

Analytical Quality by Design in der HPLC – Qualitätskriterien einer HPLC-Trennung

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. Zur Trennung komplexer Gemische sollten in einem Chromatogramm möglichst viele Peaks mit genügender Auflösung nebeneinander Platz haben. Die Anzahl der Peaks ist umso größer, je höher die Trennstufenzahl der Säule ist und je länger man gewillt ist, auf den letzten Peak zu warten [1]. Durch die Angabe der Zahl möglicher Peaks ZMP ist ein weiteres Qualitätskriterium für eine HPLC-Trennung gegeben [2].

Es wird eine strukturierte Methodik zur Ermittlung der Zahl möglicher Peaks einer HPLC-Trennung unter Berücksichtigung von Auflösung, Analysenzeit und Robustheit vorgestellt.

Einführung

Wichtige Zielgrößen zur Optimierung einer HPLC-Trennung sind die kritische Auflösung $R_{s,krit}$ (Auflösung für das am schlechtesten getrennte Peakpaar im Chromatogramm) und die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm $t_{R,max}$ zur Minimierung der Analysenzeit.

Die Zahl möglicher Peaks ZMP -Zahl der Peak, die mit einer bestimmten Auflösung, in der Regel 1.5, in einem definierten Retentionszeitfenster getrennt werden- könnte eine weitere Zielgröße in der Optimierung einer HPLC-Trennung sein.

Mit den Retentionszeiten $t_{R,max}$ und t_{R1} und den Peakbreiten $w_{h,max}$ und w_{h1} , die man ohne Mühe von jedem Chromatographie-Datensystem erhält, kann die Zahl möglicher Peaks einer HPLC-Trennung ($R_s=1.5$) einfach berechnet werden nach [3]:

$$ZMP \approx \frac{t_{R,max} - t_{R1}}{2.4(w_{h,max} - w_{h1})} \cdot \ln \frac{w_{h,max}}{w_{h1}}$$

Eine mehr als 1 Zielgröße umfassende multifaktorielle Optimierung einer HPLC-Trennung kann allein mit einem Multizielgrößen-/Multi-einflussgrößen-Modell zielführend durch Ver-

knüpfung von chromatographischer Modellierungssoftware und statistischer DoE-Software realisiert werden.

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) [4-11].

Zielgröße ZMP der HPLC-Trennung

Zur Optimierung der HPLC-Trennung wird im 1. Schritt ein Rechtschaffner-Versuchsplan mit 29 Versuchen (Anhang) für die Modellierung der 6 Einflussgrößen t_G , T , %Bs, %Be, pH, F und der Zielgröße ZMP erstellt, abgearbeitet und ausgewertet.

In Auswertung der Versuchsplanexperimente der Maximierung der Zielgröße ZMP (Abbildung 1) wird ein ZMP-Wert von 40 ausgewiesen. Die einzelnen Faktoren haben einen stark unterschiedlichen Einfluss auf die HPLC-Trennung. Den größten Einfluss auf HPLC-Trennung hat Faktor t_G mit 38.5%. Am geringsten wird die HPLC-Trennung durch den pH des wässrigen Eluenten A beeinflusst

(2.7%). Die Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm des robusten Arbeitspunktes der Maximierung der Zielgröße ZMP. Für das kritische Peakpaar 6/7 der HPLC-Trennung wird keine Trennung ausgewiesen und Peak 7 eluiert vor Peak 6 (Peakumkehr).

In einem 2. Schritt lassen wir uns deshalb für die Maximierung der Zielgröße ZMP die Auflösungswerte R_s der 7 möglichen Peakpaare und die Retentionszeit für den letzten Peak im Chromatogramm $t_{R,max}$ sowie die Faktoreinstellungen

Response	Criterion	Value	Prob. of failure
ZMPeaks	Maximize	39,56	0%
Factor	Role	Value	Factor contribution
tG	Free	6,20	38,48
T	Free	24,80	9,00
%Bs	Free	28,33	20,39
%Be	Free	62,33	4,41
pH	Free	2,53	2,66
F	Free	0,52	25,06

Abb. 1 Robuster Arbeitspunkt der Maximierung der Zielgröße ZMP.

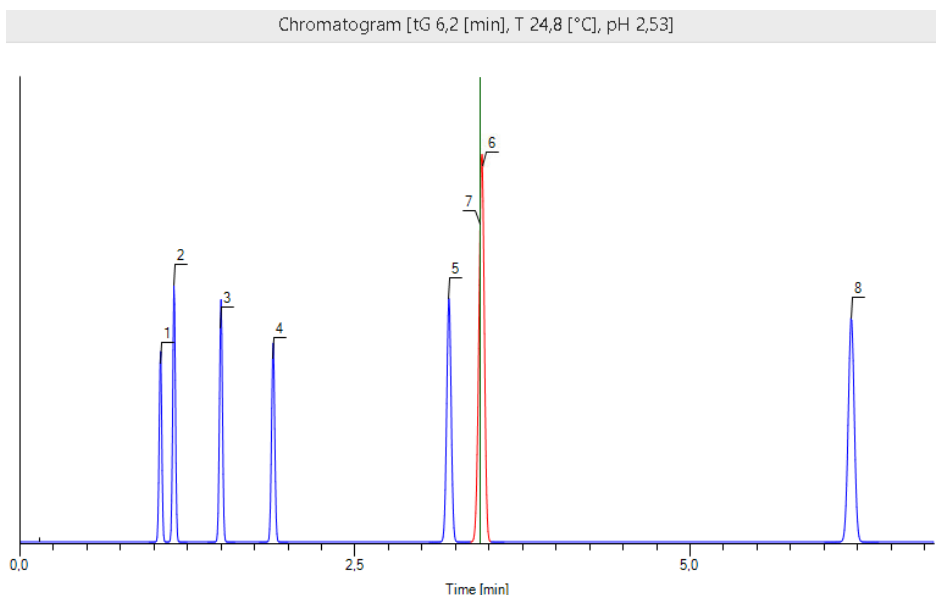


Abb. 2. Chromatogramm der Maximierung von ZMP.

Response	Criterion	Value
pp1/2	Predicted	2,81
pp2/3	Predicted	9,41
pp3/4	Predicted	10,15
pp4/5	Predicted	28,30
pp5/6	Predicted	4,20
pp6/7	Predicted	0,36
pp7/8	Predicted	40,53
tRmax	Predicted	6,61
Peakanzahl	Maximize	40,70

Factor	Role	Value
tG	Free	6,43
T	Free	25,71
%Bs	Free	28,71
%Be	Free	62,71
pH	Free	2,57
F	Free	0,54

Abb. 3 Prognostizierte Zielgrößen und Faktoreinstellungen der Maximierung der Zielgröße ZMP.

für den robusten Arbeitspunkt des multidimensionalen Design Space voraussagen. Die prognostizierten Werte für Zielgrößen und Einflussgrößen der HPLC-Trennung sind in der Abbildung 3 wiedergegeben und in der Abbildung 4 visualisiert.

In Auswertung der Versuchsplanexperimente wird die bei der ZPM-Maximierung gefundene unzureichende Auflösung für kritische Peakpaar 6/7 der HPLC-Trennung mit einem R_s von 0.4 bestätigt und ein geringfügig höherer ZMP-Wert von 41 prognostiziert. Die Abbildung 4 zeigt Chromatogramm und Daten des Chromatographie-Datensystems für den robusten Arbeitspunkt der ZMP-Maximierung

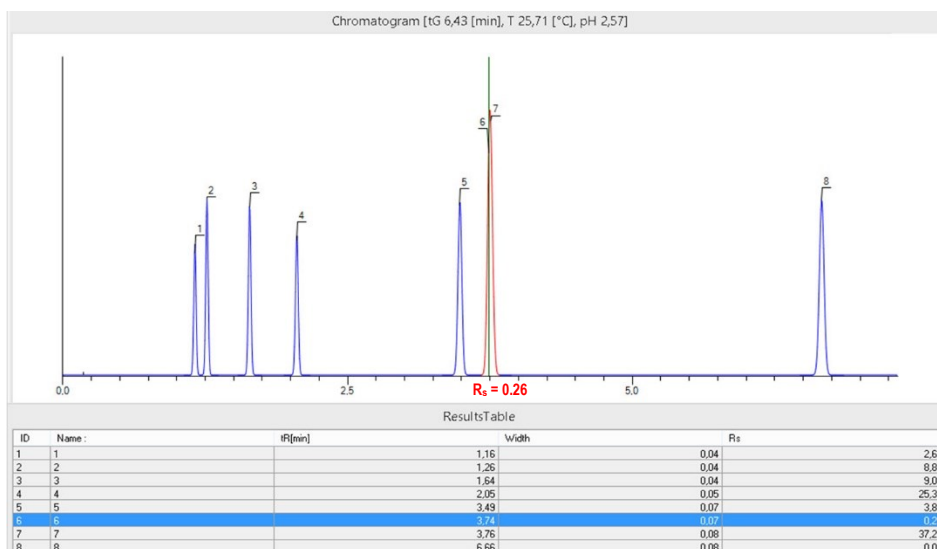


Abb. 4. Chromatogramm mit Retentionszeiten und Basis-Peakweiten für alle Peaks sowie der Auflösung für die Peakpaare.

unter Berücksichtigung der Prognosewerte für alle 9 Zielgrößen der HPLC-Trennung, simuliert mit der(U)HPLC-Modellierungssoftware DryLab® 4.0.

Aus den Chromatogramm-Daten lässt sich die Zahl der möglichen Peaks berechnen:

$$ZMP \approx \frac{6.66 - 1.16}{2.4(0.07 - 0.04)} \cdot \ln \frac{0.07}{0.04} = 43$$

Zwischen 1,16 min und 6,66 min haben theoretisch 43 Peaks mit einer Auflösung von $R = 1.5$ Platz. Zugleich ist aber auch aus dem Chromatogramm zu entnehmen, dass in der Praxis nicht alle benachbarten Peaks getrennt sind. Für das am schlechtesten getrennte

Peakpaar (kritisches Peakpaar 6/7) wird eine unzureichende Auflösung von $R_s = 0.3$ angezeigt. Die mit statistischer Versuchsplanungssoftware (MODDE® 12 Pro) berechneten und von Computer unterstützter (U)HPLC-Modellierungssoftware (DryLab® 4.0) simulierten Qualitätskriterien Auflösung R_s , Retentionszeit tR_{max} und Zahl möglicher Peaks stimmen recht gut überein.

In einem 3. Schritt wird nun aufgezeigt, wie man sowohl einen maximalen ZMP-Wert als auch eine Auflösung von $R_s \geq 1.5$ für das kritische Peakpaar einer HPLC-Trennung bei möglichst kurzer Analysenzeit erreichen kann.

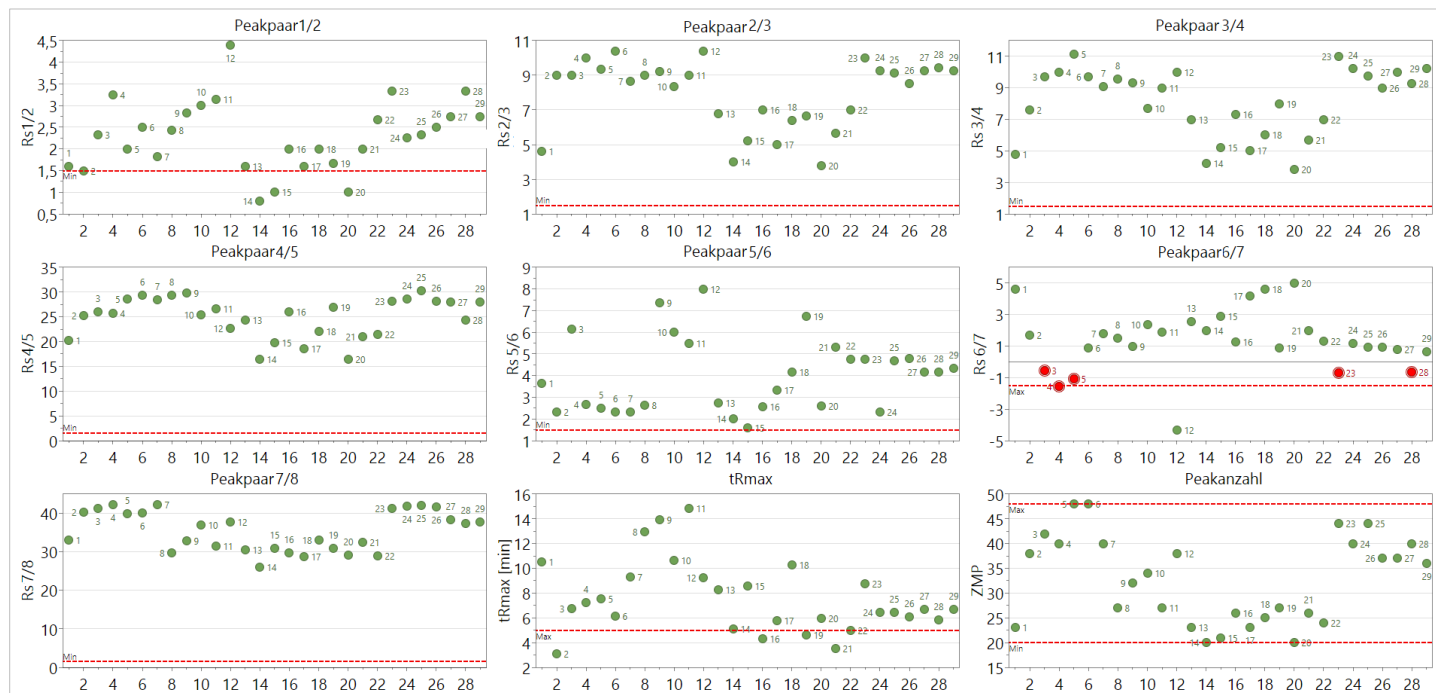


Abb. 5 Rohdaten der Versuchsplanexperimente.

Rohdaten der Versuchsplanexperimente

Betrachten wir zunächst die Zielgrößen-Daten der Versuchsplanexperimente (Abbildung 5).

Die Rohdaten der 29 Versuchsplanexperimente des Rechtschaffner-Versuchsplanes weisen für das Peakpaar 6/7 negative Auflösungs-werte (sehr häufig bei Optimierungsexperimenten aufgrund breiter Faktorvarie-rung) auf. Bedingt durch die Faktoreinstellungen der Experimente 3, 4, 5, 23 und 28 des Versuchsplanes kehrt sich die Elutionsreihen-folge für das kritische Peakpaar 6/7 um. Daher werden für dieses Peakpaar vorzeichen-abhängige Auflösungs-werte R_s von $R_s = -3.3$ bis 5.2 (Abbildung 6) prognostiziert.

Simultane Optimierung der 3 Zielgrößen

Auflösung R_s , ZMP und tR_{max}

Für eine zielführende Optimierung der 3 Zielgrößen Auflösung R_s , ZMP und tR_{max} ist es deshalb erforderlich zu überprüfen, welches der möglichen Optimierungskriterien „Maximierung“ oder „Minimierung“ der Auflösung des Peakpaares 6/7 zu einem größeren Design Space und somit zu einer robusteren HPLC-Trennung führt (Abbildung 7).

Für beide Optimierungskriterium „Maximierung“ oder „Minimierung“ wird für alle Peakpaare eine Auflösung von $R_s \geq 1.5$ gefunden und durch die Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt bestätigt (Abbildung 8). Für die Minimierung der Zielgröße $R_{s6/7}$ wird eine längere Analysenzeit ($tR_{max} = 7.84$ min) und folgerichtig der größere ZMP-Wert mit 42 ausgewiesen.

Mit dem Design Space Hypercube, dem größtmöglichen regelmäßigen Hyperwürfel im höchst unregelmäßigen Design Space Volumen [12], werden die Ergebnisse der ZMP-Optimierung visualisiert. Ein Hypercube (dunkelgrünes Rechteck), ist ein hochdimensionaler Würfel, der die Method Operable Design Region (MODR) definiert [13]: Für jeden Faktor wird ein Bereich angegeben, in dem

alle Faktoren nach Belieben variiert werden können, ohne dass Gefahr besteht, dass irgendein Auflösungs-Wert R_s unter 1.5 fällt.

In der Abbildung 9 sind die Design Space Hypercube Plots für die Faktoren tG und F in Abhängigkeit von den Optimierungskriterien Maximierung und Minimierung der Auflösung des kritischen Peakpaares $R_{s6/7}$ dargestellt. Diese

beiden Faktoren haben den größten Einfluss auf die simultane, robuste Optimierung der 6 Faktoren tG, pH, T, F, %Bs, %Be und der 7 Zielgrößen $R_{s1/2}$, $R_{s2/3}$, $R_{s3/4}$, $R_{s5/6}$, $R_{s6/7}$, tR_{max} , ZMP.

Mit dem Design Space Hypercube werden zusätzlich zum robusten Arbeitspunkt (Kreuz) die maximalen Faktor-Einstellungen grafisch

Response	Criterion	Min	Target	Max	Pred. min	Pred. max
pp1/2	Predicted				1,07	4,52
pp2/3	Predicted				3,28	10,71
pp3/4	Predicted				3,70	12,04
pp4/5	Predicted				15,46	33,91
pp5/6	Predicted				1,06	8,53
pp6/7	Predicted				-3,28	5,20
pp7/8	Predicted				26,60	49,00
tRmax	Predicted				2,90	13,84
Peakanzahl	Maximize	19,00	48,00		19,08	53,08

Abb. 6 Prognostizierte Grenzwerte „Pred. min“ und „Pred. max“ für die Zielgrößen R_s , tR_{max} und ZMP der ZMP-Optimierung.

Response	Criterion	Value	Response	Criterion	Value
pp1/2	Predicted	2,18	pp1/2	Predicted	4,15
pp2/3	Predicted	6,81	pp2/3	Predicted	10,39
pp3/4	Predicted	7,02	pp3/4	Predicted	10,11
pp4/5	Predicted	22,28	pp4/5	Predicted	25,04
pp5/6	Predicted	3,65	pp5/6	Predicted	5,90
pp6/7	Maximize	2,94	pp6/7	Minimize	-2,63
pp7/8	Predicted	35,09	pp7/8	Predicted	38,11
tRmax	Minimize	6,36	tRmax	Minimize	7,84
Peakanzahl	Maximize	30,68	Peakanzahl	Maximize	42,16
Factor	Role	Value	Factor	Role	Value
tG	Free	4,20	tG	Free	8,60
T	Free	16,80	T	Free	18,40
%Bs	Free	27,67	%Bs	Free	25,00
%Be	Free	65,00	%Be	Free	61,67
pH	Free	2,80	pH	Free	2,07
F	Free	0,35	F	Free	0,72

Abb. 7 Simultane a) Maximierung, b) Minimierung der Zielgröße $R_{s6/7}$ und Maximierung der Zielgröße ZMP bei Minimierung von tR_{max} .

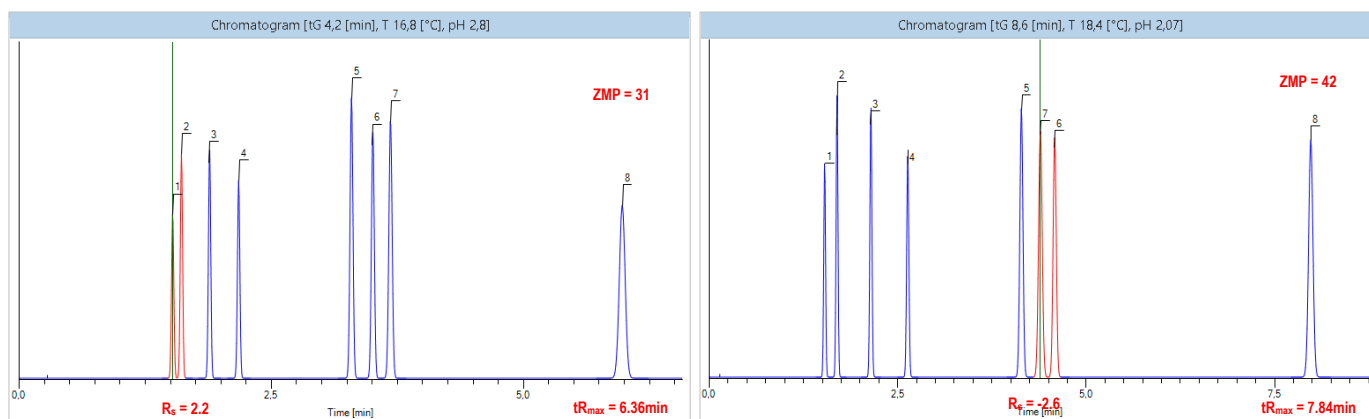


Abb. 8 Chromatogramme am robusten Arbeitspunkt Maximierung der Zielgröße $R_{s6/7}$ und Minimierung der Zielgröße $R_{s6/7}$.

angezeigt. Augenscheinlich werden einerseits je nach Wahl des Optimierungskriteriums stark unterschiedliche globale Arbeitspunkte gefunden und andererseits führt die Wahl des Optimierungskriteriums „Maximierung“ der Auflösung des kritischen Peakpaares 6/7 zu einem deutlich größeren Design Space Hypercube (dunkelgrünes Rechteck). Bei „Minimierung“ der Auflösung des kritischen Peakpaares 6/7 wird mit 42 Peaks zwar die höchste Zahl an möglichen Peaks im definierten Retentionszeitfenster getrennt, jedoch verbunden mit einem deutlich kleineren Design Space Hypercube, d.h. mit einer wesentlich geringeren Robustheit der HPLC-Trennung.

Ableitend vom Design Space Hypercube der HPLC-Trennung, wird nun für jeden Faktor der HPLC-Trennung der „bewährte“ Bereich ermittelt. Mit den erhaltenen „Design Space Hypercube“-Grafiken für die simultane Maximierung/Minimierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ (Abbildung 10), werden die maximalen Faktoreinstellungen tabellarisch durch die Werte für „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ ausgewiesen und in einem Balkendiagramm auch grafisch dargestellt.

Die grünen Balken markieren die Bereiche, innerhalb derer alle Faktoren mit einem eingestellten Fehlerrisiko von 1% gleichzeitig und ohne weitere Einschränkungen geändert werden können unter Einhaltung der vorgegebenen Spezifikationen ($R_{s,krit.} \geq 1.5$, $t_{R,max} \leq 9\text{min}$). Sie sind für die simultane Maximierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ wesentlich breiter gegenüber jenen der simultanen Minimierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ und bestätigen die Aussagen zur Abhängigkeit der Robustheit der HPLC-Trennung vom Optimierungskriterium für die Zielgröße $R_s^{6/7}$.

Die mit DryLab® simulierten Chromatogramme (Abbildung 11 und 12) an den Punkten „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ des hochdimensionalen Design Space belegen die Einhaltung der vorgegebenen Spezifikationen ($R_{s,krit.} \geq 1.5$, $t_{R,max} \leq 9\text{min}$) der ZMP-Optimierung, unabhängig von der Wahl des Optimierungskriteriums.

Zusammenfassung

Eine möglichst hohe Peakzahl, eine Trennung aller Peaks und eine möglichst kurze Analysenzeit wird bei einer ZMP-Optimierung nur erreicht, wenn die Zielgrößen R_s und $t_{R,max}$ in die Optimierung mit einbezogen werden.

Beim Vorliegen von negativen Werten für die Auflösung des kritischen Peakpaares, ist die Abhängigkeit der Zielgröße ZMP vom Optimierungskriterium des kritischen Peakpaares der HPLC-Trennung zu beachten.

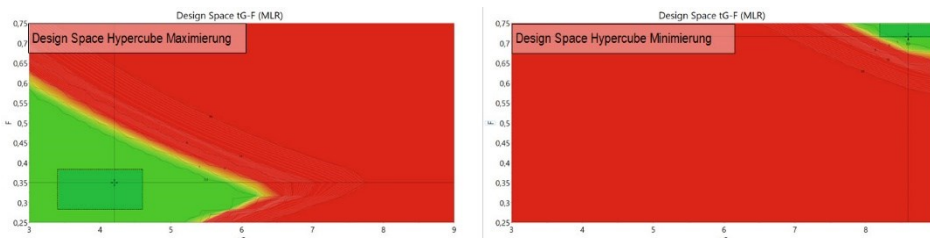


Abb. 9: Design Space Hypercube für Maximierung und Minimierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$.

Design Space Hypercube Maximierung				Design Space Hypercube Minimierung			
Factor	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range	Factor	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,4	4,6		tG	8,6	9	
T	12	18,4		T	16,8	20	
%Bs	25,6667	30,3333		%Bs	24,3333	25,6667	
%Be	63,6667	67		%Be	61	62,3333	
pH	2,6	3		pH	2	2,33333	
f	0,283333	0,383333		f	0,716667	0,75	

Abb. 10: Design Space Hypercube-Tabelle Maximierung und Minimierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ mit dem Zulässigkeitsbereich für die Faktoren des robusten Arbeitspunktes.

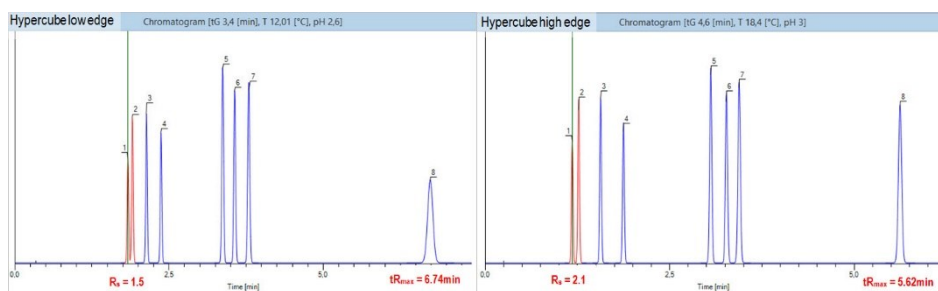


Abb. 11: Chromatogramme „Hypercube low edge“ und „Hypercube high edge“ der Maximierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ (kleiner ZMP-Wert, hohe Robustheit).

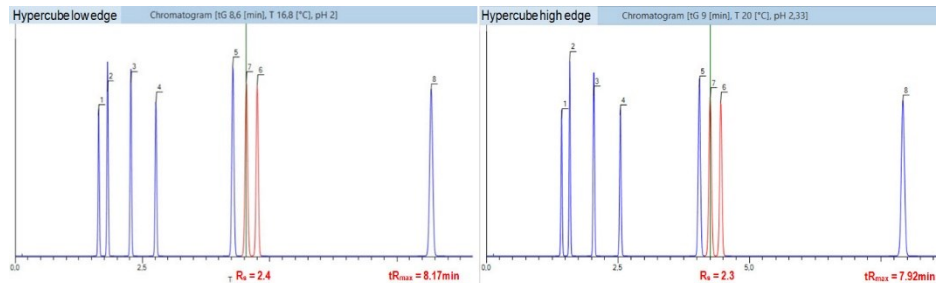


Abb. 12: Chromatogramme a) „Hypercube low edge“ und b) „Hypercube high edge“ der Minimierung der Zielgröße $R_s^{6/7}$ (hoher ZMP-Wert, geringere Robustheit).

Werden obige Aussagen berücksichtigt, ist die Zahl der möglichen Peaks ZMP durchaus ein Qualitätskriterium einer HPLC-Trennung und kann somit als Zielgröße für die Optimierung der HPLC-Trennung benutzt werden.

Referenzen und Literatur

- [1] V.R. Meyer, Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. Hüthig Verlag Heidelberg 1996. 24-27.
- [2] T. Welsch, GDCH-Vortrag
- [3] T. Welsch, persönliche Mitteilung Januar (2018)
- [4] H.W. Bilke und S. Moser, LABORPRAXIS 4 (2013)
- [5] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 8 (2014)

- [6] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 9 (2015)
- [7] H.W. Bilke und A. Orth, LABORPRAXIS 11 (2016)
- [8] H.W. Bilke, LABORPRAXIS 4 (2017)
- [9] H.W. Bilke und A. Orth, Analytik News, Sept. 2016
- [10] H. W. Bilke, Analytik News, Nov. 2016
- [11] H. W. Bilke, Analytik News, Juni 2017
- [12] C. Vikström "Robust Optimization", MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014).
- [13] A. Orth, GIT 3/2017

Anhang

Factors						
Name	Abbr.	Units	Type	Settings	Transform	Precision
tG	tG	min	Quantitative	3 to 9	None	0,1
T	T	°C	Quantitative	12 to 36	None	0,5
%Bs	%Bs	%	Quantitative	23 to 33	None	0,5
%Be	%Be	%	Quantitative	57 to 67	None	0,5
pH	pH	unit	Quantitative	2 to 3	None	0,05
F	F	ml/min	Quantitative	0,25 to 0,75	None	0,01

Responses						
Name	Abbr.	Units	Transform	Type	Min	Max
pp1/2	Rs1/2		None	Regular	1,5	
pp2/3	Rs2/3		None	Regular	1,5	
pp3/4	Rs3/4		None	Regular	1,5	
pp4/5	Rs4/5		None	Regular	1,5	
pp5/6	Rs5/6		None	Regular	1,5	
pp6/7	Rs6/7		None	Regular	1,5	-1,5
pp7/8	Rs7/8		None	Regular	1,5	
tRmax	tRm	min	None	Regular		5
Peakanzahl	ZMP		None	Regular	20	48

Worksheet									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	tG	T	%Bs	%Be	pH	F
1	N1	1	Incl	3	12	23	57	2	0,25
2	N2	14	Incl	3	36	33	67	3	0,75
3	N3	8	Incl	9	12	33	67	3	0,75
4	N4	23	Incl	9	36	23	67	3	0,75
5	N5	11	Incl	9	36	33	57	3	0,75
6	N6	12	Incl	9	36	33	67	2	0,75
7	N7	22	Incl	9	36	33	67	3	0,25
8	N8	7	Incl	9	36	23	57	2	0,25
9	N9	26	Incl	9	12	33	57	2	0,25
10	N10	20	Incl	9	12	23	67	2	0,25
11	N11	2	Incl	9	12	23	57	3	0,25
12	N12	19	Incl	9	12	23	57	2	0,75
13	N13	18	Incl	3	36	33	57	2	0,25
14	N14	27	Incl	3	36	23	67	2	0,25
15	N15	28	Incl	3	36	23	57	3	0,25
16	N16	17	Incl	3	36	23	57	2	0,75
17	N17	15	Incl	3	12	33	67	2	0,25
18	N18	13	Incl	3	12	33	57	3	0,25
19	N19	16	Incl	3	12	33	57	2	0,75
20	N20	24	Incl	3	12	23	67	3	0,25
21	N21	10	Incl	3	12	23	67	2	0,75
22	N22	5	Incl	3	12	23	57	3	0,75
23	N23	9	Incl	9	24	28	62	2,5	0,5
24	N24	25	Incl	6	36	28	62	2,5	0,5
25	N25	3	Incl	6	24	33	62	2,5	0,5
26	N26	4	Incl	6	24	28	67	2,5	0,5
27	N27	6	Incl	6	24	28	62	3	0,5
28	N28	29	Incl	6	24	28	62	2,5	0,75
29	N29	21	Incl	6	24	28	62	2,5	0,5

Abb. Anhang: Einflussgrößen, Zielgrößen und Rechtschaffner-Versuchsplan