



Quality by Design und Designspace in der HPLC:

Die Optima einer HPLC-Trennung – Teil 1 Lokales vs. globales Optimum

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

QbD-Konzepte werden zunehmend zur Sicherung der Qualität von analytischen Methoden in pharmazeutischen Unternehmen benutzt [1,2]. Um einem höheren Standard auch in der Qualität von HPLC-Methoden zu erreichen, fordert die Zulassungsbehörde FDA zunehmend eine systematischere Planung von Versuchen zur Methodenentwicklung [3]. Die Methodenparameter sollten innerhalb bestimmter Grenzen ohne Verlust an Selektivität der chromatographischen Trennung angepasst werden können. Die Basis dafür ist, ein umfassendes Verständnis des flüssigchromatographischen Trennprozesses und ein definierter Design Space (MODR) für die HPLC-Trennung, in dem Anpassungen von Methodenparameter nicht als Änderungen betrachtet werden. Alleinig zielführend ist es hierfür den globalen Arbeitspunkt der HPLC-Trennung mittels einer Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Modellierung zu finden.

Lokales vs. globales Optimum einer HPLC-Trennung

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Einflussgrößen ab. Das klassische 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 Informationsgehalt. Durch den Erhalt eines lokalen Optimums (ein von mehreren möglichen hohen Arbeitspunkten im Design Space) kommt man zwar dem Ziel einer HPLC-Trennung von hoher Qualität und Robustheit näher, aber man erreicht es nie.

Einflussgrößen	Abkürzung	Einheit	Faktorstufen	Type
Gradientenzeit	tG	min	20 - 60	Quantitativ
Temperatur	T	° C	30 - 60	Quantitativ
Ternäre Eluentzusammensetzung	tC	(Vol.% MeOH in ACN)	0 - 100	Quantitativ
Startkonzentration Eluent B	%B _{start}	(Vol.%B)	0 - 10	Quantitativ
Endkonzentration Eluent B	%B _{end}	(Vol.%B)	90 - 100	Quantitativ
pH Eluent A	pH		2 - 3.2	Quantitativ
Flussrate	F	ml/min	0.5 - 1.5	Quantitativ

Tab. 1 Mögliche signifikante Einflussgrößen und deren Stufen für eine HPLC-Trennungsoptimierung.

Nur die Findung des *globalen Arbeitspunktes* (höchster Arbeitspunkt im Design Space) für die HPLC-Trennung erlaubt die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen zu ermitteln, d.h. die maximale Variation der Einflussgrößen zu erhalten ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Dieses „globale Optimum“ einer HPLC-Trennung kann nur gefunden werden, wenn alle signifikanten Einflussgrößen der HPLC-Trennung *gleichzeitig* unter Berücksichtigung von mehr als einer Zielgröße mittels Versuchsplanung modelliert werden [4]. Die Einheit von Chromatographie und statistischer Versuchsplanung (DoE) ist der effektivste Ansatz, um global zu optimieren.

Einflussgrößen

Größen mit wesentlichem Einfluss auf die HPLC-Trennung – auch als Einflussgrößen oder Faktoren bezeichnet – werden innerhalb der statistischen Versuchsplanung methodisch untersucht. Vor der Untersuchung wird die Variation der Einflussgrößen durch Abschätzung festgelegt. Der Raum, den die Variation

der Einflussgrößen (Tabelle1) für die Untersuchung maximal annehmen kann, wird Versuchsraum oder Wissensraum genannt. Alle hier gewählten Faktoren können quantitativ erfasst werden.

Zielgrößen

Die Auswahl der Zielgrößen gestaltet sich weitaus schwieriger. Um alle Ziele einer Versuchsreihe abzubilden, benötigt man meist mehrere Zielgrößen. Dabei treten häufig Zielkonflikte zwischen den Zielgrößen auf. Die Einstellungen der Einflussgrößen, die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen ungünstig sein [5].

Wichtige Zielgrößen für eine HPLC-Trennungsoptimierung sind die Auflösung R_s für eine selektive Trennung aller Peaks, speziell die kritische Auflösung $R_{s,krit}$ (Auflösung für das am schlechtesten getrennte Peakpaar im Chromatogramm), sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm tR_{max} zur Minimierung der Analysenzeit.

Ein Problem ist jedoch, dass innerhalb der Experimente des Versuchsplans infolge der Variation der Versuchsbedingungen einerseits unterschiedliche Peakpaare als das kritische Peakpaar

auftreten und andererseits „negative“ Auflösungsweite für Peakpaare beobachtet werden. Diese Peakpaare weisen in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen eine Peakumkehr auf. Um das Auftreten unterschiedliche Peakpaare als kritisches Peakpaar sowie die Peakumkehr infolge der geänderten Versuchsbedingungen zu berücksichtigen, wurde die Auflösung von 12 Peakpaaren als Zielgröße modelliert. Und zwar die R_s -Werte der 10 kritischen Peakpaare der Versuchsplanexperimente (siehe Anhang) sowie die R_s -Werte der Peakpaare 2/3 und 5/6 am Zentralpunkt des Versuchsplanes (Abbildung 1).

Versuchsplan

Da in der Optimierung von HPLC-Trennungen die Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen sehr wichtig ist, wurde ein Rechtschaffner-Versuchsplan für „Response Surface Modeling“ [6,7] zur Lösung der Aufgabenstellung verwendet. Dieser Versuchsplan-Typ erlaubt die Untersuchung aller linearen Haupteffekte, deren eventuelle Nichtlinearität in quadratischer Näherung sowie aller Wechselwirkungen ohne Vermengungen (Response Surface Modeling) für die HPLC-Trennungsoptimierung.

Hinweis

Alle Experimente des Versuchsplans wurden mit dem DryLab®4-tG-T-tC/-tG-T-pH Modellen simuliert (Abbildung 2 und Abbildungen der Versuchsplanexperimente im Anhang). Versuchsdurchführung und Peakzuordnung durch Molnar-Institut für angewandte Chromatographie, Berlin (2011)

Die Optima der HPLC-Trennungsoptimierung

Für die HPLC-Trennungsoptimierung in der Pharmaanalytik kleiner Moleküle werden die 7 Einflussgrößen Gradientenzeit, Temperatur, ternäre Eluentzusammensetzung, Startkonzentration Eluent B, Endkonzentration Eluent B, pH Eluent A und Flussrate als wichtig erachtet.

Die Strategie der 3-Faktor-Optimierung mit flüssigchromatographischer Modellierungssoftware wie z.B. DryLab®4 [8,9] brachte einen wesentlichen Fortschritt für das Aufspüren und Verifizieren eines „lokalen Optimums“ einer HPLC-Trennung. Mit diesen Software-Tools zur Computer-unterstützten HPLC-Methodenentwicklung (CMD) wird aber möglicherweise am „globalen Optimum“ der HPLC-Trennung vorbei optimiert, ohne dass eine Diagnostik oder auch nur eine Strategie existiert, um dies zu erkennen und zu verbessern. Nur die Findung des globalen Arbeitspunktes [10,11] der HPLC-Trennung erlaubt allein die in allen

möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen zu ermitteln, d.h. die maximale Variation der Faktoren zu erhalten, ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Das hierfür benutzte QbD-Konzept für die Optimierung der HPLC-Trennungen mit mehr als 3 Einflussgrößen und mehr als einer Zielgröße verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer-unterstützter HPLC-Trennungsoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE) [12-20] und wird nun näher betrachtet.

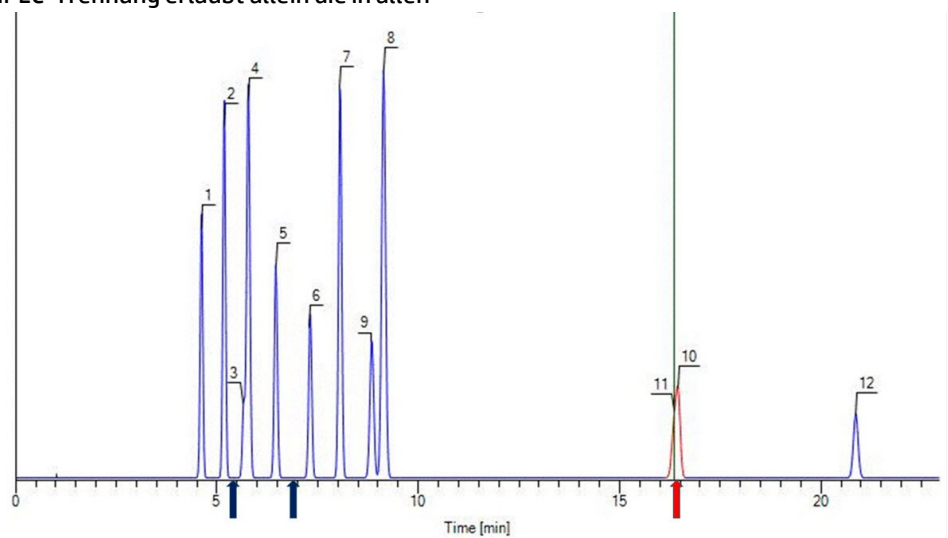


Abb. 1: DryLab®-simuliertes Chromatogramm der HPLC-Trennung am zentralen Arbeitspunkt des Versuchsplanes, Chromatographische Bedingungen: tG(40min), T(45°C), tC(50% Acetonitril), %B_{start}(5%), %B_{end}(95%), pH(2.6), F(1.0ml/min), Verweilvolumen(1.06ml).

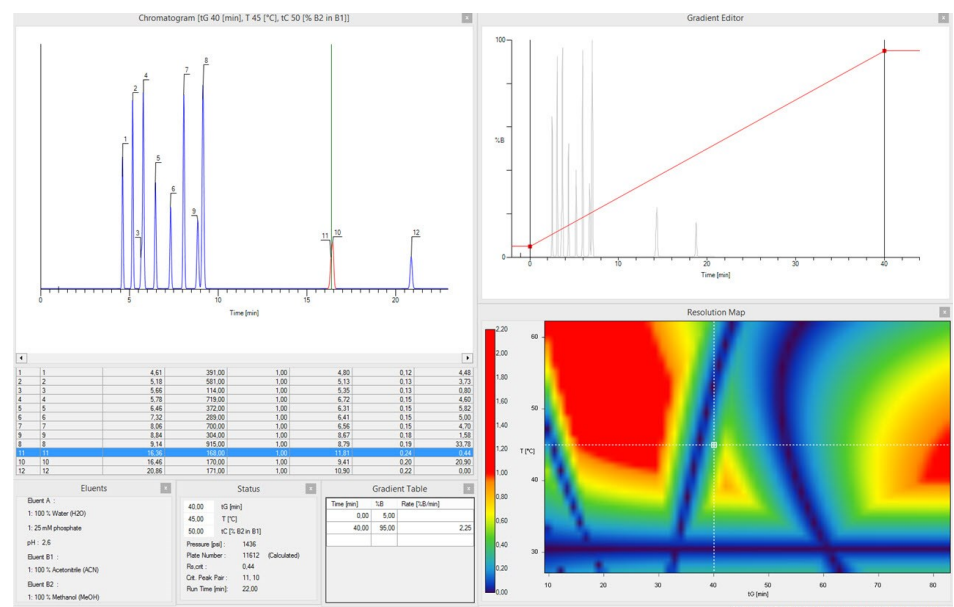


Abb. 2: Simulation des zentralen Arbeitspunktes (DryLab®4 3D tG-T-tC Modell) für den Rechtschaffner-Versuchsplan.

Das Auffinden der Arbeitspunkte einer HPLC-Trennungsoptimierung, ob lokal oder global, erfolgt nach einer einfachen Systematik, die tatsächlich deutlich mehr chromatographische Erfahrung und Wissen erfordert als etwa Mathematikkenntnisse [21]:

- Definition der Einflussgrößen,
- Definition der Zielgrößen,
- Auswahl von Modell und Versuchsplan,
- Durchführung der Versuche,
- Analyse der Rohdaten,
- Anpassen des Modells,
- Diagnose des Modells,
- Finden der Arbeitspunkte.

Basierend auf den 37 Experimenten des Rechtschaffner-Versuchsplanes (siehe Anhang) wird eine simultane Optimierung von 7 Einflussgrößen der HPLC-Trennung zur Findung der Arbeitspunkte durchgeführt. Hierzu ist die Auflösung R_s von 12 Peakpaaren als Zielgröße für $R_s \geq 1.5$ zu maximieren sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm für $t_{Rmax} \leq 23$ min zu minimieren (Abbildung 3).

In der Abbildung 4 sind die für den lokalen und globalen Arbeitspunkt (durch 35.651.584 Simulationspunkte berechnete) gefundenen Einstellungen für die Einflussgrößen, deren Einflussstärke sowie die Auflösungswerte der HPLC-Trennung aufgezeigt.

Aus der Abbildung 4 ist zu entnehmen, dass – wie zu erwarten – für den lokalen und globalen Arbeitspunkt einer HPLC-Trennungsoptimierung *unterschiedliche* Einstellungen für die HPLC-Einflussgrößen im multidimensionalen Design Space erhalten werden. Den größten Unterschied weist die Einflussgröße ternäre Eluentzusammensetzung tC (0.04% MeOH in ACN vs. 14.29% MeOH in ACN) auf. Sie hat auch mit 27.8% und 25.7% den stärksten Einfluss auf die HPLC-Trennung. Am geringsten beeinflussen Flussrate (7.1%) und Endkonzentration Eluent B (6.6%) die Trennung.

Die Forderung nach Einhaltung der gesetzten Spezifikation für die Auflösung von $R_{s,krit.} \geq 1.5$ wird für beide Arbeitspunkte mit Auflösungswerten

von $R_s^{6/7} = 2.5$ und $R_s^{6/7} = 2.7$ für das kritische Peakpaar erfüllt. Auch die vorgegebene Zielgrößenpezifikation von $t_{Rmax} \leq 23$ min für die HPLC-Trennung wird mit Retentionszeiten von 15.63min und 14.65min für den letzten Peak im Chromatogramm eingehalten.

Die Abbildungen 5a und b zeigen das Ergebnis der simultanen 7 Faktor-Optimierung in Form einer Visualisierung der Arbeitspunkte und der robusten Arbeitsbereiche im zwei- und vierdimensionalen Design Space für die Einflussgrößen mit der stärksten Wirkung auf die HPLC-Trennung.

Die abgebildeten Arbeitspunkte (schwarze Kreuze) im jeweiligen Design

Space visualisieren die gefundenen *unterschiedlichen* Einstellungen für die Einflussgrößen (vergleiche Abbildung 4) der simultanen Optimierung.

Ein Vergleich der visualisierten robusten Bereiche (grüne Flächen im 2D und 4D Design Space, Spezifikationen der HPLC-Trennung sind hier mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % erfüllt) zeigt, dass bei der simultanen Optimierung mit Findung eines lokalen Arbeitspunktes eine jeweils deutlich kleinere robuste Arbeitsfläche ausgewiesen wird.

Die kommerziell erhältlichen Softwaretools zur flüssigchromatographischen Modellierung der Optimierung einer HPLC-Trennung wie ACD/LC Simulator[®],

Response	Criterion	Min	Target	Max
pp1/2	Maximize	1,50	17,47	
pp2/3	Maximize	1,50	6,06	
pp2/4	Maximize	1,50	12,01	
pp3/4	Maximize	1,50	10,54	
pp4/5	Maximize	1,50	11,89	
pp5/6	Maximize	1,50	11,76	
pp5/7	Maximize	1,50	18,74	
pp6/7	Maximize	1,50	10,74	
pp7/8	Maximize	1,50	15,46	
pp7/9	Maximize	1,50	9,81	
pp9/8	Maximize	1,50	10,25	
pp10/11	Maximize	1,50	10,72	
tRmax	Minimize		1,50	23,00

Abb.3: Kriterien der Zielgrößen für die simultane Trennungsoptimierung von 7 Einflussgrößen.

Lokaler Arbeitspunkt				Globaler Arbeitspunkt			
Factor	Role	Value	Factor contribution	Factor	Role	Value	Factor contribution
tG	Free	36,36	15,12	tG	Free	31,43	16,62
T	Free	35,98	7,48	T	Free	42,86	9,15
tC(B2:B1)	Free	0,04	27,77	tC(B2:B1)	Free	14,29	25,72
%Bs	Free	5,68	14,89	%Bs	Free	5,71	14,18
%Be	Free	90,00	7,91	%Be	Free	91,43	6,61
pH	Free	3,12	19,76	pH	Free	3,03	20,23
F	Free	1,46	7,07	F	Free	1,36	7,51
Response	Criterion	Value	Prob. of failure	Response	Criterion	Value	Prob. of failure
pp1/2	Maximize	7,76	0,02%	pp1/2	Maximize	8,25	0,01%
pp2/3	Maximize	3,09	0%	pp2/3	Maximize	3,26	0%
pp2/4	Maximize	8,20	0%	pp2/4	Maximize	7,70	0%
pp3/4	Maximize	5,21	0%	pp3/4	Maximize	4,59	0,01%
pp4/5	Maximize	2,97	0,04%	pp4/5	Maximize	2,88	0,01%
pp5/6	Maximize	4,50	0%	pp5/6	Maximize	4,84	0%
pp5/7	Maximize	7,03	0,01%	pp5/7	Maximize	7,60	0%
pp6/7	Maximize	2,50	0,03%	pp6/7	Maximize	2,74	0,01%
pp7/8	Maximize	12,86	0,02%	pp7/8	Maximize	11,09	0%
pp7/9	Maximize	5,80	0%	pp7/9	Maximize	5,25	0%
pp9/8	Maximize	7,21	0%	pp9/8	Maximize	5,90	0%
pp10/11	Maximize	5,95	0%	pp10/11	Maximize	4,23	0%
tRmax	Minimize	15,63	0,01%	tRmax	Minimize	14,65	0%

Abb.4: Optima der HPLC-Trennung, Einflussgrößen, Einflussstärke, Zielgrößenwerte R_s mit Fehlerwahrscheinlichkeit in %.

ChromSword®, DryLab®, Osiris® ermitteln immer nur den lokalen Arbeitspunkt einer HPLC-Trennung und führen somit zu eingeschränkten Robustheitsausagen.

Zusammenfassung

Um einen höheren Standard in der Qualität einer HPLC-Trennung zu erreichen, ist eine multidimensionale Trennungsoptimierung unter Einbeziehung der statistischen Versuchsplanung (DoE) zwingend notwendig.

Nur die Findung des *globalen Arbeitspunktes* der HPLC-Trennung erlaubt allein die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen zu ermitteln, d.h. die maximale Variation der Einflussgrößen zu erhalten, ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Das hierfür benutzte QbD-Konzept für die Optimierung der HPLC-Trennungen mit mehr als 3 Einflussgrößen und mehr als einer Zielgröße verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von *Computer-unterstützter HPLC-Trennungsoptimierung (CMD)* und *statistischer Versuchsplanung (DoE)*.

Mit der Findung des globalen Optimums der HPLC-Trennung ist eine Möglichkeit gegeben, HPLC-Trennungen mit einer höheren Robustheit zu entwickeln.

Referenzen

- [1] P. Nethercote, et al., "QbD for Better Method Validation and Transfer," *Pharmamanuf. online*, accessed June 10, 2012.
- [2] P. Nethercote and J. Ermer, "QbD for Analyticals Methods: Implication for method Validation and Transfer." *Pharm Tech.*, 36 (10), 74-79 (2012)
- [3] M. Nasr, FDA, Lecture on "Quality by Design in HPLC: The Balance Between Chromatography and Chemometrics" at Pittsburgh Conference, Atlanta, USA, March 2011.
- [4] K. Kessler, DECHEMA-Kurs „Quality by Design (QbD): Wissenschaftliche Grundlagen“, April 2012, Stuttgart.

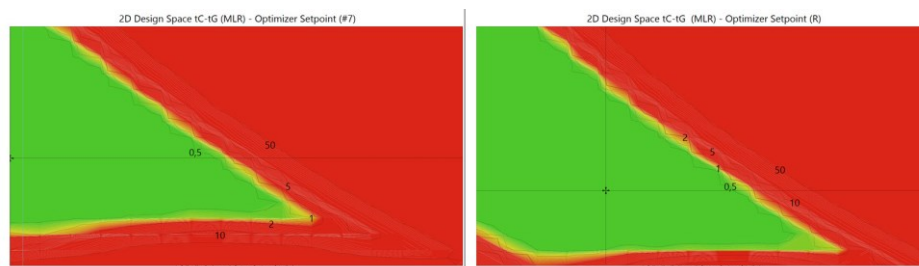


Abb.5a: 2D Design Space der Einflussgrößen tC und tG (links) lokaler Arbeitspunkt, (rechts) globaler Arbeitspunkt

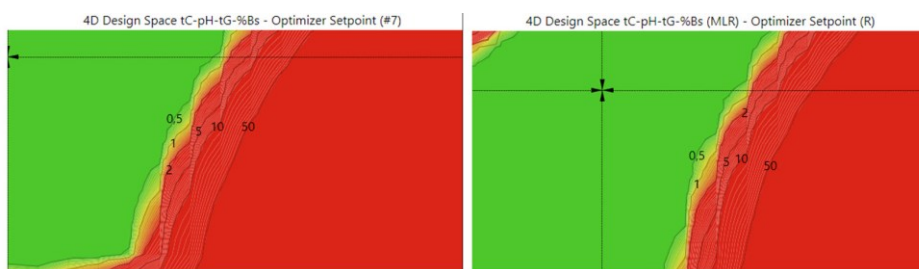


Abb.5b: 4D Design Space der Einflussgrößen tC, pH, tG, %Bs (links) lokaler Arbeitspunkt, (rechts) globaler Arbeitspunkt

[5] *Taschenbuch Versuchsplanung: „Praxisreihe Qualitätswissen“*, Wilhelm Kleppmann, Hanser Verlag, 2008.

[6] H.W. Bilke und S. Moser, *Quality by Design in der HPLC*, *Laborpraxis 4* (2013), 50-52.

[7] L. Eriksson et al., "Design of Experiments: principles and applications", MKS Umetrics AB, 2008.

[8] Aspects of the "Design Space" in High Pressure Liquid Chromatography Method Development, I. Molnár, H.-J. Rieger, K.E. Monks, *J. Chromatogr. A* 1217, 3193-3200 (2010).

[9] *Chromatography Modelling in High Performance Liquid Chromatography Method Development*, I. Molnár, H.-J. Rieger, R. Kormány, *Chromatography Today*, 1, 3-8 (2013)

[10] M. Pfeffer, in *HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim 2006,627-650.

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

[12] MODDE®Pro 12.0.1 Software – zur Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Optimierung von mehr als 3 UHPLC-Faktoren und mehr als 1 Zielgröße,

Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea 2017

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

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

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

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

[17] H.W. Bilke, *LABORPRAXIS 4* (2017)
[11] H.W. Bilke, *Analytik News Sept. 2016*

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

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

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

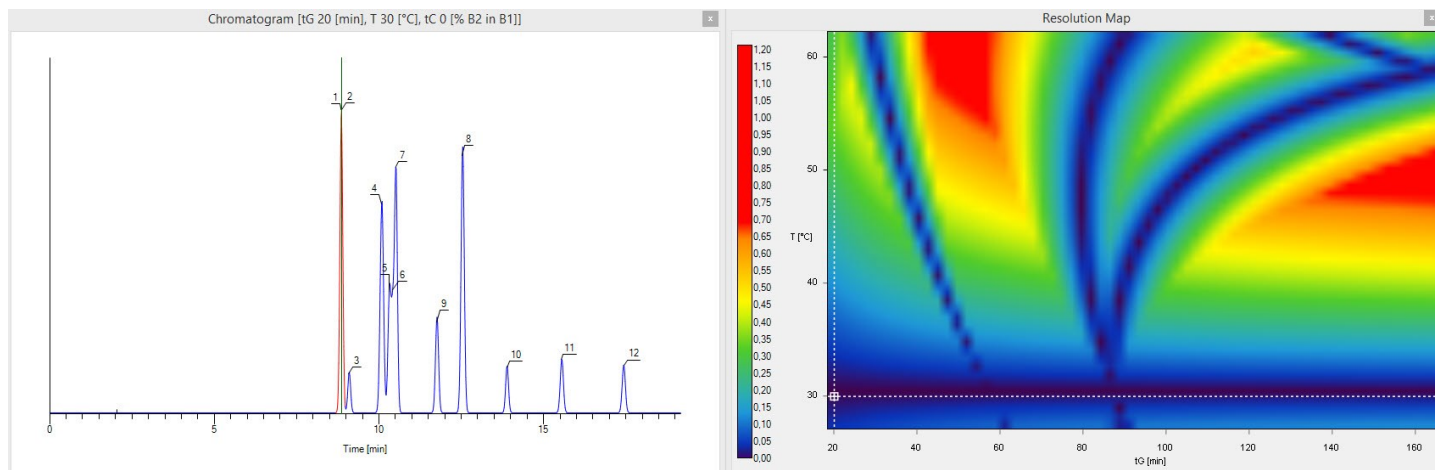
[21] A. Orth, "Robustheit von Chromatographiemethoden", *GIT Labor-Fachzeitschrift 3/17*

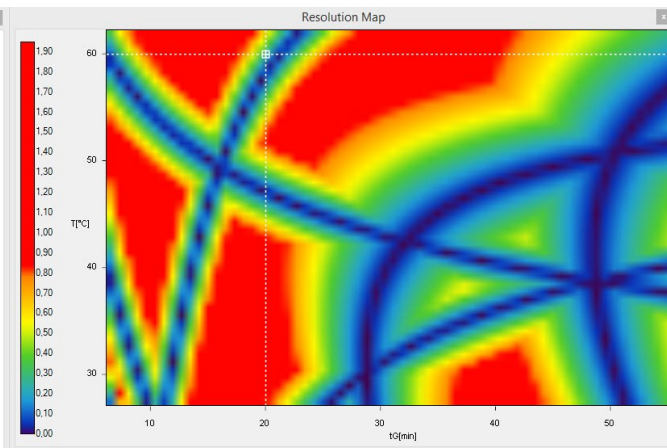
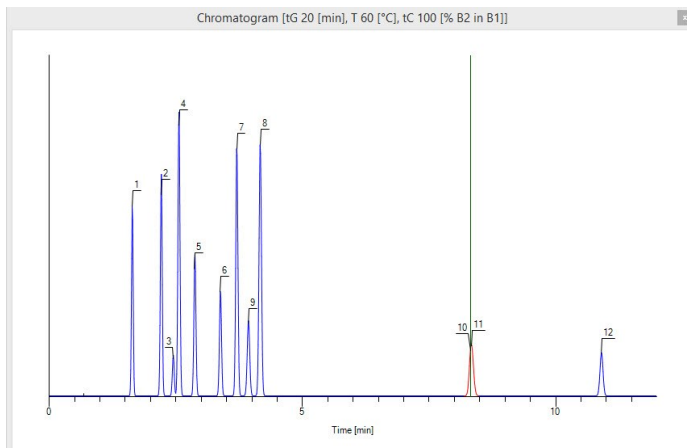
Anhang

Rechtschaffner-Versuchsplan für 7 Einflussgrößen und 17 Zielgrößen

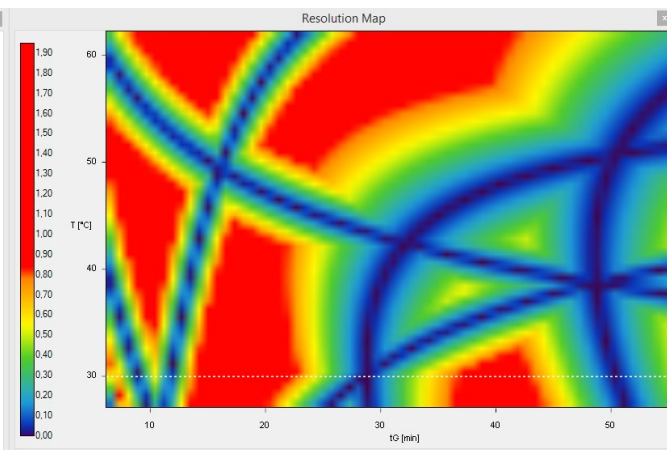
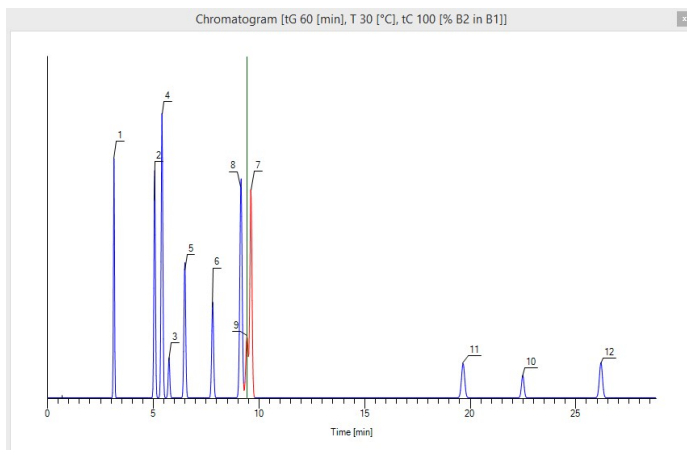
Experiment-Nr.	tG	T	tC (B2:B1)	%B _{start}	%B _{end}	pH	F
1	20	30	0	0	90	2.0	0.5
2	20	60	100	10	100	3.2	1.5
3	60	30	100	10	100	3.2	1.5
4	60	60	0	10	100	3.2	1.5
5	60	60	100	0	100	3.2	1.5
6	60	60	100	10	90	3.2	1.5
7	60	60	100	10	100	2.0	1.5
8	60	60	100	10	100	3.2	0.5
9	60	60	0	0	90	2.0	0.5
10	60	30	100	0	90	2.0	0.5
11	60	30	0	10	90	2.0	0.5
12	60	30	0	0	100	2.0	0.5
13	60	30	0	0	90	3.2	0.5
14	60	30	0	0	90	2.0	1.5
15	20	60	100	0	90	2.0	0.5
16	20	60	0	10	90	2.0	0.5
17	20	60	0	0	100	2.0	0.5
18	20	60	0	0	90	3.2	0.5
19	20	60	0	0	90	2.0	1.5
20	20	30	100	10	90	2.0	0.5
21	20	30	100	0	100	2.0	0.5
22	20	30	100	0	90	3.2	0.5
23	20	30	100	0	90	2.0	1.5
24	20	30	0	10	100	2.0	0.5
25	20	30	0	10	90	3.2	0.5
26	20	30	0	10	90	2.0	1.5
27	20	30	0	0	100	3.2	0.5
28	20	30	0	0	100	2.0	1.5
29	20	30	0	0	90	3.2	1.5
30	60	45	50	5	95	2.6	1
31	40	60	50	5	95	2.6	1
32	40	45	100	5	95	2.6	1
33	40	45	50	10	95	2.6	1
34	40	45	50	5	100	2.6	1
35	40	45	50	5	95	3.2	1
36	40	45	50	5	95	2.6	1.5
37	40	45	50	5	95	2.6	1

Simulierte Versuchsplanexperimente mit DryLab

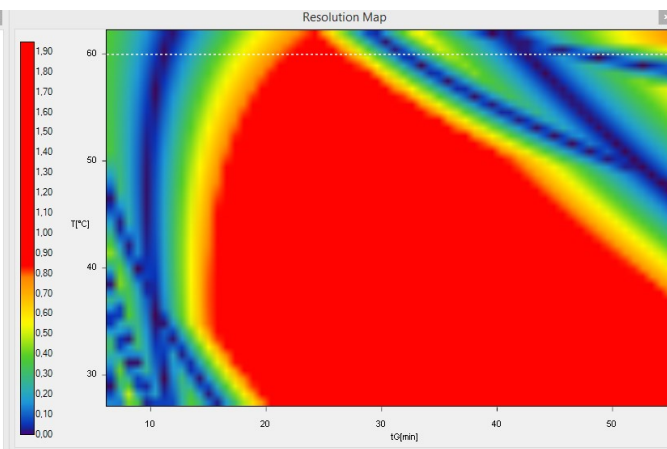
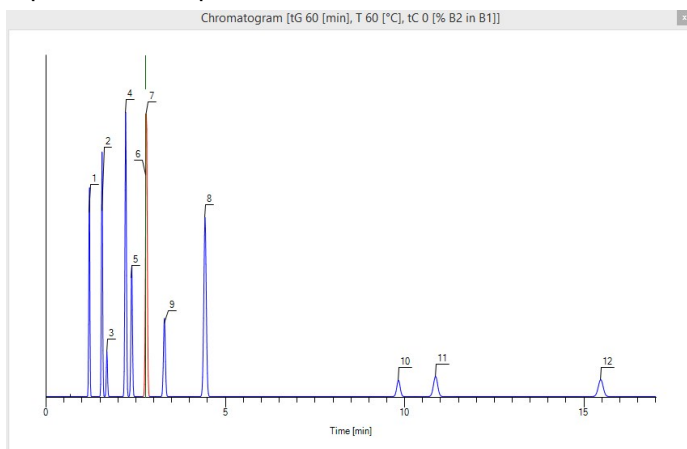
Experiment 1, Peakpaar_{krit.} 1/2, R_s 0.0



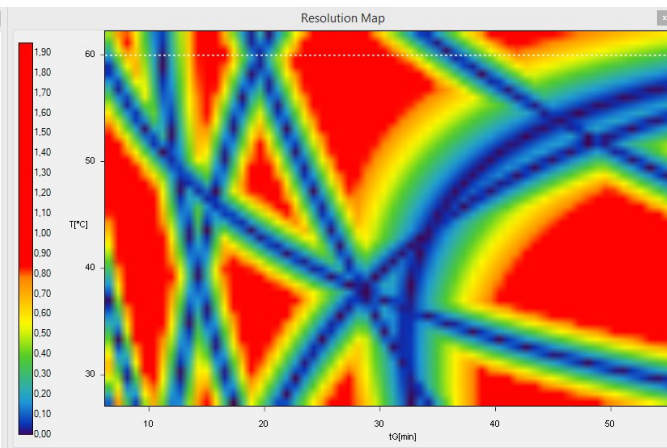
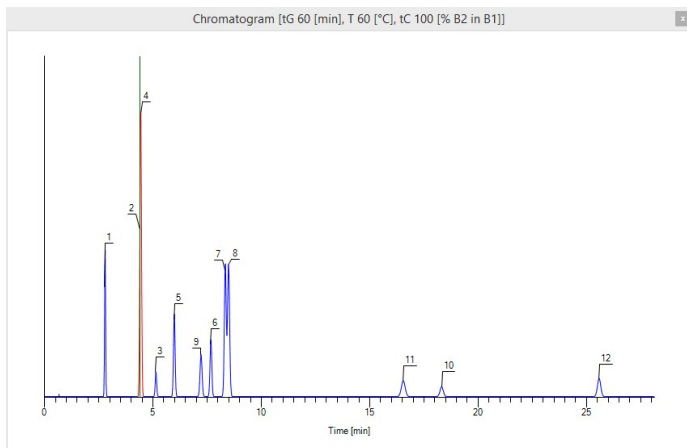
Experiment 2, Peakpaar krit. 10/11, R_s 0.3



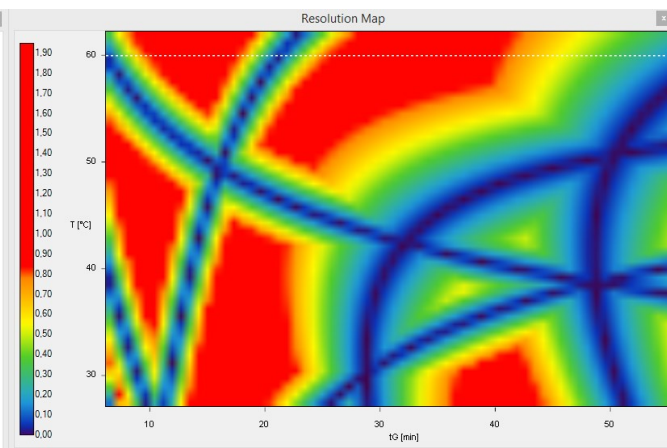
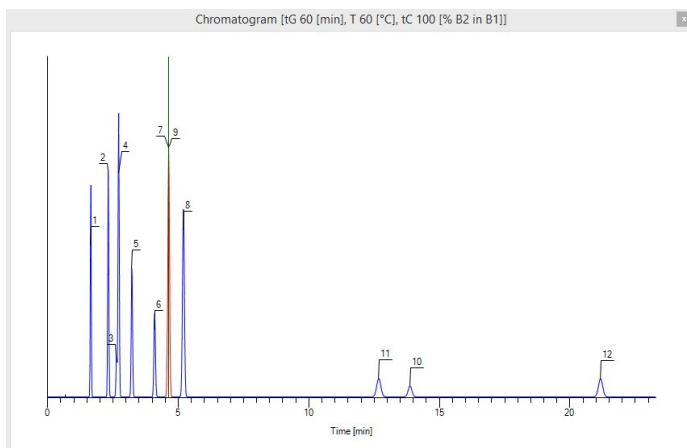
Experiment 3, Peakpaar krit. 9/7, R_s -0.9



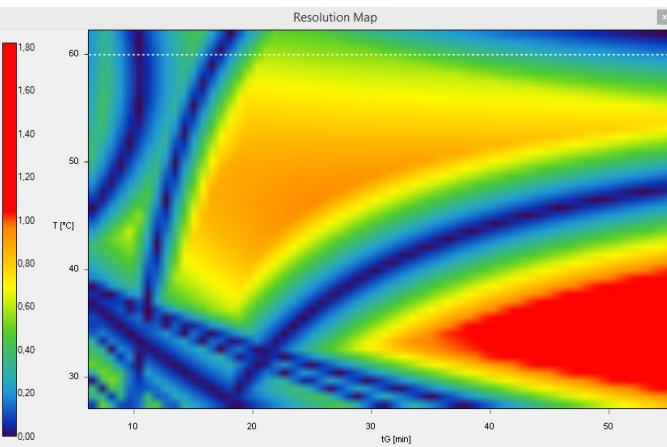
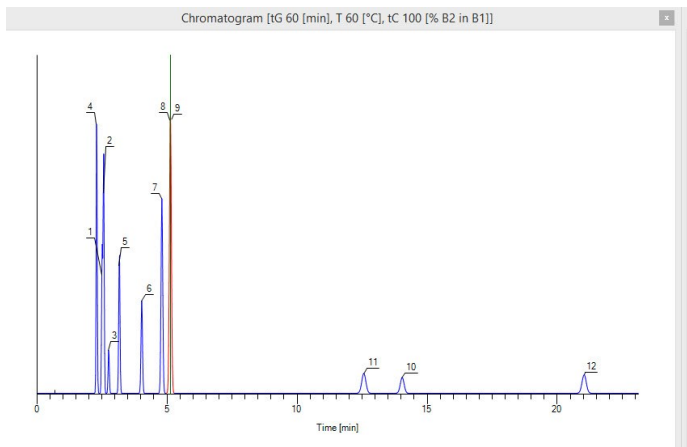
Experiment 4, Peakpaar krit. 6/7, R_s 0.2



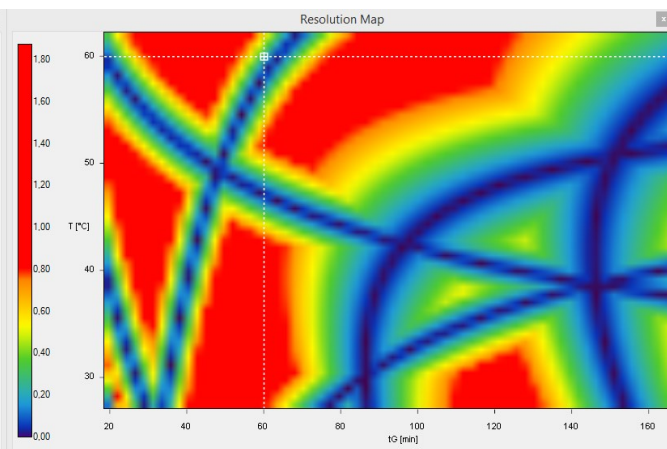
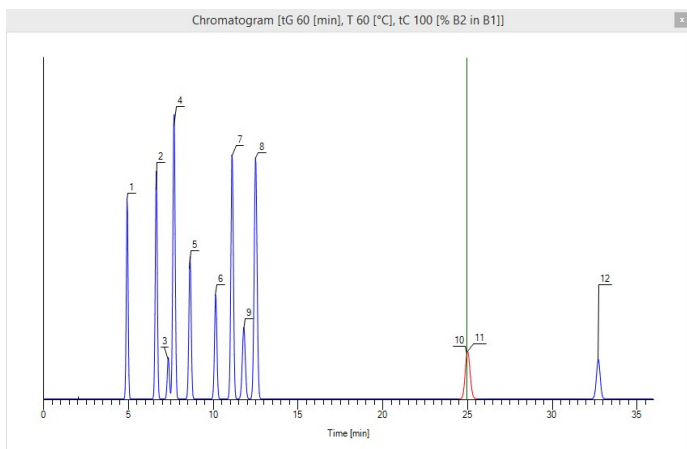
Experiment 5, Peakpaar krit. 2/4, R_s 0.3



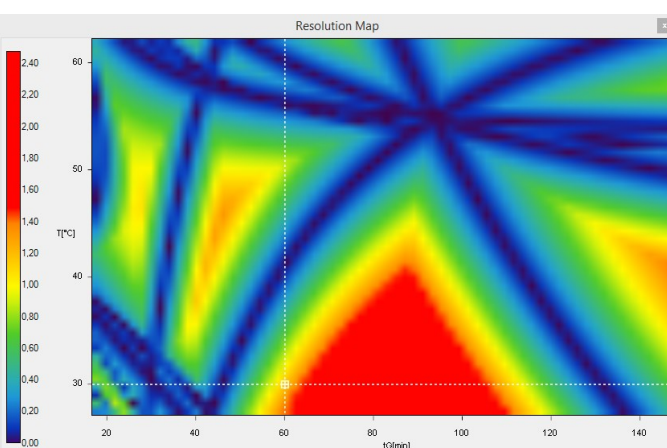
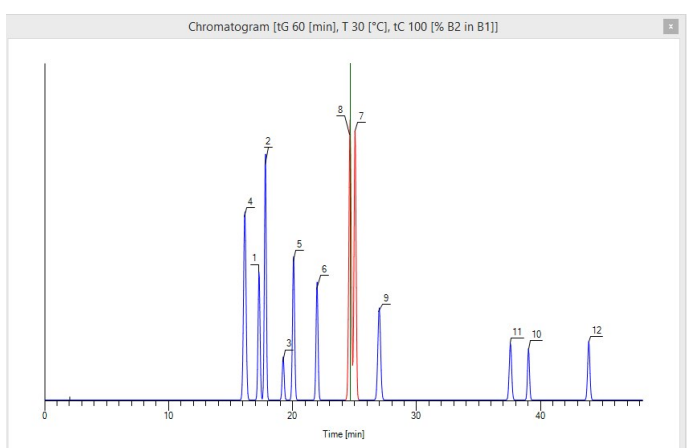
Experiment 6, Peakpaar krit. 7/9, R_s 0.0



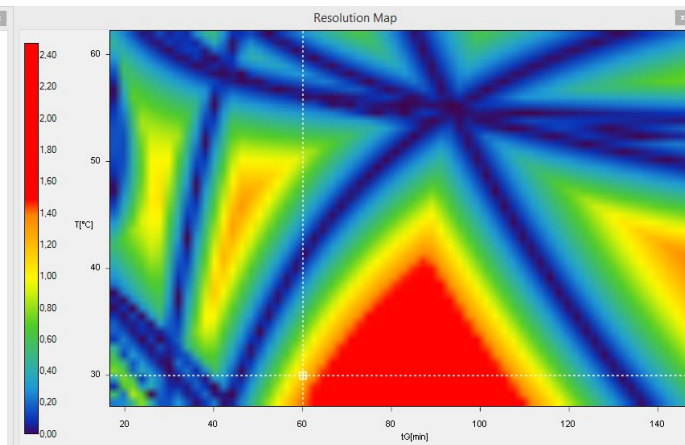
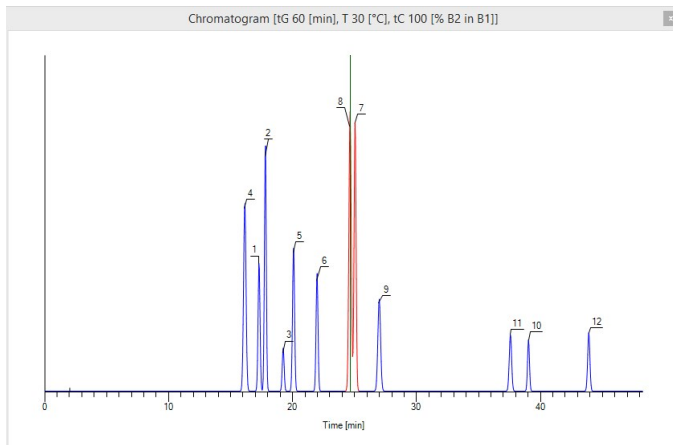
Experiment 7, Peakpaar krit. 8/9, R_s 0.2



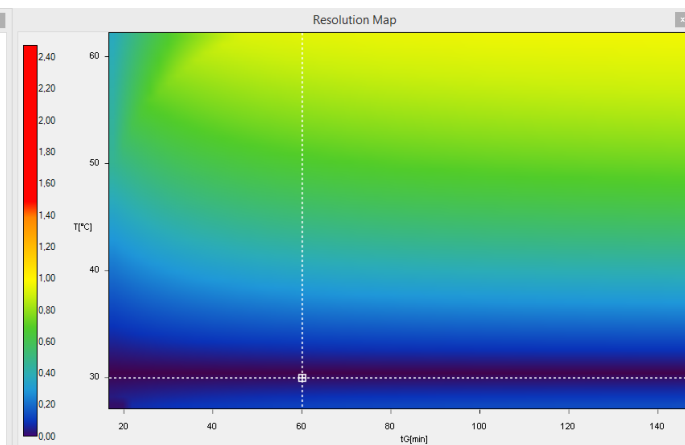
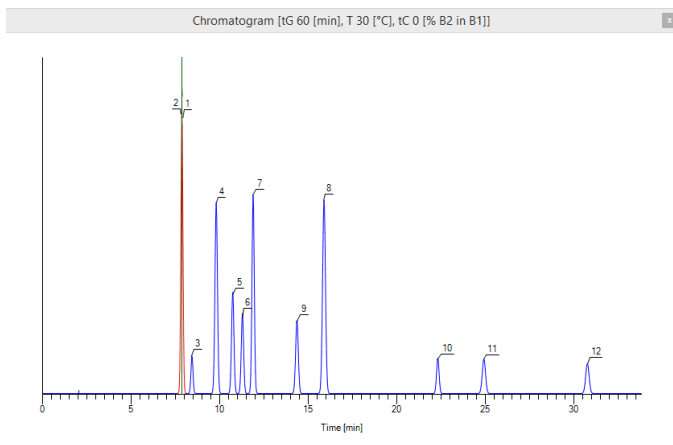
Experiment 8, Peakpaar krit. 10/11, R_s 0.2



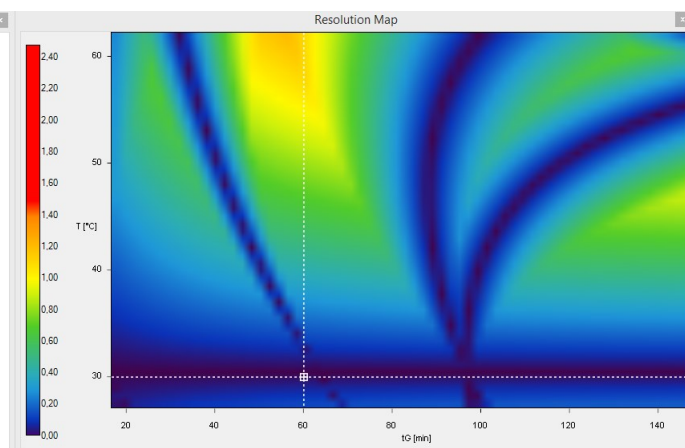
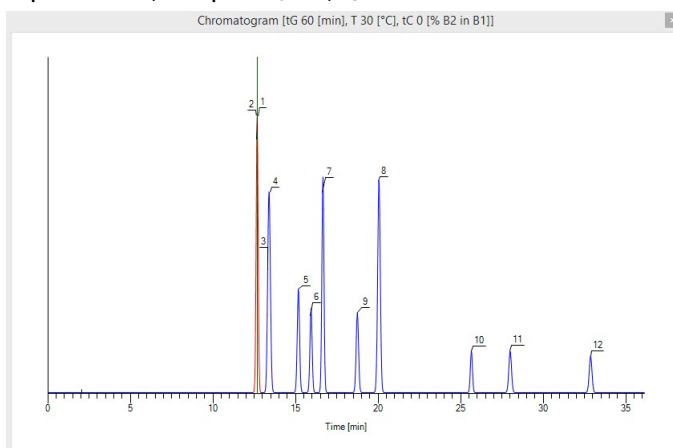
Experiment 9, Peakpaar krit. 2/4, R_s 0.8



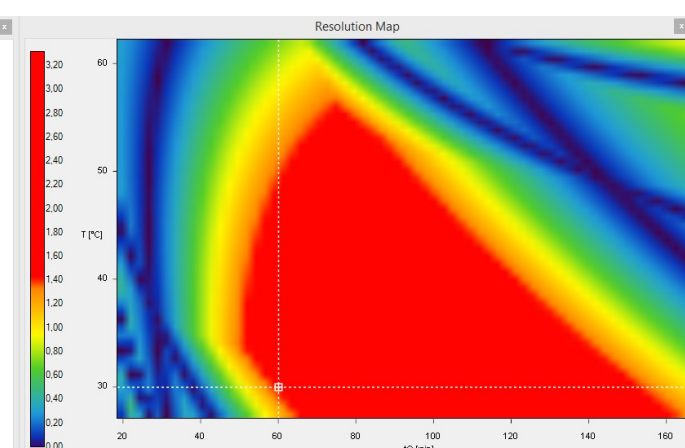
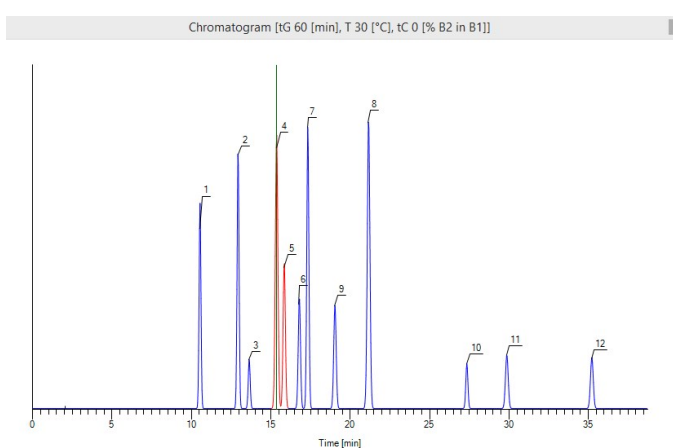
Experiment 10, Peakpaar krit. 8/7, R_s -1.2



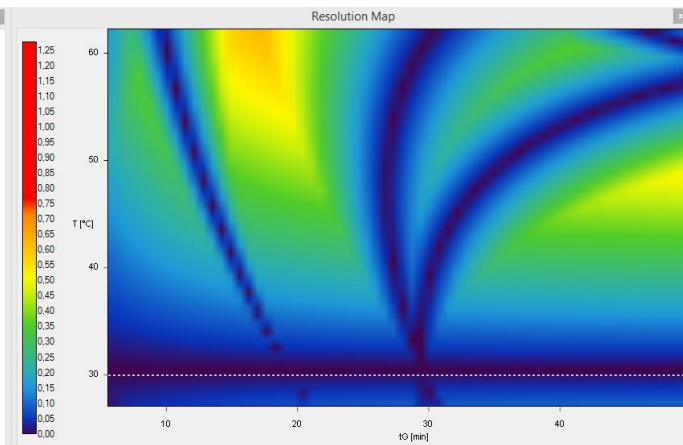
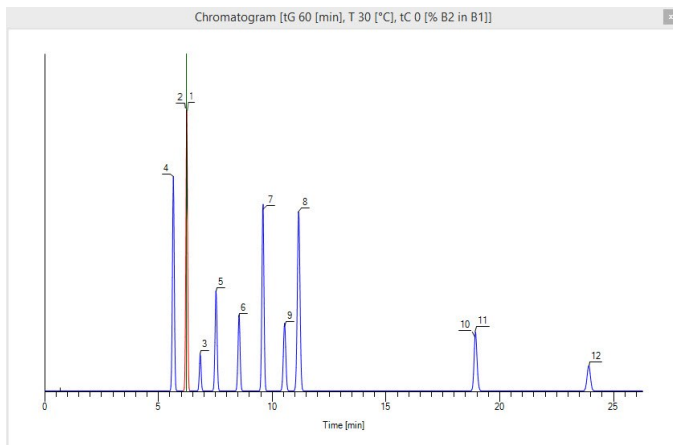
Experiment 11, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



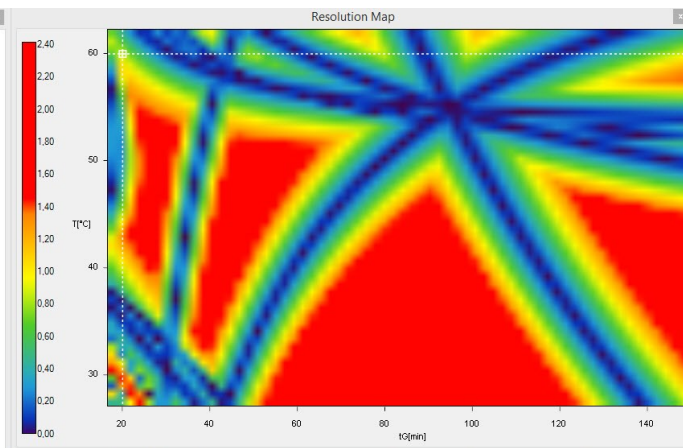
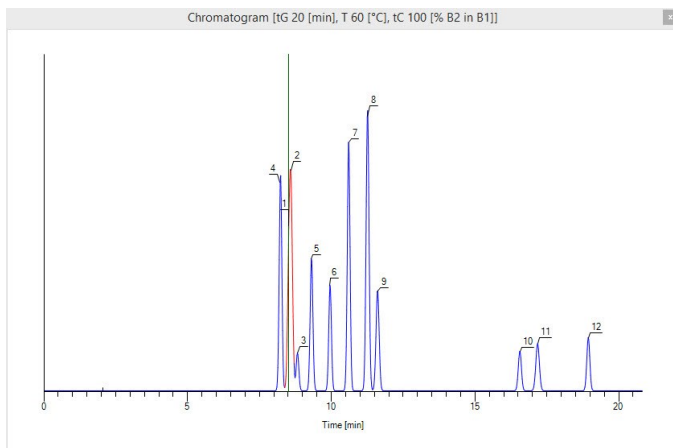
Experiment 12, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



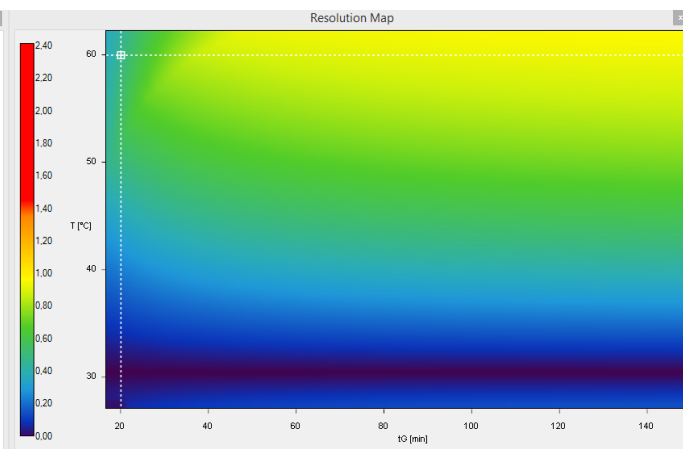
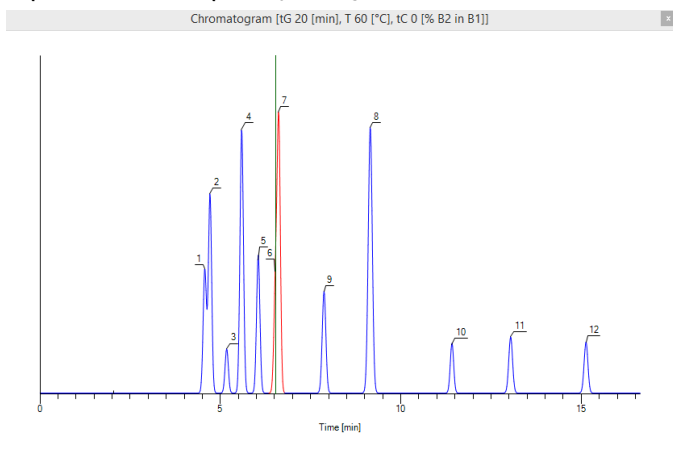
Experiment 13, Peakpaar krit. 4/5, R_s 1.6



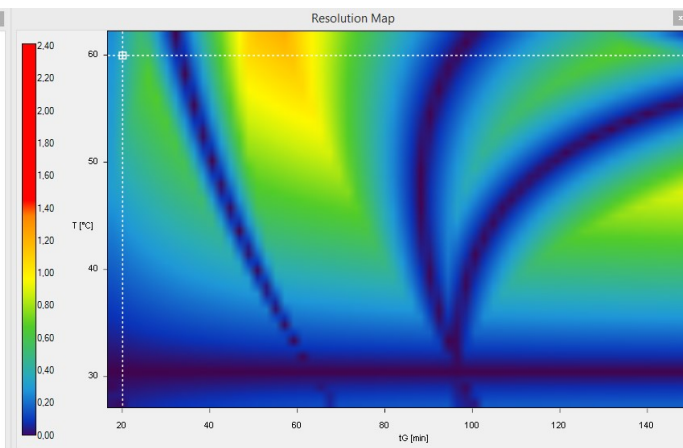
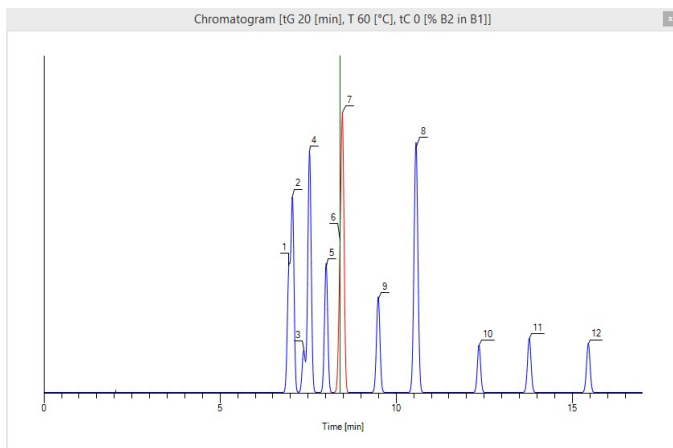
Experiment 14, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



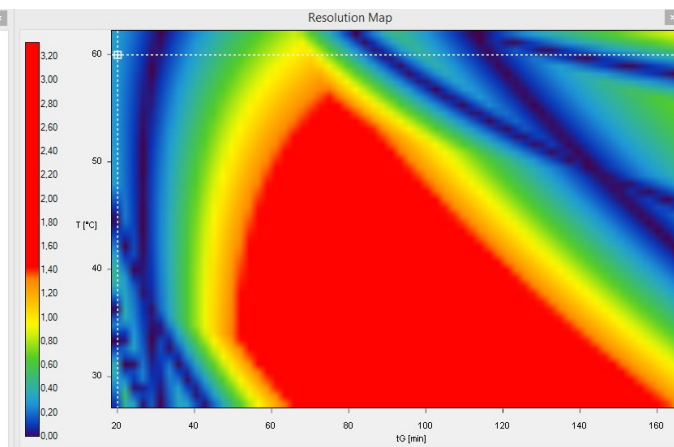
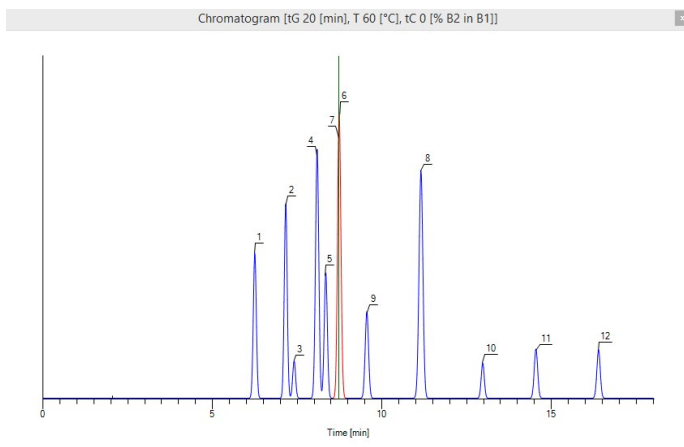
Experiment 15, Peakpaar krit. 1/2, R_s 0.4



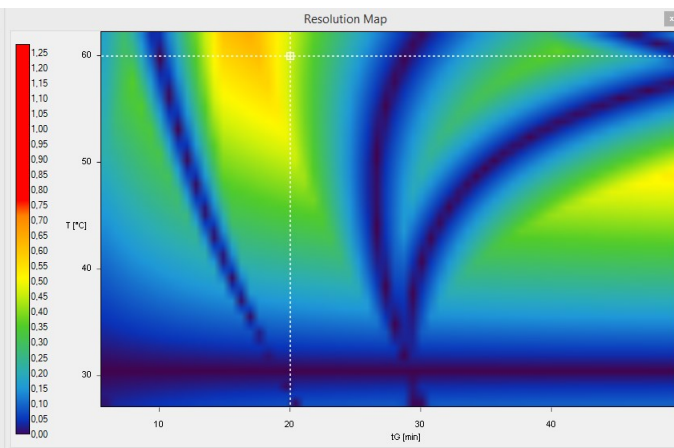
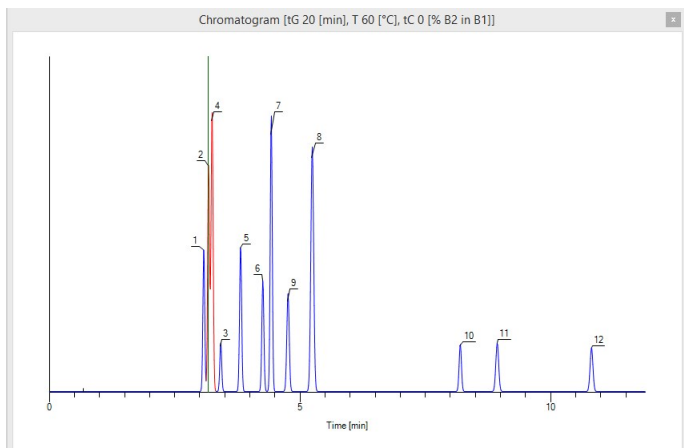
Experiment 16, Peakpaar krit. 6/7, R_s 0.5



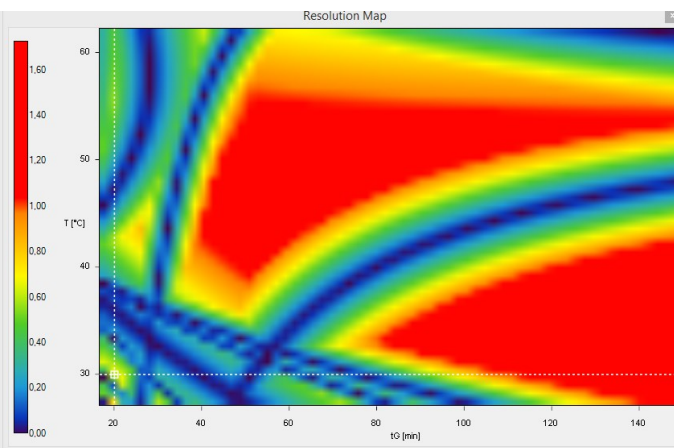
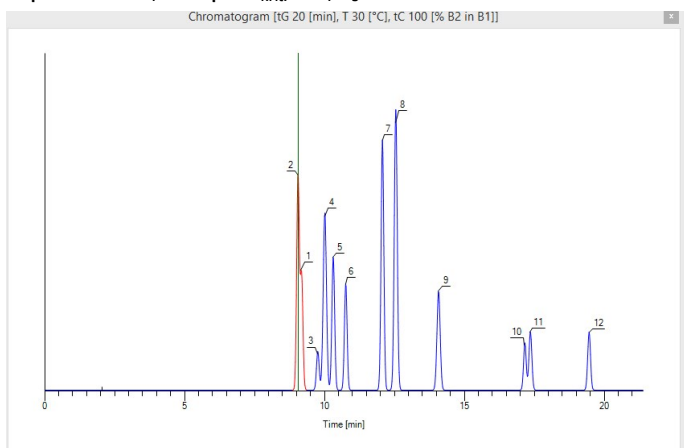
Experiment 17, Peakpaar krit. 6/7, R_s 0.4



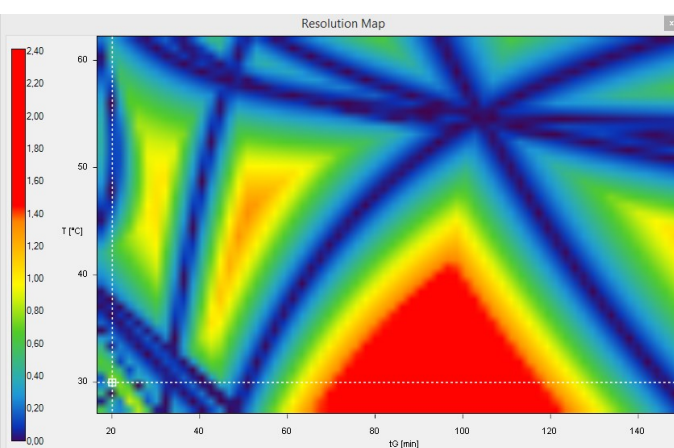
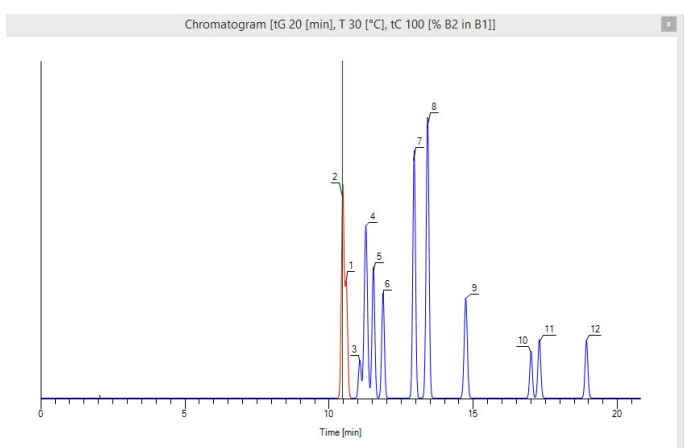
Experiment 18, Peakpaar krit. 7/6, R_s -0.3



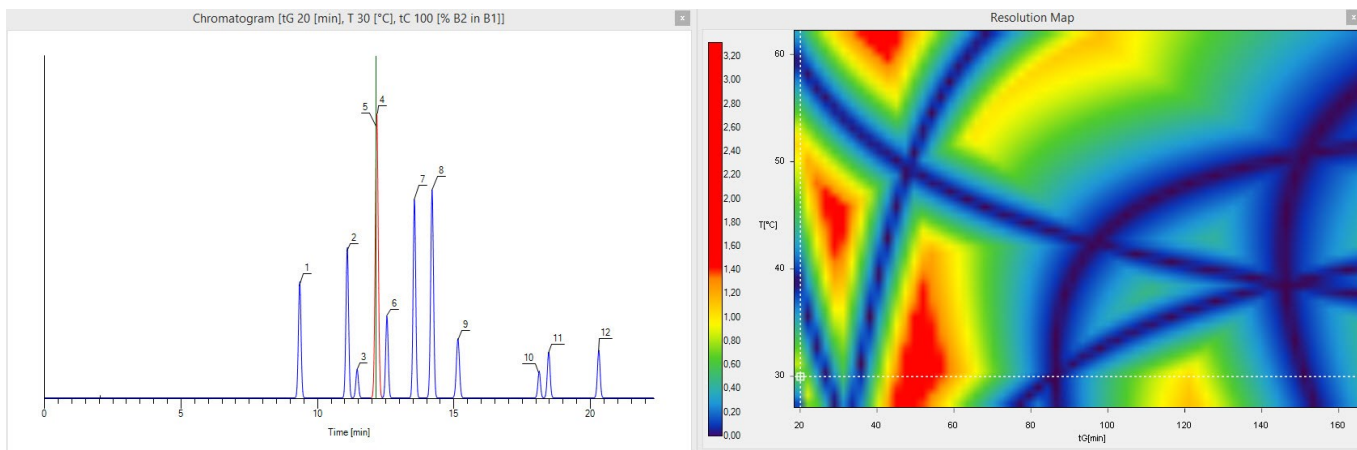
Experiment 19, Peakpaar krit. 2/4, R_s 0.9



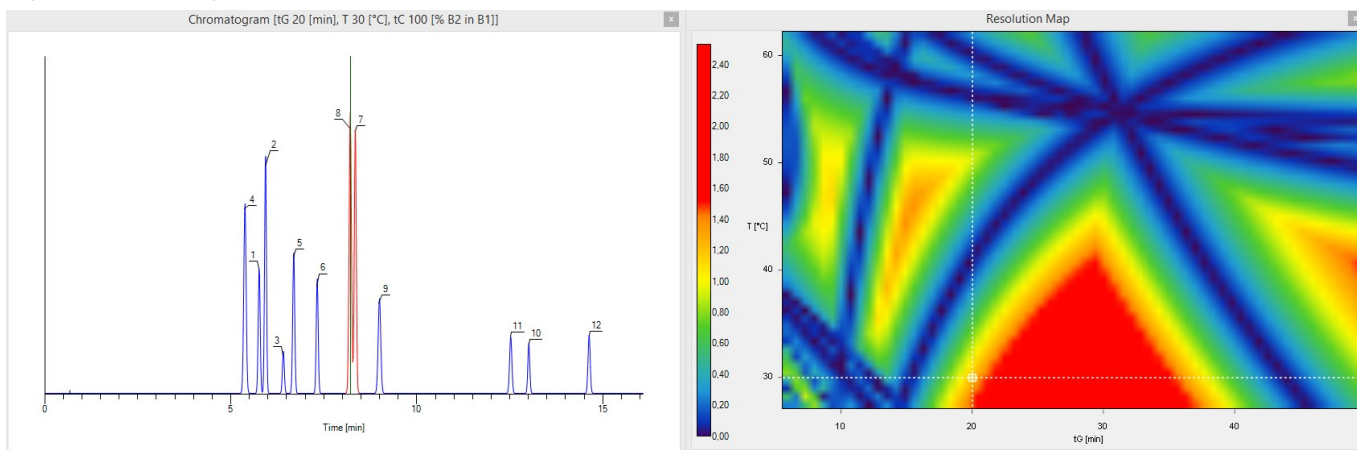
Experiment 20, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.7



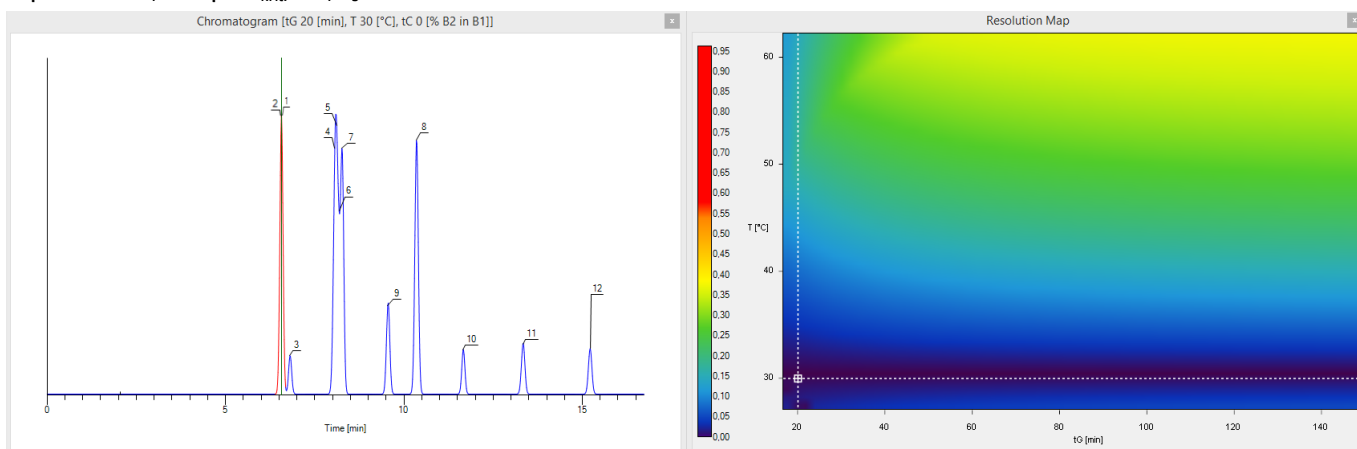
Experiment 21, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.7



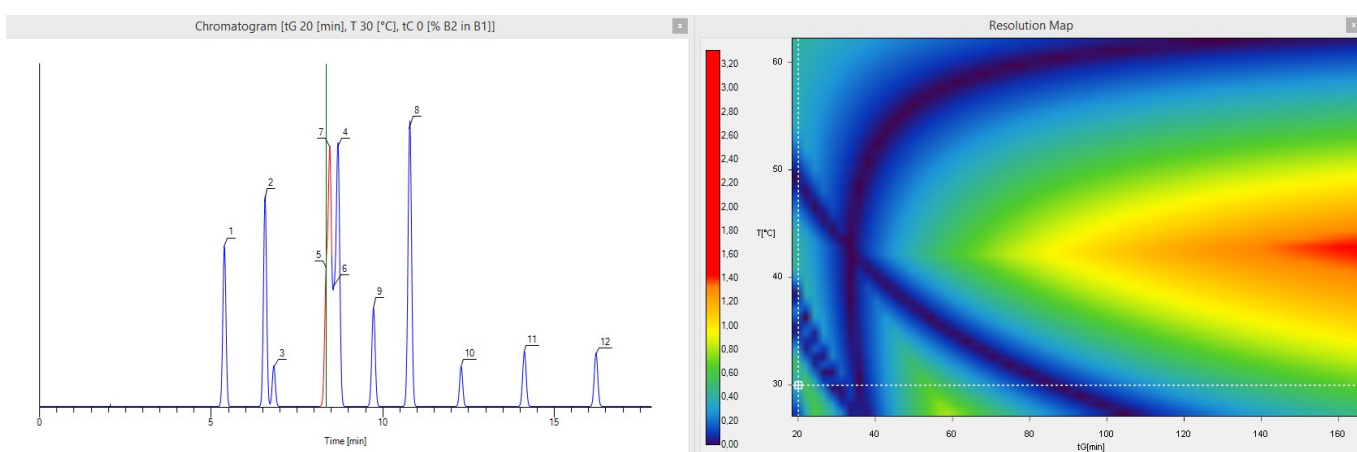
Experiment 22, Peakpaar krit. 5/4, R_s -0.1



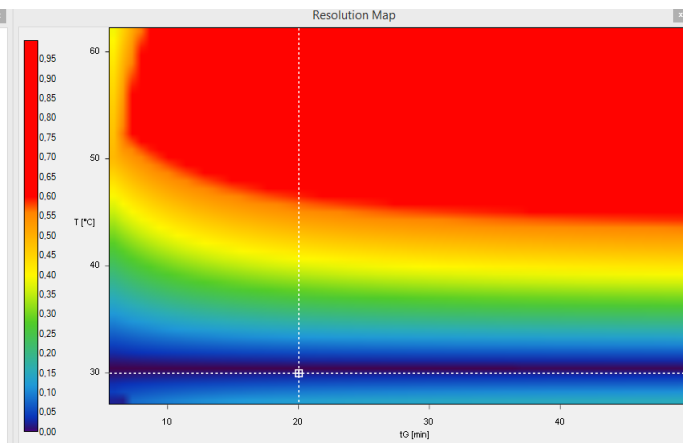
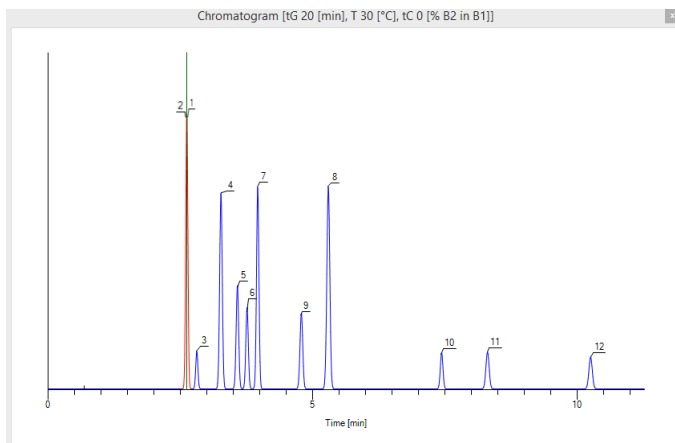
Experiment 23, Peakpaar krit. 8/7, R_s -1.2



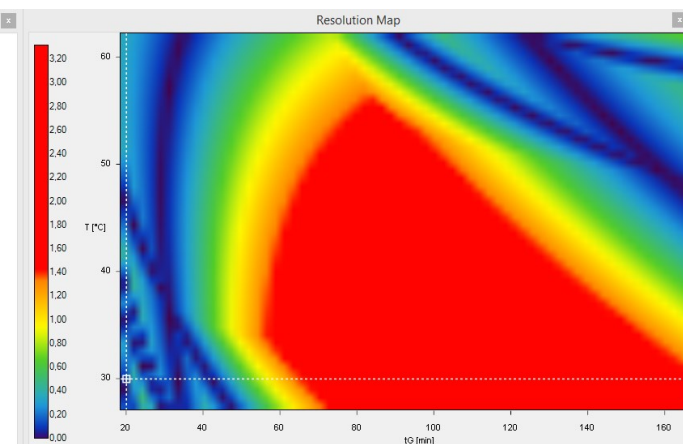
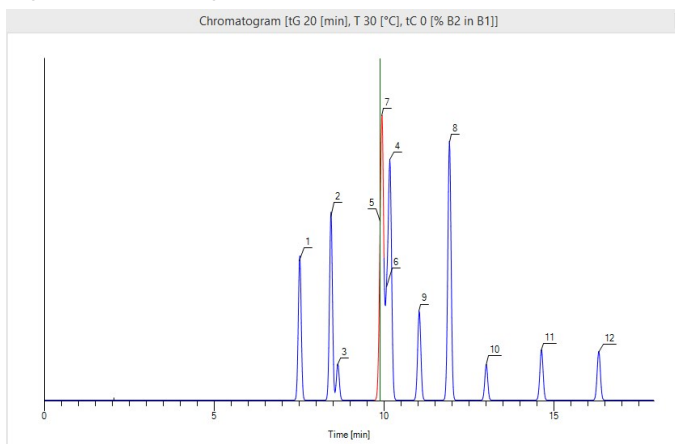
Experiment 24, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



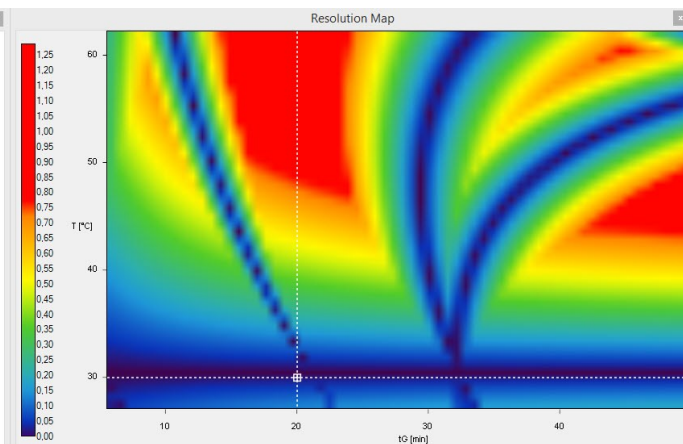
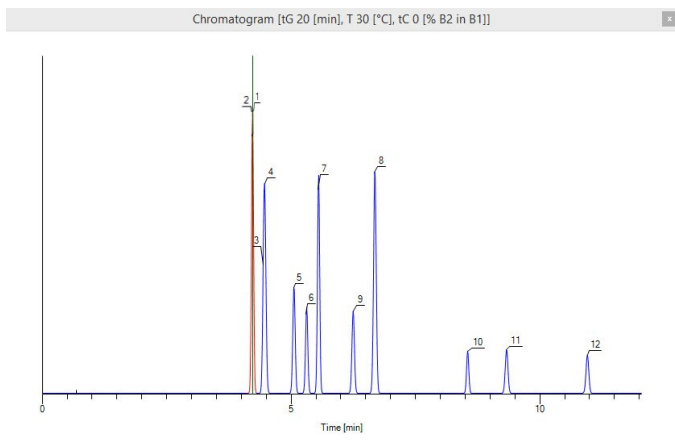
Experiment 25, Peakpaar krit. 5/7, R_s 0.6



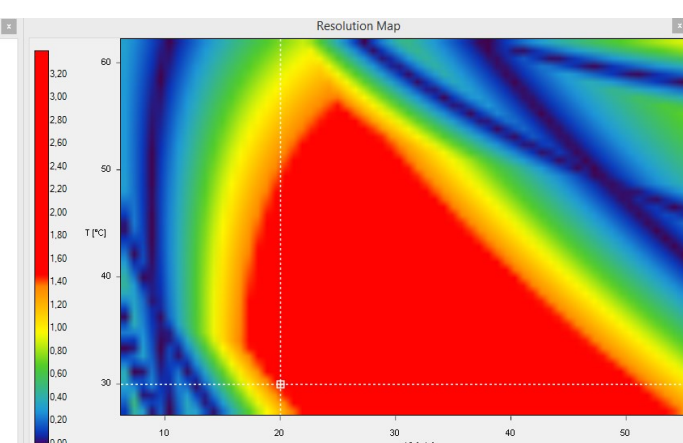
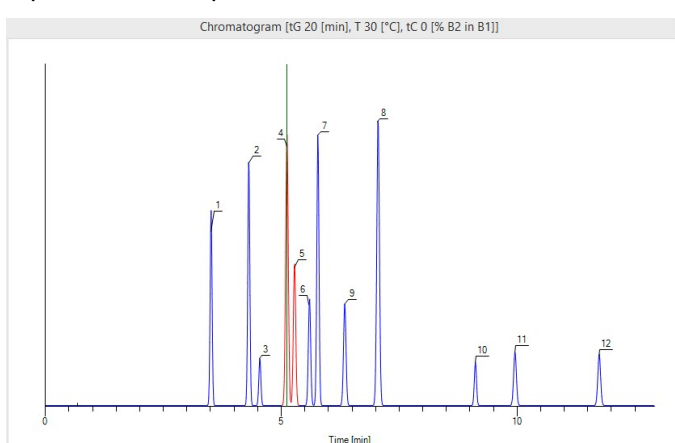
Experiment 26, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



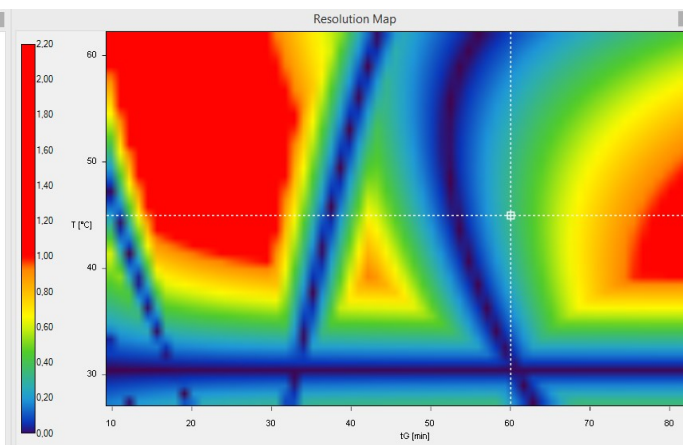
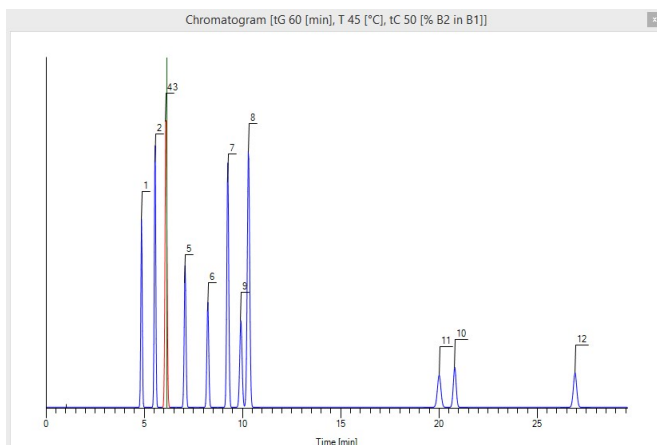
Experiment 27, Peakpaar krit. 5/7, R_s 0.3



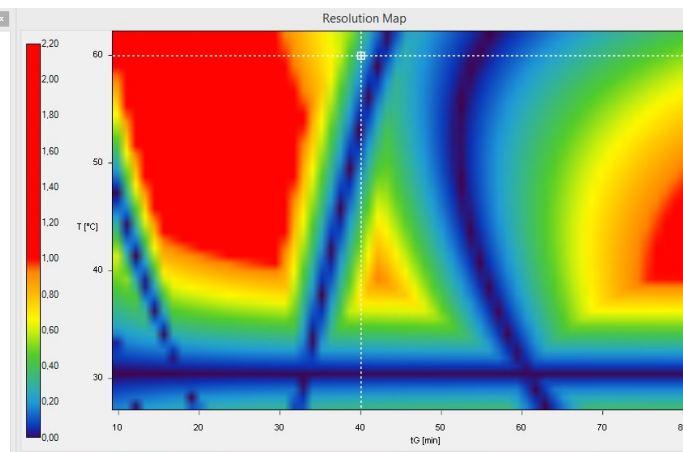
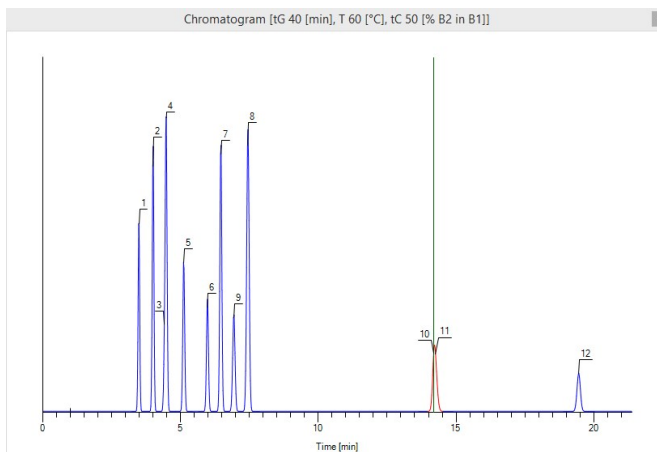
Experiment 28, Peakpaar krit. 2/1, R_s -0.0



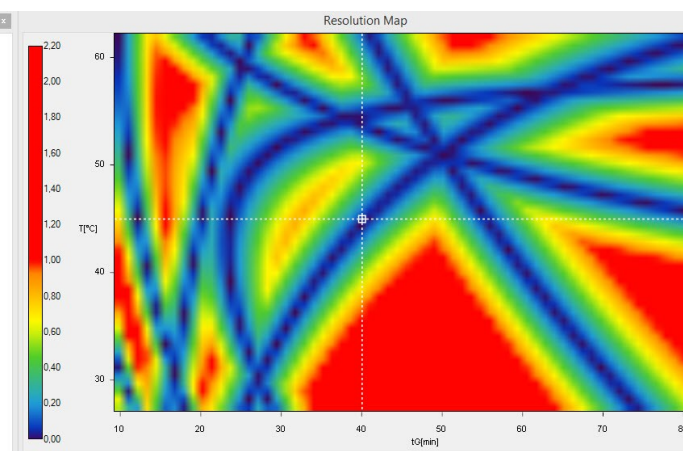
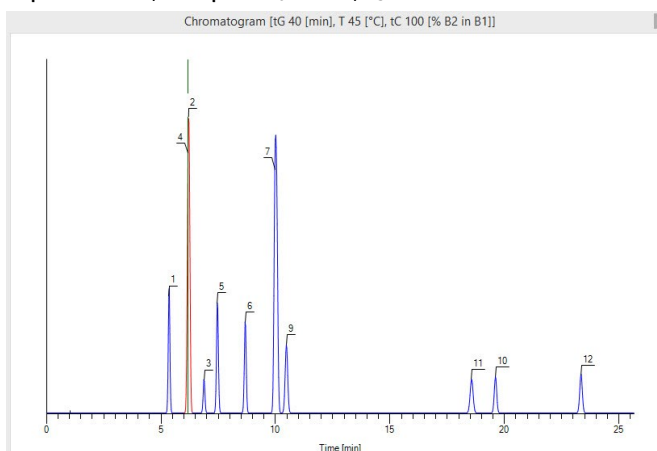
Experiment 29, Peakpaar krit. 4/5, R_s 1.6



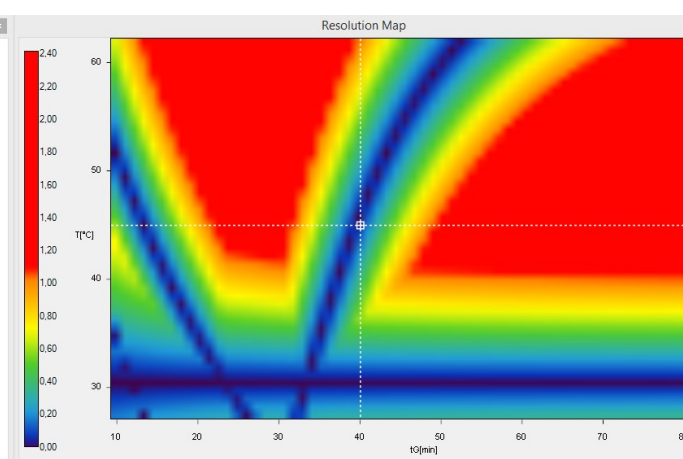
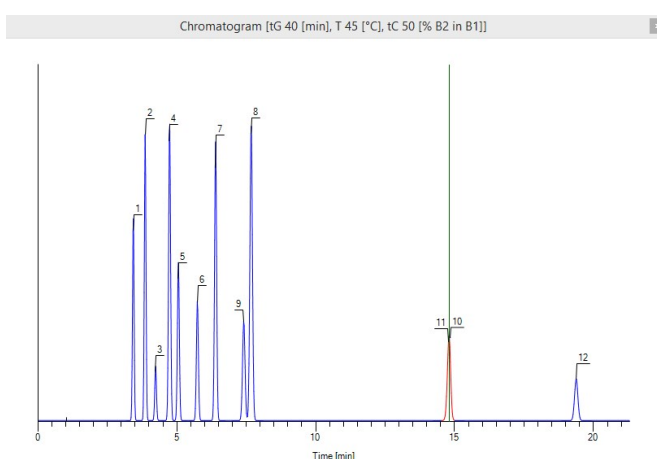
Experiment 30, Peakpaar krit. 4/3, R_s -0.4



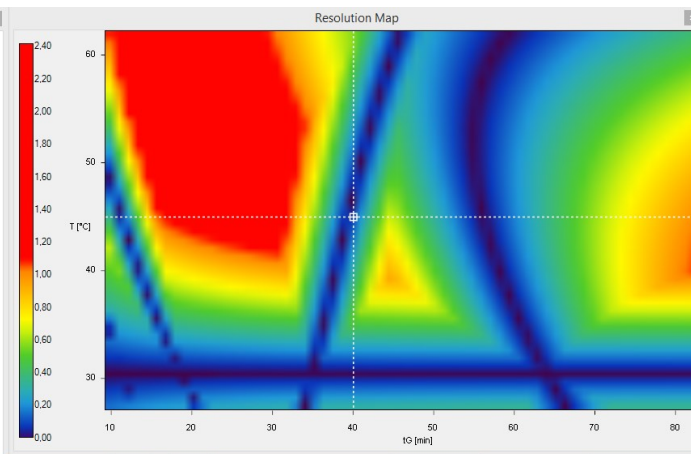
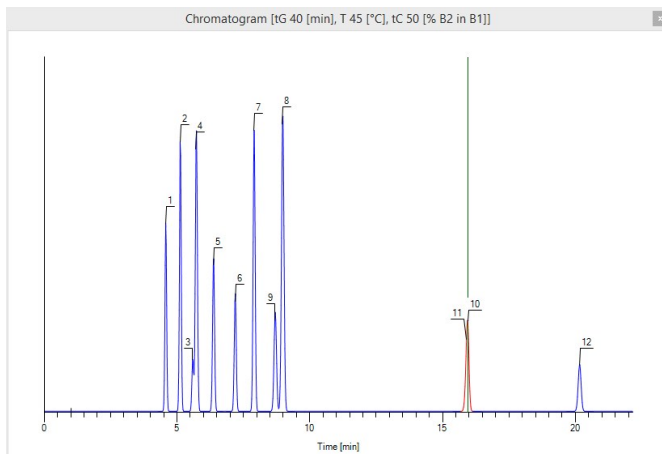
Experiment 31, Peakpaar krit. 10/11, R_s 0.2



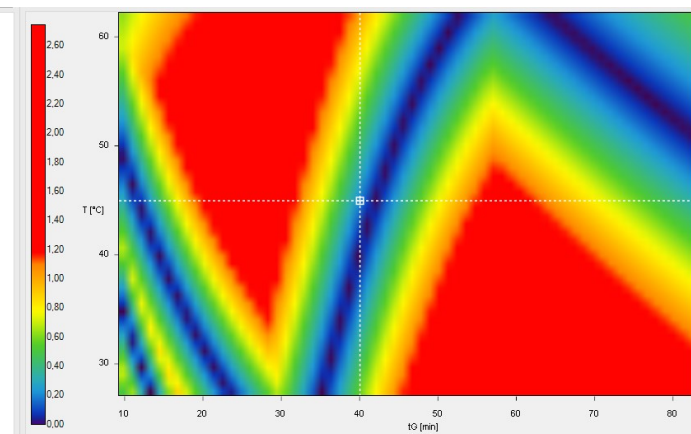
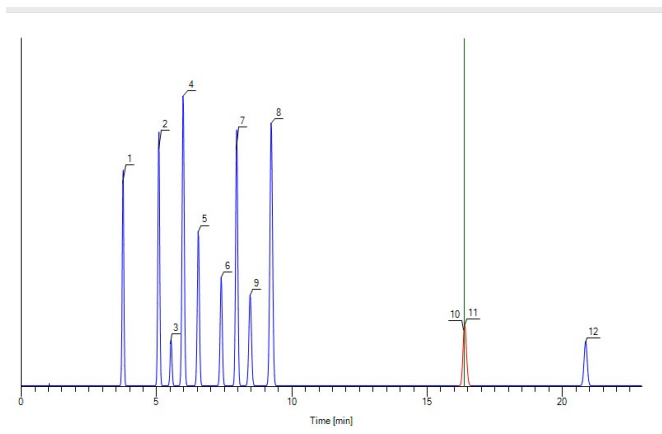
Experiment 32, Peakpaar krit. 4/2, R_s -0.4



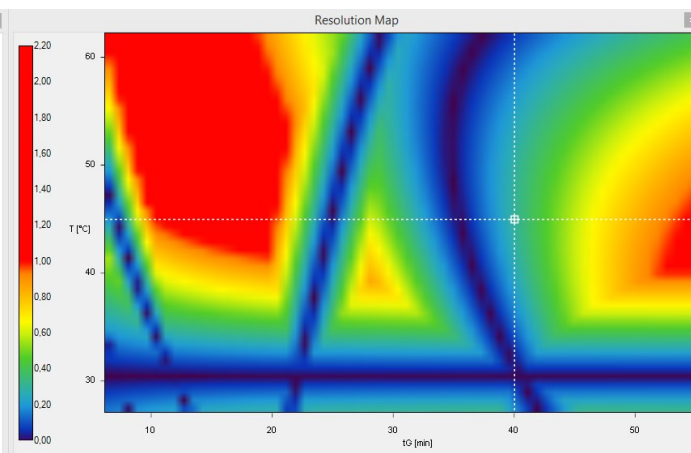
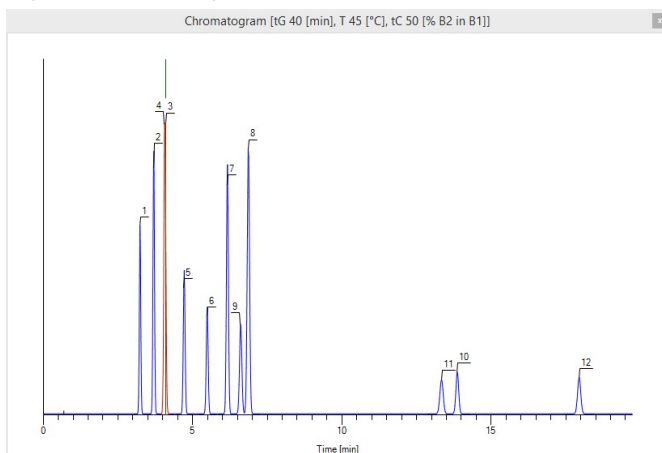
Experiment 33, Peakpaar krit. 11/10, R_s -0.1



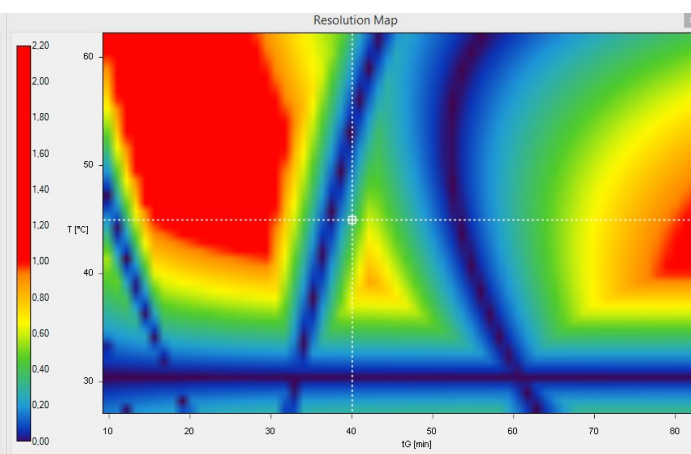
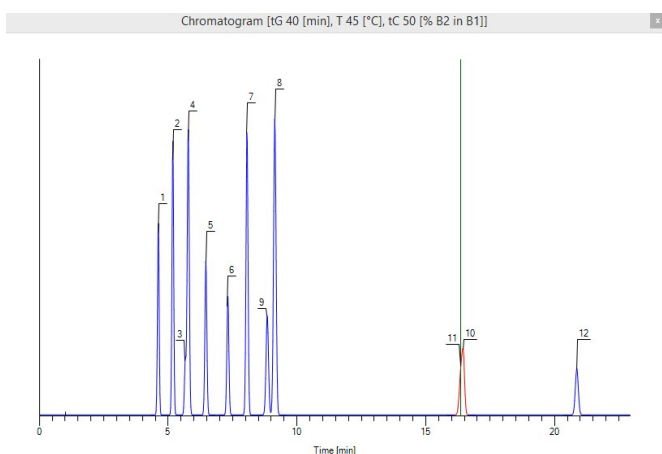
Experiment 34, Peakpaar krit. 11/10, R_s -0.2



Experiment 35, Peakpaar krit. 10/11, R_s 0.2



Experiment 36, Peakpaar krit. 4/3, R_s -0.4



Experiment 37, Peakpaar krit. 11/10, R_s -0.4