，配备被动预加热器

检测器： PDA和ACQUITY QDa

样品瓶： LCMS最大回收样品瓶，容积2 mL，部件号600000670CV

## 方法开发条件

色谱柱： 所有色谱柱尺寸均为4.6 × 100 mm，2.5 μm

XSelect HSS T3

XSelect BEH C<sub>18</sub>

XSelect CSH C<sub>18</sub>

XSelect HSS PFP

柱温： 40 °C

样品温度： 10 °C

进样体积： 10–25 μL

流速： 1–1.5 mL/min

流动相： A: 乙腈

B: 甲醇

C: 100 mM甲酸水溶液

D: 100 mM氢氧化铵水溶液

梯度： 5–95%有机溶剂

清洗溶剂： 灌注/样品清洗： 60:40水/乙腈

密封清洗液： 90:10水/乙腈

检测器设置: PDA: 210–400 nm (提取237 nm下的谱图)

## 最终方法条件

色谱柱: XSelect HSS T3, 4.6 × 100 mm, 2.5 μm

柱温: 40 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 10 μL

流动相: A: 0.1%甲酸水溶液

B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

清洗溶剂: 灌注/样品清洗: 60:40水/乙腈

密封清洗液: 90:10水/乙腈

检测器设置: PDA: 210–400 nm (提取237 nm下的谱图)

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	1.3	95.0	5.0	6
0.10	1.3	95.0	5.0	6
7.00	1.3	5.0	95.0	6
8.50	1.3	5.0	95.0	6
8.60	1.3	95.0	5.0	6
12.00	1.3	95.0	5.0	6

## 质谱条件

质谱检测器:	ACQUITY QDa (extended performance)
电离模式:	ESI-
采集范围:	50-450 m/z
毛细管电压:	-0.6 kV
锥孔电压:	2 V
数据:	质心

## 软件

色谱数据系统(CDS):	Empower 3 FR4 SR2
方法开发软件:	S-Matrix Corporation开发的Fusion QbD软件，版本9.9.0.650 SR2b

---

## 结果与讨论

本研究使用的方法开发理念为：首先确定方法性能目标，并对关键方法参数进行风险评估，然后实施筛选和优化DoE研究（图1）。

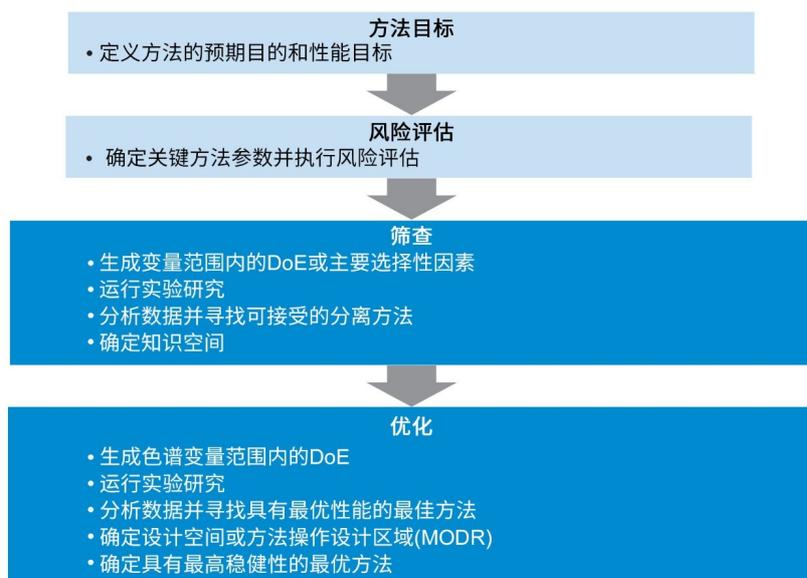


图1.研究使用的方法开发理念

## 方法目标

方法目标是一组分析目标，描述了方法的预期目的、测量内容以及测量的性能标准。对于阿司匹林和相关物质，方法性能目标包括：

- 方法应分离阿司匹林活性药物成分(API)与相关物质，且所有分析物的USP分离度 $\geq 2.5$ 。
- 方法必须在兼容MS的条件下操作以便采用质谱法进行鉴定。
- 方法必须满足系统适应性标准：
  - USP峰拖尾因子 $\leq 1.2$
  - 峰面积的%RSD  $\leq 2.0$
  - 保留时间的%RSD  $\leq 1.0$
- 方法应满足有关阿司匹林片的USP专论中规定的分析可接受标准（90.0~110.0%）<sup>7</sup>，且重复制剂的精密度小于5% RSD。

## 风险评估

在风险评估中，确定并评估关键方法参数(CMP)对方法生成的数据质量的最大影响<sup>1</sup>。根据可靠的色谱科学原理、先前的知识和经验，评估可能对方法满足目标的能力有影响的高风险参数。

对于阿司匹林及相关物质，根据文献中的分析物信息和科学经验来选择风险评估方法参数。在本例中，将色谱柱填料、流动相pH、缓冲液和溶剂类型确定为对选择性、保留性和峰形影响最大的关键方法参数（图2）。因

此，在方法开发的筛选阶段研究这些参数。其他色谱参数（包括流速、梯度时间、斜率和进样体积）可能会影响分析物之间的分离度，但这些参数很容易控制，因此认为其并非关键参数。对于样品前处理，原料药和产品的溶剂选择和萃取程序被视为对分析程序产生的测量值的准确度和精密度以及样品溶液的稳定性具有显著影响。

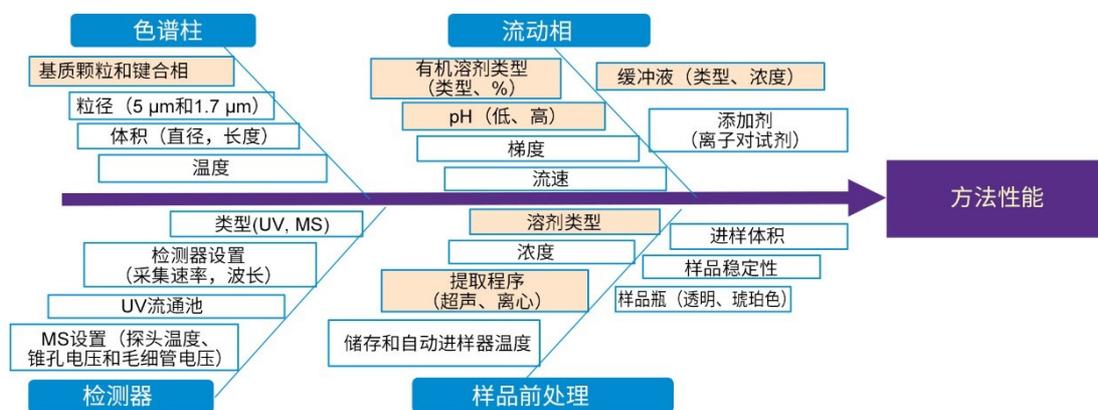


图2.方法参数风险评估的鱼骨图。关键参数用黄色表示。

## 实验设计(DoE)

使用Fusion QbD软件，针对筛选和优化阶段创建了单独的DoE研究。Fusion QbD方法开发软件使用部分因子，从整个实验空间中统一选择随机点，以创建高效的实验设计，与全因子相比，运行次数更少且时间更短<sup>8-10</sup>。将每个阶段的DoE导出至Empower软件，该软件自动生成样品组方法（进样序列），其中包含整个DoE运行的仪器方法、平衡和色谱柱老化步骤。完成运行后，将处理后的数据导入Fusion QbD进行统计分析和数值搜索以确定最佳条件。

## 筛选DoE

筛选目的是确定使阿司匹林API及其相关物质实现有效分离的理想条件。筛选出对选择性影响最大的参数包括色谱柱填料、有机溶剂、pH和梯度时间。本研究选用了不同基质颗粒和键合相的色谱柱，以扩大选择性的范围。使用色谱柱管理器，在一次色谱运行中用乙腈和甲醇筛选所有色谱柱，无需手动切换色谱柱。由于分析物具有酸性，通过混合0.1%甲酸和0.1%氢氧化铵来选择低pH流动相。使用Fusion QbD软件进行DoE筛选研究的变量及其范围包括：

- 色谱柱：CSH C<sub>18</sub>、BEH C<sub>18</sub>、HSS T3和HSS PFP
- 溶剂：乙腈和甲醇
- 流动相pH：2.74、3.40和4.97

- 梯度时间：有机相在7~13 min从5%增加至95%

保持恒定的方法参数包括：流速1 mL/min、进样体积10  $\mu$ L、柱温40  $^{\circ}$ C。将Empower结果和色谱迹线数据导入Fusion QbD软件以生成趋势响应并进行数值搜索，根据用户定义的分​​离目标确定理想方法。

在Fusion QbD软件中输入的方法响应目标设置包括：

- USP分离度 $\geq$ 2.5的峰数量：最大值5~6
- USP拖尾因子 $\leq$ 1.2的峰数量：最大值6~7
- 第一个峰 - 保留性( $k^*$ )：最大值2.0~3.0
- 最后一个峰 - 保留时间：最小值为6~8

数值搜索确定，使用乙腈、8.3 min梯度以及0.1%甲酸水溶液(pH 2.74)和HSS T3色谱柱可以获得理想分离效果。在Empower中，所有峰在这些色谱运行条件下均实现基线分离（图3）。

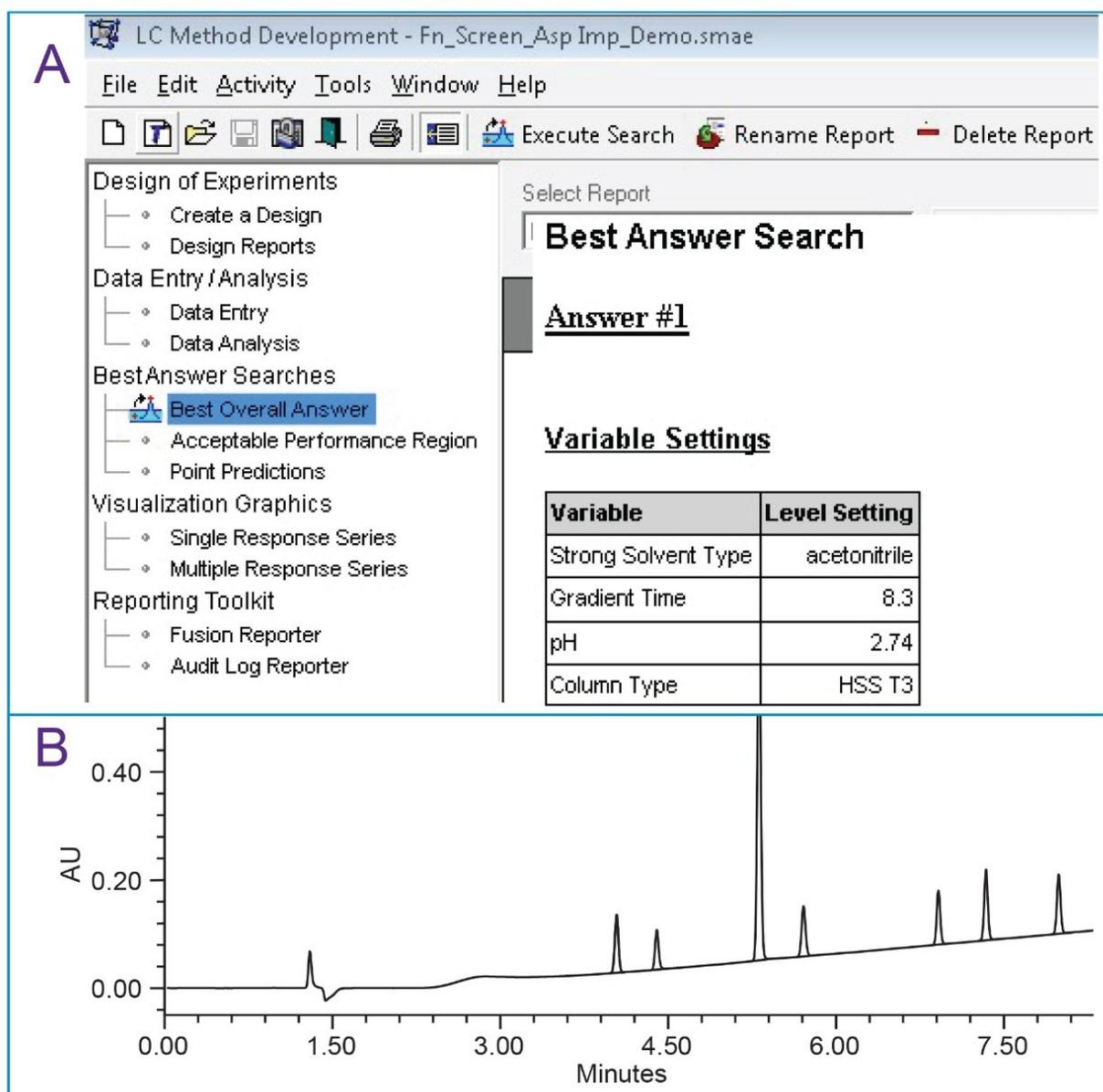


图3.筛选结果。从Fusion QbD软件(A)和Empower中237 nm下的色谱分离(B)中寻找理想方法条件的数值搜索。

## 优化DoE

虽然筛选步骤的方法提供了可接受的色谱分离，但还需要进一步优化这些条件，缩短运行时间并增加进样体积以获得更高的杂质灵敏度，同时满足分离目标设置。优化期间研究了梯度时间、进样体积、流速和柱温的影响。使用Fusion QbD软件进行DoE优化的范围包括：

- 梯度时间：6~8 min

- 进样体积：10~25  $\mu\text{L}$
- 流速：1.0~1.5 mL/min
- 柱温：40~44  $^{\circ}\text{C}$

将结果从Empower导入Fusion后，确定最佳方法为：流速1.3 mL/min，梯度时间7 min，进样体积10  $\mu\text{L}$ ，柱温40  $^{\circ}\text{C}$ 。在这些条件下，中心点(T)处于可接受的性能区域框内（图4）。矩形周围的预测点(A-D)表示方法满足USP分离度、峰拖尾因子、 $k^*$ 和最后一个峰的保留时间目标的置信限。矩形内的区域称为设计空间或方法可操作设计区域(MORD)，其表示可接受且稳定的方法性能区域。总体而言，无阴影区域表示该方法满足所有分离目标设置的条件，而阴影区域则表示不可接受的性能区域。

将图4的预测点(A-D)条件从Fusion导出至Empower，以通过实验验证该方法不受流速和梯度时间变化的影响。色谱数据表明，在该组测试条件下，实现了有效分离（图5）。此外，目视评估响应面图，以检查方法变量对响应（例如USP分离度和峰拖尾因子）的综合影响。例如，梯度时间和流速的影响表明，在梯度时间为7 min时获得了最佳分离度（图6A），在约1.3 mL/min的流速下，峰拖尾因子最小（图6B）。这些结果由红色、平缓的斜率表示。

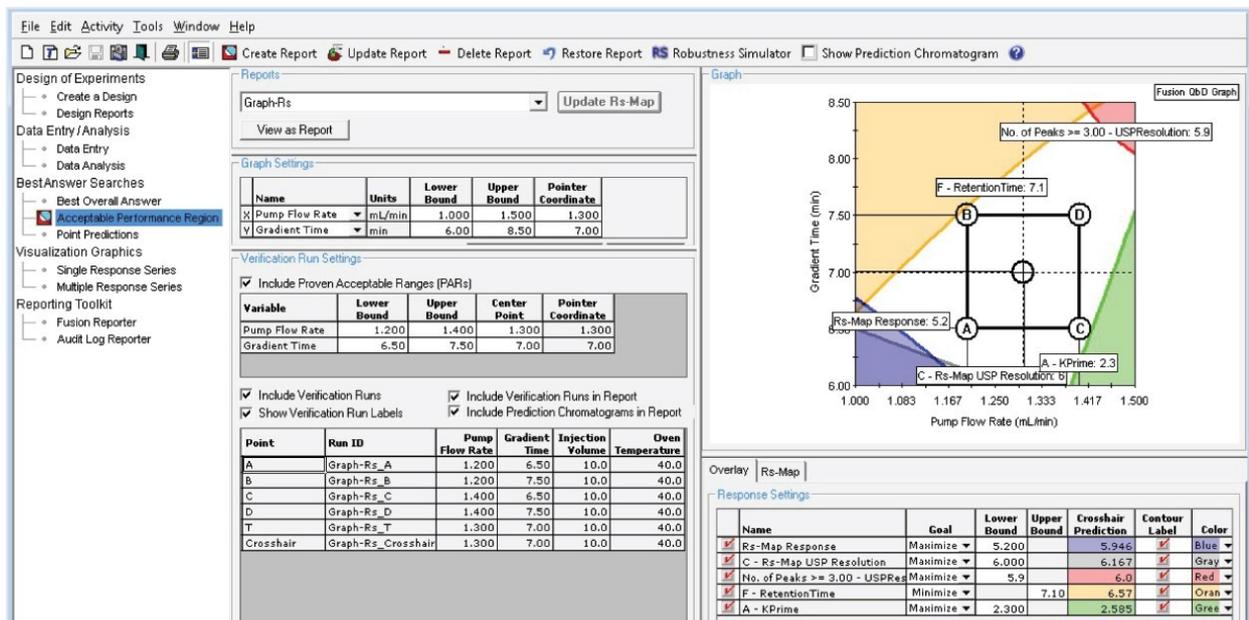


图4. Fusion QbD软件确定的方法可接受性能区域。已证实的可接受范围(PAR)矩形或设计空间，包含可接受方法性能的稳定区域。

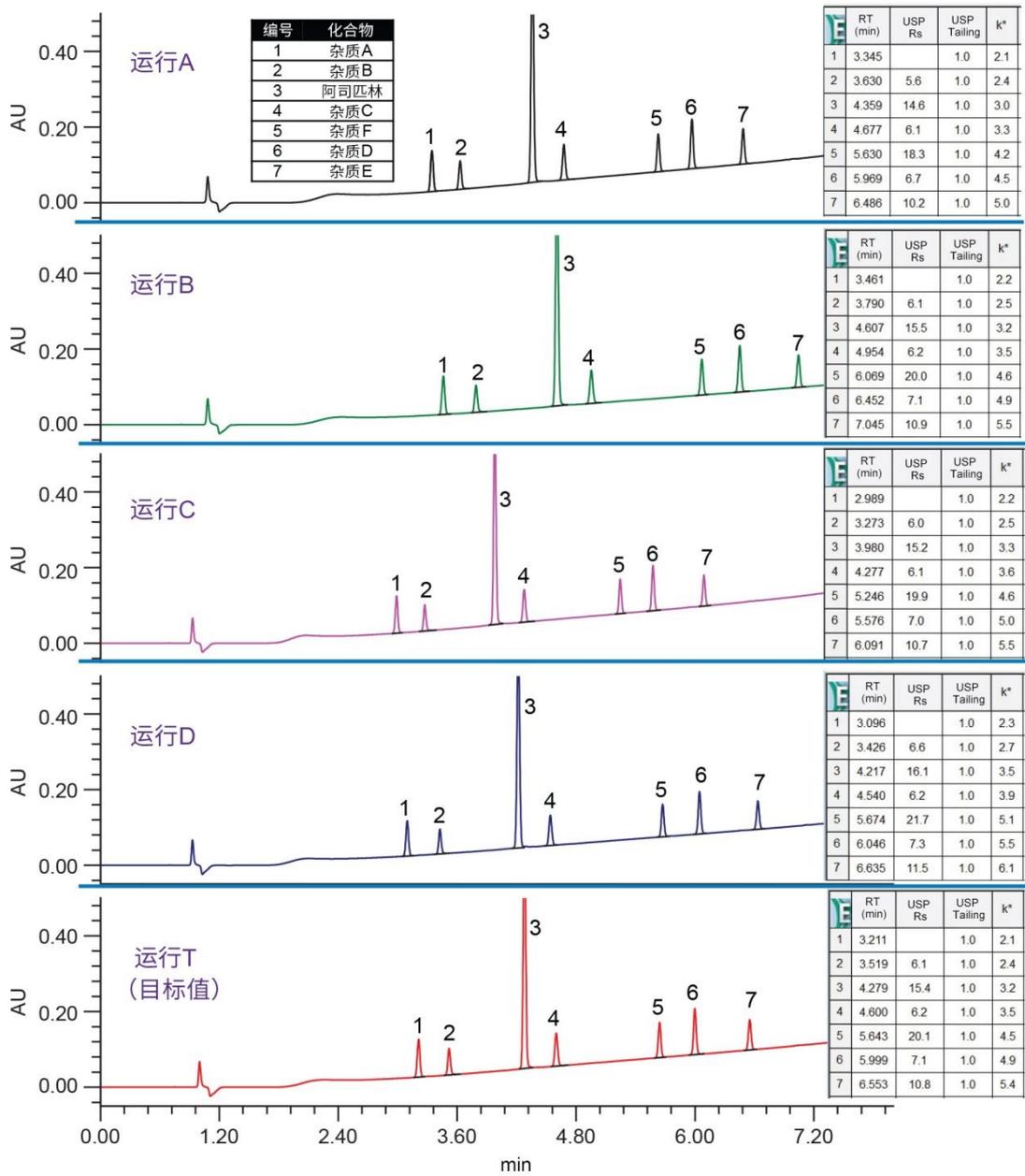
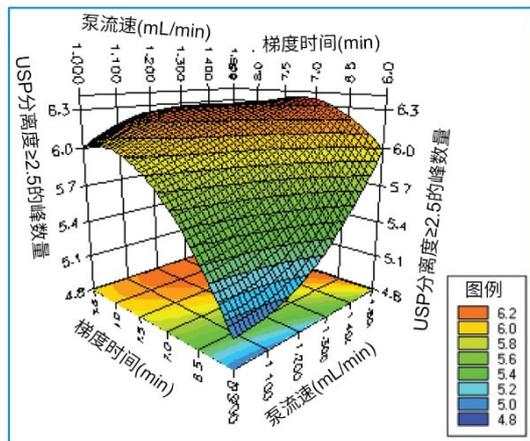


图5.设计空间周围的预测点(A-D)和中心的最终方法（运行T）的验证

A. USP分离度 $\geq 2.5$ 的峰数量, 响应面, 进样体积=10.0; 柱温=40.0



B. USP分离度 $\leq 1.2$ 的峰数量, 响应面, 进样体积=10.0; 柱温=40.0

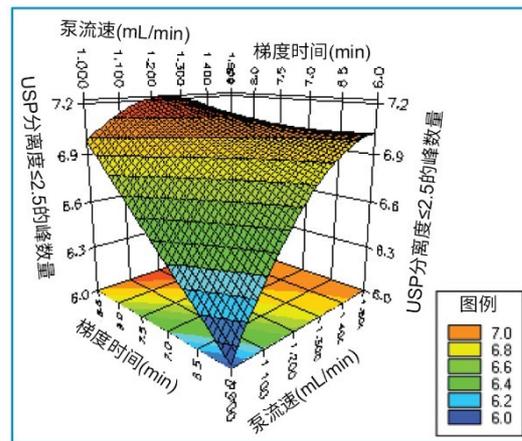


图6.Fusion QbD软件的响应面图, 显示了变量对USP分离度(A)和USP峰拖尾因子的相互作用

## 样品稀释剂的优化

方法开发过程中评估了各种稀释剂的适用性, 以确保阿司匹林在溶液中的溶解性和稳定性。观察到阿司匹林在包含80:20水/甲醇的稀释剂中发生降解, 之前发表的研究指出, 阿司匹林在水性条件下水解为水杨酸(杂质C)<sup>11</sup>。本例中开展了一项研究来考察阿司匹林在不同水与有机溶剂比例的稀释剂中的降解情况。研究将阿司匹林片溶于水与乙腈或甲醇组成的溶剂中(比例为80:20、60:40和50:50, 含0.1%甲酸)。数据表明, 与水/乙腈相比, 阿司匹林在水/甲醇稀释剂中发生了严重降解(图7)。因此, 使用含0.1%甲酸的60:40水/乙腈来制备标样和片剂样品溶液。此外, 所有溶液均储存于-20 °C下。

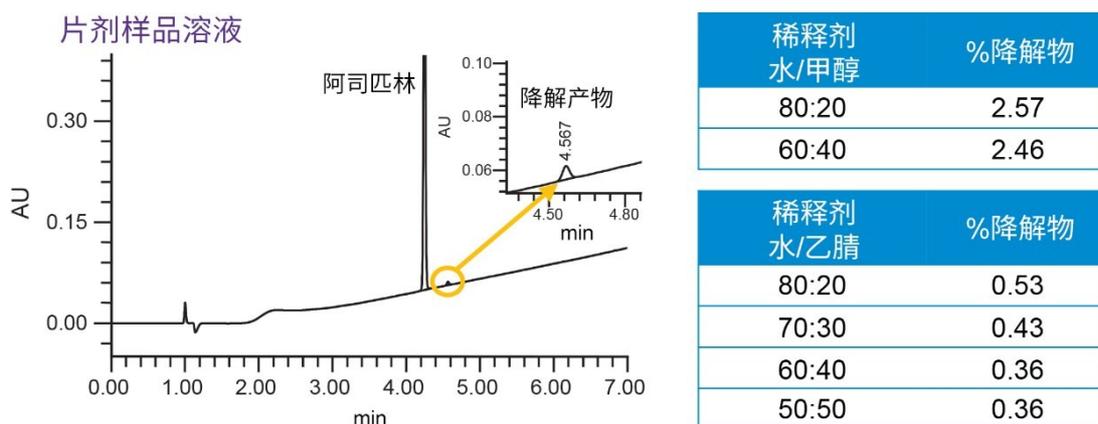


图7.样品前处理方案优化的稀释剂研究。所有稀释剂均包含0.1%甲酸。

## 最终方法

通过将方法产生的结果与方法目标下列出的性能要求进行比较来评估方法开发是否成功。在实验部分所述的兼容MS的条件下操作，最终方法使所有分析物的USP分离度远高于要求的 $\geq 2.5$ ，符合所有系统适应性标准（图8）。通过计算片剂样品溶液中阿司匹林的回收率来确定准确度（图9）。回收率(%)范围为94.2~97.0%，符合有关阿司匹林片的USP专论中列出的分析标准(90~110%)<sup>7</sup>。此外，六份重复制剂的精密度符合质量标准（小于5% RSD）。

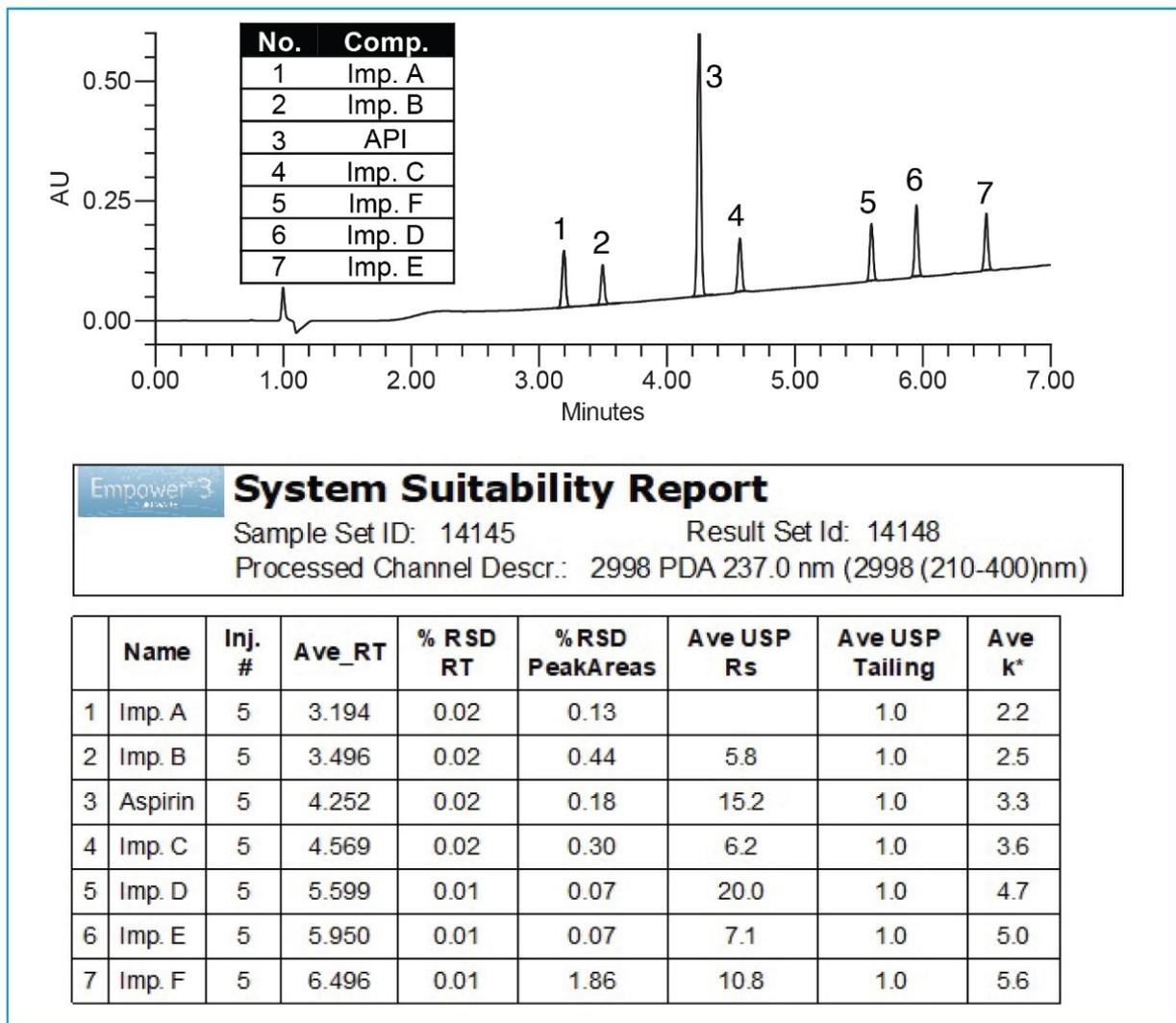


图8.包含阿司匹林API及相关物质的混标重复进样5次所得到的系统适应性结果。最终方法的检测波长为237 nm。

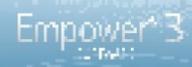
 <b>Accuracy Results</b>				
		Sample Set ID: 2589	Result Set Id: 2735	
		Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 237nm@4.8nm,		
	SampleName	RT	Area	% Rec
1	Tab Prep 1, 0.1mg	4.272	1164309	97.00
2	Tab Prep 2, 0.1mg	4.271	1162569	96.86
3	Tab Prep 3, 0.1mg	4.271	1137353	94.76
4	Tab Prep 4, 0.1mg	4.269	1148391	95.68
5	Tab Prep 5, 0.1mg	4.269	1130876	94.22
6	Tab Prep 6, 0.1mg	4.269	1155648	96.28
Mean				95.8
Std. Dev.				1.1
% RSD				1.18

图9.片剂中阿司匹林API的回收率

## 控制策略

我们根据风险评估和实验研究的结果提出了控制策略，以确定获得一致的性能和符合标准的数据质量输出所需要实施的控制措施。

研究表明，流速和梯度时间对分析物之间分离度的影响最大，使用仪器方法可以设置并轻松控制这些参数。至于样品前处理，应当将阿司匹林API和片剂溶于含40~50%乙腈和0.1%甲酸的稀释剂中。标样和样品溶液应储存于-20 °C下，以尽量减少降解。

## 结论

使用Fusion QbD方法开发软件成功开发出一种稳定、可靠并能快速分析阿司匹林及相关物质的方法。最终方法符合所有方法性能目标和标准。该方法在兼容MS的条件下操作，因此能够使用ACQUITY QDa质谱检测器进行峰鉴定结果确认。将Fusion QbD软件与Empower CDS结合使用，简化了从DoE生成到设计空间建立的整个方法开发过程。无缝接口支持将Fusion DoE快速导出至Empower进行数据采集，并将结果导入Fusion进行统计建模。Fusion生成的响应面图有助于确定对方法响应（例如分离度或峰拖尾因子）影响最大的变量。最后制定了控制策略来确定应当控制的参数，确保方法在日常分析中满足性能目标。

总体而言，应用DoE理念提高了所开发方法的稳定性，并能保障该方法生成的数据质量。使用Fusion QbD方法开发软件、ACQUITY Arc系统和Empower CDS，分析实验室能够快速开发可靠且可重现的分析方法。因此，方法可成功通过验证，并在不同实验室间转移，或者转移至第三方合作伙伴。

---

## 参考资料

1. Tome, T. Zigart, N. Casar, Z. Obreza, A. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Organic Process Research and Development*. 2019, 23, 1784–1802.
2. Guadin, K. Ferey, L. Quality by Design: A tool for Separation Method Development in Pharmaceutical Laboratories. *LCGC*. 2016, 29 (10), 16025.
3. Zigart, N. Casar, Z. Development of a Stability-Indicating Analytical Method for Determination of Venetoclax Using AQbD Principles. *ACS Omega*. 2020, 5, 17726–17742.
4. Proposed New USP General Chapter: The Analytical Procedure Lifecycle <1220>, The United States Pharmacopeia Convention. *Pharmacopeia Forum*, 43(1), Jan-Feb 2017.
5. The American Society of Health-System Pharmacists®  
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682878.html> <  
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682878.html>> , January 2021.
6. Ph.Eur.Monograph. Acetylsalicylic Acid. *The European Pharmacopeia* 10.0.01/2017:0309.
7. USP monograph for Aspirin Tablets. *United States Pharmacopeia* USP 43-NF 38, official May 1, 2020.
8. Fusion QbD Software, LC Method Development User’ s Guide. S-Matrix Corporation.
9. Fusion QbD Software, LC Method Development Tutorial. S-Matrix Corporation.

10. Fusion QbD Software, Data Exchange User's Guide – Waters Empower 2 and 3.S-Matrix Corporation.
11. Bakar, S.K. Niazi, S. Stability of Aspirin in Different Media.Research Articles.1983, 72:9, 1024–1026.

---

## 特色产品

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

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

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

720007177ZH, 2021年3月