

Quality by Design in der Chromatographie

Mehrdimensionale Optimierung der RP-HPLC-Trennung eines Arzneimittels

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

Analytical Quality by Design (AQbD), als Adaption des Quality by Design (QbD) auf die Anforderungen der Analytik, ist ein risikobasierter und wissenschaftlich fundierter Ansatz zur Entwicklung und Validierung von analytischen Methoden.

Gesicherte Aussagen zur robusten Optimierung einer RP-HPLC-Methode erhält man aber nur, wenn sowohl der Einfluss der HPLC-Methodenparameter (Einflussgrößen, Faktoren) auf die HPLC-Trennung als auch die multivariaten Wechselwirkungen der HPLC-Methodenparameter untereinander untersucht werden¹.

Die robuste Optimierung der RP-HPLC-Trennung selbst kann und muss mit den Methoden der Versuchsplanung durchgeführt werden, weil anders keine zuverlässigen Aussagen über die größte mögliche zulässige Method Operable Design Region (MODR) gemacht werden kann. In diesem „HPLC-Designspace“ sind die Methodenparameter zu einem definierten Risikoniveau für alle vorgegebenen Spezifikationen erfüllt und Bewegungen innerhalb des Design Space werden nicht als eine Änderung der Methode betrachtet. Die regulatorische Flexibilität ist somit für Bewegungen innerhalb des definierten Design Space gewährt.

In diesem Artikel wird eine strukturierte Methodik zur multidimensionalen robusten Optimierung der HPLC-Trennung eines Arzneimittels vorgestellt, die es gestattet mit mehreren Einflussgrößen und Zielgrößen zu arbeiten. Hinsichtlich des Optimierens mit negativen Auflösungswerten (-Rs) ist es notwendig, als Obergrenze des betroffenen Peakpaares minus $R_{s,krit.}$ einzugeben, so dass der Mehrzieloptimierer und die Risikoschätzmethoden die korrekten Kriterien verwenden.

Einführung

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Faktoren und Zielgrößen ab. In der

pharmazeutischen Analytik von kleinen Molekülen können je nach Molekül für ein Optimieren der HPLC-Trennung bis zu 10 Faktoren sowie deren Wechselwirkungen signifikant sein. Wichtige Zielgrößen sind die Auflösung R_s aller interessanten Peakpaare sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm $t_{R,max}$ zur Minimierung der Analysenzeit. Die Minimierung der Analysenzeit von Routinemethoden bietet ein erhebliches Potential zur Steigerung des Durchsatzes und der Produktivität im HPLC-Analysenlabor. Noch sehr häufig wird die Optimierung der einzelnen Faktoren schrittweise vorgenommen. Das immer noch vorherrschende Verfahren, einen Einflussfaktor zu optimieren, alle anderen konstant zu halten und dann nach dessen Untersuchung den nächsten zu optimieren, führt schnell zu einem ausufernden Aufwand mit geringem respektive falschem Informationsgehalt. Das QbD-Konzept für eine robuste Optimierung der RP-HPLC-Trennung verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer-unterstützter HPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE).

Methodisches

Die Strategie der 3-Faktor-Optimierung mit der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab@4² brachte einen wesentlichen Fortschritt für das Aufspüren und Verifizieren eines Optimums einer HPLC-Trennung. Die Einschränkungen der DryLab@4-Optimierung bestehen jedoch einerseits darin, dass nicht alle signifikanten Faktoren simultan optimiert werden können und das andererseits 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. Eine mehr als 3 Methodenparameter sowie mehr als 1 Zielgröße umfassende Optimierung einer RP-HPLC-Trennung ist aber in Kombination von

der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab@4 mit statistischer Versuchsplanung (DoE-Software z.B. MODDE 12 Pro³) und empirischer Modellierung realisierbar.

Experimentelles

Die systematische Entwicklung der HPLC-Methode zur Bestimmung des Gehalts an aktiven und verwandten Substanzen im Arzneimittel erfolgte mit der Modellierungssoftware DryLab@4 und beruhte auf der sukzessiven Optimierung der experimentellen Faktoren pH der wässrigen mobilen Phase, Säulofentemperatur T und Gradientenlaufzeit tG. In allen Läufen wurden die gleichen Testlösungen an Referenz- und Vergleichssubstanzen sowie an gestresster Probe in gleicher Menge (10 µl) injiziert. Hierzu wurden die Proben tiefgefroren aufbewahrt. In diesem Fall sind für jeden Peak in allen Grundläufen ungefähr gleiche Peakflächen zu erwarten.

Für das Ausführen der Experimente wurde eine Atlantis dC18-Säule (100 Å, 336 m²/g, 12.4% C), 150 x 4,6 mm eingesetzt. Gradientenzeiten von 20 min und 40 min für den linearen Gradienten von 0% auf 35% Acetonitril, Temperaturen von 25°C und 45°C sowie einem pH-Werte für den 15mM phosphatpufferhaltigen Eluenten A von pH 3.3 wurden gewählt. Die Flussrate war 1 ml/min. Zur Auswertung der jeweiligen Grundläufe erfolgte eine Peakzuordnung (peak tracking) über Retentionszeit, Peakfläche, Peaktaillig, Peakweite und UV-Vis-Spektrum für jeden Peak im Chromatogramm. Die DryLab-Grundläufe (Abbildung 2) wurden auf einer modifizierten Agilent 1100 ChemStation (Abbildung 1) ausgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Dioden Array-Detektor bei 210 und 230 nm.

DryLab®4 -Grundläufe RP-Gradient/Temperatur-Modell

Auffallend sind die Bewegungen der Peaks 7, 8, 9, 14 und 15 mit Peakumkehr bei Erhöhung von Gradientenzeit und Temperatur. Aus den DryLab®4 -Grundläufe lassen sich einerseits „interessante“ Peakpaare als mögliche Zielgrößen einer robusten Optimierung (Multi-Faktoren-Modell und Multi-Zielgrößen-Modell) der RP-HPLC-Trennung ableiten und andererseits die Experimente der statistischen Versuchsplanung prognostizieren, mit den Vorteil einer sehr effizienten Peakzuordnung und das alles ohne zusätzliche experimentelle Laborarbeit.

Versuchsplanung (DoE)

Die Verwendung eines Versuchsplans, in dem ein ganzer Satz von Einflussfaktoren⁴ systematisch gegeneinander variiert wird, hat diverse Vorteile, die gerade bei einem vielseitigen, schwer verständlichen flüssigchromatographischen Prozess, wie einer RP-HPLC-Methode zum Tragen kommen:

- Simultane Untersuchung mehrerer Einflussfaktoren,
- Simultane Untersuchung mehrerer Zielgrößen – eventuell sogar sehr vieler,
- kontrollierte Fehlerfortpflanzung durch Verwendung balancierter Versuchspläne,
- Berücksichtigung von Interaktion zwischen den Faktoren.

Bei den Einflussfaktoren in der pharmazeutischen HPLC-Analytik von kleinen Molekülen gelangt man – wenn man die RP-HPLC-Methode als Ganzes betrachtet – schnell zu 30 bis 40 solcher Faktoren (Abbildung 3). Angefangen bei den eigentlichen Trennparametern wie Start- und Endzeit des Gradienten, Temperatur, Start- und Endkonzentration des organischen Eluenten B, pH des wässrigen Eluenten A und Flussrate, hin zum Typ der Säule, ihrer Lebensdauer, der Konzentration der Analyten, dem Einfluss der Vorbereitung und am Ende sogar dem Einfluss der agierenden Laboranten oder dem des Labors. Experimentell sind so viele Faktoren nicht mehr zu bewältigen.

Abbildung 3 zeigt die mögliche Einflussfaktoren der HPLC-Methoden-Entwicklung⁵

Weder die Variation der Faktoren nach der Ein-Faktor-„Methode“ (OFAT) noch ein ausgeklügeltes Design of Experiments können so viele Faktoren greifbar machen.



Abb. 1 Gerät zur RP-HPLC-Methodenentwicklung

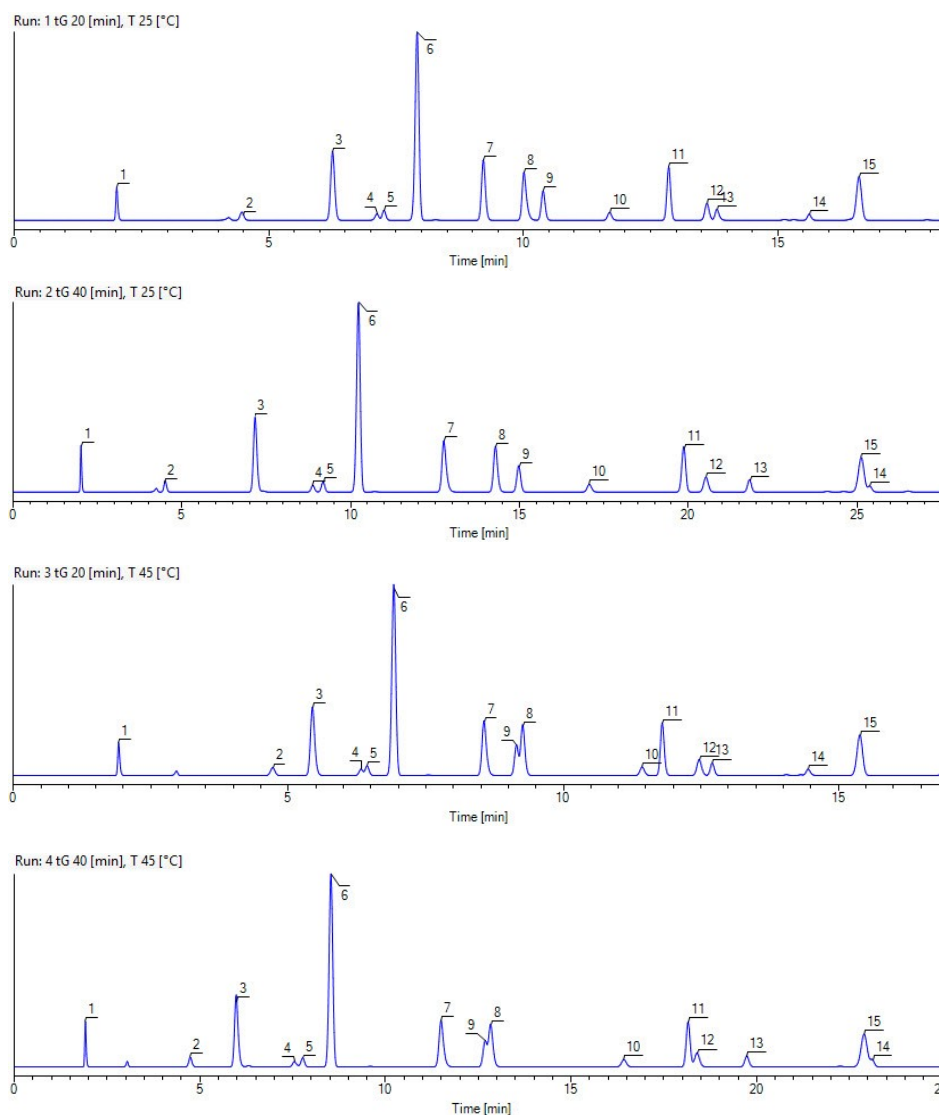


Abb. 2 Chromatogramme der DryLab®4 -Grundläufe RP-Gradient/Temperatur-Modell

Nur eine Kombination⁶

- von chromatographischer Expertise und Erfahrung,
- von theoretischen Konzepten wie First Principle Modeling und Computer-Simulation,
- von Quality Engineering Methoden wie Brainstorming, Risikoanalyse und FMEA,
- und von dem empirischen Ansatz der Versuchsplanung, Experimentdurchführung und Parameterschätzung

kann zum ausreichenden Verständnis einer RP-HPLC-Methode und zum Nachweis dieses Verständnisses führen.

Die robuste Optimierung der RP-HPLC-Trennung selbst kann und muss mit den Methoden der Versuchsplanung durchgeführt werden, weil anders keine zuverlässigen Aussagen über den größten möglichen zulässigen MODR gemacht werden können.

Zum Prognostizieren der Experimente des Versuchsplanes für eine 5 dimensionale Modellierung der Einflussfaktoren Gradientenzeit tG, Temperatur T, Startkonzentration Eluent B %Bs, Endkonzentration Eluent B %Be und Flussrate F wurden das DryLab®4 RP-Gradient/Temperatur-Modell benutzt.

Um robust zu optimieren, ist sowohl ein Multi-Faktoren-Modell als auch ein Multi-Zielgrößen-Modell notwendig.

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) – eine Optimierung durchgeführt.

Simultanes Optimieren einer RP-HPLC-Trennung

Mit der simultanen Optimierung (Response Surface Modelling) gelingt es nun mit möglichst wenigen strukturierten Versuchen, maximale Information über den Wirkzusammenhang zwischen mehreren Faktoren und mehr

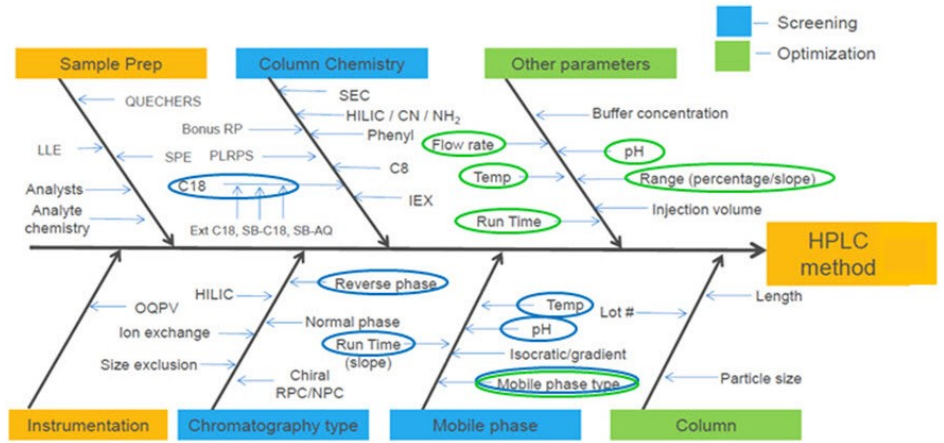


Abb. 3 Mäßigung Einflussfaktoren der HPLC-Methoden-Entwicklung

Name	Abbr.	Units	Type	Settings	Transform	Precision
Gradientenzeit	tG	min	Quantitative	20 to 60	None	0,1
Temperatur	T	°C	Quantitative	25 to 45	None	0,5
Eluent Bstart	%Bs	%	Quantitative	0 to 5	None	0,5
Eluent Bend	%Be	%	Quantitative	30 to 35	None	0,5
Fluss	F	ml/min	Quantitative	0,5 to 1,5	None	0,01

Abb. 4 Faktoren und Faktorenbereiche

als einer Zielgröße der RP-HPLC-Trennung zu erhalten.

Das DoE-Experiment muss so geplant werden, dass damit zuverlässig der Nachweis einer robusten Optimierung erbracht werden kann. Hierzu kann man sich in der Regel mittlerer Versuchspläne wie faktorielle Versuchspläne bedienen. Da die Schätzung von Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen und ihren Einfluss auf die Zielgrößen beim Optimieren einer HPLC-Trennungen sehr wichtig ist, wurde ein Rechtschaffner-Versuchsplan mit 22 Versuchen verwendet.

Rechtschaffner Pläne sind nicht ganz ausbalancierte und deshalb nur fast orthogonale, gesättigte Fraktionen der Auflösung V eines 2ⁿ oder 3ⁿ faktoriellen Designs. Sie erlauben die Schätzung aller Haupteffekte sowie aller erster Ordnung-Wechselwirkungen ohne Vermengung und unterstützen wie in unserem Fall des 3ⁿ faktoriellen Designs auch die Verwendung quadratischer Terme.

Faktoren und Zielgrößen der robusten Optimierung einer RP-HPLC-Trennung

Zur Problemlösung wird nun Einfluss und Wechselwirkung der Faktoren sowie der Zielgrößen auf die robuste Optimierung der RP-HPLC-Trennung untersucht und visualisiert.

Den Faktoren wird meist ein wesentlicher Einfluss auf die Qualitätsmerkmale unterstellt. Sie werden deshalb innerhalb der statistischen Versuchsplanung methodisch untersucht. Hierzu sollten größere Faktorenbereiche (Abbildung 4) gewählt werden, wenn auch mit der größeren Gefahr von Interaktionen und das Auftreten von negativen Auflösungswerten aber auch mit der Möglichkeit eines größeren MODR.

Die Variationen für die Faktoren sind Erfahrungswerte. Durch diese Variation der Faktoren wird auf den Bereich, der für die Untersuchung relevant ist, fokussiert. Dabei treten häufig Zielkonflikte auf. Einstellungen der Fak-

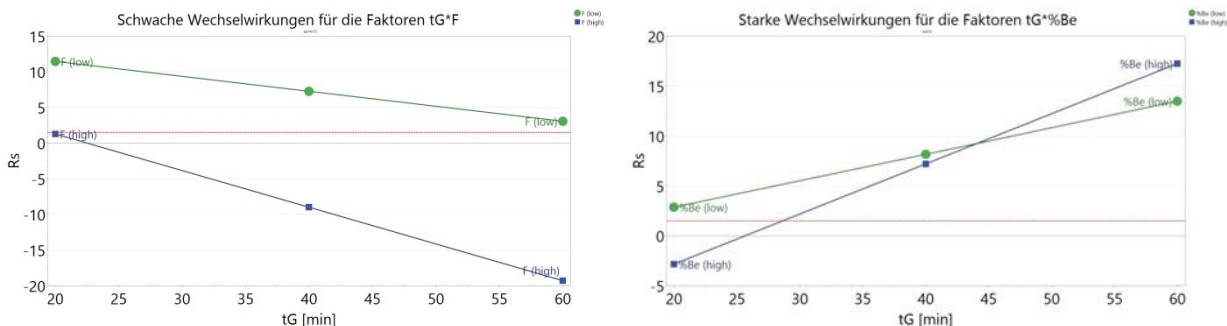


Abb. 5 Schwache und starke Zwei-Faktor-Wechselwirkungen

toren, die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen ungünstig sein und es treten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren auf. In der Flüssigchromatographie muss man immer mit signifikanten Zwei-Faktor-Wechselwirkungen AB (Abbildung 5) rechnen.

Der Effekt des Faktors A (t_G) auf die betrachtete Zielgröße Auflösung R_s hängt ab vom Wert des Faktors B (F , %Be) und umgekehrt. Die Faktoren beeinflussen sich in ihrer Wirkung auf die Zielgröße gegenseitig.

Meist benötigt man mehrere Zielgrößen (Abbildung 6) um alle Ziele des DoE-Experiments abzubilden.

Bei der Optimierung einer RP-HPLC-Trennung sollte neben der Auflösung des „kritischen Peakpaares“ der nominalen RP-HPLC-Trennung auch weitere interessante Peakpaare respektive deren Auflösungen als Zielgrößen in die Betrachtung einbezogen werden. Im vorliegenden Fall sind es die Peakpaare 3/4, 4/5, 9/8, 10/11, 11/12 und 14/15 (rote Peak-Kennzeichnung), abgeleitet aus den mit DryLab®4 prognostizierten Experimenten (Abbildung 7) des Versuchsplanes.

Recht schön ist auch in den 6 Chromatogrammen zu erkennen, wie in Abhängigkeit von der Variierung der Einflussfaktoren im Versuchsplan sich die Elutionsreihenfolge der Peaks in den Chromatogrammen ändert. Die „richtige“ Zuordnung der Peaks in den einzelnen Versuchsplanexperimenten, das sogenannte „Peak Tracking“, erfolgte mit „PeakMatch®“ (DryLab®4-Modul) und ist eine nicht zu unterschätzende Aufgabe für den Chromatographen und ist gleichfalls eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche robuste Optimierung der RP-HPLC-Trennung, d.h. zuerst Chromatographie und dann Statistik.

Rohdaten und Diagnose/Interpretation der DoE-Experimente

Die Rohdaten der DoE-Experimente sind in den Rohdaten-Plots (Abbildung 8) der Peakpaare aufgezeigt.

Vorsicht ist bei der Verwendung der Auflösung als Zielgröße immer dann geboten, wenn auf Grund der Änderung der Trennparameter im Versuchsplan die Reihenfolge der Peaks in den Chromatogrammen sich umkehrt. Denn dann wird diese Zielgröße unstetig (genauer gesagt, deren Ableitung) und sie ist nicht mehr modellierbar. Besser ist es, dann eine vorzeichenbehaftete Auflösung zu verwenden, die nicht ausschließlich für benachbarte oder gar kritische, sondern für alle interessanten Peakpaare der Trennung definiert ist und die negativ werden kann, wenn $t_{R,1} < t_{R,2}$ ist; dann bleiben diese Zielgrößen glatt genug für die

Name	Abbr.	Units	Transform	Type	Min	Max
pp3/4	R34		None	Regular	1,5	
pp4/5	R _s 45		Log: 10Log(Y)	Regular	1,5	
pp9/8	R _s 98		None	Regular		-1,5
pp10/11	R1011		None	Regular	1,5	
pp11/12	R1112		None	Regular	1,5	
pp14/15	R1415		None	Regular		-1,5
tR _{max}	tR	min	None	Regular		35

Abb. 6 Zielgrößen der RP-HPLC-Trennung

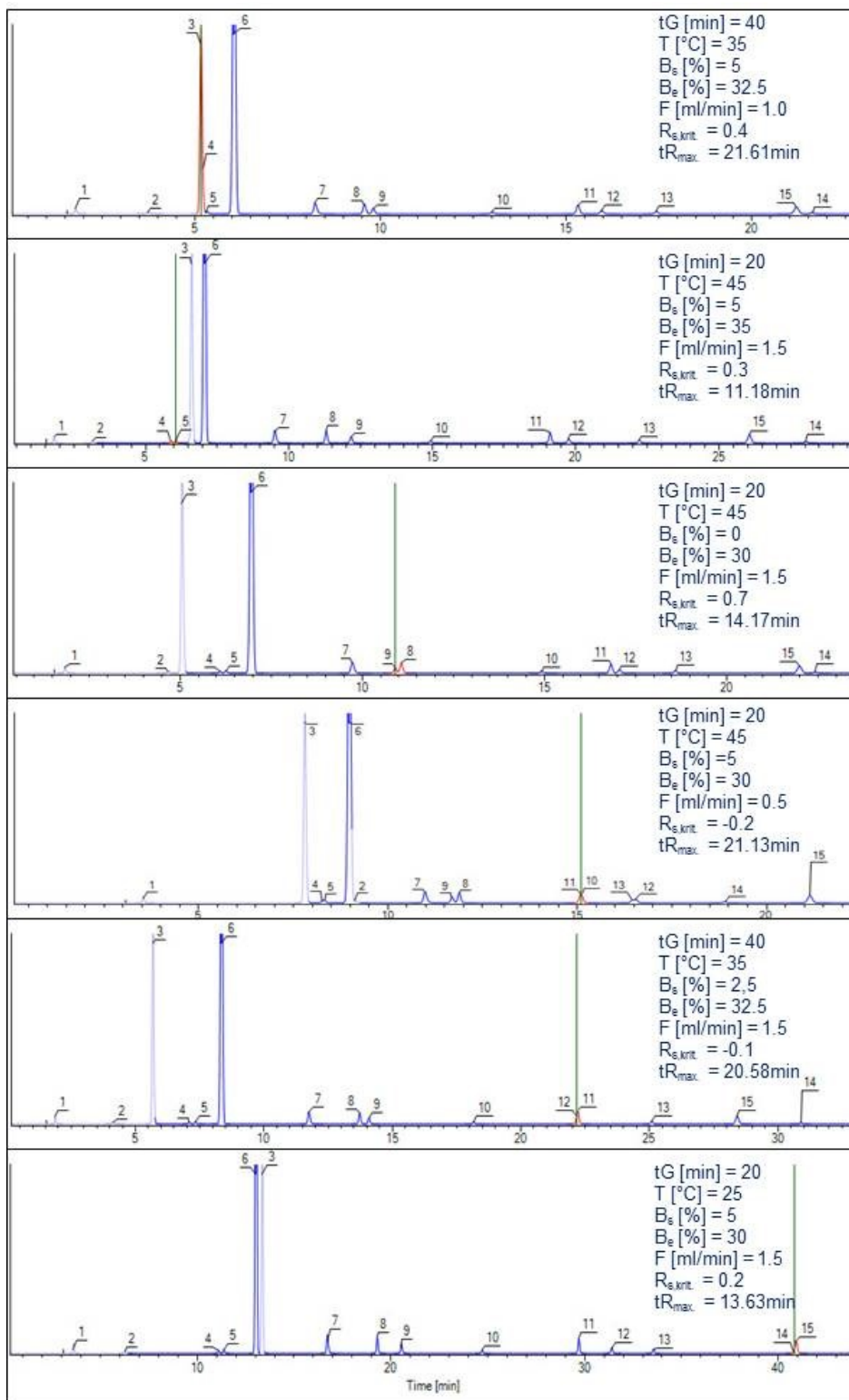


Abb. 7 Chromatogramme der Rechtschaffen-Versuchsplanexperimente 19, 2, 13, 11, 21, 15

Modellierung. Die Forderung, dass alle so definierten Auflösungen oberhalb von 1,5 zu liegen haben wird ersetzt durch die Option, oberhalb von 1,5 oder unterhalb von -1,5 zu liegen.

Basierend auf den Ergebnissen des Versuchsplanes wurde mittels softwaremäßiger Auto-Transformation und Auto-Tuning für jede Zielgröße ein Modell (Abbildung 9) erstellt. Anschließend wird mit Hilfe dieser Modelle, nach geprüfter Zulassung durch einfache statistische Diagnostiken eine robuste Optimierung durchgeführt.

Das Auto-Tuning entfernt automatisch die Terme aus dem Modell, wenn der p-Wert für den Koeffizienten größer als 0,05 ist und Q2 nach dem Entfernen des Terms ansteigt.

In dem Versuchsplan werden die ausgewählten Faktoren alle systematisch gegeneinander variiert, die Auswahl der Einstellungskombinationen ist aber so geschickt ausbalanciert, dass die Wirkung der einzelnen Faktoren unabhängig voneinander als Differenzen von Mittelwerten ermittelt werden kann und sehr fehlerresistent ist⁷. Moderne Versuchsplanungssoftware stellt diese Abhängigkeiten als Koeffizienten eines mathematischen Regressionsmodells dar, welches einfach interpretiert und diagnostiziert werden kann. Der Wert eines Koeffizienten in einem richtig skalierten Modell zeigt an, um wie viel der entsprechende Faktor die entsprechende Zielgröße maximal verändern kann (Abbildung 10).

Die Faktoren Gradientenzeit und Flussrate haben in allen Fällen signifikanten Einfluss. Auch lineare Zwei-Faktor- und quadratische Wechselwirkungen tG x tG, F x F sind für alle Peakpaare signifikant (an den Intervallen erkennbar).

Zur Modelldiagnose sollte man sich die Residuen (Abbildung 11), also die Modellabweichungen, ansehen.

Neben diesem „Ausreißeralarm“ gibt es noch eine Reihe von solchen Grafiken, aus denen man im ungünstigen Fall „Alarmsignale“ ablesen kann:

- „Zentrumspunkt-Alarm“,
- „Transformationsalarm“,
- „Reproduzierbarkeitsalarm“,
- „Dominanzversuchsalarm“ und
- „Alarm der allgemeine Modellschwäche“.

Auf diese Alarmszenarien muss man reagieren, entweder mit einer Transformation der Messwerte vor der Auswertung, mit einer Erläuterung im Dossier, mit einer Wiederholung eines Versuchs oder im Extremfall mit einer Wiederholung des gesamten Versuchsplans, dann aber bei veränderten Grenzen für die Faktoren.

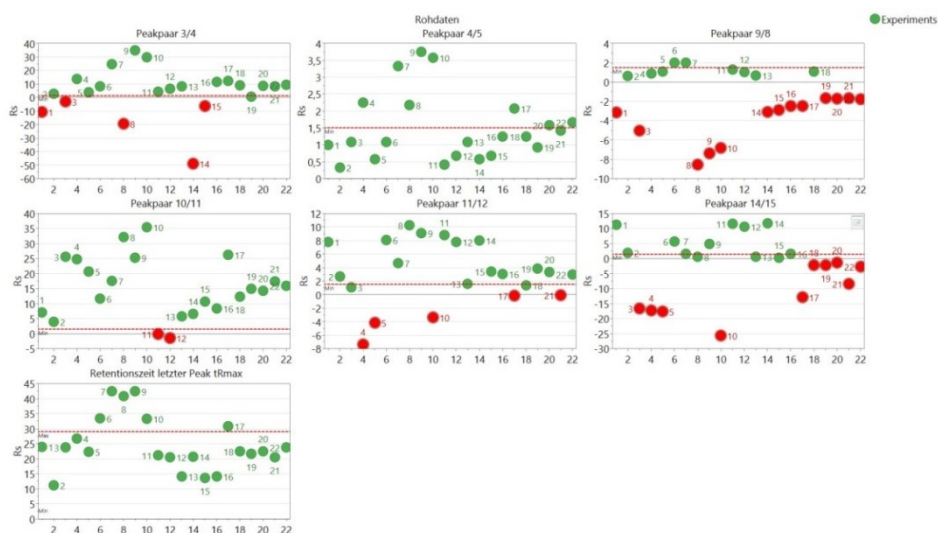


Abb. 8 Rohdaten-Plots der DoE-Experimente für die Peakpaare 3/4, 4/5, 8/9, 10/11, 11/12, 14/15 und tRmax, für alle rot gekennzeichnete Rohdaten sind die Auflösungswerte der Peakpaare negativ (Peakumkehr).

Response	New model
pp4/5	tG, T, %Bs, %Be, F, tG*tG, %Bs*%Bs, %Be*%Be, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*F, %Bs*F, %Be*F
pp9/8	tG, T, %Bs, %Be, F, tG*tG, T*T, %Bs*%Bs, %Be*%Be, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*%Be, T*F, %Bs*%Be, %Bs*F, %Be*F
pp10/11	tG, T, %Bs, %Be, F, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, T*%Bs, T*%Be, T*F, %Bs*%Be, %Bs*F
pp11/12	tG, T, %Bs, %Be, F, tG*tG, %Bs*%Bs, %Be*%Be, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*%Be, T*F, %Bs*F
pp14/15	tG, T, %Bs, %Be, F, tG*tG, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*F, %Bs*F
tRmax	tG, T, %Bs, %Be, F, tG*tG, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*%Be, %Bs*%Be, %Bs*F, %Be*F
pp3/4	tG, T, %Bs, %Be, F, T*T, %Bs*%Bs, F*F, tG*T, tG*%Bs, tG*%Be, tG*F, T*%Bs, T*F, %Bs*%Be, %Bs*F

Abb.9 Auto-Transformation und Auto-Tuning-Modelle der 7-Zielgrößen



Abb. 10 Einfluss der Faktoren auf die 6 Zielgrößen der Auflösung (Rs^{3/4}, Rs^{4/5}, Rs^{9/8}, Rs^{10/11}, Rs^{11/12}, Rs^{14/15}) und tRmax.

Insbesondere die Verfügbarkeit moderner Methodenwerkzeuge des statistischen Software-Tools wie Mehrzielgrößen-Optimierer, Sweet-Spot-Analyse, Risiko-Höhenliniengrafiken und Hyperwürfel zur Design Space Charakterisierung ermöglichen es, auch bei Optimierung mit mehreren Faktoren und mehreren Zielgrößen robuste Faktorbereiche aufzufinden. Aus den Sweet-Spot-Grafiken (Ab-

bildungen 12/13) der Faktoren sind erste Hinweise auf mögliche Arbeitsbereiche abzuleiten.

Bei einem Fluss von 1 ml/min und Startkonzentrationen von 0% bis 2.5% Acetonitril werden für einen Gradientenzeit-Bereich von 37min bis 60min und einen Temperaturbereich 25°C bis 36°C erfolgversprechende

Trennbedingungen gefunden (mittlere und rechte Spalte der Abbildung 12).

Weitere interessante Arbeitsbereiche zeigen sich für Gradientenzeiten von 31min bis 53min, einen Temperaturbereich 25°C bis 37°C bei Startkonzentrationen Eluent B von 0% und 2.5% und Endkonzentrationen Eluent B von 30%, 32.5% und 35% (linke und mittlere Spalte der Abbildung 13).

Konkretisieren lassen sich diesen Aussagen mit einer Risiko-Höhenlinien-Grafik des Design Space (Abbildung 14).

Ein erfolgversprechender Arbeitsbereich (grüne Fläche) mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% ergibt sich für eine Gradientenzeitbereich von 40.3min bis 49.3min, einen Temperaturbereich 25°C bis 30.4°C bei Startkonzentrationen Eluent B von 0% und Endkonzentration Eluent B von 30% (linke Spalte unten der Abbildung 14).

Hypercube, MODR und PAR der RP-HPLC-Trennung

Aleinige Fokussierung auf die Maximierung der Auflösung (Ziel der HPLC-Modellierungs-Software DryLab® oder Chromsword®) ist für eine Optimierung der RP-HPLC-Trennung nicht zielführend. Eine größerer Auflösung für die Analyse von aktiven Substanzen als $R_s > 1.5$ oder für die Analyse von Verunreinigungen als $R_s > 2$ führt nur zu längeren Analysenzeiten. Ziel der robusten Optimierung ist es eine „Method Operable Design Region“ (MODR) und ein „Proven Acceptable Range“ (PAR) zu etablieren.

Voraussetzung für eine zuverlässige Aussage zur robusten Optimierung und der Design Space Bestimmung einer RP-HPLC-Trennung ist die Findung des robusten Arbeitspunktes unter Einbeziehung aller Einflussfaktoren, wie Gradientenzeit, Temperatur, Startkonzentration Eluent B und Flussrate sowie der Auflösung aller interessanten Peakpaare als Zielgrößen. Für die Optimierung der RP-HPLC-Trennung werden die Zielgrößen $R_{s3/4}$, $R_{s4/5}$, $R_{s10/11}$, $R_{s11/12}$, maximiert ($R_s \geq 1.5$) und die Zielgrößen $R_{s9/8}$, $R_{s14/15}$ ($R_s \geq -1.5$) sowie die Zielgröße tR_{max} minimiert (Abbildung 15).

Zur Findung des robusten Arbeitspunktes werden die Einstellungen für die Faktoren ermittelt, die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes die größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen haben, diese entspricht dem robustesten Arbeitspunkt. In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Optimierung für robusten Arbeitspunkt⁸ zusammengestellt.

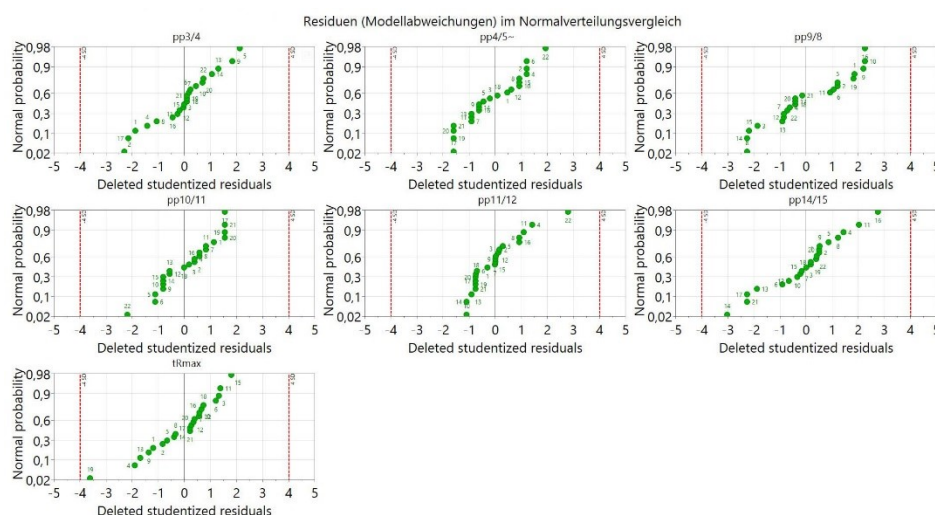


Abb. 11 Residuen als Vielfache der Reststandardabweichung, durch Achsenverzerrung linearisiert dargestellt, für den Vergleich mit der Normalverteilung.

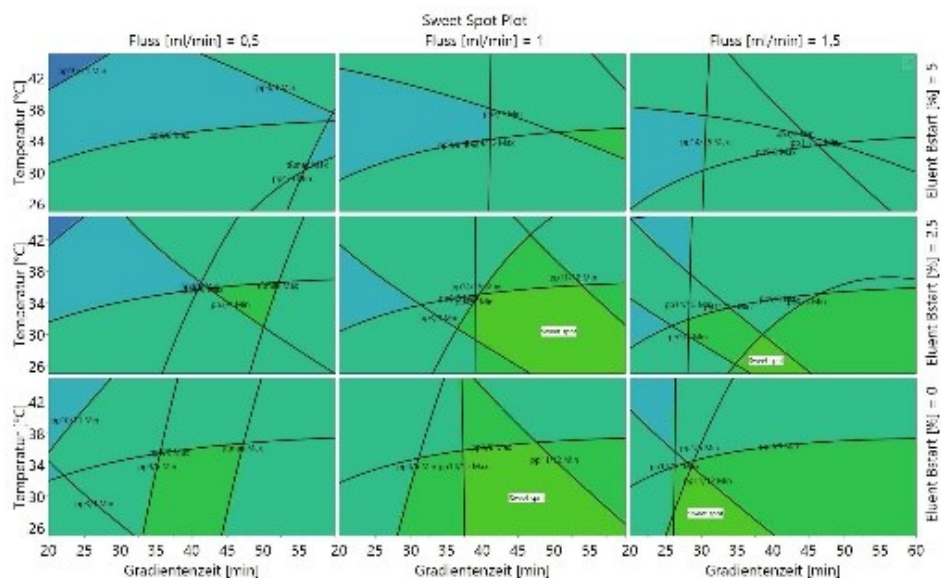


Abb. 12 Sweet-Spot-Grafik der Einflussfaktoren Gradientenzeit, Temperatur, Flussrate und Startkonzentration Eluent B.

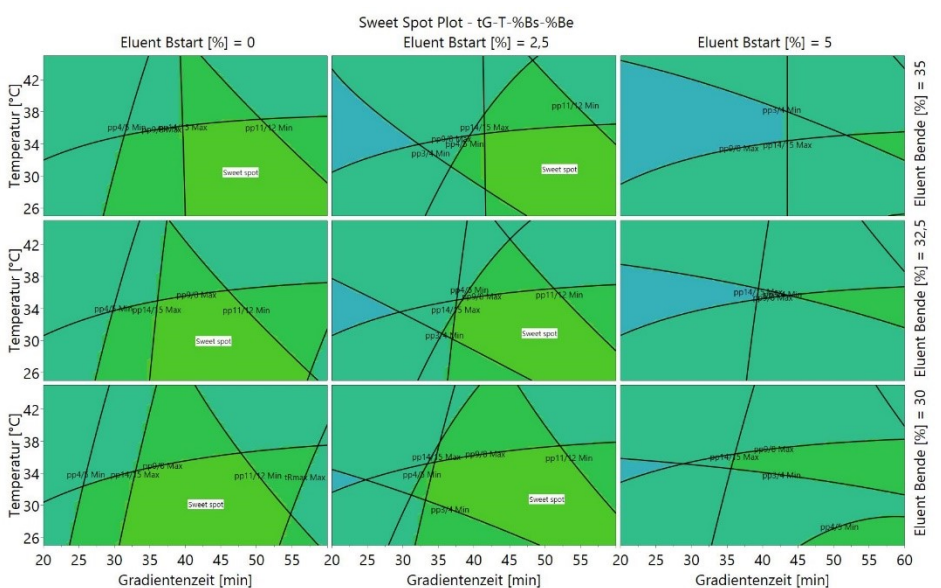
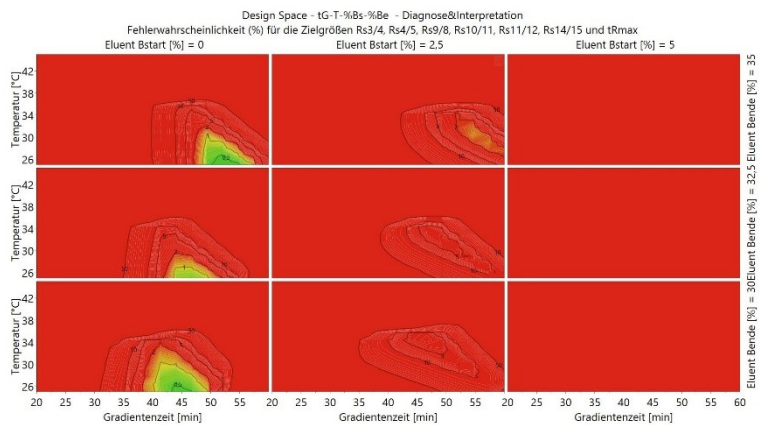


Abb. 13 Sweet-Spot-Grafik der Einflussfaktoren Gradientenzeit, Temperatur, Startkonzentration Eluent B und Endkonzentration Eluent B.



Response	Criterion	Min	Max	Graph
pp11/12	Maximize	1,50		
tRmax	Minimize		35,00	

Response	Criterion	Min	Max	Graph
pp3/4	Maximize	1,50		
pp4/5	Maximize	1,50		
pp9/8	Minimize		-1,50	
pp10/11	Maximize	1,50		
pp11/12	Maximize	1,50		
pp14/15	Minimize		-1,50	
tRmax	Minimize		35,00	

Abb.15: Robuste Optimierung einer RP-HPLC-Trennung mit 1 und 6 Zielgrößen für die Auflösung und jeweils tRmax.

Abb.14: Risiko-Höhenlinien-Grafik der Einflussfaktoren Gradientzeit, Temperatur, Startkonzentration Eluent B und Endkonzentration Eluent B.

Response	Criterion	Value	Graph	Prob. of failure
pp3/4	Maximize	22,66		0,06%
pp4/5	Maximize	2,97		0,02%
pp9/8	Minimize	-5,03		0%
pp10/11	Maximize	22,66		0,01%
pp11/12	Maximize	3,22		0,26%
pp14/15	Minimize	-6,31		0,06%
tRmax	Minimize	30,44		0%
Factor	Role	Value	Graph	Factor contribution
Gradientzeit	Free	52,00		35,63
Temperatur	Free	26,33		18,45
Eluent Bstart	Free	0,67		15,55
Eluent Bende	Free	34,67		8,29
Fluss	Free	0,97		22,08

Response	Criterion	Value	Graph	Prob. of failure
pp11/12	Maximize	4,81		0%
tRmax	Minimize	22,10		0%
Factor	Value	Graph	Factor contribution	
Gradientzeit	Free	33,33		27,64
Temperatur	Free	34,33		7,35
Eluent Bstart	Free	3,33		9,95
Eluent Bende	Free	33,33		6,66
Fluss	Free	0,83		48,39

Abb. 17 Robuster Arbeitspunkt, Zielgrößenwerte und Beiträge der Faktoren zur Optimierung einer RP-HPLC-Trennung mit einer Zielgröße für die Auflösung ($R_s^{11/12}$) und tRmax.

Abb. 16 Robuster Arbeitspunkt, Zielgrößenwerte und Beiträge der Faktoren zur Optimierung einer RP-HPLC-Trennung mit 6 Zielgrößen für die Auflösung ($R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{9/8}$, $R_s^{10/11}$, $R_s^{11/12}$, $R_s^{14/15}$) und tRmax.

Response	Criterion	Value	Graph	Prob. of failure
pp3/4	Predicted	-2,14		
pp4/5	Predicted	1,12		
pp9/8	Predicted	-1,47		
pp10/11	Predicted	11,31		
pp11/12	Maximize	4,81		0,04%
pp14/15	Predicted	2,50		
tRmax	Minimize	22,10		0%
Factor	Value	Graph	Factor contribution	
Gradientzeit	Free	33,33		27,64
Temperatur	Free	34,33		7,35
Eluent Bstart	Free	3,33		9,95
Eluent Bende	Free	33,33		6,66
Fluss	Free	0,83		48,39

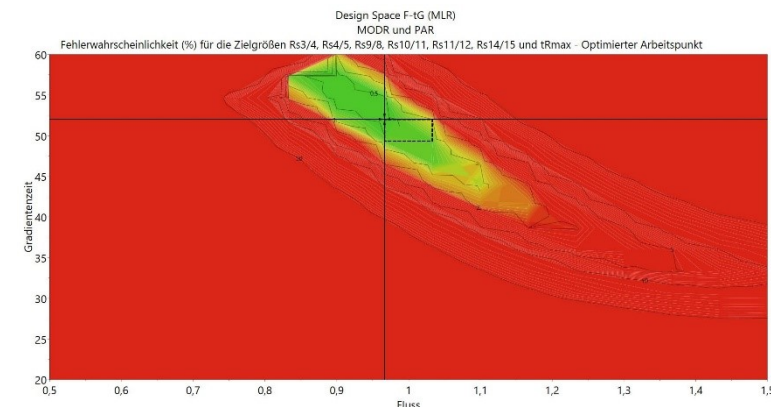


Abb. 19 Robuster Arbeitspunkt und MODR (Hyperwürfel) der RP-HPLC Trennoptimierung mit 6 Zielgrößen für die Auflösung ($R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{9/8}$, $R_s^{10/11}$, $R_s^{14/15}$) und tRmax.

Abb. 18 Robuster Arbeitspunkt, Zielgrößenwerte und Beiträge der Faktoren zur Optimierung einer RP-HPLC-Trennung mit einer Zielgröße für die Auflösung ($R_s^{11/12}$) unter Berücksichtigung der weiteren 5 Zielgrößen für die Auflösung ($R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{9/8}$, $R_s^{10/11}$, $R_s^{14/15}$) und tRmax.

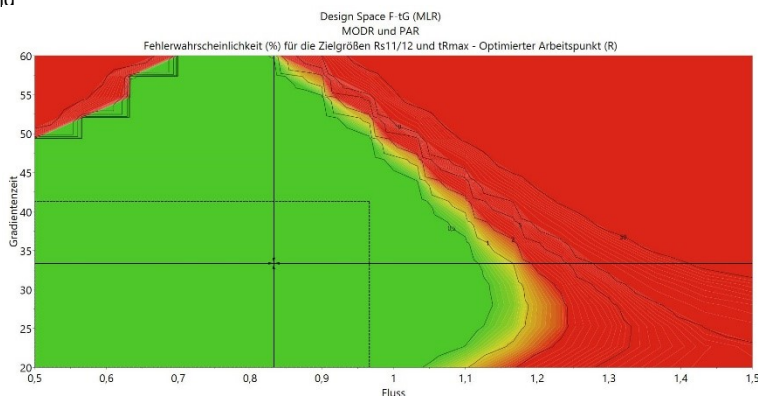


Abb. 20 Robuster Arbeitspunkt und MODR (Hyperwürfel) der RP-HPLC Trennoptimierung mit 1 Zielgröße für die Auflösung ($R_s^{11/12}$) und tRmax.

Folgt man der heute noch weit verbreitete Strategie der Optimierung einer HPLC-Trennung mit nur einer Zielgröße für die Auflösung z.B. $R_s^{11/12}$ (Peakpaar mit dem kleinsten Wert für die Auflösung $R_s = -0.1$ aller Versuchsplanexperimente) ist dies für eine robuste Optimierung nicht zielführend (Abbildung 17).

Während für die 7-Zielgrößen-Optimierung (Abbildung 16) der Faktor Gradientenzeit mit 35.6% den stärksten Einfluss und der Faktor Endkonzentration Eluent B mit 8.3% den geringsten Einfluss auf die RP-HPLC-Trennung hat sind es für die 2-Zielgrößen-Optimierung (Abbildung 17) die Faktoren Fluss mit 48.3% und Endkonzentration Eluent B mit 6.7%.

Je nach Anzahl der gewählten Zielgrößen unterscheiden sich sowohl die berechneten robusten Arbeitspunkte als auch die Zielgrößen-Werte. Bei der 2-Zielgrößen-Optimierung wird für das betrachtete Peakpaar 11/12 mit $R_s = 4.8$ (Abbildung 17) zwar eine vielfach größere Auflösung als die Zielgrößenpezifikation $R_s \geq 1.5$ gefunden aber die RP-HPLC-Trennung ist dennoch nicht robust; denn für das Peakpaar 4/5 wird mit $R_s = 1.1$ (Abbildung 18) eine Auflösung unterhalb der Zielgrößenpezifikation prognostiziert, wenn alle 6 interessanten Peakpaare in die Prognose einbezogen werden. Zuverlässigen Aussagen über den größten möglichen zulässigen MODR können nur mit der Darstellung des Design Space Hypercube gemacht werden, dem größtmöglichen regelmäßigen Hyperwürfel⁹, der in das unregelmäßige Design Space-Volumen eingefügt werden kann. Der Hypercube ist ein hochdimensionaler Würfel, der die Method Operable Design Region (MODR) definiert: Für jeden Faktor wird ein Bereich angegeben, innerhalb dessen alle Faktoren nach Belieben variiert werden können, ohne dass Gefahr besteht, dass irgendein Auflösungs-Wert unter die Spezifikation $R_s \geq 1.5$ fällt. Berücksichtigt werden hierbei Modelfehler (X, Y), Reproduzierbarkeit (Pure Error) und Faktorpräzision in X sowie das eingestellte Fehlerrisiko von 1%. In der 2D-Design Space Darstellung der Faktoren mit den größten Einfluss auf die RP-HPLC-Trennung F und tG werden robuster Arbeitspunkt (Kreuz) und Hyperwürfel (gestrichelte Linie) abgebildet (Abbildungen 19/20).

Je nach Anzahl der gewählten Zielgrößen unterscheiden sich sowohl die berechneten robusten Arbeitspunkte als auch die Größe der Hyperwürfel. Für die heute immer noch vorherrschende Optimierung der Trennung mit nur einer Zielgröße für die Auflösung ($R_s^{11/12}$) wird ein vielfach größerer Hyperwürfel gegenüber der RP-HPLC Trennoptimierung mit 7 Zielgrößen erhalten.

Findung der Toleranzgrenzen (PAR) der RP-HPLC-Trennung

Basierend auf dem Design Space Hypercube werden die Toleranzgrenzen der RP-HPLC-Trennung durch die Werte für Hypercube low edge und Hypercube high edge gefunden (Abbildungen 21/22).

Für die RP-HPLC-Trennung der 2-Zielgrößen-Optimierung werden wesentlich breitere Faktorbereiche (grüne Flächen im „Hypercube range“) im Vergleich zur 7-Zielgrößen-Optimierung ausgewiesen. Diese Aussage steht im Gleichgang mit der Aussage zu den Flächengrößen der Hyperwürfel.

Ist die RP-HPLC-Trennung der 7-Zielgrößen-Optimierung aufgrund der engeren Toleranzgrenzen also weniger robust oder ist die Robustheit der 2-Zielgrößen-Optimierung eine „Pseudo“-Robustheit?

Kontrollstrategie der RP-HPLC-Trennung

Da die Grundläufe zur Entwicklung der RP-HPLC-Trennung des Arzneimittels mittels der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware DryLab®⁴ ausgeführt wurden, ist es nun auch möglich die Faktoreinstellungen eines jeden Punktes im MODR mit einem Chromatogramm zu prognostizieren und somit auf Einhaltung der Spezifikation zu überprüfen.

Die Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt (Abbildung 23) sowie an den Eckpunkten des Design Space Hypercube (Abbildungen 23/24/25) für die 7-Zielgrößen-Optimierung bestätigen die Robustheit der 7-Zielgrößen-Optimierung der RP-HPLC-Trennung.

An allen drei Punkten des Design Space Hypercubes werden für die 7-Zielgrößen-Trennoptimierung die Zielgrößenpezifikationen $R_{s,krit} \geq 1.5$ und $t_{R,max} \leq 35$ min. eingehalten.

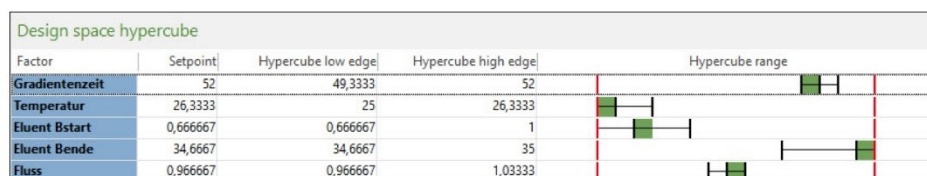


Abb. 21 Bewährte akzeptable Faktorbereiche (PAR) der RP-HPLC Trennoptimierung mit 6 Zielgrößen für die Auflösung ($R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{9/8}$, $R_s^{10/11}$, $R_s^{14/15}$) und $t_{R,max}$.

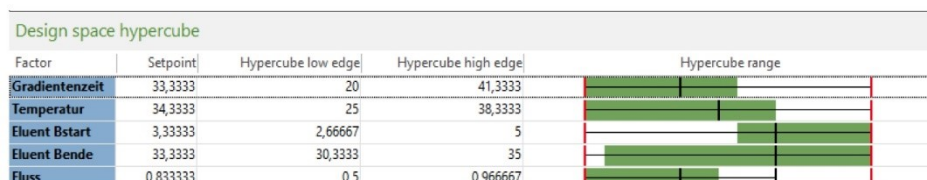


Abb. 22 Bewährte akzeptable Faktorbereiche (PAR) der RP-HPLC Trennoptimierung mit 1 Zielgröße für die Auflösung ($R_s^{11/12}$) und $t_{R,max}$.

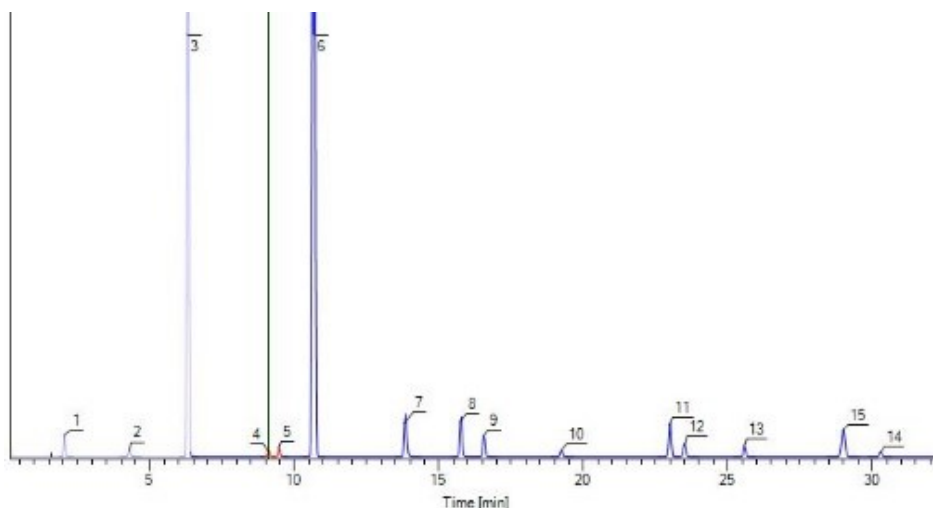


Abb. 23 Chromatogramm für den robusten Arbeitspunkt der 7-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 4/5.

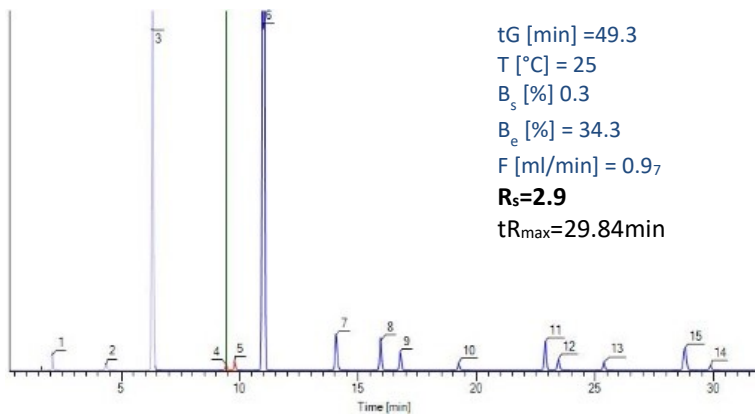


Abb. 24 Chromatogramm für den Hypercube „low edge“ Arbeitspunkt der 7-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 4/5.

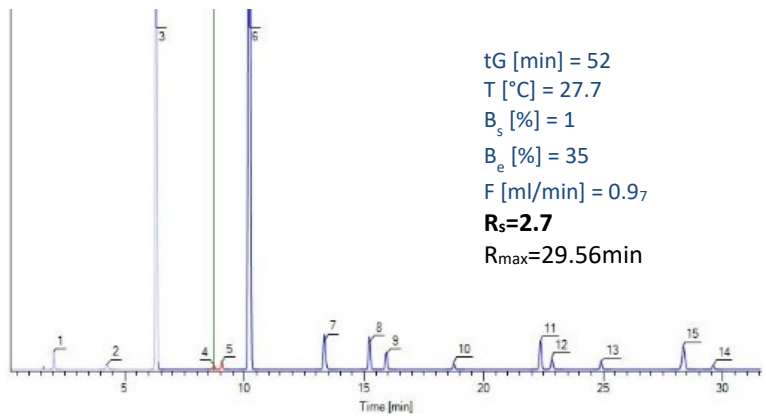


Abb. 25 Chromatogramm für den Hypercube „high edge“ Arbeitspunkt der 7-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 4/5.

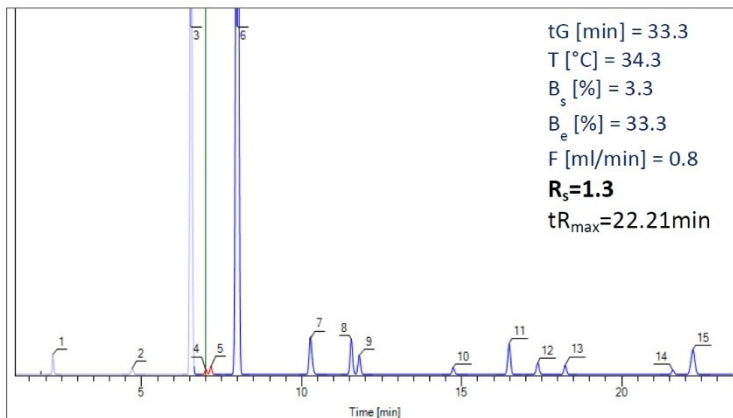


Abb. 26 Chromatogramm für den robusten Arbeitspunkt der 2-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 4/5.

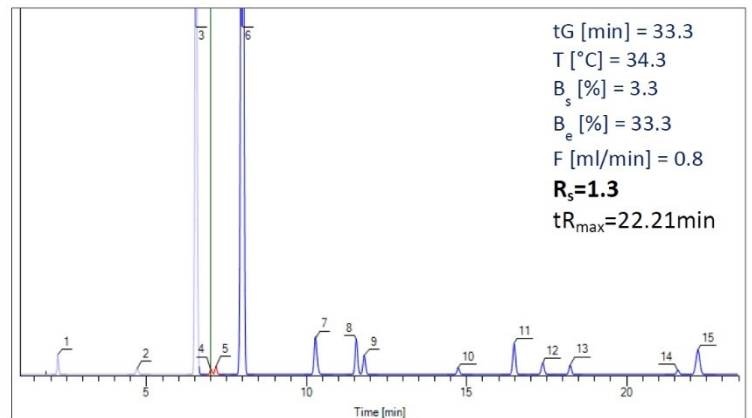


Abb. 27 Chromatogramm für den Hypercube „low edge“ Arbeitspunkt der 2-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 4/5.

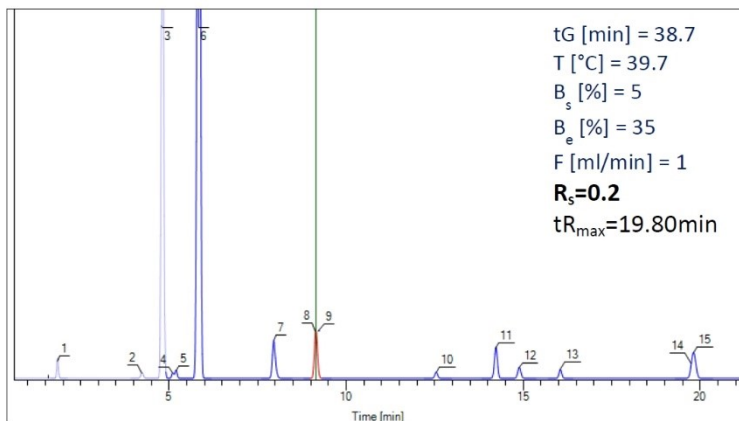


Abb. 28 Chromatogramm für den Hypercube „high edge“ Arbeitspunkt der 2-Zielgrößen-Optimierung, kritisches Peakpaar 8/9.

Für die 2-Zielgrößen-Optimierung sind in den Abbildungen 26 bis 28 die Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt sowie an den Eckpunkten des Design Space Hypercube dargestellt.

An allen drei Punkten des Design Space Hypercubes wird für die 2-Zielgrößen-Trennoptimierung die Zielgrößenpezifikation für die Auflösung $R_{s,krit} \geq 1.5$ nicht eingehalten. Die prognostizierten Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt sowie an den Eckpunkten des Design Space Hypercube belegen, dass die durch den Design Space Hypercube ausgewiesene Robustheit eine „Pseudo“-Robustheit ist.

Die Vorgangsweise, die robuste Trennoptimierung einer RP-HPLC-Methode mit allen interessanten Zielgrößen (7) und signifikanten Einflussgrößen (5) auszuführen und mittels robusten Arbeitspunkt, Design Space Hypercube (MODR) und Toleranzgrenzen (PAR) zu belegen, ist alleinig zielführend.

Zusammenfassung

Zur robusten Optimierung der RP-HPLC-Trennung wird ein fraktionierter faktorieller Versuchsplan verwendet.

Mit Hilfe 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 Einstellungsauigkeit der Faktoren (Präzision) mathematisch einbezogen. Nur das simultane Betrachten aller signifikanten Faktoren und der interessanten Zielgrößen führt zu wahren robusten Faktorbereichen (PAR) bei Einhaltung der Spezifikationen und hilft somit gesicherte Toleranzgrenzen für die signifikanten Faktoren der RP-HPLC-Trennung zu deklarieren.

Bei Änderungen der Faktoreinstellungen innerhalb der ausgewiesenen Toleranzgrenzen (Hypercube range, MODR) z.B. Anpassung der Trennung bei einer Methodenübertragung oder bei einer anfälligen Trennung, ist somit eine Revalidierung nicht erforderlich.

Anpassungen der Faktoreinstellungen sind in der HPLC-Praxis nicht gerade selten und werden auch heute noch überwiegend mit der „Trail und Error-Strategie vorgenommen.

Zur Qualitätssicherung der Trennung einer HPLC-Methode wird eine strukturierte Methodik vorgestellt, wie den Forderungen nach „Quality by Design“ in der Entwicklung einer HPLC-Trennung sehr effizient nachgekommen werden kann.

Die aufgezeigte Kombination von Modellierungs- und Diagnosemethoden zusammen mit dem Drill Down zu den Chromatogrammen ist, wie beschrieben, möglich. Eine komplette Software ist aber leider auf dem Markt nicht verfügbar. Eine Kopplung von flüssigchromatographischer Modellierungssoftware (DryLab®) mit Software zur statistischer Versuchsplanung und empirischer Modellierung (MODDE®) könnte das Problem lösen¹⁰.

Das Wissen zum Einfluss der signifikanten Faktoren auf den chromatographischen Trennprozess, die Findung des robustesten Arbeitspunktes der HPLC-Trennung, die realistische Schätzung von robusten, bewährten

Faktorbereichen (PAR) sowie die Visualisierung des MODR im Design Space der HPLC-Trennung verhelfen zu einer hohen Qualität im HPLC-Labor.

Danksagung

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Andreas Orth (Frankfurt University of Applied Sciences) für die fruchtbringenden Diskussionen zur Versuchsplanung mit der MODDE-Software verpflichtet.

Der Autor bedankt sich auch bei dem Molnar Institut für angewandte Chromatographie für die Bereitstellung der Chromatographie-Modellierungs-Software „DryLab@4“ mit den Modulen „PeakMatch@“ und „3-D Cube@“.

Ein Dankeschön gilt ebenfalls Conny Vikström von MKS Data Analytics Solutions (Sartorius Stedim Biotech) die ständige Bereitstellung der aktuellsten Versionen der Software MODDE Pro.

¹ S. Chatterjee, *Considerations for Analytical Methods - FDA Perspective, IFPAC Annual Meeting Baltimore, January 25, 2013*

² DryLab@4.0 Software – zur computergestützten Optimierung von 3 UHPLC-Faktoren, Molnár -Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)

³ MODDE 12 Pro®, msk data analytics solutions, Umea, Sweden

⁴ A. Orth Umesoft GmbH, Eschborn, Deutschland (2016)

⁵ J.Link und S. Lateef, Vinayck AK

⁶ A. Orth Umesoft GmbH, Eschborn, Deutschland (2016)

⁷ Soravia S., Orth, A.: *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)*

⁸ Finden einer Lösung mit maximalen Faktorbereichen

⁹ C. Vikström "Robust Optimization", MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014)

¹⁰ ANALYTIK NEWS (Abruf: 8. 2. 2017)

Bilke, H-W.: Quality by Design in der HPLC - Robustheitsprüfung einer HPLC-Trennung. Nov. 2016,

Bilke, H-W., Orth A.: Güte einer UHPLC-Trennung - Screenen von ACQUITY UHPLC® Säulen. Sept. 2016