

# Analytical Quality by Design in der (U)HPLC

## Ermittlung der bewährten Faktorbereiche (PAR) einer (U)HPLC-Methode

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

Analytical Quality by Design (AQbD) ist ein risikobasierter und wissenschaftlich fundierter Ansatz zur Entwicklung und Validierung von analytischen Methoden. Betrachtet man die (U)HPLC als Informationsbeschaffer für ein Zulassungsdossier, so steht die Kenntnis der bewährten Faktorbereiche (Proven Acceptable Range) der eingereichten UHPLC-Methode neben der Robustheit mit an vorderster Stelle in den Anforderungen der Behörden [1,2]. Solange Änderungen von Faktoreinstellungen innerhalb bewährter Faktorbereiche erfolgen, besteht kein Bedarf an einer Revalidierung der (U)HPLC-Trennung.

Die Basis für einen höheren Standard in der Qualität von (U)HPLC-Methoden ist ein umfassendes Verständnis des flüssigchromatographischen Trennprozesses und ein definierter Designspace (MODR) für die (U)HPLC-Trennung. In diesem „(U)HPLC-Designspace“ sind die Methodenparameter 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“ (statistische Versuchsplanung) ist der effektivste Ansatz um diese Ziele zu erreichen. Mithilfe der DoE-Software [3] werden in vergleichsweise wenigen Experimenten Ursache und Wirkung von (U)HPLC-Trennprozessen definiert und visualisiert.

Es wird eine strukturierte Methodik zur Ermittlung der bewährten Faktorbereiche (PAR) einer UHPLC-Methode vorgestellt. Nur durch die Angabe des robusten Arbeitspunktes, der bewährten Faktorbereiche (Proven Acceptable Range, PAR) und der Auflösung für das kritische Peakpaar wird die Güte einer UHPLC-Trennung hinreichend charakterisiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Ermittlung der bewährten Faktorbereiche der (U)HPLC-Trennung erlauben einen tiefgehenden

Einblick in den flüssigchromatographischen Trennprozess und führen zu einem hohen Verständnis dieses Prozesses.

### 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 die (U)HPLC-Trennungsoptimierung bis zu 10 Faktoren sowie deren Wechselwirkungen signifikant sein.

Solche Faktoren sind zu suchen in der Gradientenzeit (tG), der Temperatur (T), der ternäre Eluentzusammensetzung (tC) des organischen Eluenten B, der Startkonzentration (%Bs) und Endkonzentration (%Be) des organischen Eluenten B, dem pH des wässrigen Eluenten A (pH) sowie der Flussrate (F).

Wichtige Zielgrößen sind die kritische Auflösung  $R_{s,krit}$  für die optimale Peakauflösung (Auflösung für das am schlechtesten getrennte Peakpaar im Chromatogramm) 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 (U)HPLC-Analysenlabor.

Kommerziell erhältliche Software zur Computer unterstützten UHPLC-Methodenentwicklung (CMD) wie etwa DryLab [4] unterliegt den Einschränkungen einer maximal 3-Faktor-Optimierung sowie der Modellierung mit nur einer Zielgröße (Auflösung des kritischen Peakpaares) und kann somit nicht für alle signifikanten Faktoren einen möglichst großen nachweisbaren Zulässigkeitsbereich für die Faktoren liefern. Zudem ist das ermittelte Optimum aufgrund dieser Limitierungen nicht das „globale Optimum“ sondern irgendein „lokales Optimum“ [5].

Eine mehr als 3 Faktoren sowie mehr als 1 Zielgröße umfassende Optimierung einer (U)HPLC-Trennung als Grundvoraussetzung

der Ermittlung der bewährten Bereiche für alle signifikanten Faktoren ist durch Verknüpfung von chromatographischer Modellierungssoftware z.B. DryLab@4 und statistischer DoE-Software z.B. MODDE 12 Pro® realisierbar.

Das QbD-Konzept für die Sicherung der Qualität von HPLC-Trennungen verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer unterstützter (U)HPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE) [6-13].

### Experimentelles [14]

Die mobile Phase war eine Mischung von Acetonitril und 5 mM Ammoniumdihydrogenphosphat-Puffer mit pH-Werten von pH 2.0, 2.5 und 3.0. Der Analyt enthält 10 µg/ml Amlodipin und seine Ph.Eur.-Verunreinigungen (A, B, D, E, F, G und H), gelöst in Acetonitril:Wasser (30:70)(V/V).

Das experimentelle Design für 3 Faktor-Optimierung ist in der Abbildung 1 aufgezeigt. Zwei lineare Gradienten von 30 zu 90% B mit Gradientenzeiten von 3 min und 9 min wurden bei Temperaturen von 15°C und 45°C ausgeführt. Als wässrigen Eluent A kam 5 mM Phosphat-Puffer mit drei verschiedenen pH-Werten von 2.0, 2.5 und 3.0 zum Einsatz. Der organische Eluent B war Acetonitril. Die UHPLC-Trennungen wurden ausgeführt auf einem Waters Acquity System (binäre Pumpe, Autosampler, Photodiodenarray-Detektor,

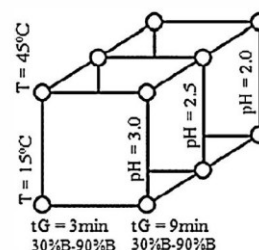


Abb. 1: Experimentelles Design für die 3 Faktor-Optimierung Gradientenzeit tG, Temperatur T und pH des wässrigen Eluenten.

Empower Software) mit einem Verweilvolumen von 0.125 ml. Detektiert wurde bei 230 nm. Injiziert wurden 5 µl.

Ableitend aus den Rohdaten [15] dieser 3-Faktor-Optimierungs-Strategie wurde für die simultane Optimierung der signifikanten Methodenparameter ein statistischer Versuchsplan mit den 6 Faktoren (Einflussgrößen) Gradientenzeit (tG), Temperatur (T), Startkonzentration (%Bs) und Endkonzentration (%Be) des organischen Eluenten B, pH des wässrigen Eluenten A (pH) und Flussrate (F) sowie mehreren Zielgrößen aufgestellt, abgearbeitet und visualisiert.

Mit einem Rechtschaffner-Versuchsplan [16] gelingt es nun mit möglichst wenigen strukturierten Versuchen (37), maximale Information über den Wirkzusammenhang zwischen mehr als 3 signifikanten Faktoren und mehr als einer Zielgröße einer UHPLC-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 optimieren, ist also ein Multi-Zielgrößen-Modell notwendig.

Dem scheinbaren Nachteil schwerer Handhabbarkeit und schwerer Interpretierbarkeit treten moderne statistische Software-Tools wirkungsvoll entgegen. Sie erledigen die mathematischen Berechnungen auf Knopfdruck, präsentieren die Auswertungs- und Vorhersageergebnisse in graphischer und auf Wunsch in tabellarischer Form [17] und erlauben es dem Analytiker somit, sich mit den eigentlichen flüssigchromatographischen Fragestellungen intensiv zu beschäftigen.

### Einflussgrößen der UHPLC-Trennung

Den Faktoren einer UHPLC-Trennung wird meist ein wesentlicher Einfluss auf die Qualitätsmerkmale unterstellt. Sie werden deshalb innerhalb der statistischen Versuchsplanung systematisch untersucht.

Vor der Untersuchung muss die Variation festgelegt werden, die die Faktoren im Versuchsraum annehmen sollen.

Die Variationen für die Faktoren sind Erfahrungswerte. Durch diese Variation der Faktoren wird auf den Bereich, der für die Untersuchung relevant ist, fokussiert. Alle hier gewählten Faktoren können quantitativ erfasst werden. Der Bereich, den alle Faktoren von ihrer minimalen bis zu maximalen Einstellung abdecken, nennt man Versuchsraum.

Tab. 1: Faktoren und Faktorbereiche einer 6-Faktor-Optimierung

Faktoren (Einflussgrößen)	Einheit	Faktorbereiche
Gradientenzeit	min	3 – 9
Temperatur	°C	15 - 45
Startkonzentration Eluent B	Vol. %B	25 – 35
Endkonzentration Eluent B	Vol. B	85 – 95
pH wässriger Eluent A	pH-Einheit	2.0 – 3.2
Flussrate	ml/min	0.25 – 0.75

### Zielgrößen der UHPLC-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 Optimieren einer UHPLC-Trennung sollte neben der Auflösung des „kritischen Peakpaares 1/2“ (Peakpaar mit der niedrigsten Auflösung im Chromatogramm) als eine wichtige Zielgröße auch weitere interessante Peakpaare resp. deren Auflösungen als Zielgrößen in die Betrachtung einbezogen werden. Im vorliegenden Fall sind es die Peakpaare 2/3, 3/4, 5/6, 6/7 sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm  $t_{R,max}$  zur Minimierung der Analysenzeit (Abbildung 2).

Wie dem Chromatogramm zu entnehmen ist, wird eine Abtrennung der aktiven Substanz von den Verunreinigungen sowie eine Trennung der Verunreinigungen untereinander mit einer völlig ausreichenden Auflösung von  $R_s=2.6$  für das kritische Peakpaar 1/2 erreicht.

Ein Problem ist, dass bei Optimierung der UHPLC-Trennung durch die erforderliche Variierung der Versuchsbedingungen eine

Umkehr der ursprünglichen Peakreihenfolge für Peakpaare auftreten kann. Wenn Änderungen in der Elutionsreihenfolge der Peaks auftreten, gibt es laut Literatur [18] Einwände gegen eine Modellierung der Auflösung als Zielgröße.

Erstens 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  $R_s^{(BA)} = -1.5$ ).

Innerhalb der Experimente des Versuchsplans können zweitens infolge der geänderten Versuchsbedingungen auch unterschiedliche Peakpaare als das kritische Peakpaar auftreten und diese Peakpaare sollten dann in die Modellierung einbezogen werden.

### Versuchsplanergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der 37 Experimente des Rechtschaffner-Versuchsplanes sind in den Rohdaten-Plots (Abbildung 3) dargestellt.

Zu beachten ist ein „negativer“ Auflösungs-wert des Peakpaares 6/7. Dieses Peakpaar weist in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen (Faktoreinstellungen) eine Peakumkehr auf. Neben der Elutionsreihenfolge ändert sich auch das kritische Peakpaar in Abhängigkeit von der jeweiligen Faktoreinstellung der Versuchsplanexperimente.

### Robuster Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung, Faktoreinfluss

Im folgendem wird nun für jeden Faktor der UHPLC-Trennung aus den erhaltenen Versuchsplanergebnissen ein bewährte Bereich (Proven Acceptable Range, PAR),

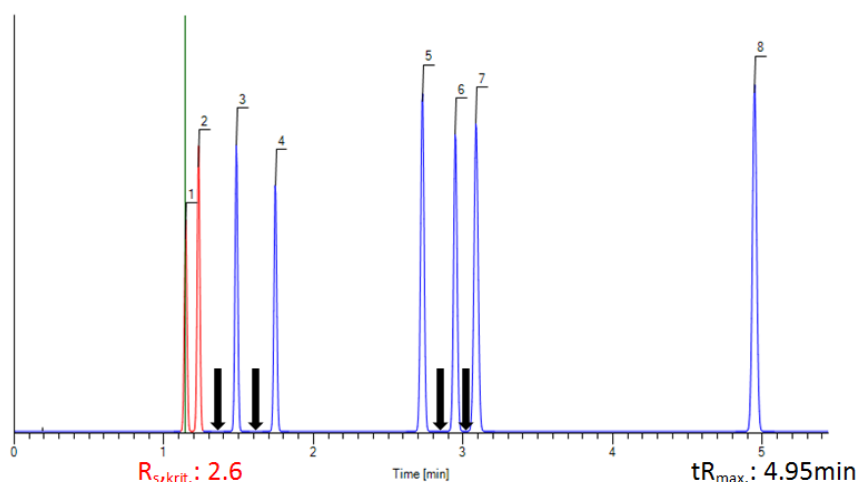


Abb. 2: Chromatogramme des optimalen Gradienten der 3-Faktor Optimierung mit den Zielgrößen  $R_{s,krit.1/2}$ ,  $R_s^{2/3}$ ,  $R_s^{3/4}$ ,  $R_s^{5/6}$ ,  $R_s^{7/6}$ ,  $t_{R,max}$ .

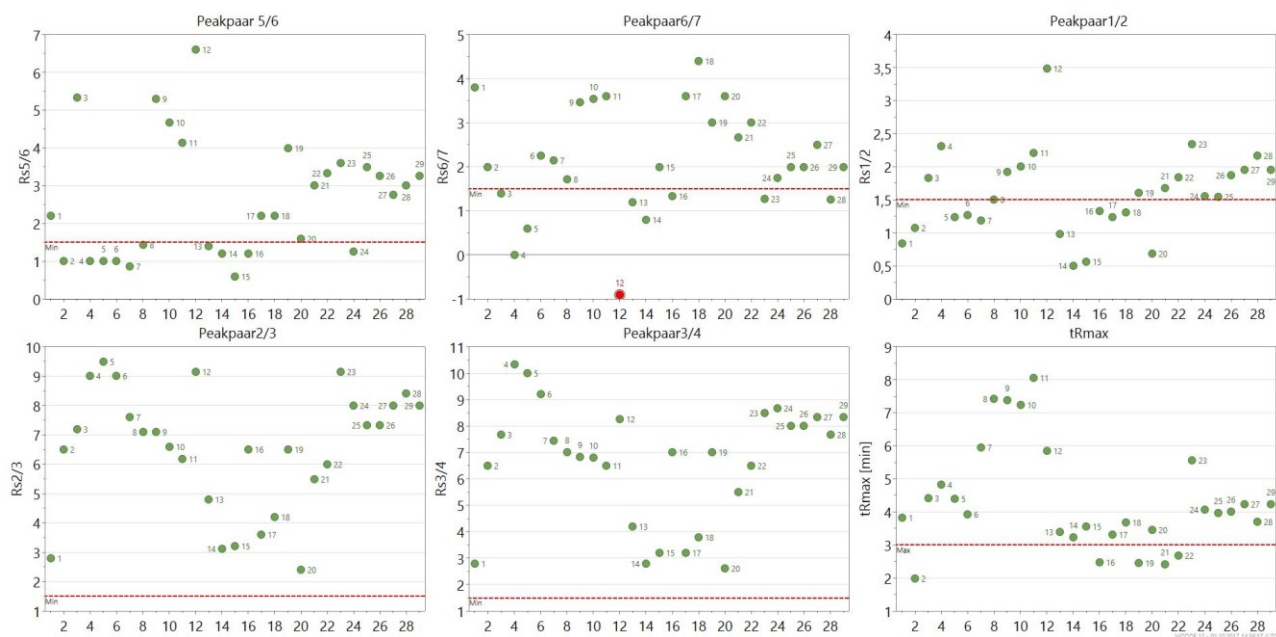


Abb. 3: Rohdaten der Versuchsplanexperimente.

also ein möglichst großer nachweisbarer Zulässigkeitsbereich für die Faktoren, ermittelt. Ist einmal ein „Proven Acceptable Range“ etabliert, können innerhalb dieses Bereiches sogar nachträgliche Änderungen der Trennparameter z.B. bei einer Anpassung einer anfälligen Trennung oder bei einer kritischen Methodenübertragung ausgeführt werden, ohne dass die Trennung erneut validiert werden muss. Eine regulatorische Flexibilität ist somit für Bewegungen innerhalb des definierten Design Space gewährt.

In kommerziell erhältlicher Software zur Computer unterstützten HPLC-Methodenentwicklung (CMD) wird dazu der optimale Arbeitspunkt der HPLC-Trennung benutzt. Zielsetzung der eingesetzten Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Modellierung ist es aber den robusten (globalen) Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung zu finden; denn nur die Findung des robusten Arbeitspunktes erlaubt die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes größte Distanz zu den Spezifikations-Grenzen zu ermitteln, d.h. die maximale Variation der Faktoren zu erhalten ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

In der Tabelle 2 werden die Faktoreinstellungen des robusten Arbeitspunktes und der Einfluss der Faktoren auf die UHPLC-Trennung aufgezeigt.

Den größten Einfluss auf die UHPLC-Trennung weist der Faktor  $t_G$  auf. Am geringsten beeinflusst der Faktor pH die Trennung. Die Einhaltung der Spezifikationen ( $R_{s,krit.} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) wird dokumentiert mit dem Chromatogramm für den robusten Arbeitspunkt (Abbildungung 4).

Tab. 2: Robuster, globaler Arbeitspunkt und Faktoreinfluss.

Faktoren / Peakpaare	robuster Arbeitspunkt	Faktoreinfluss in (%)
Gradientenzeit	3.40	49.1
Temperatur	19.0	14.3
Startkonzentration Eluent B	30.3	7.4
Endkonzentration Eluent B	85.7	9.4
pH wässriger Eluent A	2.9	2.8
Fluss	0.72	17.0

### Design Space Hypercube und Proven Acceptable Range (PAR)

Als das wichtigste Kriterium für die "Güte" einer flüssigchromatographischen Trennung wird auch heute immer noch die Auflösung  $R_s$  des kritischen Peakpaares angesehen. Sie muss jedoch ergänzt werden durch Aussagen

zur Robustheit der flüssigchromatographischen Trennung sowie zu den bewährten Bereichen für jeden Faktor der UHPLC-Trennung.

Das Auffinden der bewährten Faktorbereiche erfolgt nach einer einfachen Systematik [19],

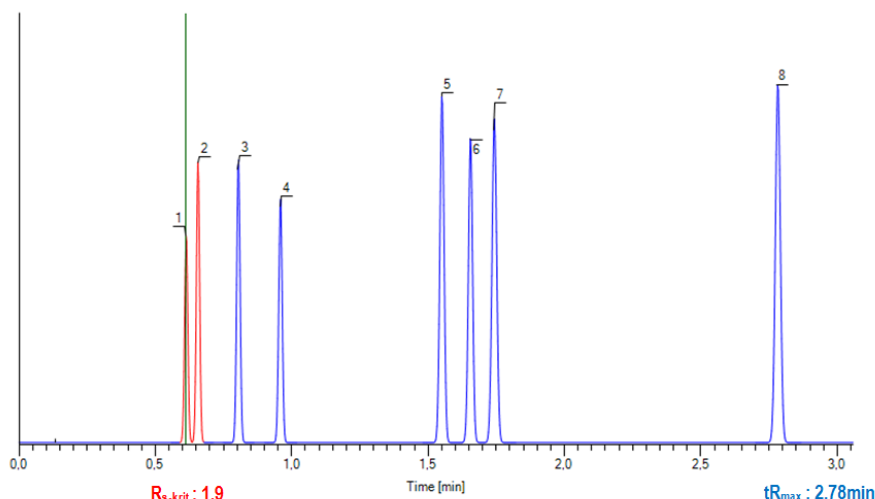


Abb. 4: DryLab@4-Simulation des Chromatogrammes des robusten Arbeitspunktes.

die tatsächlich deutlich mehr chromatographische Erfahrung und Wissen erfordert als etwa Mathematikkenntnisse:

- Definition der Einflussfaktoren,
- Definition der Zielgrößen,
- Auswahl von Modell und Versuchsplan,
- Durchführung der Versuche,
- graphische Analyse der Rohdaten,
- Anpassen des Empirischen Modells,
- Diagnose dieses Modells,
- Verwendung des Modells für die Bestimmung robuster Operationsbedingungen und maximaler Einstellbereiche der Faktoren.

Diese Vorgehensweise muss erlernt, die Begriffe müssen verstanden und die Werkzeuge praktisch erprobt werden. Dann sind der Analytiker oder die Analytikerin im Besitz eines methodischen Werkzeugkastens zum zielführenden Einsatz der statistischen Versuchsplanung.

Mit dem Design Space Hypercube (Abbildung 5), dem größtmöglichen regelmäßigen Hyperwürfel im höchst unregelmäßigen Design Space Volumen [20], werden die Ergebnisse der robusten Multi-Einflussgrößen- / Multi-Zielgrößen-Modelle visualisiert. Ein Hypercube (dunkelgrünes Rechteck), ist ein hochdimensionaler Würfel, der die Method Operable Design Region (MODR) definiert [21]: Für jeden Faktor wird ein Bereich angegeben, in dem alle Faktoren nach Belieben variiert werden können, ohne dass Gefahr besteht, dass irgendein Auflösung-Wert  $R_s$  unter 1,5 fällt.

Mit dem Design Space Hypercube werden zusätzlich zum robusten Arbeitspunkt die maximalen Faktor-Einstellungen grafisch angezeigt und tabellarisch in der Design Space Hypercube-Tabelle (Abbildung 6) durch die Werte für Hypercube low edge und Hypercube high edge ausgewiesen.

Die grünen Balken markieren die Bereiche, innerhalb derer alle Faktoren mit einem einstellten Fehlerrisiko von 1% gleichzeitig und ohne weitere Einschränkungen geändert werden können, unter Einhaltung der vorgegebenen Spezifikationen ( $R_{s,krit.} \geq 1.5$ ,  $t_{Rmax} \leq 5min.$ ).

### Ermittlung der maximalen Einstellbereiche (PAR) für die Faktoren der UHPLC-Trennung

Die mögliche maximale Änderung für den jeweiligen Faktor, erreicht durch eine Maximierung der grünen Balken (Hypercube range), werden in den Abbildungen 7, 9, 11, 13, 15 und 17 aufgezeigt und die Einhaltung der Spezifikationen mit den entsprechenden Chromatogrammen (Abbildungen 8, 10, 12, 14, 16 und 18) belegt.

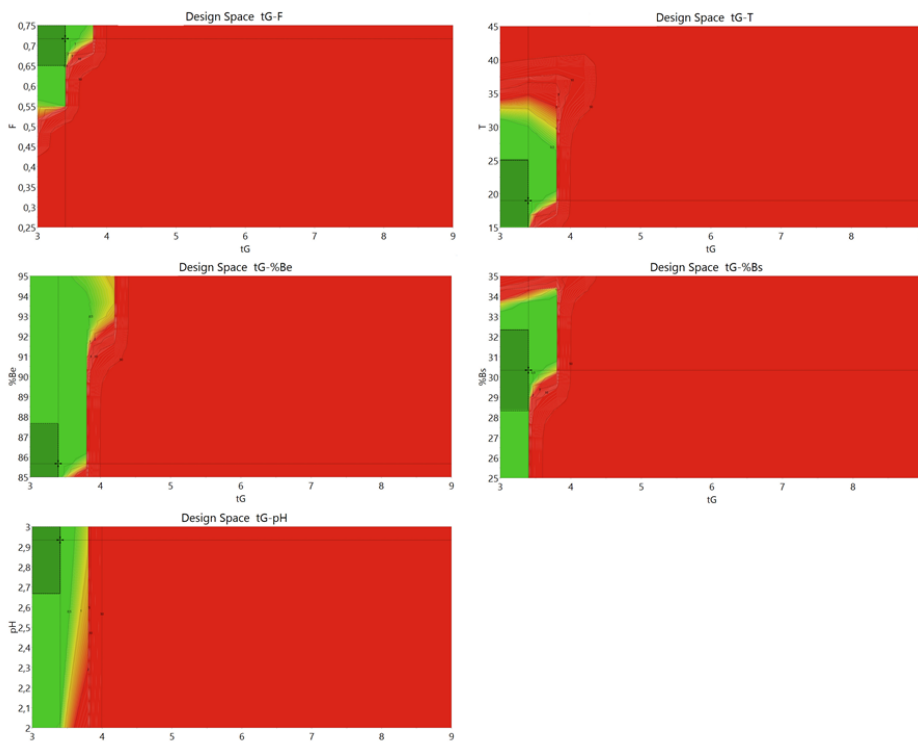


Abb. 5: Hypercube Design Space-Plots der robusten Optimierung der Faktoren tG, pH, T, F, %Bs, %Be und der Zielgrößen  $R_{s1/2}$ ,  $R_{s2/3}$ ,  $R_{s3/4}$ ,  $R_{s5/6}$ ,  $R_{s6/7}$ ,  $t_{Rmax}$ .

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2,66667	3	
T	19	15	25	
F	0,716667	0,65	0,75	
%Bs	30,3333	28,3333	32,3333	
%Be	85,6667	85	87,6667	

Abb. 6: Design Space Hypercube-Tabelle mit den Zulässigkeitsbereich für die Faktoren des robusten Arbeitspunktes.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,8	
pH	2,93333	2,86667	3	
T	19	19	25	
F	0,716667	0,716667	0,75	
%Bs	30,3333	30,3333	32,3333	
%Be	85,6667	85,6667	91	

Abb. 7: Variierung des Faktors tG von 3.0min bis 3.8min.

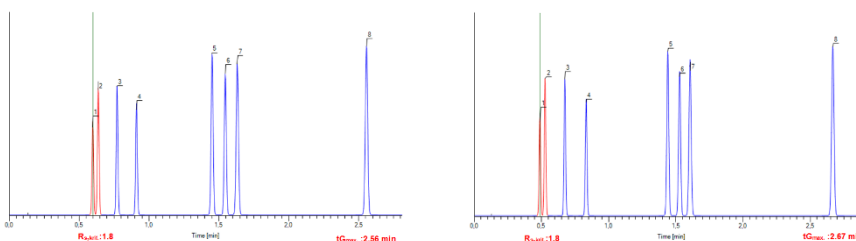


Abb.8: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors tG.

Der Faktor tG kann innerhalb des Bereiches von 3 bis 3.8min eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit.} \geq 1.5$ ,  $t_{Rmax} \leq 5min.$ ) für die UHPLC-Trennung.



## Zusammenfassung

Nur das simultane Betrachten aller signifikanten Faktoren sowie aller sinnvollen Zielgrößen führt zu robustesten, bewährten Faktorbereichen (PAR) unter Einhaltung der Zielgrößen-spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) und hilft somit bei der Findung von gesicherten Spezifikationsgrenzen für die Faktoren der UHPLC-Trennung.

Bei Änderungen der Faktoreinstellungen in den ausgewiesenen Zulässigkeitsbereich für die Faktoren z.B. Anpassung der Trennung bei einer Methodenübertragung oder bei einer anfälligen Trennung, besteht somit kein Erfordernis an eine Revalidierung. Die regulatorische Flexibilität ist somit für Bewegungen innerhalb des ausgewiesenen Zulässigkeitsbereich der jeweiligen Faktoren gewährt.

Derartige Anpassungen der Faktoreinstellungen sind in der UHPLC-Praxis nicht gerade selten und werden auch heute noch überwiegend mit der „Trial und Error“-Strategie vorgenommen.

## Literatur und Referenzen

[1] M. Nasr, FDA, Lecture on "Quality by Design in HPLC: The Balance Between Chromatography and Chemometrics" at Pittsburgh Conference, Atlanta, USA, March 2011.

[2] S. Chatterjee, Considerations for Analytical Methods - FDA Perspective, IFPAC Annual Meeting Baltimore, January 25, 2013

[3] MODDE12Pro®, Umetrics Dataanalytics Sartorius-Stedim, Umea Sweden

[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] H.W. Bilke und S. Moser, LABORPRAXIS 4 (2013)

[7] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 8 (2014)

[8] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 9 (2015)

[9] H.W. Bilke und A. Orth, LABORPRAXIS 11 (2016)

[10] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 4 (2017)

[11] H.W. Bilke und A. Orth, *Analytik News* Sept. 2016

[12] H. W. Bilke, *Analytik News* Nov. 2016

[13] H. W. Bilke, *Analytik News* Juni 2017

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2	3	
T	19	15	19	
F	0,716667	0,65	0,716667	
%Bs	30,3333	29,6667	32,3333	
%Be	85,6667	85	87,6667	

Abb. 9: Variierung des Faktors von pH 2.0 bis pH 3.0

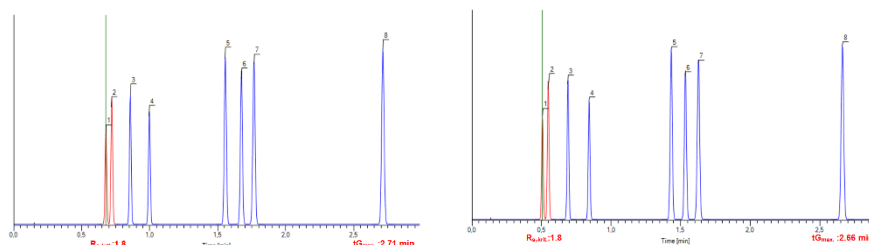


Abb. 10: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors pH. Der Faktor pH kann innerhalb des Bereiches von pH 2 bis pH 3 eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) für die UHPLC-Trennung.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2,86667	3	
T	19	15	31	
F	0,716667	0,683333	0,716667	
%Bs	30,3333	29,6667	31	
%Be	85,6667	85	87	

Abb. 11: Variierung des Faktors T von 15°C bis 31°C

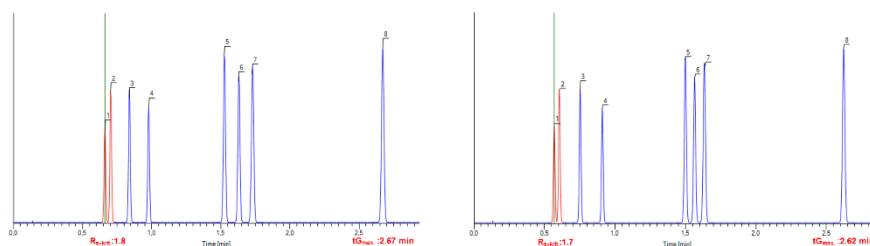


Abb. 12: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors T. Der Faktor T kann innerhalb des Bereiches von 15°C bis 31°C eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) für die UHPLC-Trennung.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2,2	3	
T	19	17	23	
F	0,716667	0,583333	0,716667	
%Bs	30,3333	29,6667	31,6667	
%Be	85,6667	85	87	

Abb. 13: Variierung des Faktors F von 0.58 ml/min bis 0.72 ml/min.

[14] Versuchsdurchführung und Peakzuordnung durch R. Kormany Egis Plc., Budapest, Ungarn und I. Molnar, H.-J. Rieger Molnar-Institut, Berlin, Deutschland (2015)

[15] Bereitgestellt durch I. Molnar, Molnar-Institut, Berlin, Deutschland

[16] R. L. Rechtschaffner, Saturated fractions of 2n and 3n factorial designs, Technometrics, 9, 1967, 569-575

[17] A. Orth Frankfurt University of Applied Sciences, Umesoft GmbH, Eschborn, Deutschland (2016)

[18] Y. Vander Heyden, "Common Problems with Method Optimization in pharmaceutical Analysis", LCGC Europe, 24(8), 423 (2011).

[19] A. Orth, GIT 3/2017

[20] C. Vikström "Robust Optimization", MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014).

[21] A. Orth, GIT 3/2017

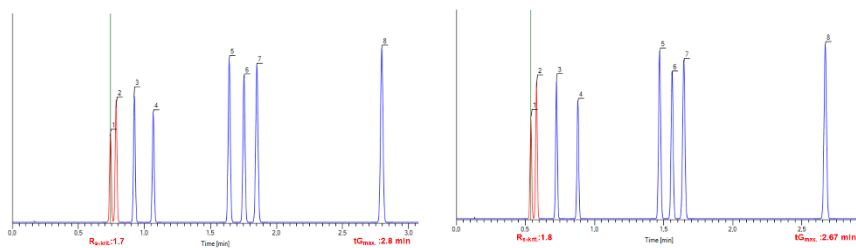


Abb.14: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors F. Der Faktor F kann innerhalb des Bereiches von 0.58 ml/min bis 0.72 ml/min eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) für die UHPLC-Trennung.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2,73333	3	
T	19	15	23	
F	0,716667	0,683333	0,75	
%Bs	30,3333	27	33	
%Be	85,6667	85	87	

Abb. 15: Variierung des Faktors %Bs von 27%B bis 33%B.

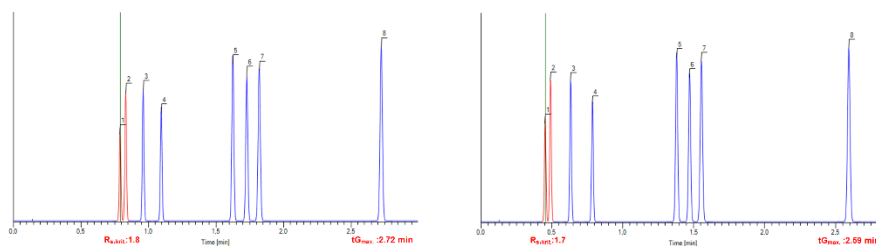


Abb.16: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors %Bs. Der Faktor %Bs kann innerhalb des Bereiches von 27 %B bis 33 %B eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) für die UHPLC-Trennung.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	3	3,4	
pH	2,93333	2,26667	3	
T	19	17	21	
F	0,716667	0,683333	0,75	
%Bs	30,3333	29	31	
%Be	85,6667	85,6667	94,3333	

Abb. 17: Variierung des Faktors %Be von 85.7 %B bis 94.3 %B.

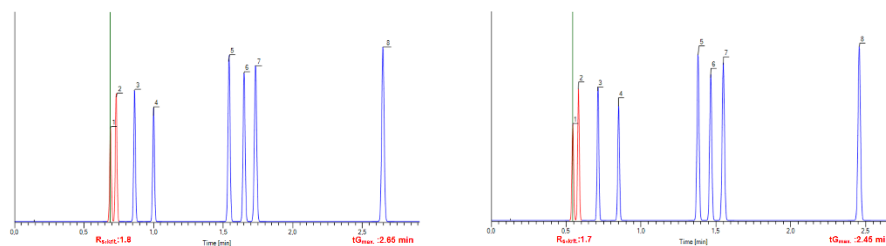


Abb. 18: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ für Variierung des Faktors %Be. Der Faktor %Be kann innerhalb des Bereiches von 85.7% B bis 94.3% B eingestellt werden unter Einhaltung der gesetzten Spezifikationen ( $R_{s,krit} \geq 1.5$ ,  $t_{R,max} \leq 5$  min.) für die UHPLC-Trennung.