

Analytical Quality by Design statt Versuch und Irrtum in der UHPLC-Methodenentwicklung – Wege zur Ermittlung der bewährten Faktorbereiche (PAR) einer UHPLC-Methode

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

Das Quality by Design (QbD)-Konzept der U.S. Food & Drug Administration (FDA) fordert die wissenschaftliche Ausarbeitung des Design Space (gem. ICH Q8) [1], für UHPLC-Methoden. Die Kenntniss der bewährten Faktorbereiche, kurz PAR (Proven Acceptable Range), einer eingereichten UHPLC-Methode steht somit an vorderster Stelle in den Zulassungsanforderungen der Behörden [1,2]. Nachfolgend werden zwei Wege zur Ermittlung der PAR einer UHPLC-Methode vorgestellt.

Mit kommerziell erhältlicher Software zur Computer unterstützten HPLC-Methodenentwicklung (CMD) wird dazu der optimale Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung benutzt. Alleinig zielführend ist es jedoch, den globalen Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung mittels einer Multi-Einflussgrößen- / Multi-Zielgrößen-Modellierung zur Ableitung der PAR zu finden.

Einführung

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Einflussgrößen (Faktoren) und Zielgrößen ab. Solche Faktoren sind zu suchen in der Gradientenzeit (tG), der Temperatur (T), der ternäre Eluentzusammensetzung (tC) des

organischen Eluenten B, der Startkonzentration (%B_s) und Endkonzentration (%B_e) des organischen Eluenten B, dem pH des wässrigen Eluenten A (pH) sowie der Flussrate. Wichtige Zielgrößen sind die Auflösung R_s (Trennung benachbarter Peaks im Chromatogramm) sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm tR_{max} zur Minimierung der Analysenzeit.

Mit kommerziell erhältlicher Software zur Computer unterstützten UHPLC-Methodenentwicklung (CMD) wie DryLab [3] kann kein „globales Optimum“ sondern nur ein „lokales Optimum“ [4] im Design Space einer UHPLC-Trennung ermittelt werden. Aber nur die Findung des globalen Arbeitspunktes der UHPLC-Trennung mit DoE-Software wie MODDE [5] erlaubt die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen zu ermitteln, d.h. die maximale Variation der Faktoren zu erhalten, ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Das hierfür benutzte QbD-Konzept für die Sicherung der Qualität von UHPLC-Trennungen verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer unterstützter UHPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE) [6-14].

3D-Faktorielle CMD-Methode zur Ermittlung der bewährten Faktorbereiche (Proven Acceptable Range) einer UHPLC-Trennung

Mit der 3-Faktor-Optimierung (3D-tG-T-pH-Modell) der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab®4 wurde der lokale Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung ermittelt. Die Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der Optimierung als 3D-tG-T-pH Würfel sowie als Chromatogramm des lokalen Arbeitspunktes

Für die Auflösung des kritischen Peakpaares wurde ein Wert von R_s = 2.4 und für die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm ein Wert von tR_{max} = 3.53 min berechnet und somit die vorgegebenen Zielgrößenspezifikationen R_{s,krit} ≥ 1.5 und tR_{max} ≤ 5min der UHPLC-Trennung erfüllt. Die Einschränkungen dieser 3-Faktor-Optimierung bestehen aber einerseits darin, dass das ermittelte Optimum häufig nicht das „globale Optimum“ sondern irgendein „lokales Optimum“ ist. Es wird möglicherweise am „globalen Optimum“ vorbei optimiert, ohne dass eine Diagnostik oder auch nur eine Strategie existiert, um dies zu erkennen und zu

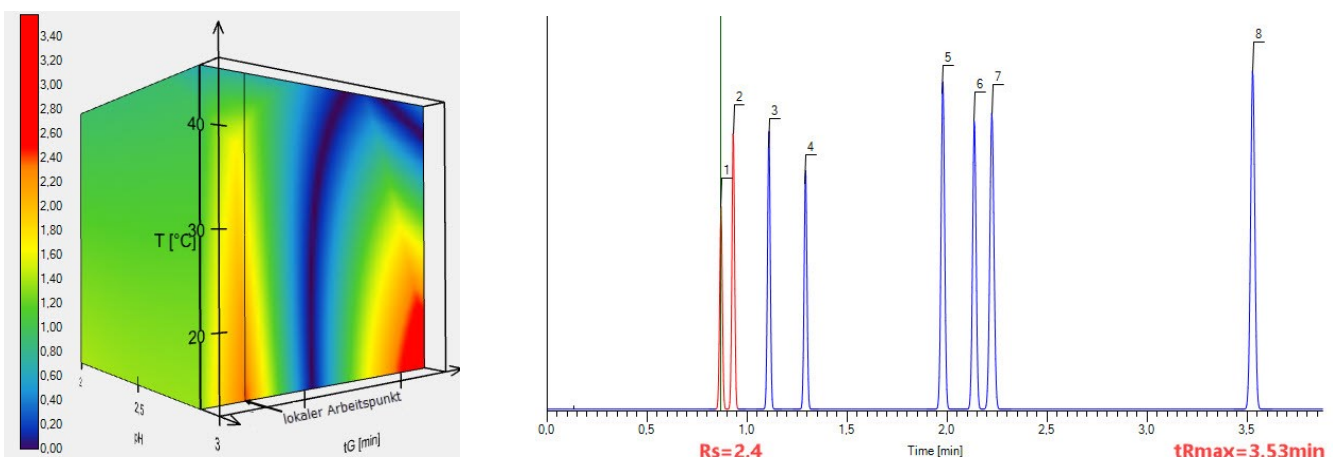


Abb. 1: DryLab®4 3D-tG-T-pH Würfel und Chromatogramm des lokalen, robusten Arbeitspunktes.

verbessern. Andererseits können die multi-dimensionalen Kombinationen und Wechselwirkungen aller signifikanten Faktoren der UHPLC-Trennung, i.d.R. sind es mehr als drei Faktoren, nicht gleichzeitig betrachtet werden, wie in der „Design Space“-Definition gefordert.

Das Robustheits-Modul der chromatografischen Modellierungs-Software DryLab®4 (Abbildung 2) ermittelt für alle 6 Faktoren der UHPLC-Trennung die bewährten Faktorbereiche des gefundenen optimalen Arbeitspunktes. Hierzu werden die Faktoreinstellungen bis zur Erreichung einer Erfolgsrate von 100 % für die Anzahl „Out-of-Specification“ variiert.

Die Robustheit der für eine Auflösung von $R_{s,krit} \geq 1.5$ berechneten Faktorbereiche der UHPLC-Trennung wird belegt durch nachstehende Chromatogramme an den Grenzen der Faktorbereiche, d.h. an den unteren und oberen Faktoreinstellungen für den lokalen Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung (Abbildung 3a/b).

Die Zielgrößenspezifikationen $R_{s,krit} \geq 1.5$ und $tR_{max} \leq 5$ min. der UHPLC-Trennung werden erfüllt. Die UHPLC-Methode ist innerhalb der ausgewiesenen Faktorbereiche (Spezifikationsgrenzen) robust.

Multifaktorielle DoE-Methode zur Ermittlung der bewährten Faktorbereiche (PAR) einer UHPLC-Trennung

Das Auffinden des globalen Arbeitspunktes und der maximalen Einstellbereiche für die Faktoren tG, pH, T, F, %Bs, %Be der UHPLC-Trennung erfolgt nach einer einfachen Systematik, die tatsächlich deutlich mehr chromatographische Erfahrung und Wissen erfordert als etwa Mathematikkenntnisse [15]:

- Definition der Einflussgrößen (Faktoren),
- Definition der Zielgrößen,
- Auswahl von Modell und Versuchsplan,
- Durchführung der Versuche,
- Analyse der Rohdaten,
- Anpassen des Modells,
- Diagnose des Modells,
- Finden des robusten Arbeitspunktes (FindRobustSetpoint-Tool).

Basierend auf den 29 Versuchen eines Reichtschaffner-Versuchsplanes, simuliert mit Rohdaten[16,17] einer DryLab® 3-Faktor-Optimierung, wird eine simultane Optimierung aller 6 Faktoren der UHPLC-Trennung zur Findung des globalen, robusten Arbeitspunktes durchgeführt. Die hierfür benutzte robuste Arbeitspunktfunktion maximiert den Abstand zu den Akzeptanzgrenzen im sechsdimensionalen Design Space der UHPLC-Trennung. In der Tabelle 1 werden die Faktoreinstellungen des mit 100.663.296 Simulationen berechneten

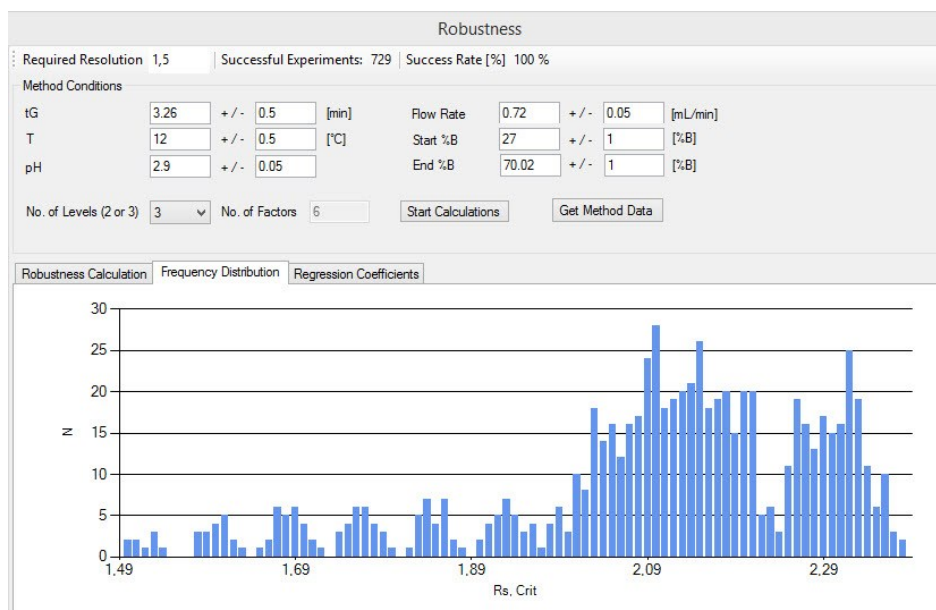


Abb.2: Robustness-Tool für Ermittlung bewährter Faktorbereiche (Faktor tC=ACN, konstant).

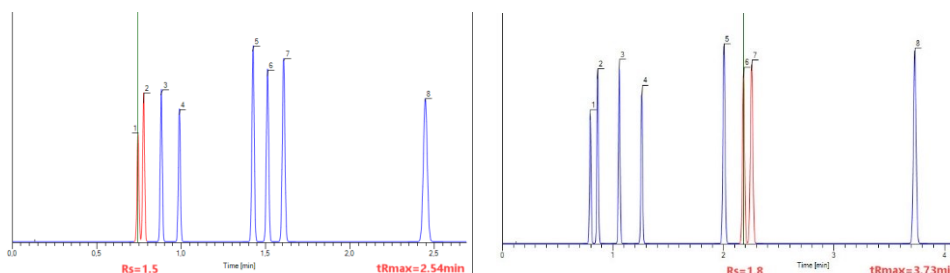


Abb.3a/b: Chromatogramme an Faktorbereichsgrenzen des lokalen Arbeitspunktes.

Tab. 1: Globaler, robuster Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung und Einfluss der Faktor.

Faktoren	robuster Arbeitspunkt	Faktoreinfluss in (%)
Gradientenzeit (tG)	3.40	49.1
Temperatur (T)	19.0	14.3
Startkonz. Eluent B (%B _s)	30.3	7.4
Endkonz. Eluent B (%B _e)	85.7	9.4
pH wässriger Eluent A	2.9	2.8
Flussrate (F)	0.72	17.0

neten robusten Arbeitspunktes und der Einfluss der Faktoren auf die UHPLC-Trennung aufgezeigt.

Den größten Einfluss auf die UHPLC-Trennung weist der Faktor tG mit 49.1 % auf. Am geringsten beeinflusst der Faktor pH mit 2.8 % die Trennung. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen das Ergebnis der simultanen 6-Faktor-Optimierung als Chromatogramm des globalen, robusten Arbeitspunktes und in Form der Visualisierung eines zweidimensionalen Design Space für die Faktoren mit dem größten Einfluss auf die UHPLC-Trennung tG, T, F.

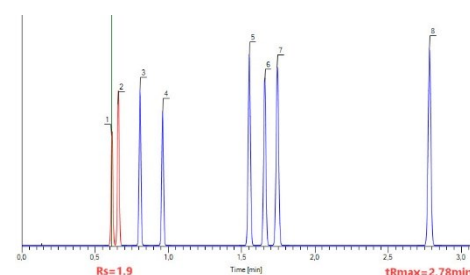


Abb. 4: DryLab®4-Simulation des Chromatogrammes des globalen, robusten Arbeitspunktes.

Für die Auflösung des kritischen Peakpaares wurde ein Wert von $R_s = 1.9$ und für die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm ein Wert von $t_{Rmax} = 2.78$ min. berechnet. Die vorgegebenen Zielgrößen-spezifikationen $R_{s,krit} \geq 1.5$ und $t_{Rmax} \leq 5$ min. der UHPLC-Trennung sind somit erfüllt.

Ableitend vom größtmöglichen regelmäßigen Hyperwürfel im höchst unregelmäßigen Design Space Volumen[18], dem Design Space Hypercube der UHPLC-Trennung (Abbildung 5), wird nun für jeden Faktor der UHPLC-Trennung der „bewährte“ Bereich ermittelt.

Mit der erhaltenen „Design Space Hypercube“-Grafik (Abbildung 6) werden die maximalen Faktor-Einstellungen tabellarisch durch die Werte für „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ ausgewiesen und in einem Balkendiagramm auch grafisch dargestellt.

Die mit DryLab® simulierten Chromatogramme (Abbildung 7a/b) an den Faktoreinstellungsgrenzen „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ des hochdimensionalen Design Space belegen die Einhaltung der vorgegebenen Spezifikationen ($R_{s,krit} \geq 1.5$, $t_{Rmax} \leq 5$ min.) für die maximale Variierung aller 6 Faktoren mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1%.

In der Tabelle 2 werden die mit statistischer Versuchsplanung (DoE) und Computer unterstützter UHPLC-Methodenentwicklung (CMD) ermittelten bewährten Faktorbereiche für die UHPLC-Trennung gegenübergestellt.

Die erlaubten Variationen der Faktoren um den globalen, robusten Arbeitspunkt sind wesentlich größer als erlaubten Variationen der Faktoren um den optimalen, robusten Arbeitspunkt.

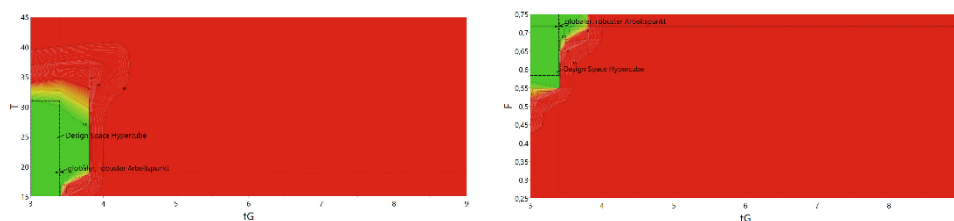


Abb. 5: Design Space tG-T und tG-F für die Faktoren mit dem größten Einfluss auf die UHPLC-Trennung.

Design space hypercube				
Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,8	
T	19	15	31	
%Bs	30,3333	27	33	
%Be	85,6667	85,6667	94,3333	
pH	2,93333	2	3	
F	0,716667	0,583333	0,716667	

Abb. 6: Design Space Hypercube für die maximale Variierung der Faktoren um den globalen, robusten Arbeitspunkt.

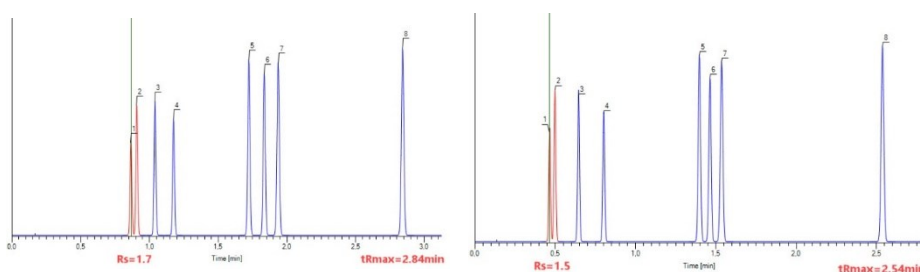


Abb. 7a/b: DryLab®-Simulation der Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für die maximale Variierung aller 6 Faktoren.

Zusammenfassung

Die Findung des globalen, robusten Arbeitspunktes führt zu wesentlich breiteren bewährten Faktorbereichen (PAR) unter Einhaltung der Zielgrößen-spezifikationen ($R_{s,krit} \geq 1.5$, $t_{Rmax} \leq 5$ min) im Vergleich zur Ableitung der bewährten Faktorbereiche aus den lokalen, robusten Arbeitspunkt und ist somit alleinig zielführend für die Ermittlung von gesicherten Spezifikationsgrenzen für die Faktoren der UHPLC-Trennung.

Tab. 2: Ermittelte Proven Acceptable Range (Toleranzgrenzen) in Abhängigkeit der Multi-Faktor-Optimierung.

Einflussgröße	Einheit	Bewährten Faktorbereiche (Toleranzgrenzen)			
		Globaler Arbeitspunkt (DoE)		Lokaler Arbeitspunkt (CMD)	
Gradientenzeit	min	3.0	3.8	2.8	3.8
Temperatur	°C	15	31	11.5	12.5
Temäre Eluentzusammensetzung	Vol.% MeOH in ACN	0.0	0.0	0.0	0.0
Startkonzentration Eluent B	Vol.%B	27	33	26	28
Endkonzentration Eluent B	Vol.%B	85.7	94.3	69	71
pH wässriger Eluent A	pH-Einheit	2.0	3.0	2.8	2.9
Fluss	ml/min	0.6	0.7	0.7	0.8

Referenzen

- [1] International Council for Harmonization (ICH) Q8(R2): Pharmaceutical Development (August 2009).
- [2] M. Nasr, FDA, Lecture on "Quality by Design in HPLC: The Balance Between Chromatography and Chemometrics" at Pitts-burgh Conference, Atlanta, USA, March 2011.
- [3] S. Chatterjee, Considerations for Analytical Methods - FDA Perspective, IFPAC Annual Meeting Baltimore, January 25, 2013
- [4] DryLab®4.0 Software – zur Computer gestützten Optimierung von drei HPLC-Faktoren, Molnár-Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)
- [5] M. Pfeffer. in HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim 2006. 627-650.
- [6] MODDE®Pro 12.0.1 Software – zur Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Optimierung von mehr als 3 UHPLC-Faktoren und mehr als 1 Zielgröße, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea 2017
- [7] H.W. Bilke und S. Moser, LABORPRAXIS 4 (2013)
- [8] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 8 (2014)
- [9] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 9 (2015)
- [10] H.W. Bilke und A. Orth, LABORPRAXIS 11 (2016)
- [11] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 4 (2017)
- [12] H.W. Bilke und A. Orth, *Analytik News* Sept. 2016
- [13] H.W. Bilke, *Analytik News* Nov. 2016
- [14] H.W. Bilke, *Analytik News* Juni 2017
- [15] A. Orth Frankfurt University of Applied Sciences, Umesoft GmbH, Eschborn, Deutschland (2016)
- [16] Versuchsdurchführung und Peakzuordnung durch R. Kormany Egis Plc., Budapest, Ungarn und I. Molnár, H.-J. Rieger Molnár -Institut, Berlin, Deutschland (2015)
- [17] Bereitgestellt durch I. Molnar, Molnár -Institut, Berlin, Deutschland
- [18] C. Vikström "Robust Optimization", MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014).