

## Quality by Design in der HPLC

### Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

Eine Prüfung auf Robustheit einer HPLC-Methode wird in der Praxis überwiegend nach der OFAT-Methode (one-factor-at-a-time) ausgeführt. Bei diesem 1-dimensionalen Modell verändert der Anwender im Labor auf Grundlage seiner Erfahrungen möglichst wichtige Methodenparameter einer HPLC-Trennung – in der statistischen Versuchsplanung als Faktoren oder Faktoren bezeichnet – einzeln und nacheinander, wobei alle anderen Methodenparameter konstant gehalten werden. Diese Vorgehensweise ist sowohl zeit- als auch kostenintensiv und kann zu falschen Aussagen hinsichtlich der Robustheit führen, wenn sich Faktoren gegenseitig beeinflussen. Für eine Validierungsaussage ist es aber wichtig zu wissen, welche Änderungen der experimentellen Parameter der HPLC-Trennung erlaubt werden können. Eine wesentlich aussagekräftigere Arbeitsweise ist die mehrdimensionale Robustheitsprüfung.

Die Basis dafür ist, ein umfassendes Verständnis des flüssigchromatographischen Trennprozesses und ein definierter Designspace<sup>1</sup>. Nur wenn man vorhersagen kann, wie sich der chromatographische Trennprozess verhalten wird, kann man für sich beanspruchen, den Vorgang wirklich zu verstehen.

In dem „HPLC-Designspace“ sind die Faktoren der HPLC-Trennung zu einem definierten Risikoniveau für alle vorgegebenen Spezifikationen erfüllt.

Für eine sichere Einschätzung des Design Space benötigt man einen gut strukturierten Ansatz und eine hohe Datenqualität. „QbD-Design of Experiments“ (DoE = statistische Versuchsplanung) ist der effektivste Ansatz um diese Ziele zu erreichen. Mithilfe der DoE-Software werden in vergleichsweise wenigen Experimenten Ursache und Wirkung von HPLC-Trennprozessen definiert und visualisiert. Auch den Anforderungen der Behörden nach einer sicheren Abschätzung eines robusten Arbeitspunktes sowie robuster

Arbeitsbereiche für alle Faktoren kann durch diesen Ansatz Folge geleistet werden.

In diesem Artikel wird eine strukturierte Methodik zur Beurteilung der Robustheit der Trennung einer HPLC-Methode vorgestellt, die mit Findung des robusten Arbeitspunktes und der bewährten Faktorenbereiche (PAR) die Robustheit einer HPLC-Trennung hinreichend charakterisiert.

Als Ergebnis der Untersuchungen werden zwei Vorgangsweisen zur Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung auf ihre Eignung verglichen und diskutiert.

#### Einführung

Gerade, weil die Flüssigchromatographie (LC) die weltweit weitverbreitetste analytische Technik ist, bedeutet dies nicht automatisch, dass es auch die zuverlässigste Technik ist. Jede LC-Methode wird früher oder später versagen. Wie robust ist meine HPLC-Trennung? Die **Guideline ICH Q2A** definiert Robustheit wie folgt: „Die Robustheit einer analytischen Methode ist ein Maß für deren Fähigkeit, von kleinen, aber absichtlichen Veränderungen der Methodenparameter unbeeinflusst zu bleiben und sie liefert somit einen Hinweis auf deren Funktionssicherheit bei normalem Einsatz“. Dies wird ergänzt durch eine Aussage zur Robustheitsprüfung von Q2B: „Eine Beurteilung der Robustheit sollte während der Entwicklungsphase berücksichtigt werden und ist von der Art der zu untersuchenden Arbeitsmethode abhängig. Die Robustheit sollte die Verlässlichkeit einer Analyse in Bezug auf absichtliche Änderungen der Methodenparameter darstellen“.

Beide Zitate beziehen sich auf „absichtliche“ Änderungen der Methodenparameter. Das bedeutet, dass wir ganz bewusst testen müssen, was geschehen wird, wenn die Methodenparameter so geändert werden, wie es bei einem Störfall oder anderen regulären Änderungen der Methode passieren könnte. Der Robustheitstest ist durchzuführen, bevor

die HPLC-Methode in den Routineeinsatz geht, d.h. vor der Methodvalidierung. Die Prüfung auf Robustheit hilft Schwachstellen der Trennung der HPLC-Methode zu erkennen.

Noch sehr häufig wird hierbei das Screening der einzelnen Faktoren schrittweise vorgenommen. Das immer noch vorherrschende Verfahren, einen Parameter zu variieren, alle anderen konstant zu halten und dann nach dessen Untersuchung den nächsten zu variieren, führt schnell zu einem ausufernden Aufwand mit geringem resp. falschem Informationsgehalt.

In der pharmazeutischen Analytik von kleinen Molekülen können je nach Molekül für das Screening einer HPLC-Trennung bis zu 10 Faktoren sowie deren Wechselwirkungen signifikant sein.

Die Strategie der 3-Faktor-Optimierung mit der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab<sup>®4</sup> brachte einen wesentlichen Fortschritt für das Aufspüren und Verifizieren eines optimalen Arbeitspunktes der HPLC-Trennung. Die Einschränkungen dieser 3-Faktor-Optimierung bestehen aber einerseits darin, dass das ermittelte Optimum häufig nicht das „globale Optimum“ ist sondern irgendein „lokales Optimum“. Es wird möglicherweise am „globalen Optimum“ vorbei optimiert, ohne dass eine Diagnostik oder auch nur eine Strategie existiert, um dies zu erkennen und zu verbessern. Andererseits können die multidimensionalen Kombinationen und Wechselwirkungen aller signifikanten Faktoren der HPLC-Trennung, i.d.R. sind es mehr als drei Faktoren, nicht gleichzeitig betrachtet werden, wie in der „Design Space“-Definition gefordert.

Ein mehr als drei Methodenparameter sowie mehr als eine Zielgröße umfassendes Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung ist z.B. durch Verknüpfung von chromatographischer Modellierungssoftware z.B. DryLab<sup>®42</sup> und statistischer DoE-Software z.B. MODDE 11 Pro<sup>®3</sup> realisierbar.

### Sequentielles Screenen einer HPLC-Trennung

Diese Arbeitsweise des sequentiellen Screenen ist in der Regel sehr zeitaufwändig und führt dazu, dass die „wahren“ Einstellbereiche für die Faktoren nicht gefunden werden können (Tabelle 1).

Je nach ausgeführter Sequenz werden unterschiedliche optimale Arbeitspunkte (Arbeitspunkte so nahe wie möglich am Ziel) gefunden. Die Überlagerung der 4D Plots (Abbildung 1) der Faktoren pH, %Bs, tC, T mit dem größten Einfluss (>83 %) auf die HPLC-Trennung bestätigen die Aussage zur gefundenen Abhängigkeit des optimalen Arbeitspunktes von der sequentiellen Arbeitsweise.

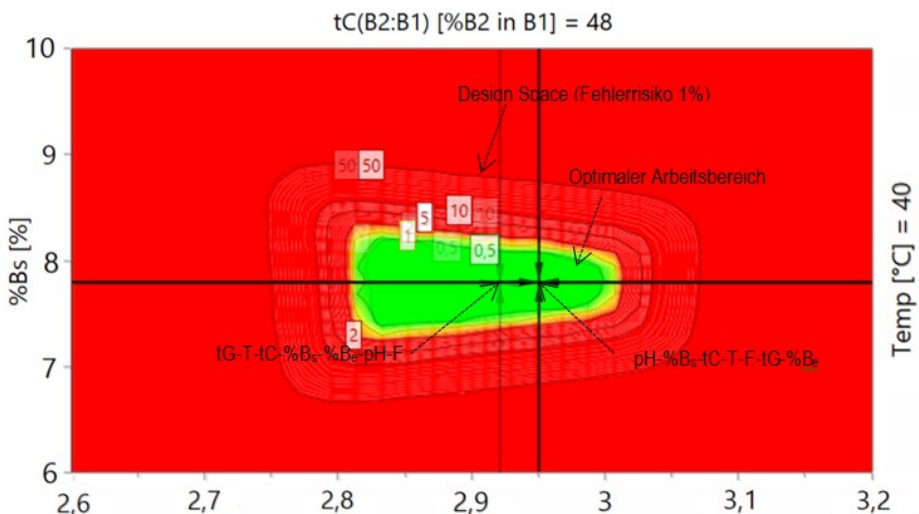


Abb. 1: Design Space pH-%Bs-tC-T Plots mit optimalen Arbeitspunkten und optimalen Arbeitsbereichen des sequentiellen 7-Faktor-Screenings1

### Empirisches Prozessmodell zum simultanen Screenen einer HPLC-Trennung

Mit der statistischen Versuchsplanung (Abbildung 2) gelingt es nun mit möglichst wenigen strukturierten Versuchen, maximale Information über den Wirkzusammenhang zwischen mehr als drei signifikanten Faktoren und mehr als einer Zielgröße einer HPLC-Trennung zu erhalten. Dabei treten häufig Zielkonflikte auf. Einstellungen der Faktoren, die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen ungünstig sein. Um robust zu screenen, ist sowohl ein Multi-Faktoren-Modell als auch ein Multi-Zielgrößen-Modell notwendig.

### Faktoren der Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung

Zur Problemlösung „7-Faktor-Modell“ wird nun Einfluss und Wechselwirkung der Faktoren sowie der Zielgrößen auf die Robustheit der HPLC-Trennung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (SVP) untersucht und visualisiert. Den Faktoren wird meist ein wesentlicher Einfluss auf die Qualitätsmerkmale unterstellt. Sie werden deshalb innerhalb der SVP methodisch untersucht. Vor der Untersuchung muss die Variation festgelegt werden, die die Faktoren im Versuch annehmen sollen (Tabelle 2).

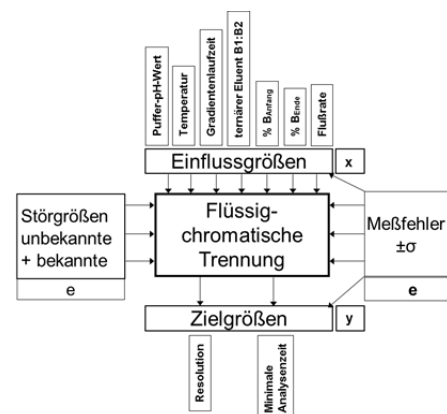


Abb. 2: Empirisches Prozessmodell einer 7-Parameter-Robustheitsprüfung

Tab. 1: Optimale Arbeitspunkte der Sequenzen tG, T, tC, %Bs, %Be, pH, Fund pH-%Bs-tC-T-F-tG-%Be des sequentiellen 7-Faktor-Screenings

Faktoren (Faktoren)	Einheit	Sequenz tG-T-tC-%Bs-%Be-pH-F	pH-%Bs-tC-T-F-tG-%Be
Gradientenzeit	min	39.2	40
Temperatur	° C	40	40
Ternäre Eluentzusammensetzung	Vol. %MeOH in ACN	48	48
Startkonzentration Eluent B	Vol. %B	7.8	7.8
Endkonzentration Eluent B	Vol. B	95	97
pH wässriger Eluent A	pH-Einheit	2.9 <sub>2</sub>	2.9 <sub>5</sub>
Flussrate	ml/min	1.5	1.5

Tab. 2: Faktoren und Faktorenbereiche eines 7-Faktor-Screenings

Faktoren (Faktoren)	Einheit	Nominale HPLC-Methode	Limits	Faktorbereiche
Gradientenzeit	min	40	±5	35 - 45
Temperatur	° C	38	±5	33 - 43
Ternäre Eluentzusammensetzung	Vol. %MeOH in ACN	50	±2.5	47.5 - 52.5
Startkonzentration Eluent B	Vol. %B	8	±2.5	5.5 - 10.5
Endkonzentration Eluent B	Vol. B	97	±2.5	94.5 - 99.5
pH wässriger Eluent A	pH-Einheit	2.6	±0.3	2.6 - 3.2
Flussrate	ml/min	1.5	±0.075	1.425 - 1.575

Die Variationen für die Faktoren sind Erfahrungswerte. Durch diese Variation der Faktoren wird auf den Bereich, der für die Untersuchung relevant ist, fokussiert. Den Bereich, den alle Faktoren von ihrer minimalen bis zu maximalen Einstellung abdecken, nennt man Versuchsraum, im Kontext von QbD auch „Knowledge Space“. Er ist i.d.R. wesentlich größer als der anschließend zu bestimmende Design Space der HPLC-Trennung (Abbildung 3).

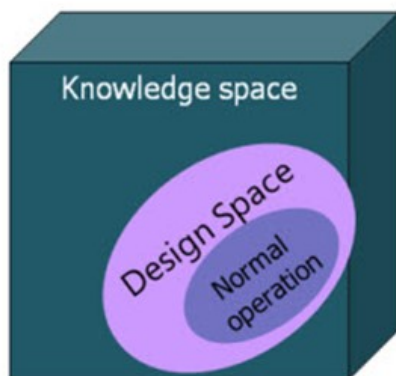


Abb. 3: Definition des Design Space als Bereich innerhalb des Wissensraumes Knowledge Space<sup>4</sup>.

### Zielgrößen der Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung

Die Zielgrößen beschreiben das Ergebnis eines Versuchs. Zielgrößenwerte sind Messwerte oder werden aus Messwerten berechnet. Meist benötigt man mehrere Zielgrößen um alle Ziele einer Versuchsreihe abzubilden. Beim Screening einer HPLC-Trennung sollte neben der Auflösung des „kritischen Peakpaares 9/8“ der nominalen HPLC-Trennung (Abbildung 4) auch weitere interessante Peakpaare resp. deren Auflösungen als Zielgrößen in die Betrachtung einbezogen werden. Im vorliegenden Fall sind es die kritischen Peakpaare 4/3, 4/5, 7/9, 9/8 und 10/11, abgeleitet aus Experimenten des Versuchsplanes (siehe Appendix).

### Versuchsplan zur Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung

Design of Experiments und Quality by Design-Analyse ist tatsächlich der effektivste Ansatz um eine Modellierung aller signifikanten Faktoren und Zielgrößen zu erreichen. Da die Schätzung von Wechselwirkungen zwischen den Faktoren und ihren Einfluss auf die Zielgrößen beim Screenen einer HPLC-Trennungen sehr wichtig ist, wurde hier ein fraktionierter faktorieller Versuchsplan der Auflösung IV  $2^{7-2}$  (Abbildung 5) mit 32 Versuchen und einem zusätzlichen Zentrumspunkt zur Lösung der Aufgabenstellung verwendet.

Dieser Plan (Appendix) ist bereits sehr mächtig und erlaubt die Bestimmung fast aller Wechselwirkungen ( $7 \times 6 \div 2 = 21$ ) der 7 Faktoren der HPLC-Trennung.

Ableitend aus den Daten<sup>5</sup> eines einfachen experimentellen Design<sup>6</sup> zur simultanen Optimierung von drei Faktoren (Abbildung 6) (Grundläufe – Appendix) wurden die 33 Versuchsplanexperimente (Appendix) für das Screening mit DryLab<sup>®</sup>4 modelliert.

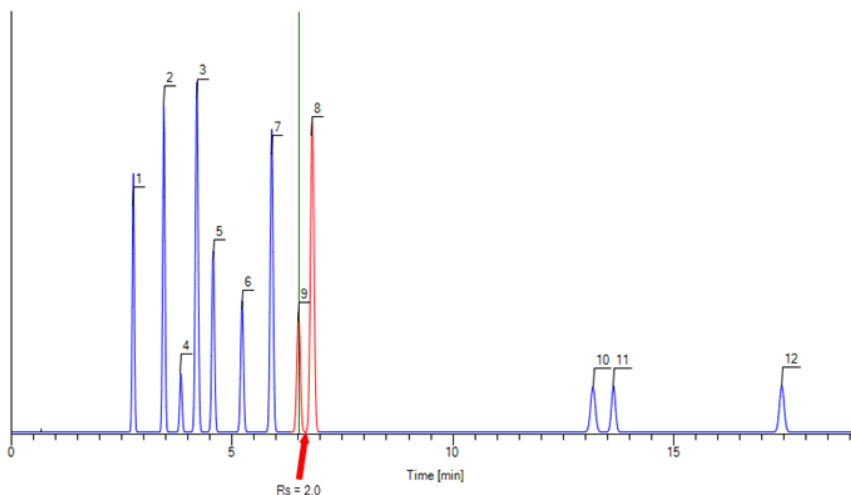


Abb. 4: Chromatogramm der nominalen HPLC-Methode

Design	Recommendation	Runs	Model	Pseudo resolution
Plackett Burman Super-Saturated		6	Linear	
Frac Fac Res III	Second	8	Linear	3
Plackett Burman		8+	Linear	
Reduced Combinatorial		11+	Linear	
D-Optimal		14+	Linear	
Frac Fac Res IV	First	16+	Linear	4
L18 (3 levels)		18	Linear	
L27 (3 levels)		27	Linear	
Rechtschaffner Res V		29	Interaction	
Orion D-Optimal		29+	Linear	
D-Optimal		35+	Interaction	
L36 (3 levels)		36	Linear	
Orion D-Optimal		50+	Interaction	
Frac Fac Res V+		64	Interaction	5
Full Fac (2 levels)		128	Interaction	5

Design runs:   
 Center points:   
 Replicates:   
 Total runs: 33

Abb.5: Design und Modell des Versuchsplanes

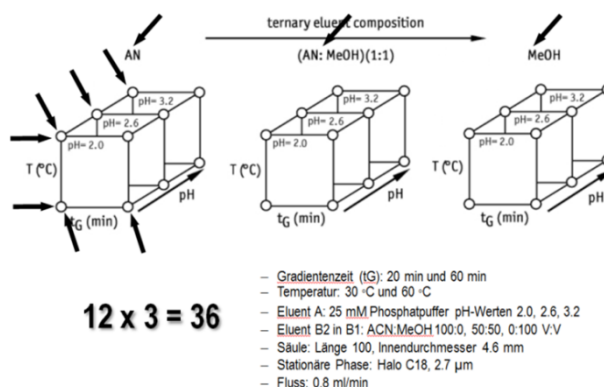


Abb. 6: Experimentelles Design für 3-Parameter-Optimierung

Die Ergebnisse der DoE-Experimente sind in den Rohdaten-Plots (Abbildung 7) der Peakpaare 3/4, 4/5, 7/9, 9/8 und 10/11 aufgezeigt. Die Peakpaare 3/4 und 10/11 weisen in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen eine Peakumkehr, d.h. negative Auflösungs-werte (rote Punkte) auf.

Basierend auf den Ergebnissen des Versuchsplanes wurde ein empirisches, statistisch abgesichertes Prozessmodell erstellt und anschließend wird mit Hilfe dieses Modells, nach geprüfter Zulassung durch einfache statistische Diagnostiken (Residuenanalysen), ein Screening durchgeführt. Bei Verwendung von mehr als drei Faktoren und mehreren Zielgrößen kann ein Design Space extreme Geometrien annehmen, wie z.B. einen unregelmäßig N-dimensionalen Design Space (Abbildung 8).

### Optimieren mit negativen Auflösungs-werten

Ein Problem ist, dass beim Screenen einer HPLC-Trennung durch die erforderliche Variierung der Versuchsbedingungen eine Umkehr der ursprünglichen Peakreihenfolge für Peakpaare auftreten kann. Wenn solche Änderungen in der Elutionsreihenfolge der Peaks auftreten, verweist die Literatur<sup>8</sup> auf zwei Einwände gegen eine Modellierung der Auflösung als Zielgröße.

Erstens, eine wie oben beschriebene Situation, zwei Peaks A und B ändern ihre Elutionsreihenfolge einmal als AB und einmal als BA. Um zwischen beiden Situationen zu unterscheiden, sollte man eine der beiden Auflösungen ein negatives Vorzeichen geben (z.B.  $R_s^{(AB)} = 1.5$  und  $R_s^{(BA)} = -1.5$ ).

Zweitens, innerhalb der Experimente des Versuchsplans können infolge der geänderten Versuchsbedingungen unterschiedliche Peakpaare (Appendix) als das kritische Peakpaar auftreten und all diese Peakpaare (3/4, 4/5, 7/9, 9/8, 10/11) sollten daher in die Modellierung einbezogen werden.

Der erste Einwand<sup>9</sup> ist auf eine ungeschickte Handhabung der DoE-Methodik zurückzuführen. Kehrt man bei Peakumkehr einfach das Vorzeichen der Auflösung um, so verwendet man implizit die Funktion „Absolutbetrag“, die bei Null eine Spitze hat. Diese Spitze kann – und soll – von der Versuchsplanung nicht modelliert werden. Abstrakt gesprochen bedeutet die Anwendung von Versuchsplanung, dass man eine Hypothese oder eine Frage an den Versuch in Form des Modelltyps stellt. Die Frage nach dem Vergleich von Wirkungen der Faktoren verbirgt sich in einem linearen Modell. Dies führt zu einem Versuchsplan mit Versuchen an den Ecken des Versuchsbereiches. Die Frage ob Faktoren unabhängig voneinander wirken, verbirgt

sich in einem Interaktionsmodell. Dies führt zu einer dichteren Besiedlung der Eckpunkte des Versuchsbereiches. Die Frage nach Maxima oder Minima im Innern oder einfach nur nach gekrümmten (nicht-linearen) Abhängigkeiten, bedeutet quadratische Modelle und die wiederum führen zu Versuchen in der Mitte des Versuchsbereiches, ebenso in der Mitte von Kanten oder Seiten(-hyper-)flächen des Versuchsbereiches. Die Modelle der Versuchsplanung sind völlig ausreichend, um die Auflösung in sicherem Abstand zu Umkehrpunkten zu beschreiben. Praktisch bedeutet das, dass man die Abso-lutfunktion gar nicht – auch nicht implizit – verwendet, sondern negative Auflösungen zulässt und „Auflösung > Grenzauflösung“ als gleichwertig mit „Negativauflösungen < minus Grenzauflösung“ betrachtet. Bezogen auf die Qualität der Trennung sind beide Forderung absolut gleichwertig.

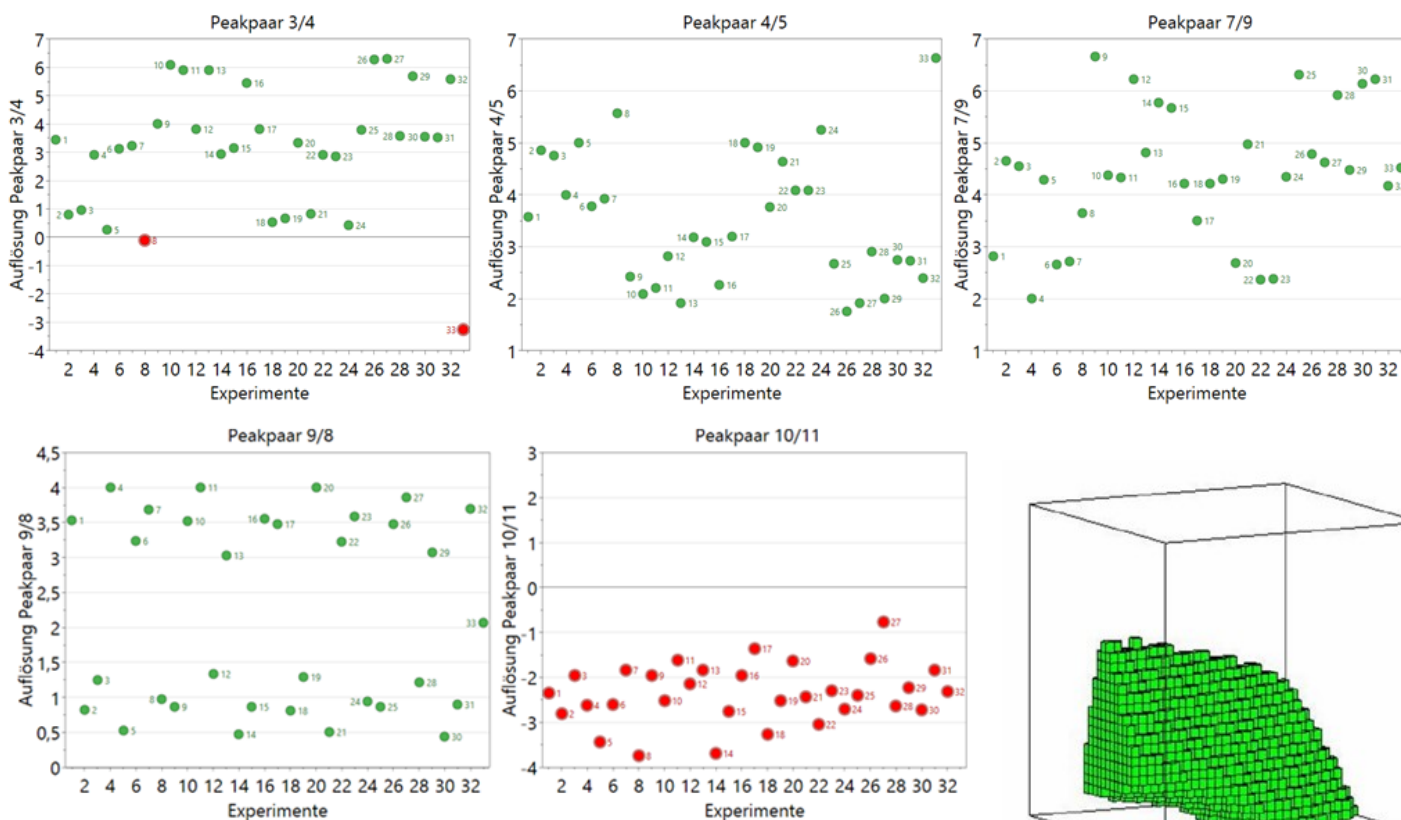


Abb. 7: Rohdaten-Plots der 32 DoE-Experimente für die Peakpaare 3/4, 4/5, 7/9, 9/8 und 10/1.

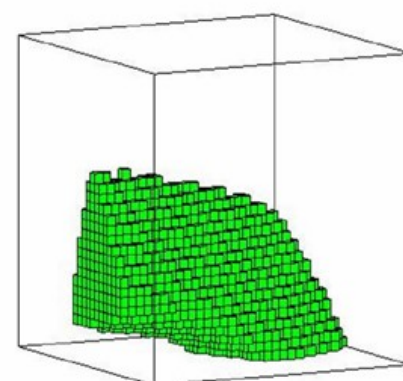


Abb. 8: Irreguläre N-dimensionale Design Space Beschreibung<sup>7</sup>



Der zweite Einwand<sup>10</sup> ist tatsächlich eines der stärksten Argumente für die Verwendung der Versuchsplanung. Bei der Formulierung der Modelle und bei der Aufstellung des Versuchsplans ist es egal welches Peakpaar an welcher Stelle im Versuchsbereich eventuell das kritische Peakpaar darstellt. Wird für alle Peakpaare derselbe Modelltyp verwendet, so ist für alle Peakpaare auch der Versuchsplan derselbe. Verwendet man als Zielgrößen die vorzeichenbehafteten Auflösungen aller – irgendwo im Versuchsbereich benachbarter – Peakpaare, so sind wiederum die Modelle der Versuchsplanung völlig ausreichend, um diese vorzeichenbehafteten Auflösungen präzise zu beschreiben. Die Verwendung der vorzeichenbehafteten Auflösung in einer Mehrzieloptimierung dient zum Definieren eines Design Space als Bereich mit sicherem Abstand zu den Umkehrpunkten.

### Finden des robusten Arbeitspunktes der HPLC-Trennung

Im Mittelpunkt des QbD-Ansatzes zum Screenen einer HPLC-Trennung steht die Schätzung eines Design Space. Mit der Design Space Schätzung kann dargestellt werden, wie die Einstellungen der jeweiligen Faktoren um den robusten Arbeitspunkt variiert werden dürfen, ohne die Einhaltung der Zielgrößen-Spezifikation(en) zu gefährden.

Voraussetzung für eine zuverlässige Aussage zur Robustheit einer HPLC-Methode ist das Finden des robusten Arbeitspunktes. Noch heute wird mit kommerziell erhältlicher Software zur Computer-unterstützten HPLC-

Methodenentwicklung (CMD) nur der optimale Arbeitspunkt der HPLC-Trennung modelliert.

Zielsetzung der Multi-Faktoren-/Multi-Zielgrößen-Modellierung ist es aber, unter Einbeziehung der Auflösung aller interessanten Peakpaare als Zielgrößen sowie aller Faktoren – Gradientenzeit (tG), Temperatur (T), ternäre Eluentzusammensetzung (tC), pH-Wert des wässrigen Eluenten (pH), Startkonzentration Eluent B (%B<sub>s</sub>), Endkonzentration Eluent B (%B<sub>e</sub>), Flussrate (F) – den robusten (globalen) Arbeitspunkt zu finden. Das Finden des robusten Arbeitspunktes erlaubt, die maximale Variation der Faktoren ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Hierzu wird die Einstellung für die Faktoren ermittelt, die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes die größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen hat. Diese entspricht dem robustesten Arbeitspunkt.

Die Anzahl der Rechenoperationen zum Finden des robusten Arbeitspunktes unter Berücksichtigung der Zielgrößen und Faktoren definiert sich über:

$$\begin{aligned} \text{Anzahl Berechnungen} \\ &= \text{Anzahl Faktoren} \\ &\times \text{Auflösung}^{\text{Anzahl Zielgrößen}} \\ &\times \text{Iterationen} \end{aligned}$$

Schon bei der größtmöglichen Auflösung von 8 (Unterteilung des irregulären Design Space Raumes in Abschnitte) sowie 5 Zielgrößen und 7 Faktoren wird der Rechenaufwand mit 10.485.760 Berechnungen sehr umfangreich

und damit zeitaufwändig. In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse des simultanen Screenen zusammengestellt.

In dieser Tabelle werden die Faktoreinstellungen der robusten Arbeitspunkte der HPLC-Trennung in Abhängigkeit der zur Findung des robusten Arbeitspunktes benutzten Anzahl an Faktoren angezeigt. Um vergleichbare robuste Arbeitspunkte mit höchster Genauigkeit zu berechnen, wurden immer die Faktoren mit dem größten Beitrag für die HPLC-Trennung zum Finden des robusten Arbeitspunktes bei einer Auflösung von R=16 für die Unterteilung des Design Space Raumes gewählt. Für das Finden des robusten Arbeitspunktes mit 7 Faktoren wären 1.342.177.280 Rechenoperationen erforderlich. Dies führt zu einem viel zu großem, nicht mehr berechenbaren Design Space. Eine Reduzierung der Rechenoperationen wird durch Herabsetzung der Auflösung von R=16 auf R=8 erreicht. Es sind immer 10.485.760 Rechenoperationen zum Finden des robusten Arbeitspunktes für 7 Faktoren notwendig. Die robusten Arbeitspunkte unterscheiden sich marginal. Die Zielgrößenpezifikation -  $1,5 \geq -R_{s,krit.}$  oder  $R_{s,krit.} \geq 1,5$  wird beim Screenen des Multi-Faktor-/Multi-Zielgrößen-Modell eingehalten.

In der Tabelle 4 sind die Beiträge (%) der einzelnen Faktoren zur HPLC-Trennung wiedergegeben.

Den stärksten mittleren Beitrag zur HPLC-Trennung weist der Faktor pH mit 48.1% auf, gefolgt von den Faktoren %B<sub>s</sub> mit 20.5%, tC mit 7.9%, T mit 7.8%, F mit 7.6% sowie %B<sub>e</sub> mit 2.6%.

Tab. 3: Robuste Arbeitspunkte des 7- Faktor Screening der HPLC-Trennung in Abhängigkeit von der Anzahl der Faktoren

Faktoren	Robuster Arbeitspunkt / Anzahl an Faktoren zur Berechnung*				
	pH,%B <sub>s</sub> ,tC	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F,tG	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F,tG,%B <sub>e</sub>
Gradientenzeit [min]	42	42	42	41.2	41.3
Temperatur [°C]	40	39.2	39.2	39.2	39.4
Ternärer Eluent [%B2/B1]	48.8	48.8	48.8	48.8	49.6
Startkonzentration Eluent B [%B]	7.9	7.9	7.9	7.9	7.7
Endkonzentration Eluent B [%B]	99	99	99	99	98.4
pH wässriger Eluent A	2.8 <sub>8</sub>	2.8 <sub>8</sub>	2.9 <sub>2</sub>	2.8 <sub>8</sub>	2.9 <sub>4</sub>
Fluss [ml/min]	1.4	1.4	1.4 <sub>5</sub>	1.4 <sub>4</sub>	1.4 <sub>3</sub>
R <sub>s,krit.</sub> <sup>9/8</sup>	2.3 <sub>1</sub>	2.2 <sub>2</sub>	2.4	2.2 <sub>2</sub>	2.5 <sub>5</sub>
tR <sub>max</sub>	18.0	18.08	17.83	17.68	17.87

\* Faktoren mit jeweils größten Beitrag zur HPLC-Trennung

Tab. 4: Beiträge der Faktoren zur HPLC-Trennung des 7- Faktor Screening

Faktoren	Robuster Arbeitspunkt / Anzahl an Faktoren zur Berechnung*				
	pH,%B <sub>s</sub> ,tC	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F,tG	pH,%B <sub>s</sub> ,tC,T,F,tG,%B <sub>e</sub>
Gradientenzeit [min]	5.5	5.5	5.7	5.5	5.6
Temperatur [°C]	7.7	7.7	8	7.7	7.7
Ternärer Eluent [%B2/B1]	7.8	7.9	8.1	7.8	7.9
Startkonzentration Eluent B [%B]	20.8	20.7	21.6	20.8	18.4
Endkonzentration Eluent B [%B]	2.6	2.6	2.7	2.6	2.6
pH wässriger Eluent A	48.1	48.1	46.2	48.1	50.2
Fluss [ml/min]	7.5	7.5	7.7	7.5	7.6

## Bewährte Faktorbereiche der HPLC-Trennung

Mit dem Design Space Hypercube (grüne Fläche) – dem größtmöglichen regelmäßigen Hyperwürfel, der in das unregelmäßige Design Space-Volumen eingefügt werden kann – werden die obigen Ergebnisse des Screenen visualisiert. In einem Design Space Plot der beiden wichtigsten Faktoren pH und %Bs werden der robuste Arbeitspunkt sowie der Hypercube abgebildet (Abbildung 9). Berücksichtigt werden hierbei Modellfehler (X, Y), Reproduzierbarkeit (Pure Error) und Faktorpräzision in X sowie das eingestellte Fehlerrisiko von 1%.

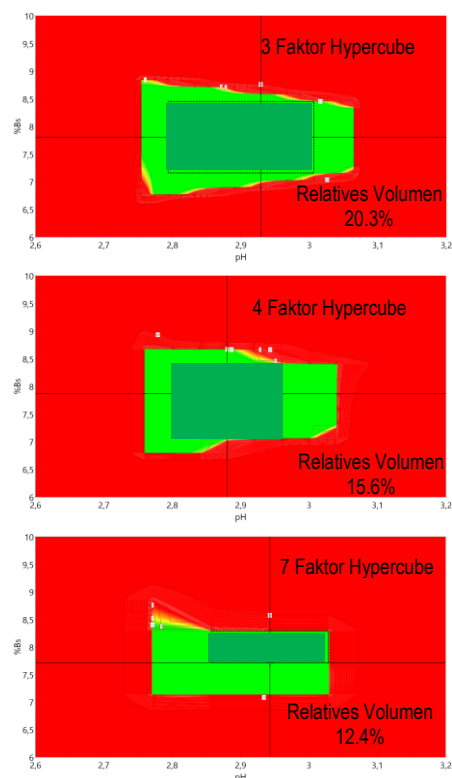


Abb. 9: 2D Design Space pH-%Bs Plots

Wie aus der Abbildung 9 ableitbar, wird mit zunehmender Faktoranzahl zur Berechnung des robusten Arbeitspunktes die Fläche des Design Space Hypercube im experimentellen Bereich kleiner, d.h. die Robustheit der HPLC-Trennung nimmt ab. Dies bedeutet aber nichts anderes, als dass bei Wahl von nur 3 der 7 signifikanten Faktoren für die Berechnung des robusten Arbeitspunktes, die Aussage zur Robustheit der HPLC-Trennung arg geschönt wird.

Die berechneten Werte für das relative Volumen ( $Auflösung^{Anzahl\ der\ Faktoren}$ ) des Design Space bestätigen die Aussage zur Robustheit der HPLC-Trennung.

## Finden der Toleranzgrenzen der HPLC-Trennung

Basierend auf dem gestrichelten Hypercube-Rahmen, werden die Toleranzgrenzen um den

robusten Arbeitspunkt – erhalten durch Maximierung des Abstands zu den Akzeptanzgrenzen im Design Space<sup>11</sup> – durch die Werte für Hypercube low edge und Hypercube high edge gefunden und in der grafischen Darstellung (Abbildung 10) des Hypercube Range angezeigt.

Die Faktor-Einstellungen (PAR)<sup>12</sup> dürfen mit einem Fehlerrisiko von 1% innerhalb des Hypercube Range gleichzeitig und ohne weitere Einschränkungen verändert werden, ohne die Qualität der HPLC-Trennung zu gefährden.

Nur das simultane Betrachten aller 7 signifikanten Faktoren (und der 5 Zielgrößen) beim Finden des robusten Arbeitspunktes führt zu robusten Faktorbereichen (PAR) bei Einhaltung der Zielgrößenspezifikationen und hilft somit beim Finden von gesicherten Spezifikationsgrenzen für die signifikanten Faktoren der HPLC-Trennung. Bei Änderungen der Faktoreinstellungen in dem ausgewiesenen

Hypercube range – z.B. Anpassung der Trennung bei einer Methodenübertragung oder bei einer anfälligen Trennung – besteht somit kein Erfordernis an eine Revalidierung. Anpassungen der Faktoreinstellungen sind in der HPLC-Praxis nicht gerade selten und werden auch heute noch überwiegend mit der „Trial und Error-Strategie“ vorgenommen.

## Strategie zur Kontrolle der Robustheitsaussage

Die nachfolgenden mit DryLab®4-simulierten Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt (Abbildung 11) sowie an den Design Space Hypercube-Eckpunkten (Abbildungen 12/13) illustrieren die getätigten Aussagen zur Robustheit der HPLC-Trennung. An allen drei Punkten des Design Space Hypercubes wird die Zielgrößenspezifikation der HPLC-Trennung ( $-1,5 \geq -R_{s,krit.}, R_{s,krit.} \geq 1,5, tR_{max} < 18\ min.$ ) eingehalten. Da mit den DryLab®4-Modellen nur Simulationen von 6 Faktoren

Factor	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tC(B2:B1)	48	52	
pH	2,8	2,96	
%Bs	7,06667	8,4	
Factor	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tC(B2:B1)	48,129	49,9355	
pH	2,79355	3,00645	
Temp	38,5806	40	
%Bs	7,16129	8,45161	
Factor	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	38,5714	42	
tC(B2:B1)	48	49,7143	
pH	2,85714	3,02857	
Temp	38,2857	40	
Flow	1,4	1,48571	
%Bs	7,71429	8,28571	
%Be	97,2857	99	

Abb. 10: Hypercube-Toleranzgrenzen „low edge“ und „high edge“ und Hypercube-Bereiche des 7-Faktor-Screening

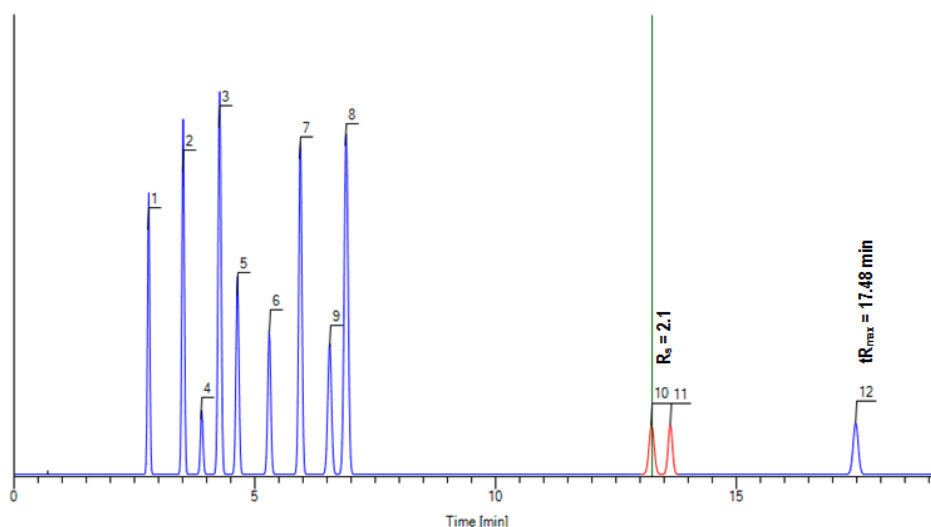


Abb. 11: Chromatogramm der DryLab®4-Simulation des robusten Arbeitspunktes

möglich sind, wurde der Faktor tC auf 50% [MeOH in ACN] für die DryLab®4-Simulationen konstant gesetzt.

Die mittels statistischer Versuchsplanung gefundenen Hypercube-Toleranzgrenzen „low edge“ und „high edge“ werden nun verglichen mit den Toleranzgrenzen, die unter Verwendung des Robustness-Tool der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab®4 erhalten wurden. Dazu werden die Einstellwerte für den robusten Arbeitspunkt (Tabelle 3) des 7-Faktor-Screenings in das Robustness-Modul übertragen und für 6 Faktoren die Toleranzbereiche für jede Einflussgröße ermittelt (Abbildung 14).

In der Tabelle 5 sind die erlaubten Variationen der Faktoren um den robusten Arbeitspunkt (Toleranzen) für die jeweiligen Tools zur Prüfung einer HPLC-Trennung auf Robustheit gegenüber gestellt.

Die erlaubten Variationen der Faktoren um den robusten Arbeitspunkt sind mit der „Design Space Hypercube“-Auswertung der statistischen Versuchsplanung am größten (mittlerer Toleranzgrenz-Wert von 1.8). Mit dem DryLab®4 -Robustness-Tool wird aufgrund des wesentlich kleineren mittleren Toleranzgrenz-Wertes von 1.0 eine verminderte Robustheit der HPLC-Trennung angezeigt.

In der Tabelle 6 sind die mit der Versuchsplanung vorhergesagten Auflösungsweite für die 11 Peakpaare der HPLC-Trennung (Abbildung 11) jenen mit den DryLab®4 simulierten Auflösungsweite gegenübergestellt.

Sowohl für die Auflösungsweite  $R_s$  als auch für die Retentionszeit des letzten Peakpaares im Chromatogramm  $tR_{max}$  der HPLC-Trennung wird eine recht gute Übereinstimmung zwischen den mit statistischer DoE-Software berechneten Daten und den Daten der DryLab®4-Simulation für den robusten Arbeitspunkt ausgewiesen.

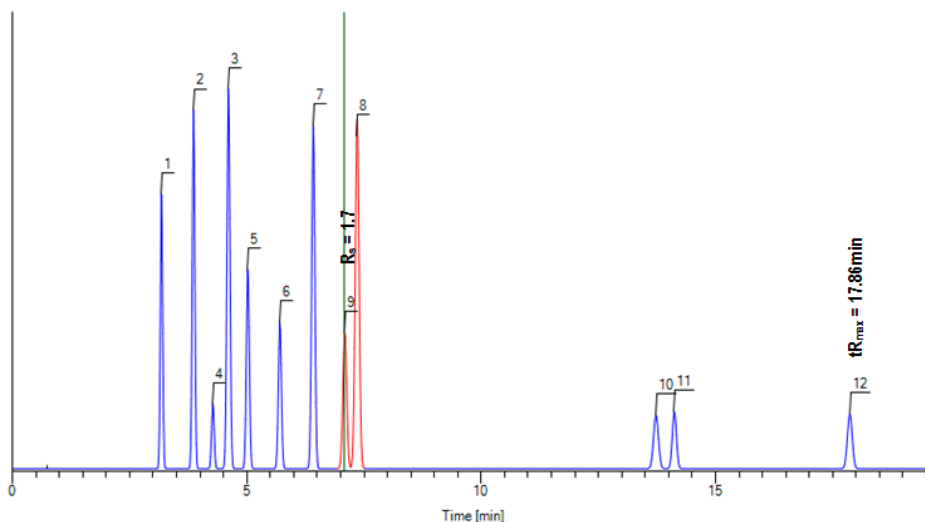


Abb. 12: Chromatogramm der DryLab®4-Simulation für die „low edge“-Toleranzgrenzen des robusten Arbeitspunktes

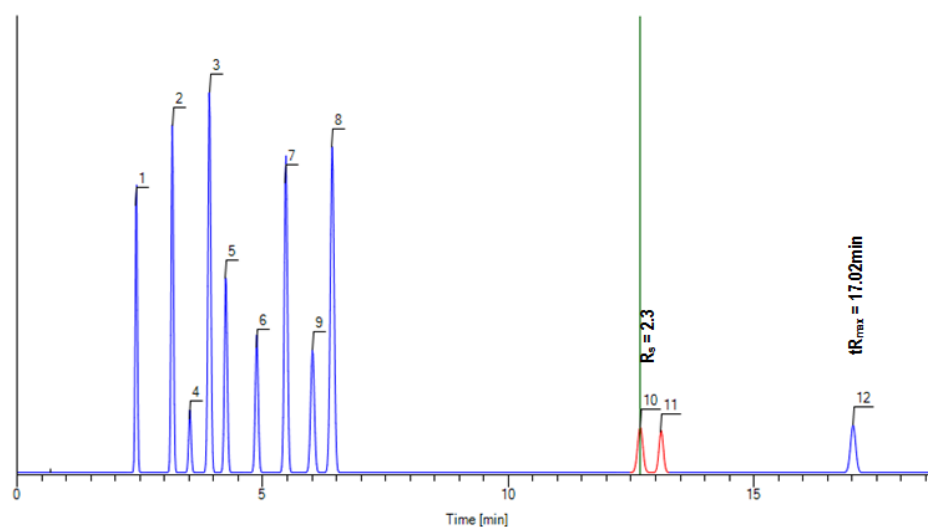


Abb. 13: Chromatogramm der DryLab®4-Simulation für die „high edge“-Toleranzgrenzen des robusten Arbeitspunktes

Required Resolution 1,5 | Successful Experiments: 729 | Success Rate [%] 100 %

Method Conditions

tG	38.8	+/- 0.5	[min]	Flow Rate	1.44	+/- 0.04	[mL/min]
T	39.2	+/- 0.75	[°C]	Start %B	7.87	+/- 1	[%B]
pH	2.92	+/- 0.1		End %B	95.8	+/- 0.5	[%B]

No. of Levels (2 or 3) 3 | No. of Factors 6 | Start Calculations | Get Method Data

Abb. 14: Toleranzen für den DoE-robusten Arbeitspunkt mit dem DryLab®4 Robustness Modul

Tab 5: Toleranzgrenzen beider Tools für den robusten Arbeitspunkt

Faktoren	Toleranzgrenzen robuster Arbeitspunkt					
	DoE - Design Space Hypercube MODDE 11 Pro®			Robustness Modul DryLab®4		
	„low edge“	„high edge“	Diff.	unterer Wert	oberer Wert	Diff.
Gradientenzeit [min]	38.0	40.9	2.9	38.3	39.3	1.00
Temperatur [°C]	37.3	40.0	2.7	38.5	40	1.50
Ternärer Eluent [%B2/B1] <sub>konst.</sub>	50	50	0	50	50	0
Startkonzentration Eluent B [%B]	7.3	8.4	1,1	6.9	8.9	2.00
Endkonzentration Eluent B [%B]	95.0	99	4.0	95.3	96.3	1.00
pH wässriger Eluent A	2.8	3.0	0.2	2.8 <sub>2</sub>	3.0 <sub>2</sub>	0.2
Fluss [ml/min]	1.4	1.5	0.1	1.40	1.48	0.08
Mittlere Toleranz			<b>1.8</b>			<b>1.0</b>

Tab. 6: Auflösungswerte  $R_s$  und  $t_{R_{max}}$  des robusten Arbeitspunkt mit 7 Faktoren der HPLC-Trennung ( $t_C=50\%$  konstant).

Peakpaar	Auflösung ( $R_s$ )	
	MODDE	DryLab
	Vorhersage	Simulation
1/2	7.4	7.7
2/4	4	3.9
4/3	-3.2	-3.3
3/5	3.1	3.2
5/6	5.7	5.6
6/7	5.4	5.3
7/9	4.4	4.4
9/8	2.3	2.3
8/10	37.5	35.4
10/11	2.9	2.1
11/12	20.8	20.6
$t_{R_{max}}$ 8min	17.46	17.48

## Zusammenfassung

### MODDE® - Design Space Hypercube

Für die „Design Space Hypercube“-Findung wird ein fraktionierter faktorieller Versuchsplan der Auflösung IV  $2^{7-2}$  verwendet. Dieser Versuchsplan erlaubt die Ermittlung aller linearen Haupteffekte, deren eventuelle Nichtlinearität in quadratischer Näherung sowie aller Wechselwirkungen ohne Vermengungen. Für die Variation der Faktoren werden 33 Experimente (Appendix) mit der DryLab®4-Software simuliert. Mit Hilfe der der „Design Space Hypercube“-Schätzung gelingt es, den robusten Arbeitspunkt sowie die maximale Toleranz der Faktoren zu finden. Alle Schätzungen basieren auf den Regressionsmodellen und Monte-Carlo-Simulationen. Zudem wird auch die Einstellungs-genauigkeit der Faktoren (Präzision) mathematisch einbezogen. Zur Absicherung des geringsten Risikos für das Screenen der HPLC-Trennung muss berücksichtigt werden, welche Auswirkungen die Unsicherheit in den Faktoren sowie die Unsicherheit aus den Einzelmodellen auf die Zielgrößen haben. Eine Risikoabschätzung selbst in den Grenzbereichen ist mit der Monte-Carlo-Simulation berechenbar und wird als maximales Fehlerisiko in %outside (außerhalb der Spezifikationen) oder DPMO (defects per million opportunities) ausgegeben. Ein Fehlerisiko von 1 % ist die Standardeinstellung von MODDE® und sagt aus, dass 99 % der Voraussagen im Design Space die gesetzte Spezifikation von  $-1,5 \geq -R_{s,krit}$  und  $R_{s,krit} \geq 1.5$  und  $t_{R_{max}} < 18$  min erfüllen.

### DryLab®4 - Robustness Modul

Das Robustheits-Modul von DryLab benutzt einen 3-Niveau vollständigen faktoriellen Versuchsplan. Dieser Versuchsplan-Typ

enthält alle Kombinationen der Faktoren auf drei Niveaus (tief/mittel/hoch) und erlaubt die Schätzung von sämtlichen Haupteffekten, Interaktionen und quadratischen Effekten. Für die Variation von 6 Faktoren werden 729 Experimente mit der DryLab®4-Software simuliert.

Nach Eingabe der MODDE Screening-Werte für den robusten Arbeitspunkt in das DryLab Robustness-Modul (Abbildung 14) wird jede Einflussgröße bis zur Erzielung einer Erfolgsrate von 100 % für einen voreingestellten Auflösungswert von  $R_s = 1.5$  variiert. DryLab®4 unterscheidet in der Robustheitsprüfung nur, ob die Auflösungswerte  $R_s$  der 729 Experimente innerhalb oder außerhalb der obigen Spezifikationen sind. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit wird dazu nicht gegeben.

### Vergleich der Tools zur Robustheit

Für eine Robustheitsaussage einer HPLC-Trennung werden das „Design Space Hypercube“-Modul (MODDE 11 Pro®) und das „Robustness Modul“ (DryLab®4) benutzt und verglichen. Die statistische Versuchsplanung (DoE) stellt für beide Tools die Basis.

Die erlaubten Variationen der Faktoren um den robusten Arbeitspunkt sind mit der „Design Space Hypercube“-Auswertung der statistischen Versuchsplanung größer, als die erlaubten Variationen der Faktoren mit dem DryLab®4 -Robustness-Tool, d.h. eine verminderte Robustheit der HPLC-Trennung wird mit dem DryLab®4 -Robustness-Tool ausgewiesen.

Eine nur eingeschränkte Nutzung der DryLab®4-Software zur Robustheitsprüfung der HPLC-Trennung, besteht in der simultanen Modellierung von nur drei Faktoren ( $t_G$ ,  $T$ ,  $t_C$ -Modell oder  $t_G$ ,  $T$ ,  $pH$ -Modell) und einer Zielgröße ( $R_{s,krit}$ ). Mit dem Robustness-Modul der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab®4 können somit die z.B. in der pharmazeutischen HPLC-Analyse kleiner Moleküle sehr wichtigen Faktoren  $t_C$  und  $pH$  nicht simultan betrachtet werden.

## Literatur

- 1 MODR = Method Operable Design Region
- 2 DryLab®4.0 Software – zur computergestützten Optimierung von 3 HPLC-Faktoren, Molnár -Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)
- 3 MODDE 11 Pro®, msk data analytics solutions, Umea, Sweden

- 4 A. Orth Frankfurt University of Applied Sciences, Umesoft GmbH, Eschborn, Deutschland (2016)
- 5 Versuchsdurchführung und Peakzuordnung sowie Bereitstellung der Rohdaten durch Molnar Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)
- 6 Molnar-Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)
- 7 C. Vikström “Robust Optimization”, MKS Umetrics AB, IFFAC presentation (2014)
- 8 Y. Vander Heyden, “Common Problems with Method Optimization in pharmaceutical Analysis”, LCGC Europe, 24(8), 423 (2011).
- 9 S. Soravia, A. Orth: Design of Experiments (DoE), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry – Release 2001/2007, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2001/2007), ebenfalls erschienen in Ullmann's Modelling and Simulation, Wiley-VCH (2007).
- 10 S. Soravia, A. Orth: Design of Experiments (DoE), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry – Release 2001/2007, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2001/2007), ebenfalls erschienen in Ullmann's Modelling and Simulation, Wiley-VCH (2007).
- 11 Manhattan-Distance = ist eine Abstandsfunktion, in der die Distanz zwischen zwei Punkten als die Summe der absoluten Differenzen ihrer Einzelkoordinaten definiert wird: Christian Royer: Simultane Optimierung von Produktionsstandorten, Produktionsmengen und Distributionsgebieten. Utz, Wiss., München 2001, S. 55.
- 12 C. Vikström “Define proven acceptable range (PAR) and normal operating range (NOR) using MODDE Pro 11”, MKS Umetrics AB



## Appendix

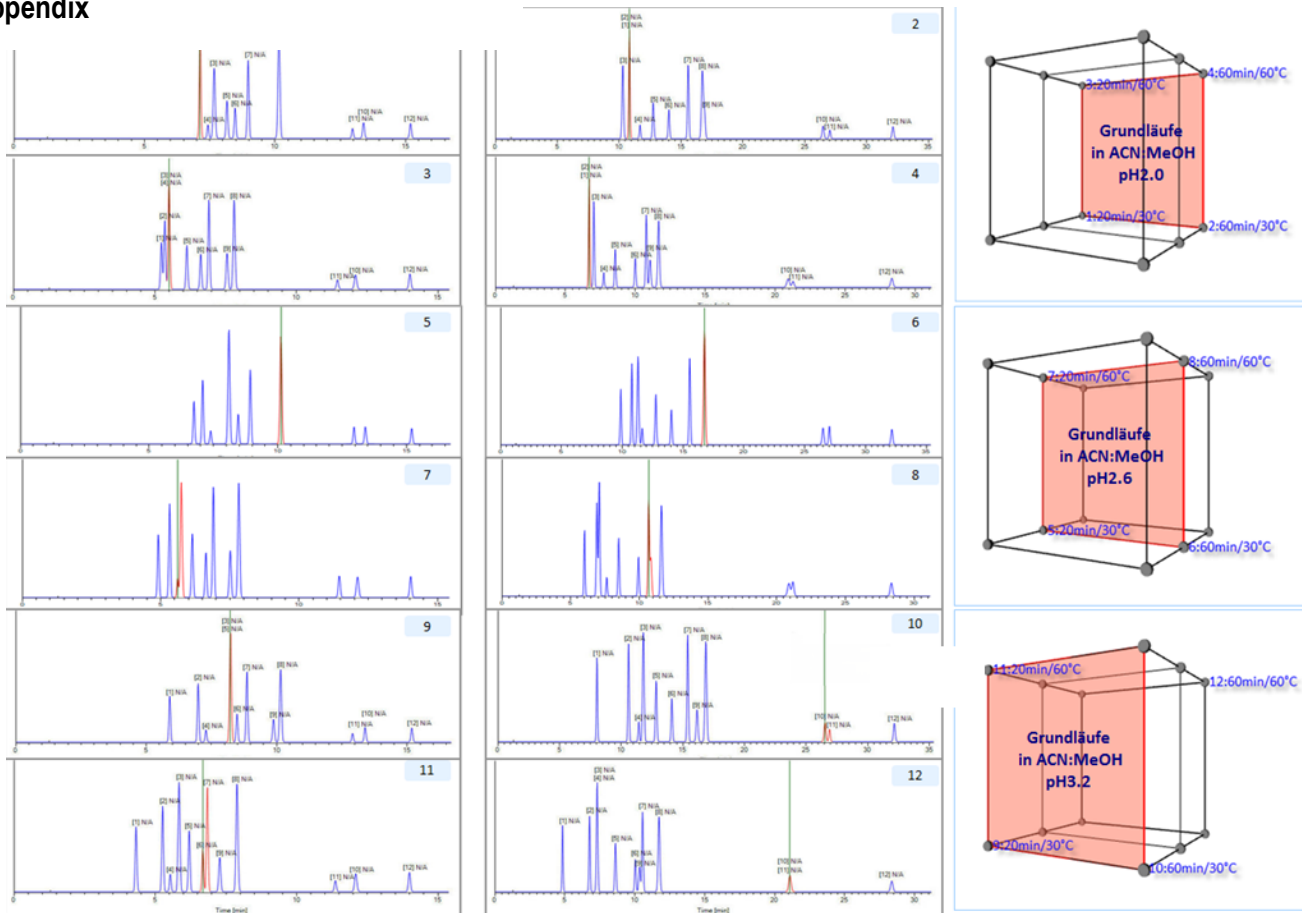


Abb. 1: Chromatogramme der 12 Grundläufe bei pH 2,0, 2,6 und 3,2 in ACN

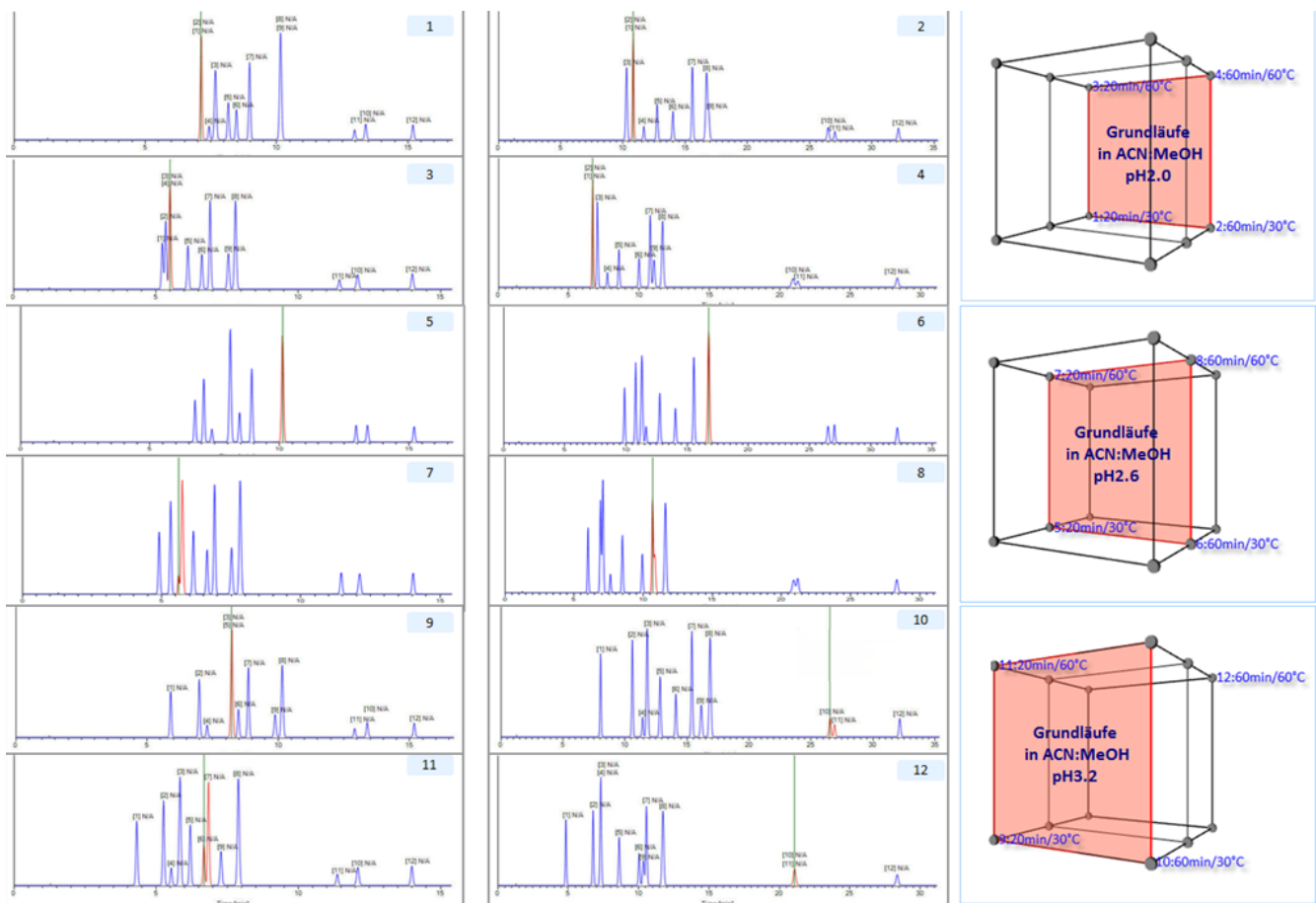


Abb. 2: Chromatogramme der 12 Grundläufe bei pH 2,0, 2,6 und 3,2 in ACN:MeOH/50:50 V/V.

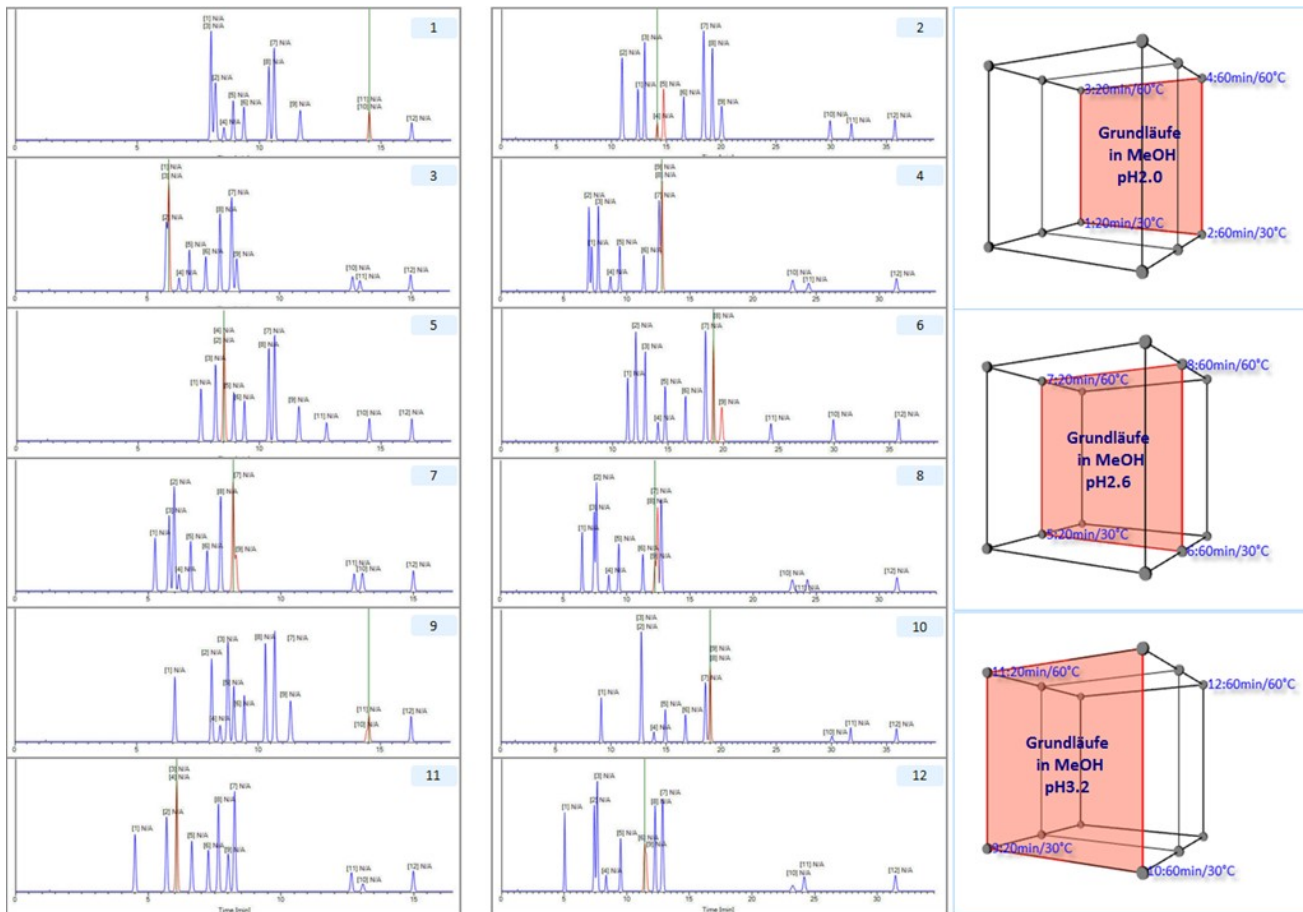


Abb. 3: Chromatogramme der 12 Grundläufe bei pH 2,0, 2,6 und 3,2 in MeOH.

Tab. 1: Experimente des Versuchsplanes

Experimente	tG	T	tC(B2:B1)	%B <sub>s</sub>	%B <sub>e</sub>	pH	Flow
1	38	36	48	6	95	3,2	1,6
2	42	36	48	6	95	2,6	1,4
3	38	40	48	6	95	2,6	1,4
4	42	40	48	6	95	3,2	1,6
5	38	36	52	6	95	2,6	1,6
6	42	36	52	6	95	3,2	1,4
7	38	40	52	6	95	3,2	1,4
8	42	40	52	6	95	2,6	1,6
9	38	36	48	10	95	2,6	1,4
10	42	36	48	10	95	3,2	1,6
11	38	40	48	10	95	3,2	1,6
12	42	40	48	10	95	2,6	1,4
13	38	36	52	10	95	3,2	1,4
14	42	36	52	10	95	2,6	1,6
15	38	40	52	10	95	2,6	1,6
16	42	40	52	10	95	3,2	1,4
17	38	36	48	6	99	3,2	1,4
18	42	36	48	6	99	2,6	1,6
19	38	40	48	6	99	2,6	1,6
20	42	40	48	6	99	3,2	1,4
21	38	36	52	6	99	2,6	1,4
22	42	36	52	6	99	3,2	1,6
23	38	40	52	6	99	3,2	1,6
24	42	40	52	6	99	2,6	1,4
25	38	36	48	10	99	2,6	1,6
26	42	36	48	10	99	3,2	1,4
27	38	40	48	10	99	3,2	1,4
28	42	40	48	10	99	2,6	1,6
29	38	36	52	10	99	3,2	1,6
30	42	36	52	10	99	2,6	1,4
31	38	40	52	10	99	2,6	1,4
32	42	40	52	10	99	3,2	1,6
33	40	38	50	8	97	2,9	1,5

Es folgen die Abbildungen der mit DryLab 4 modellierten Versuchsplanexperimente (Chromatogramme Exp.1 – Exp.33)

