



## Quality by Design und Designspace in der HPLC:

# Die Optima einer HPLC-Trennung - Teil 3 Optima vs. Zielgröße

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 definierter Design Space (MODR) für die HPLC-Trennung, in dem Anpassungen von Methodenparameter nicht als Änderungen betrachtet werden. Für die Definition des Designspace im multidimensionalen Raum wurden sowohl Einflussgrößen als auch Zielgrößen festgelegt und Experimente zur Findung des Designspace um den globalen robusten Arbeitspunktes der HPLC-Trennung [4-15] mithilfe softwaregestützter [16] statistischer Versuchsplanung (DoE) ausgeführt und visualisiert. Das hierfür benutzte QbD-Konzept der Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Optimierung mit 6 Einflussgrößen und 10 Zielgrößen zeigt eine eindeutige Abhängigkeit der gefundenen Optima bzw. deren Robustheit von der Zahl der gewählten Zielgrößen an und ist bei einer Trennungsoptimierung mit mehreren Einflussgrößen und mehreren Zielgrößen immer zu beachten.

### Zielgrößen der HPLC-Trennungsoptimierung:

Allgemein beschreiben Zielgrößen das Ergebnis eines Versuches. Sie können Messwerte sein, aber auch Größen, die aus einem oder mehreren Messwerten

errechnet werden. Die Auswahl der Zielgrößen für eine HPLC-Trennungsoptimierung gestaltet sich ziemlich schwierig. Um möglichst alle Ziele einer Versuchsreihe abzubilden, benötigt man also mehrere Zielgrößen. Dabei treten häufig Zielkonflikte zwischen den Zielgrößen auf. Einstellungen der Einflussgrößen (Abbildung 1), die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen ungünstig sein. Wichtig ist, dass die Untersuchungsziele erfasst werden [17].

Die Interpretation der Ergebnisse wird erleichtert, wenn die Anzahl der Zielgrößen umfassend aber jedoch möglichst klein ist und jede Zielgröße einen anderen, möglichst grundlegenden, Zusammenhang erfasst.

Schon sehr erstaunlich ist es daher, dass noch in kommerziell erhältlichen Softwaretools zur flüssigchromatographischen Modellierung der Optimierung einer HPLC-Trennung die Auflösung des kritischen Peakpaares am lokalen (optimalen) Arbeitspunkt als das Kriterium

| 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      |

Abb.1: Einflussgrößen der HPLC-Trennungsoptimierung

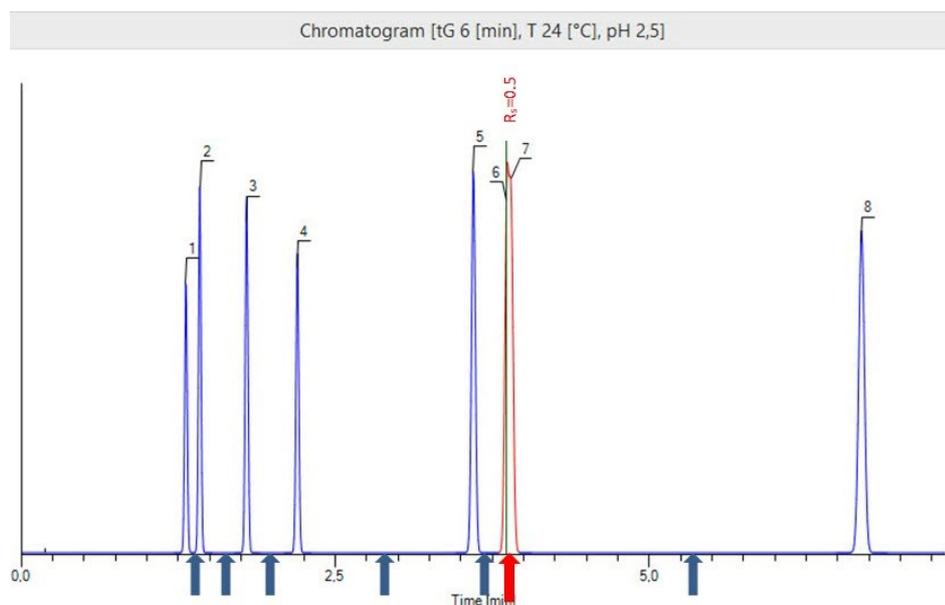


Abb.2: DryLab®-simuliertes Chromatogramm der HPLC-Trennung für den zentralen Arbeitspunkt des Versuchsplanes mit den obig aufgeführten Zielgrößen; Chromatographische Bedingungen: tG (6min), T (24°C), Eluent B (Acetonitril), %B<sub>start</sub> (28%), %B<sub>end</sub> (62%), pH (2.5), F (0.5ml/min), Verweilvolumen (1.25ml).

für die "Güte" einer HPLC-Trennung angesehen wird.

Wichtige Zielgrößen einer HPLC-Trennungsoptimierung sind die Auflösung  $R_s$  für eine selektive Trennung aller Peaks und die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm  $t_{Rmax}$  zur Minimierung der Analysenzeit. 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 [18]. Die Zahl möglicher Peaks ZMP im Chromatogramm ist daher eine weitere Zielgröße in der Optimierung einer HPLC-Trennung. Es ist die Zahl der Peaks, die mit einer bestimmten Auflösung, in der Regel  $R_s=1.5$ , in einem definierten Retentionszeitfenster getrennt werden [19].

Als Zielgrößen für unser Beispiel einer robusten Trennungsoptimierung wird deshalb nicht allein die Auflösung des kritischen Peakpaares  $R_s^{6/7}$  der HPLC-

Trennung betrachtet, sondern es werden die Auflösungen der Peakpaare  $R_s^{1/2}, R_s^{2/3}, R_s^{3/4}, R_s^{4/5}, R_s^{5/6}, R_s^{6/7}, R_s^{7/6}, R_s^{7/8}$  (Abbildung 2), die maximale Analysenzeit ( $t_{Rmax}$ ) und die Zahl möglicher Peaks (ZMP) im Chromatogramm in die Trennungsoptimierung einbezogen.

Das Auffinden des globalen, robusten Arbeitspunktes der HPLC-Trennungsoptimierung erfolgt nach einer einfachen Systematik, die tatsächlich deutlich mehr chromatographische Erfahrung und Wissen erfordert als etwa Mathematikkenntnisse [20]:

- 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.

Betrachten wir nun die Zielgrößenkriterien zur HPLC-Trennungsoptimierung (Abbildung 3): Zu beachten ist hierbei,

dass nicht ausgewählte Zielgrößen jeweils prognostiziert werden, d.h. in die Optima-Findung der HPLC-Trennungsoptimierung mit einbezogen werden.

Zur Visualisierung des globalen, robusten Designraums um den jeweiligen gefundenen robusten Arbeitspunkt (schwarzes Kreuz), steht als grafisches Werkzeug der sogenannte „Design Space Hypercube“ im 2D-Design Space Plot als gestrichelter Rahmen (Abbildung 4) oder in der multidimensionalen Ausdehnung über alle 6 Dimensionen (Abbildung 5) der Balken-Plot als „Hypercube range“ der Einflussgrößen zur Verfügung. Der „Design Space Hypercube“ ist der größtmögliche regelmäßige Hyperwürfel im unregelmäßigen Design Space Volumen [20].

Aus den Abbildungen 4 ist zu entnehmen, dass in Abhängigkeit von der gewählten Anzahl an Zielgrößen im 2-D Design Space Plot tG-F unterschiedlich große Flächen für den Design Space Hypercube der HPLC-Trennungsoptimierung erhalten werden. Ein größerer

| Response        | Criterion | Min  | Target | Max |
|-----------------|-----------|------|--------|-----|
| pp1/2           | Predicted |      |        |     |
| pp2/3           | Predicted |      |        |     |
| pp3/4           | Predicted |      |        |     |
| pp4/5           | Predicted |      |        |     |
| pp5/6           | Predicted |      |        |     |
| pp6/7           | Maximize  | 1,50 | 5,16   |     |
| pp7/6           | Predicted |      |        |     |
| pp7/8           | Predicted |      |        |     |
| tRmax           | Predicted |      |        |     |
| Number of peaks | Predicted |      |        |     |

| Criterion | Min   | Target | Max  |
|-----------|-------|--------|------|
| Maximize  | 1,50  | 4,55   |      |
| Predicted |       |        |      |
| Maximize  | 1,50  | 5,16   |      |
| Maximize  | 1,50  | 41,38  |      |
| Predicted |       |        |      |
| Minimize  |       | 2,80   | 9,00 |
| Maximize  | 46,60 | 48,00  |      |

Abb.3: Zielgrößenkriterien für HPLC-Trennungsoptimierung, links: 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ), rechts: 5 Zielgrößen ( $R_s^{1/2}, R_s^{6/7}, R_s^{7/6}, t_{Rmax}, ZMP$ ).

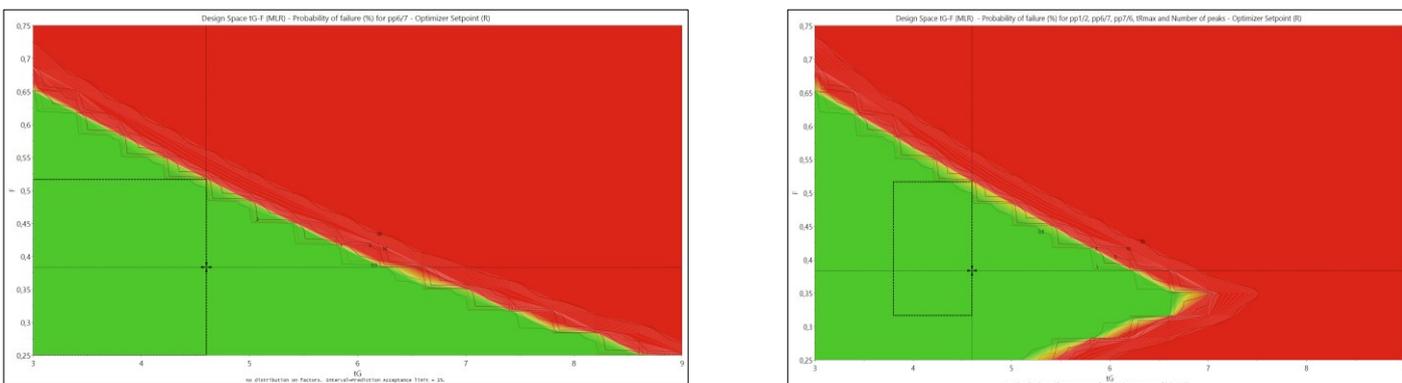


Abb. 4: Design Space Hypercube der HPLC-Trennungsoptimierung im 2D-Design Space Plot tG-F, links: für 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ), rechts: für 5 Zielgrößen ( $R_s^{1/2}, R_s^{6/7}, R_s^{7/6}, t_{Rmax}, ZMP$ ).

Design Space Hypercube bedeutet, dass die Einflussgrößen in breiteren Einstellbereichen variiert werden können, ohne die Zielgrößen-Spezifikationen zu verletzen. Die HPLC-Trennung ist somit bei Wahl von nur einer Zielgröße augenscheinlich robuster.

Diese Robustheitsaussage wird auch bei der Betrachtung der „Hypercube range“ für die Einflussgrößen (grüne Balken) in der Abbildung 5 bestätigt. Die breitesten Faktorbereiche der multidimensionalen Ausdehnung über alle 6 Dimensionen (tG, T, %B<sub>start</sub>, %B<sub>end</sub>, pH, F) werden mit Ausnahme des Faktorbereiches der Einflussgröße pH für die HPLC-Trennungsoptimierung mit nur 1 Zielgröße angezeigt.

In der Abbildung 6 ist der Einfluss der Zielgrößenanzahl auf den robusten Arbeitspunkt (Findung einer Lösung mit maximalen Faktorbereichen) der HPLC-Trennung wiedergegeben.

Die gefundenen jeweiligen globalen robusten Arbeitspunkte unterscheiden sich nur leicht in den Einstellungen für die Einflussgrößen pH und %B<sub>s</sub>. Stärker unterscheiden sich schon die Beiträge der jeweiligen Einflussgröße auf HPLC-Trennungsoptimierung. Bei der 1 Zielgrößen-Trennungsoptimierung hat die Temperatur mit 38.3% den größten Einfluss auf die Trennung. Hingegen beeinflusst die Gradientenzeit mit 30.2% die HPLC-Trennung am stärksten bei der Trennungsoptimierung mit 5 Zielgrößen. Den geringsten Beitrag zur HPLC-Trennung liefert mit jeweils ca. 3% die Einflussgröße pH des wässrigen Eluenten A.

In der Abbildung 7 sind die DryLab®-simulierten Chromatogramme der HPLC-Trennung am jeweiligen globalen robusten Arbeitspunkt aufgezeigt.

Den Forderungen nach Einhaltung der gesetzten Spezifikation für die Auflösung von  $R_{s,krit} \geq 1.5$  und von  $tR_{max} \leq 9$  min für die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm der HPLC-Trennung wird nachgekommen.

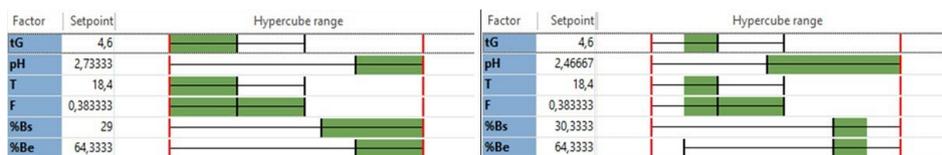


Abb.5: Design Space Hypercube range der multidimensionalen Ausdehnung über alle 6 Dimensionen als Balken-Plot, links: für 1 Zielgröße (R<sub>s</sub><sup>6/7</sup>), rechts: für 5 Zielgrößen (R<sub>s</sub><sup>1/2</sup>, R<sub>s</sub><sup>5/7</sup>, R<sub>s</sub><sup>7/6</sup>, tR<sub>max</sub>, ZPM).

| Factor | Role | Value | Factor contribution | Factor | Role | Value | Factor contribution |
|--------|------|-------|---------------------|--------|------|-------|---------------------|
| tG     | Free | 4,60  | 23,80               | tG     | Free | 4,60  | 30,18               |
| T      | Free | 18,40 | 38,30               | T      | Free | 18,40 | 12,37               |
| %Bs    | Free | 29,00 | 1,07                | %Bs    | Free | 30,33 | 17,35               |
| %Be    | Free | 64,33 | 3,86                | %Be    | Free | 64,33 | 17,91               |
| pH     | Free | 2,73  | 3,06                | pH     | Free | 2,47  | 2,93                |
| F      | Free | 0,38  | 29,91               | F      | Free | 0,38  | 19,26               |

Abb.6: Globaler, robuster Arbeitspunkt und Beitrag der jeweiligen Einflussgröße auf HPLC-Trennungsoptimierung, links: für 1 Zielgröße (Rs<sup>6/7</sup>), rechts: für 5 Zielgrößen (Rs<sup>1/2</sup>, Rs<sup>5/7</sup>, Rs<sup>7/6</sup>, tR<sub>max</sub>, ZPM).

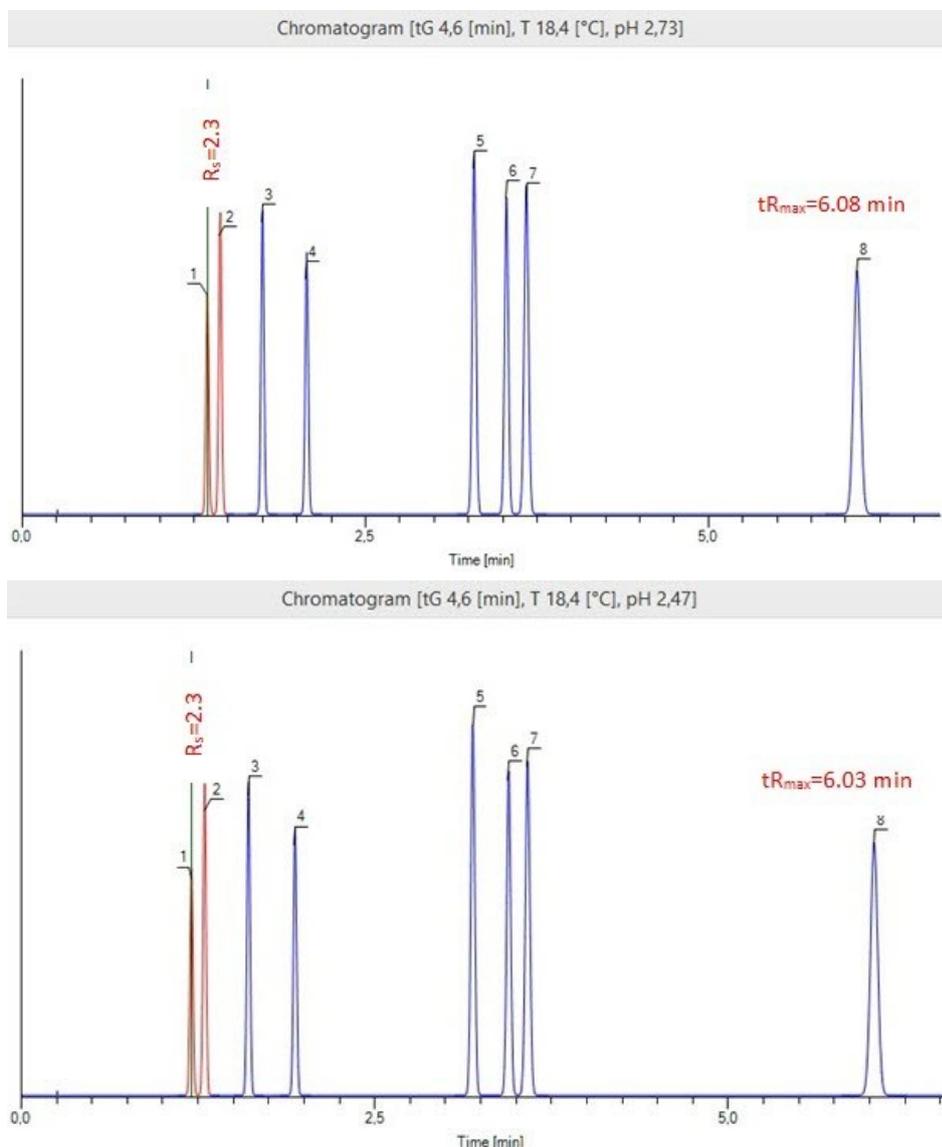


Abb.7: DryLab®-simuliertes Chromatogramme der HPLC-Trennung für den globalen robusten Arbeitspunkt der HPLC-Trennungsoptimierung, oben: für 1 Zielgröße (R<sub>s</sub><sup>6/7</sup>), unten: für 5 Zielgrößen (R<sub>s</sub><sup>1/2</sup>, R<sub>s</sub><sup>5/7</sup>, R<sub>s</sub><sup>7/6</sup>, tR<sub>max</sub>, ZPM).

Mit Hilfe der Setpoint-Analyse (Abbildung 8) kann gezeigt werden, wie die Einstellungen der Einflussgrößen um den globalen, robusten Arbeitspunkt herum variiert werden können. Die Schätzung erfolgt mittels Monte-Carlo-Simulationen an den Einstellungen der Einflussgrößen. Es wird eine Suche durchgeführt, um den größtmöglichen Toleranzbereich für jede Einflussgröße zu ermitteln, der verwendet werden kann und dennoch alle Zielgrößenspezifikationen (Abbildungen 9 und 10) zu erfüllen.

Für vergleichbare Einstellungen der Einflussgrößen tG, T, F, %Be des jeweiligen robusten Arbeitspunktes sind die möglichen Variierungen um den robusten Arbeitspunkt für die Trennoptimierung mit 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ) breiter. Dieser Fakt bestätigt wiederum die Robustheitsaussage zum Design Space Hypercube range der multidimensionalen

Ausdehnung über alle 6 Dimensionen (grüne Balken-Plots für Einflussgrößen tG, T, F, %Be in der Abbildung 5).

Den Forderungen nach Einhaltung der gesetzten Spezifikation für die Auflösung von  $R_{s,krit} \geq 1.5$  und von  $t_{R,max} \leq 9$  min für die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm der HPLC-Trennung wird nachgekommen.

**Zusammenfassung**

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

Das hierfür benutzte QbD-Konzept der Multi-Einflussgrößen / Multi-Zielgrößen Optimierung mit 6 Einflussgrößen und 10 Zielgrößen zeigt eine eindeutige Abhängigkeit des gefundenen globalen,

| Factor | Low      | Setpoint | High    | Factor | Low     | Setpoint | High     |
|--------|----------|----------|---------|--------|---------|----------|----------|
| tG     | 3,60625  | 4,6      | 5,59375 | tG     | 3,655   | 4,6      | 5,545    |
| pH     | 2,5077   | 2,73333  | 2,95896 | pH     | 1,88823 | 2,46667  | 3,04511  |
| T      | 12,985   | 18,4     | 23,815  | T      | 13,075  | 18,4     | 23,725   |
| F      | 0,308646 | 0,383333 | 0,45802 | F      | 0,31013 | 0,383333 | 0,456536 |
| %Bs    | 26,35    | 29       | 31,65   | %Bs    | 27,3645 | 30,3333  | 33,3021  |
| %Be    | 62,077   | 64,3333  | 66,5895 | %Be    | 62,1395 | 64,3333  | 66,527   |

Abb.8: Setpoint-Analyse des globalen, robusten Arbeitspunktes der HPLC-Trennungsoptimierung, links: für 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ), rechts: für 5 Zielgrößen ( $R_s^{1/2}$ ,  $R_s^{6/7}$ ,  $R_s^{7/6}$ ,  $t_{R,max}$ , ZPM).

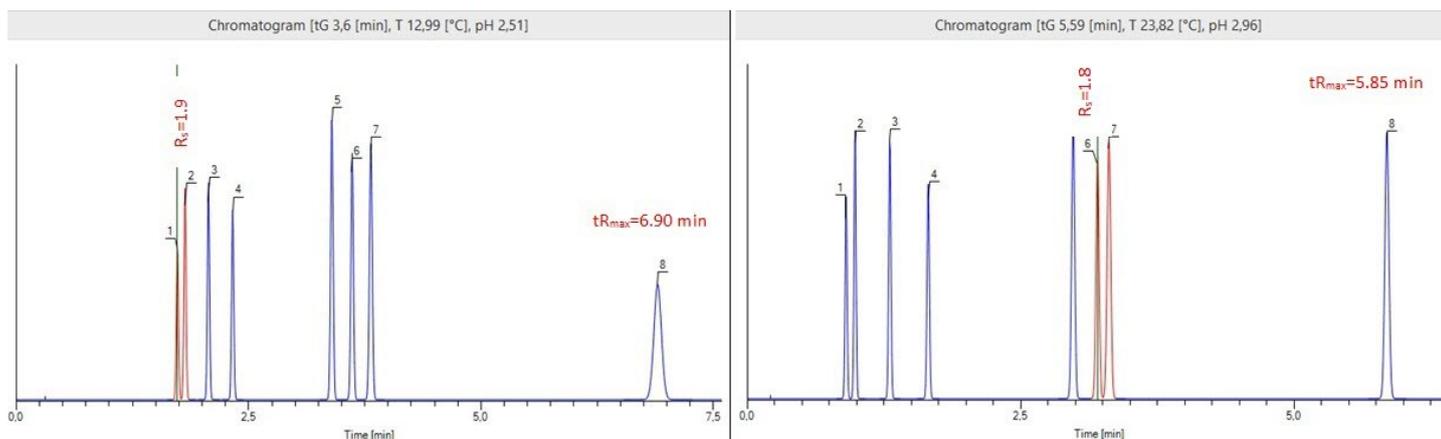


Abb.9: DryLab®-simuliertes Chromatogramme der HPLC-Trennung für den „low“-Arbeitspunkt der Setpoint-Analyse, links: für 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ), rechts: für 5 Zielgrößen ( $R_s^{1/2}$ ,  $R_s^{6/7}$ ,  $R_s^{7/6}$ ,  $t_{R,max}$ , ZPM).

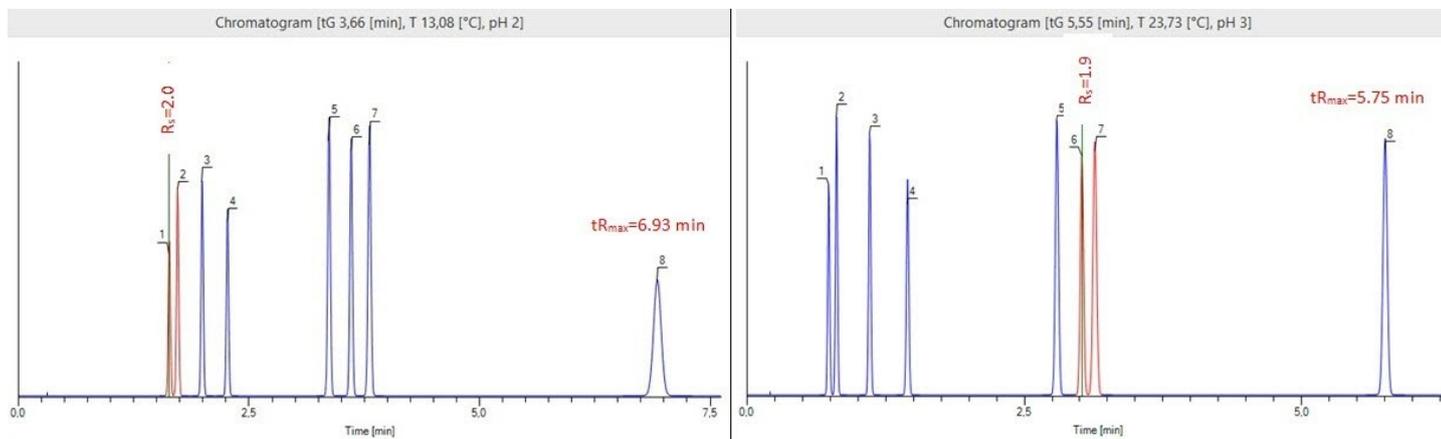


Abb.10: DryLab®-simuliertes Chromatogramme der HPLC-Trennung für den „high“-Arbeitspunkt der Setpoint-Analyse, links: für 1 Zielgröße ( $R_s^{6/7}$ ), rechts: für 5 Zielgrößen ( $R_s^{1/2}$ ,  $R_s^{6/7}$ ,  $R_s^{7/6}$ ,  $t_{R,max}$ , ZPM).

robusten Arbeitspunktes und der Robustheit der HPLC-Trennung von der Zahl der gewählten Zielgrößen an. Dieser Fakt ist bei einer Multi-Einflussgrößen / Multi-Zielgrößen Trennungsoptimierung immer zu beachten.

## 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] 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] H.W. Bilke, Analytik NEWS 2018

[13] H.W. Bilke, Analytik NEWS. 2018

[14] H.W. Bilke, Analytik NEWS 2019

[15] H.W. Bilke, Analytik NEWS 2019

[16] 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

[17] Taschenbuch Versuchsplanung: „Praxisreihe Qualitätswissen“, Wilhelm Kleppmann, Hanser Verlag, 2008, 253.

[18] V.R. Meyer, Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. Hüthig Verlag Heidelberg 1996, 24-27.

[19] T. Welsch, GDCH-Vortrag

[20] A. Orth, GIT Labor-Fachzeitschrift 3/17

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

## Anhang

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

Factors: 6 Responses: 10 Runs: 29 Objective: Optimization (RSM) Design: Rechtschaffner, quadratic model Cond. no: \* Fitted with: MLR