

Güte einer UHPLC-Trennung

Screenen von ACQUITY UHPLC® Säulen

Dr. Hans-Werner Bilke¹, Prof. Andreas Orth²

¹LC-Pharm-HPLC-Expert Service, ²Frankfurt University of Applied Sciences

Einführung

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

Basis für eine systematischere Planung von Versuchen zur UHPLC-Methodenentwicklung oder UHPLC-Methodenüberarbeitung ist ein umfassendes Verständnis des flüssig-chromatographischen Trennprozesses und ein definierter Designspace für die UHPLC-Trennung. Design of Experiments (statistische Versuchsplanung DoE) ist der effektivste Ansatz um diese Ziele zu erreichen.

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Faktoren und Zielgrößen ab. Solche Faktoren sind zu suchen in der Gradientenzeit (tG), der Temperatur (T), der ternäre Eluentzusammensetzung (tC) des organischen Eluenten B, der Startkonzentration (%B_s) und Endkonzentration (%B_e) des organischen Eluenten B, dem pH des wässrigen Eluenten A (pH) sowie der Flussrate (F).

Das immer noch vorherrschende Verfahren „Versuch und Irrtum“ führt schnell zu einem ausufernden Aufwand mit geringem Informationsgehalt. Wichtige Zielgrößen sind die kritische Auflösung $R_{S,krit}$ (Auflösung für das am schlechtesten getrennte Peakpaar im Chromatogramm) für die UHPLC-Trennung sowie die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm $t_{R,max}$ zur Minimierung der Analysenzeit.

Das QbD-Konzept für die Sicherung der Qualität von UHPLC-Trennungen verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer unterstützter UHPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE). Eine mehr als drei Methodenparameter sowie mehr als eine Zielgröße umfassendes Optimierung einer UHPLC-Trennung ist durch Verknüpfung von chromatographischer Modellierungssoftware z.B.

DryLab@4¹ und statistischer DoE-Software z.B. MODDE 11 Pro@² realisierbar.

Experimentelles³

Säulen: ACQUITY UHPLC® Säulen der Dimension 50 x 2,1 mm mit 2-µm Partikel

Eluent: Die mobile Phase war eine Mischung von Acetonitril und 5mM Ammoniumdihydrogenphosphat-Puffer.

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).

Versuchsplanung (DoE)

Empirisches Prozessmodell zum Screenen einer UHPLC-Trennung

Ableitend aus den Rohdaten⁴ einer 3-Faktor-Optimierung mit DryLab@4 wurde für die simultane Optimierung aller signifikanten UHPLC-Methodenparameter ein 6-Faktor-Modell (Multi-Einflussgrößen-Modell) aufgestellt. Basierend auf den Ergebnissen des Versuchsplanes wird ein empirisches, statistisch abgesichertes Prozessmodell erstellt und anschließend wird mit Hilfe dieses Modells – insofern einfache statistische Diagnostiken (Residuenanalysen) dies zulassen – ein Screening durchgeführt.

Dabei treten häufig Zielkonflikte auf. Einstellungen der Faktoren, die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen

ungünstig sein. Um robust zu screenen, ist also ein Multi-Zielgrößen-Modell notwendig.

Die sehr effiziente Arbeitsweise der statistischen Versuchsplanung (DoE) ermöglicht gerade die Verwendung dieser Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Modelle.

Einflussgrößen der UHPLC-Trennung

Zur Problemlösung „6-Faktor-Modell“ werden nun Haupt- und Wechselwirkungen der Faktoren (Tabelle 1) auf die Zielgrößen (Appendix Abbildung 2) untersucht und visualisiert. Genau das ist es, was mit „Erstellung des Prozessmodells“ gemeint ist, denn diese Haupt- und Wechselwirkungen sind so gut wie identisch (nämlich genau doppelt so groß) mit den für Prognose- und Optimierungszwecke verwendeten Koeffizienten im Prozessmodell.

Den Faktoren wird meist ein wesentlicher Einfluss auf die Qualitätsmerkmale unterstellt. Genau dies wird deshalb innerhalb des DoE methodisch untersucht. Vor der Untersuchung muss die Variation festgelegt werden, die die Faktoren im Versuch annehmen sollen.

Der Bereich, den alle Faktoren von ihrer minimalen bis zu maximalen Einstellung abdecken, nennt man Versuchsraum, im Kontext von QbD auch Knowledge Space. Der Knowledge Space ist i.d.R. wesentlich größer als der anschließend zu bestimmende Design Space für die UHPLC-Trennung.

Tab. 1: Faktoren und Faktorbereiche eines 6-Faktor-Screenings

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

Zielgrößen der UHPLC-Trennung

Die Zielgrößen beschreiben das Ergebnis eines Versuchs. Meist benötigt man mehrere Zielgrößen um alle Ziele einer Versuchsreihe abzubilden. Die Auflösung wird auch heute noch als die Zielgröße bzw. als das wichtigste Kriterium für die „Güte“ einer Trennung angesehen.

In der Tabelle 2 sind die Faktoreinstellungen des optimalen Arbeitspunktes der 3-Faktor Optimierung mit DryLab®4 für die jeweilige RP-ACQUITY UHPLC® Säule zusammengestellt.

Die Abbildung 1 zeigt die Chromatogramme des optimalen Arbeitspunktes der 3-Faktor Optimierung mit DryLab®4 für die jeweilige RP-ACQUITY UHPLC® Säule.

Auf allen ACQUITY UHPLC® Säulen wird eine Abtrennung der aktiven Substanz von den Verunreinigungen sowie eine Trennung der Verunreinigungen untereinander mit einer völlig ausreichenden Auflösung von $R_s \geq 2,0$ für die kritischen Peakpaare 1/2 und 6/7 erreicht. Wird nur die Auflösung für das jeweilige kritische Peakpaar für eine Aussage zur Güte der UHPLC-Trennung herangezogen, so ist die Acquity CSH C18-Säule die Säule der Wahl. Die kürzeste Analysenzeit für die UHPLC-Trennung wird mit der Acquity HSS T3-Säule erreicht. Eine Aussage hinsichtlich der für die Routine-Analytik am besten geeignetsten ACQUITY UHPLC® Säulen ist aber schwierig zu treffen, wenn nicht gar unmöglich.

Beim Screenen einer UHPLC-Trennung sollte neben der Auflösung des jeweiligen kritischen Peakpaares auch weitere interessante Peakpaare bzw. deren Auflösungen als Zielgrößen in die Betrachtung einbezogen werden. Im vorliegenden Fall sind es die Peakpaare 1/2, 5/6 und 6/7 (siehe auch Abbildung 1)

Ein Problem ist, dass beim Screenen der UHPLC-Trennung durch die erforderliche Variierung der Versuchsbedingungen eine Umkehr der ursprünglichen Peakreihenfolge für Peakpaare auftritt. Darüber hinaus sind unterschiedliche kritische Peakpaare zu beobachten.

Versuchsplan zum Screening einer UHPLC-Trennung

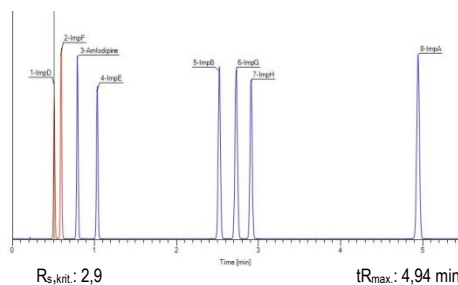
Im folgenden Beispiel wird die oben beschriebene Situation illustriert, wie mit umkehrenden Peakpaaren und mit wechselnden kritischen Peakpaaren innerhalb des Versuchsbereichs umgegangen werden kann.

Da die Schätzung von Wechselwirkungen zwischen den Faktoren und ihren Einfluss auf die Zielgrößen beim Screenen einer UHPLC-

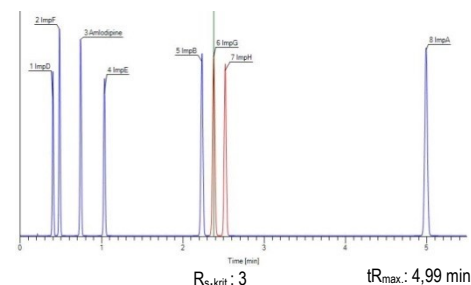
Tab. 2: Faktoreinstellungen des optimalen Arbeitspunktes 3-Faktor Optimierung mit DryLab®4 für jeden Acquity Säulen-Typ

Faktoren	ACQUITY UHPLC® Säulen / Optimaler Arbeitspunkt (DryLab®4)				
	BHE C18	CSH C18	HSS C18	HSS C18 SB	HSS T3
Gradientenzeit [min]	4.54	4.59	4.59	4.59	3.35
Temperatur [°C]	12	18.8	28.5	18.8	12
Eluent B _s [%]	30	32	34	32	30
Eluent B _e [%]	63.1	60.3	61.6	60.3	74.2
pH wässriger Eluent A	2.1	3	2	3	2
Fluss [ml/min]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Auflösung $R_{s,krit.}$	2.9	3	2.6	2.9	2.1
Retentionszeit $tR_{max.}$ [min]	4.94	4.99	4.98	4.9	3.77

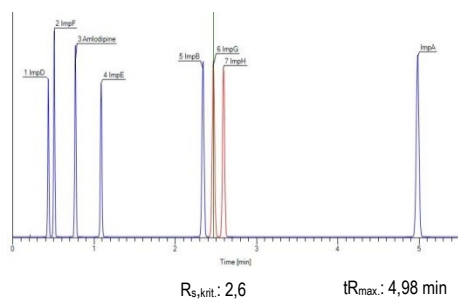
Acquity BEH C18



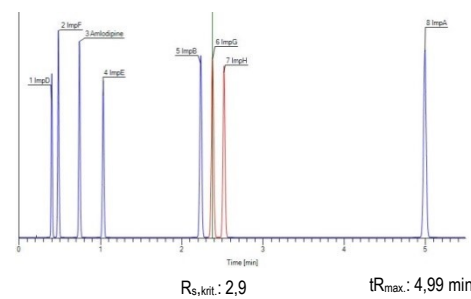
Acquity CSH C18



Acquity HSS C18



Acquity HSS C18 SB



Acquity HSS T3

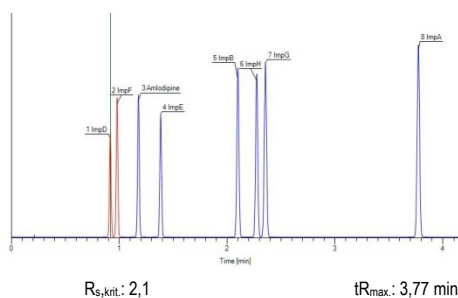


Abb. 1: Chromatogramm für den optimalen Arbeitspunkt

Trennungen sehr wichtig ist, wurde hier ein Rechtschaffner-Versuchsplan der Auflösung V mit 29 Versuchen und einem zusätzlichen Zentrumspunkt zur Lösung der Aufgaben-

stellung verwendet. Rechtschaffner Pläne⁸ sind nicht ganz ausbalancierte und deshalb nur fast orthogonale, gesättigte Fraktionen der Auflösung V eines 2ⁿ oder 3ⁿ faktoriellen

Designs. Sie erlauben die Schätzung aller Haupteffekte sowie aller erster Ordnung-Wechselwirkungen ohne Vermengung und unterstützen wie in unserem Fall des 2^n faktoriellen Designs auch die Verwendung quadratischer Terme.

Resultate und Diskussion

Die Ergebnisse der DoE-Experimente für die Zielgröße R_s sind in den Rohdaten-Plots (Abbildung 2) dargestellt. Zu beachten sind die R_s -Werte der Peakpaare 1/2, 5/6 und 6/7. Diese Peakpaare weisen in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen (Faktoreinstellungen) der Versuchspläne eine Peakumkehr, d.h. negative Auflösungsweite auf (rote Punkte). Neben der Elutionsreihenfolge ändert sich auch das kritische Peakpaar in Abhängigkeit von der jeweiligen Faktoreinstellung der Versuchsplanexperimente.

Robuster Arbeitspunkt der UHPLC-Trennung

Im folgendem wird die Güte der UHPLC-Trennung in Abhängigkeit von der Wahl der stationären Phase der ACQUITY UHPLC® Säulen betrachtet.

Noch heute wird nur die Auflösung des kritischen Peakpaares am **optimalen Arbeitspunkt** in kommerziell erhältliche Software zur Computer unterstützten UHPLC-Methodenentwicklung (CMD) zur Modellierung benutzt.

Zielsetzung der Multi-Einflussgrößen-/Multi-Zielgrößen-Modellierung ist es aber unter Einbeziehung der Auflösung aller interessanten Peakpaare (3) als Zielgrößen sowie aller oben genannten sechs Faktoren (6) als Einflussgrößen den **robusten (globalen) Arbeitspunkt** zu finden.

Hierzu wird die Einstellung ermittelt, die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raumes die größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen hat, diese entspricht dem „robustesten Arbeitspunkt“ (Tabelle 3).

Die Anzahl der Rechenoperationen zur Findung des robusten Arbeitspunktes unter Berücksichtigung aller Peakpaare und Faktoren definiert sich über Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Anzahl Berechnungen} \\ &= \text{Anzahl Zielgrößen} \\ & \times \text{Auflösung}^{\text{Anzahl der Faktoren}} \\ & \times \text{Iterationen} \end{aligned}$$

Schon bei einer mittleren Auflösung (Unterteilung des Design Space) und 6 Faktoren ist der Rechenaufwand mit 67.108.864 Berechnungen sehr zeitaufwändig.

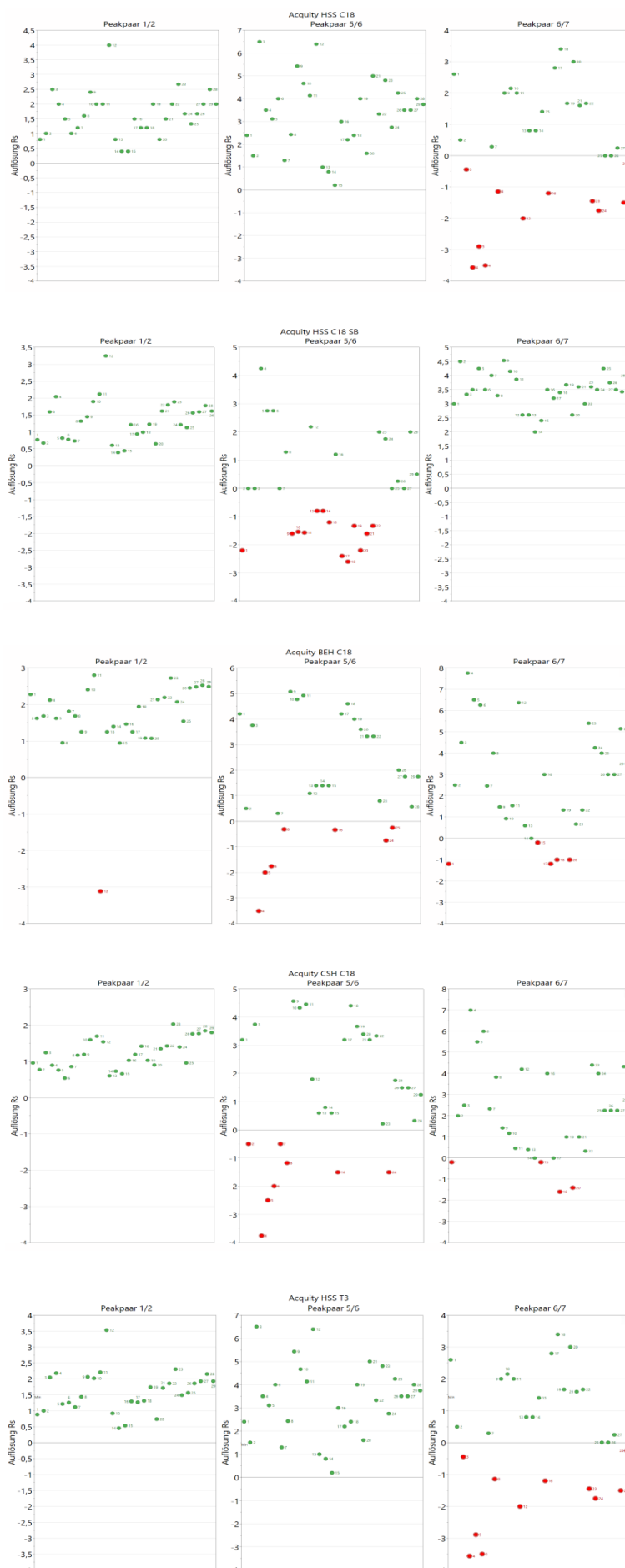


Abb. 2: Rohdaten-Plot der Ergebnisse der DoE-Experimente für die Zielgröße R_s

Wie in der Tabelle 3 ersichtlich, wird für alle robusten Trennoptimierungen unabhängig vom ACQUITY UHPLC® Säulentyp der Forderung nach Einhaltung der gesetzten Spezifikation $-1,5 \geq -R_{s,krit}$ und $R_{s,krit} \geq 1,5$ nachgekommen.

Eine Aussage hinsichtlich der für die Routine-Analytik am besten geeigneten ACQUITY UHPLC® Säule ist nun für die Acquity BHE C18-Säule gegeben. Mit dieser UHPLC-Säule wird für die UHPLC-Trennung von Amlodipin und seinen Verunreinigungen voneinander und der Verunreinigungen untereinander die höchste Auflösung $R_{s,krit} = 2.6$ und die kürzeste Retentionszeit $t_{Rmax.} = 2.99$ min erreicht.

Den größten Einfluss auf die UHPLC-Trennung (Tabelle 4) weisen jeweils die Faktoren tG und T auf, wobei für die Acquity HSS C18-Säule die Gradientenzeit mit 32,6% und für die Acquity HSS T3 C18-Säule die Temperatur mit 27,2% die Trennung am stärksten beeinflussen. Für die BHE C18-Säule ist der Einfluss des Faktors pH mit 12,8% auffallend groß.

Robustheit der UHPLC-Trennung und Toleranzgrenzen der Faktoren

Aussagen, dass neben der Auflösung des kritischen Peakpaares als Gütekriterium einer HPLC-Trennung auch die Robustheit der Trennung zu beachten ist, liegen seit 25 Jahren⁵ vor. Mit dieser Arbeit wird dazu eine Strategie zur Lösung vorgeschlagen.

Im Mittelpunkt des QbD-Ansatzes zur Robustheitsaussage einer UHPLC-Trennung ist die Schätzung eines Design Space. Mit der Design Space Schätzung kann dargestellt werden, wie die Faktor-Einstellungen um einen ausgewählten Arbeitspunkt variiert werden dürfen, ohne die Einhaltung der Zielgrößen-Spezifikation(en) zu gefährden. Die stärkere Betonung von Quality by Design und Design Space erfordern bei der Interpretation der Daten eine Einschätzung des Risikos. Zur Absicherung des geringsten Risikos muss berücksichtigt werden, welche Auswirkungen die überlagerten Unsicherheiten auf die Zielgrößen haben. Dies sind die Unsicherheit in den Faktoren sowie die Unsicherheit aus den Einzelmodellen. Zur Schätzung des Fehlerrisikos wird in Betracht gezogene, wie die Unsicherheiten in den UHPLC-Faktoren (tG, T, pH, %B_s, %B_e, F) und in den Modellen die Zielgrößen beeinflussen.

Eine Risikoabschätzung selbst in den Grenzbereichen ist berechenbar und wird von der verwendeten Software als Fehlerrisiko in % oder DPMO im zugehörigen Plot grafisch als Konturlinien angezeigt⁶.

Tab. 3: Robuster Arbeitspunkt für jeden Acquity Säulen-Typ

Faktoren	ACQUITY UHPLC® Säulen / Robuster Arbeitspunkt (MODDE 11 Pro®)				
	CSH C18	HSS C18	HSS C18 SB	HSS T3	BHE C18
Gradientenzeit [min]	7.4	7.8	7.8	7.8	5
Temperatur [°C]	19	39	39	39	19
Eluent B _s [%]	29.7	30.3	27	29	30.3
Eluent B _e [%]	93.7	89.7	93	92.3	93.7
pH wässriger Eluent A	2.1 ₃	2.2	2.5 ₃	2.2	2.8 ₇
Fluss [ml/min]	0.6 ₈	0.6 ₅	0.6 ₅	0.6 ₅	0.6 ₈
Auflösung R _{s,krit}	1.9	2.3	1.9	2.1	2.6
Retentionszeit t _{Rmax.} [min]	3.8 ₂	4.49	3.84	4.48	2.9 ₉

Tab. 4: Einfluss der Faktoren auf die UHPLC-Trennung in Abhängigkeit vom Acquity Säulen-Typ

Faktoren	ACQUITY UHPLC® Säulen / Faktoreinfluss in %				
	CSH C18	HSS C18	HSS C18 SB	HSS T3	BHE C18
Gradientenzeit [min]	29.6	32.6	27.8	29.8	27.9
Temperatur [°C]	24.9	26.5	21.9	27.2	20.6
Eluent B _s [%]	10.9	10.2	18.1	11.2	7.5
Eluent B _e [%]	13.9	7.4	3.7	7.5	16
pH wässriger Eluent A	5.8	4.8	3.7	5.6	12.8
Fluss [ml/min]	14.9	18.5	24.8	18.7	15.2

Tab. 5: Toleranzgrenzen der Faktoren

Faktoren	ACQUITY UHPLC® Säulen / Faktortoleranzen									
	BHE C18		CSH C18		HSS C18		HSS C18 SB		HSS T3	
Gradientenzeit [min]	4.6	5.4	6.6	7.8	7.4	8.2	7.4	9	7.8	8.2
Temperatur [°C]	17	19	15	19	37	45	37	43	37.0	45.0
Eluent B _s [%]	29.7	31	28.3	31	29	31	25	27.7	27.7	29.7
Eluent B _e [%]	93	94.3	92.3	95	89	90.3	87.7	95	91	93.7
pH wässriger Eluent A	2.8	2.9 ₃	2	2.2 ₇	2.1 ₃	2.4 ₇	2.3 ₃	2.7 ₃	2.1	2.5
Fluss [ml/min]	0.6 ₈	0.6 ₈	0.6 ₂	0.7 ₂	0.6 ₂	0.7 ₅	0.6 ₂	0.75	0.6	0.8
Mittlere Faktortoleranz	0.9		1.8		2.1		3.0		2.2	

Berücksichtigt werden hierbei Modellfehler (X, Y), Reproduzierbarkeit (Pure Error) und Faktorpräzision in X sowie das eingestellte Fehlerrisiko von 1%.

In den Design Space Plots (Abbildung 3) der wichtigsten Faktoren T, %B_s, tG, F wird die Robustheit mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit

von 1% durch die Größe der grünen Flächen grafisch dargestellt und in den Toleranzgrenzen (Tabelle 5), abgeleitet aus den Design Space Hypercube⁷, für jeden Faktor bestätigt.

Der Design Space Hypercube ist der größtmögliche regelmäßige Hyperwürfel im unregelmäßigen Design Space Volumen.

Aus der Abbildung 3 ist ableitbar, dass für die Acquity HSS C18 SB-Säule die größte grüne Fläche mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% im Design Space Plot gefunden wird, d.h. die Trennung ist am robustesten. Am geringsten robust (keine grüne Fläche) ist die UHPLC-Trennung auf der Acquity BHE C18-Phase.

Diese beiden Aussagen werden bestätigt durch die mittleren Toleranzgrenzen der Faktoreinstellung (Tabelle 5) am robusten Arbeitspunkt mit dem größten Wert für die Acquity HSS C18 SB-Säule und den kleinsten Wert für die Acquity BHE C18-Phase.

Werden für die Güte der UHPL-Säulen nur die Auflösung des kritischen Peakpaares $R_{s,krit}$ und die Retentionszeit t_{Rmax} berücksichtigt, so ist für die Routineanalytik die Acquity BEH C18-Säule die geeignetste Trennsäule (beste Auflösung für das kritische Peakpaar, kürzeste Analysenzeit). Werden zusätzlich noch die Robustheit und die Toleranzgrenzen der jeweiligen UHPLC-Trennung zur Beurteilung der Güte der Trennung herangezogen so ist die Acquity HSS C18 SB-Säule die geeignetste Trennsäule für die Routineanalytik.

Nur das simultane Betrachten aller signifikanten Faktoren sowie die Wahl von mehr als nur einer Auflösung als Zielgröße führt unter Berücksichtigung der Robustheit sowie der Toleranzgrenzen der UHPLC-Trennung zu eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Güte der UHPLC-Trennung und ist somit zielführend hinsichtlich der Auswahl der am besten geeigneten ACQUITY UHPLC® Säulen für eine effiziente und robuste Trennung unter Einhaltung der Zielgrößenspezifikationen ($-1,5 \geq -R_{s,krit}$ oder $R_{s,krit} \geq 1,5$).

Zusammenfassung

Es wird eine strukturierte Methodik zur Beurteilung der Güte einer UHPLC-Trennung für das Screenen von verschiedenen Acquity UHPLC® Säulen vorgestellt.

Neben der Auflösung des kritischen Peakpaares wird auch die Robustheit zur Beurteilung der Güte der Trennung herangezogen.

- Nur durch die Angabe des robusten Arbeitspunktes, der Toleranzgrenzen für die Einflussgrößen und der Auflösung für das kritische Peakpaar wird die UHPLC-Trennung hinreichend charakterisiert.

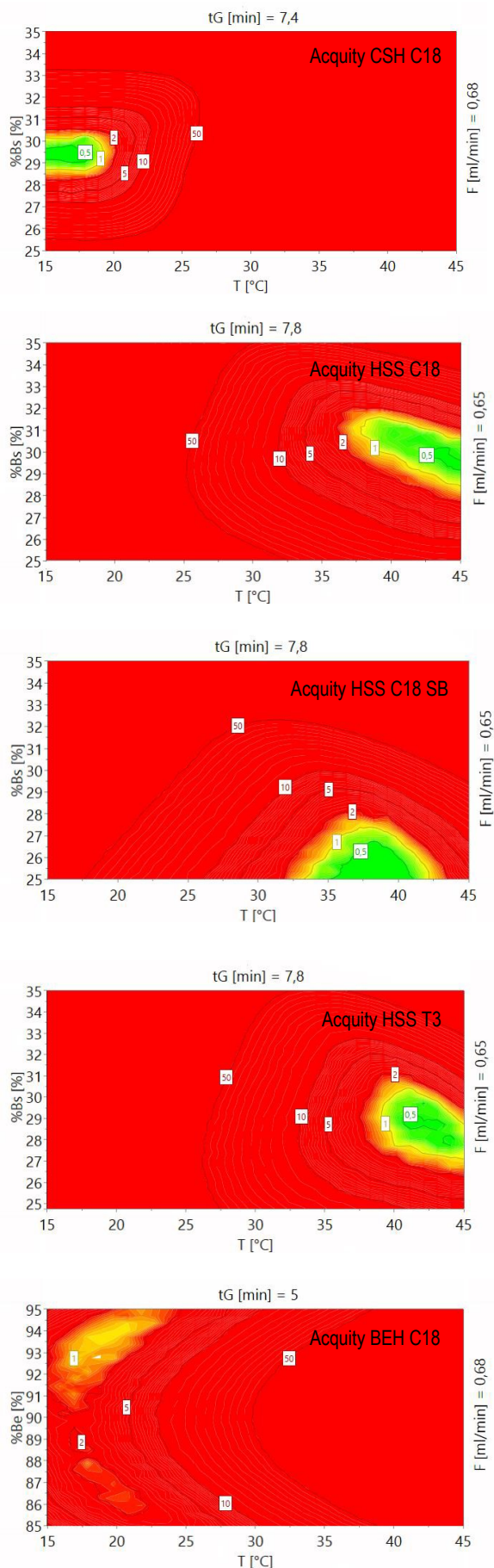


Abb. 3: Robustheit der Trennung: Design Space Plot T – % B_s – t_G – F des robusten Screening der Faktoren t_G, T, F, %B_s, %B_e, pH und der Zielgrößen $R_{s}^{1/2}$, $R_{s}^{5/6}$, $R_{s}^{6/7}$, t_{Rmax} .

- Dann und auch nur dann kann man argumentieren, die für das vorliegende Trennproblem am besten geeignete ACQUITY UHPLC® Säulen gefunden zu haben.

Die durchgängige Anwendung statistischer DoE-Software zum Vergleich von ACQUITY UHPLC® Säulen

- ermöglicht eine äußerst effiziente Arbeitsweise beim Screenen von ACQUITY UHPLC® Säulen,
- erlaubt eine risikobasierte Aussage zur Güte der UHPLC-Trennung

und ist somit zielführend hinsichtlich der Auswahl der am besten geeigneten ACQUITY UHPLC® Säulen für eine effiziente und robuste Trennung unter Einhaltung der Zielgrößenspezifikationen.

Literatur

- DryLab®4, Molnar-Institut für angewandte Chromatographie, Berlin
- MODDE11Pro®, msk data analytics solutions, Umea Sweden
- Versuchsdurchführung und Peakzuordnung und durch R. Kormany Egis Plc., Budapest, Ungarn und I. Molnar, H.-J. Rieger Molnar-Institut, Berlin, Deutschland (2015)
- Bereitstellung der Rohdaten durch I. Molnar Molnar-Institut, Berlin, Deutschland (2015)
- V. R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 7. Auflage 1992, Otto Salle Verlag GmbH
- MODDE11Pro®, msk data analytics solutions, Umea Sweden
- C. Vikstrom, msk data analytics solutions, Umea Sweden
- R. L. Rechtschaffner, Saturated fractions of 2ⁿ and 3ⁿ factorial designs, Technometrics, 9, 1967, 569-575