



Quality by Design und Design Space in der HPLC:

Die Optima einer HPLC-Trennung – Teil 4 Optima vs. Design

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

Die flüssigchromatographische Trenntechnik der (U)HPLC ist weltweit stark verbreitet. Die Entwicklung von effizienten und qualitätsgerechten HPLC-Methoden hat somit einen sehr hohen Stellenwert.

Bei Einsatz von flüssigchromatographischen Modellierungs-Programmen wie z.B. ACD/LC Simulator®, DryLab®, ChromSword®, Osiris® zur (U)HPLC-Methodenentwicklung ist jedoch zu beachten, dass mit der Ermittlung eines lokalen/optimalen Arbeitspunktes möglicherweise am „globalen Optimum“ vorbei optimiert wird, ohne dass eine Diagnostik oder auch nur eine Strategie existiert, um dies zu erkennen und zu verbessern [1].

Für eine effiziente und qualitätsgerechte (U)HPLC-Methodenentwicklung mit mehr als 4 Faktoren, die erforderlich sein können, um alle analytischen Ziele zu erreichen, ist alleinig die Bestimmung des globalen/robusten Arbeitspunktes zielführend.

Ein hochaktuelles Szenario in der Findung des globalen/robusten Arbeitspunktes ist auf die Anwendung der Quality by Design (QbD)-Strategie ausgerichtet.

Eine der wichtigsten Fragen bei der Umsetzung dieser DoE-Methodik ist die Auswahl eines geeigneten Versuchsplanes. Im nachfolgenden Artikel wird versucht, das bestgeeignete experimentellen Designs für die Ermittlung des globalen/robusten Arbeitspunktes einer HPLC-Trennoptimierung zu finden.

Einflussgrößen, Zielgrößen, Versuchsplan

Grundlegendes:

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Einflussgrößen (Faktoren) und Zielgrößen ab. Solche Einflussgrößen 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. Wichtige Zielgrößen sind die Auflösung R_s (Trennung engst benachbarter Peaks im Chromatogramm), die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm t_{Rmax} zur Minimierung der Analysenzeit sowie die Zahl möglicher Peaks ZMP im Chromatogramm.

Die HPLC-Trennungsoptimierung selbst kann und muss mit den Methoden der Versuchsplanung (DoE) durchgeführt werden, weil anders keine zuverlässigen Aussagen über einen größtmöglichen Arbeitsbereich für jede Einflussgröße erbracht werden können. Die Auswahl des geeigneten experimentellen Designs ist eine der wichtigsten Fragen bei der Umsetzung dieser DoE-Methodik.

Die Einheit von Computer-unterstützter (U)HPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE) ist der effektivste Ansatz, um dieses Ziel zu erreichen [2-12]. Die Ausführung der statistischen Datenanalyse sowie der Modellierung erfolgte mit dem DoE-Programm MODDE (Version 12.0.1) [13].

Das für das Auffinden des globalen/robusten Arbeitspunktes einer

HPLC-Trennoptimierung benutzte QbD-Konzept kann nach folgender Systematik, die tatsächlich deutlich mehr chromatographische Erfahrung und Wissen erfordert als etwa Mathematikkenntnisse [14], erfolgen

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

und kann nur erfolgreich wenn gelingen, wenn alle signifikanten Einflussgrößen (Abbildung 1) und alle wichtigen Zielgrößen einer HPLC-Trennung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung gleichzeitig untersucht werden [15].

Den Einflussgrößen wird ein wesentlicher Einfluss auf die Zielgrößen (Qualitätsmerkmale der HPLC-Trennung) unterstellt. Die Einstellungen der Einflussgrößen, die für eine Zielgröße günstig sind, können für andere Zielgrößen ungünstig sein [16]. Deshalb werden diese innerhalb des statistischen Versuchsplanes methodisch untersucht.

Wichtige Zielgrößen einer HPLC-Trennungsoptimierung sind die Auflösung R_s für eine selektive Trennung aller Peaks ($R_s^{1/2}$, $R_s^{2/3}$, $R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{5/6}$, $R_s^{6/7}$, $R_s^{7/8}$) und die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm t_{Rmax} zur Minimierung der Analysenzeit (Abbildung 2).

Die Interpretation der Optimierungsergebnisse wird erleichtert, wenn die Anzahl der Zielgrößen umfassend aber

jedoch möglichst klein ist und jede Zielgröße einen anderen, möglichst grundlegenden Zusammenhang erfasst. 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 [17]. Die Zahl möglicher Peaks ZMP im Chromatogramm ist daher eine weitere Zielgröße in der Optimierung einer HPLC-Trennung. Es ist die Zahl der Peak, die mit einer bestimmten Auflösung, in der Regel $R_s=1.5$, in einem definierten Retentionszeitfenster getrennt werden [18].

Betrachten wir nun sowohl die Zielgrößen als auch ihre Kriterien zur HPLC-Trennungsoptimierung (Abbildung 3).

Zu beachten ist hierbei, dass neben der zur Maximierung ausgewählten Zielgröße $R_s^{6/7}$ die Zielgrößen $R_s^{1/2}$, $R_s^{2/3}$, $R_s^{3/4}$, $R_s^{4/5}$, $R_s^{5/6}$, $R_s^{7/8}$ in die Findung der HPLC-Arbeitspunkte einbezogen werden müssen.

Schon sehr erstaunlich ist es, dass in kommerziell erhältlichen Softwaretools zur flüssigchromatographischen Modellierung der Optimierung einer HPLC-Trennung immer noch die Auflösung des kritischen Peakpaares am lokalen (optimalen) Arbeitspunkt noch alleinig als das Kriterium für die "Güte" einer HPLC-Trennung angesehen wird [19, 20, 21].

Experimentellen Design und Arbeitspunkte [23]

Experimentelles Design:

Zur Abschätzung der Hauptwirkungen einer großen Anzahl von Faktoren werden sehr häufig 2-stufige Designs wie Fraktionierte Faktorielle oder Plackett-Burman oder 3-stufige Definite Screening Designs verwendet. Der Hauptvorteil der Anwendung solcher Designs ist die minimale Anzahl von Experimenten, die erforderlich sind, um die Wirkung mehrerer Faktoren zu berechnen. Wenn weitere Informationen über Wechselwirkungseffekte und quadratische Effekte

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: Mögliche Einflussgrößen und ihr jeweiliger Variationsraum einer HPLC-Trennung in der Pharma-Analytik.

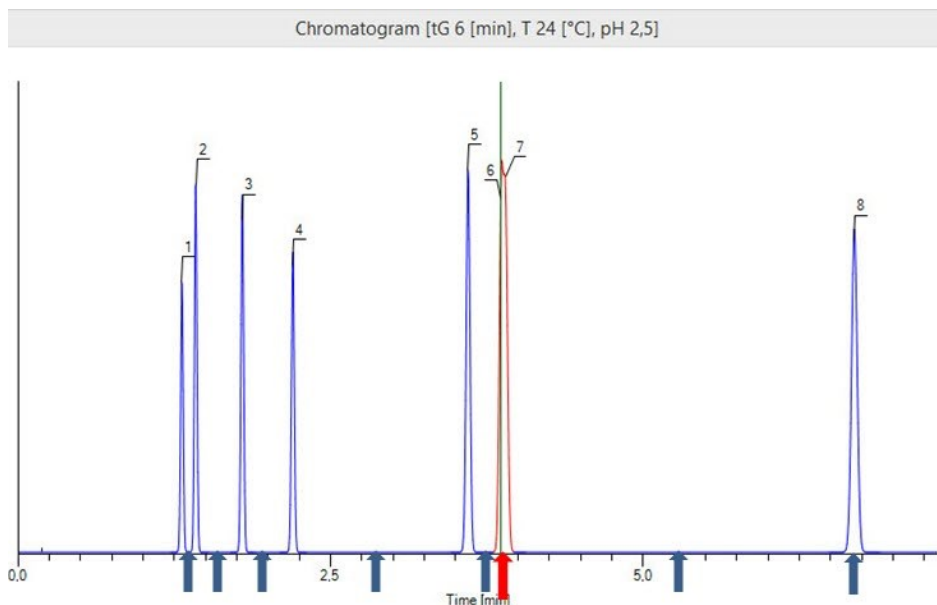


Abb.2: DryLab® – simuliertes Chromatogramm der HPLC-Trennung für den zentralen Arbeitspunkt des Versuchsplanes mit den obig aufgeführten Zielgrößen; Chromatographische Bedingungen: tG(6min), T(24°C), Eluent B(Acetonitril), %Bstart(28%), %Bend(62%), pH(2.5), F(0.5ml/min), Verweilvolumen(1.25ml).

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	5,43	
pp7/8	Predicted			
tRmax	Minimize		2,98	9,00
Peakanzahl	Maximize	20,00	48,00	

Abb.3: Zielgrößen der HPLC-Trennung.

gewünscht werden, sind Hochauflösende oder gar voll Faktorielle oder Rechtschaffner Designs für Interaktionsmodelle, Designs zweiter Ordnung wie Central Composite Designs (CCD, CCF) und Box Behnen Designs (BBD) die am häufigsten verwendeten.

Ableitend aus den Daten [23, 24] einer 3-Faktor-Optimierung tG-T-pH mit der flüssigchromatographischen Modellierungssoftware der DryLab® 4.1.5.2 wurde die Experimente der jeweiligen Versuchspläne unter Berücksichtigung einer 1%-igen Fehleraddition auf den jeweiligen Centerpoint simuliert.

Optimaler Arbeitspunkt:

Mit der Ermittlung eines von mehreren möglichen „optimalen Arbeitspunkten“ in einem 6-dimensionalen Arbeitsraum kommt man dem Ziel der HPLC-Trennungsoptimierung schon recht nahe, erreicht es aber selten. Die dazu notwendige Berechnung der Mehrgrößenoptimierung wird in der Regel auf Basis eines konvexen Optimierungs-Algorithmus gelöst. Da alle relevanten Zielgrößen mit Spezifikation hinterlegt sind, kann nun von jeder möglichen Faktoreinstellung der Abstand zu den Spezifikationsgrenzen (Zieleinstellungen) berechnet werden. Die Einzelabweichungen zu den Zielgrößen werden nun kumuliert und logarithmiert und als „Desirability“ bzw. als $\log(D)$ -Wert ausgegeben und für die Maximierung verwendet. Um der Gefahr von Nebenoptima zu begegnen werden simultan mehrere konvexe Optimierungen von verschiedenen Startpunkten her kommand berechnet. So kann der $\log(D)$ -Wert maximiert werden, der dann den optimalen/lokalen Arbeitspunkt (Abbildung 4) für das jeweilige experimentelle Design (Versuchspläne im Anhang) darstellt.

In dieser Arbeit wurden solche optimalen Arbeitspunkte ausgehend von verschiedenen Designs untersucht um zu sehen, ob große Unterschiede bestehen und auch um zu sehen, ob das eine oder andere Design als deutlich vorteilhaft zu bezeichnen ist. Die Einstellungen der Einflussgrößen für den optimalen Arbeitspunkt der experimentellen Designs unterscheiden sich für die verschiedenen Designs – mit Ausnahme des Plackett Burmann Designs – nur marginal.

Betrachtet man jedoch die Visualisierung der optimalen Arbeitspunkte im jeweiligen 2-dimensionalen Design Space (Abbildung 5) der Einflussgrößen mit dem größten Einfluss auf die HPLC-Trennungsoptimierung, so ist auffallend, dass nur mit den Versuchsplänen Box-Behnken und CCF robuste Arbeitsbereiche (grüne Flächen) mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% erhalten werden.

Experimentelle Design				
Factor	Blackett-Burmann	Rechtschaffner	Box-Behnken	CCF
	Value	Value	Value	Value
tG	3,00	3,00	3,00	3,00
T	36,00	12,05	12,03	12,00
%Bs	33,00	33,00	32,99	33,00
%Be	57,08	67,00	67,00	67,00
pH	2,97	3,00	3,00	3,00
F	0,41	0,39	0,75	0,35

Abb.4: Optimaler Arbeitspunkt der HPLC-Trennungsoptimierung in Abhängigkeit von der Wahl des experimentellen Designs.

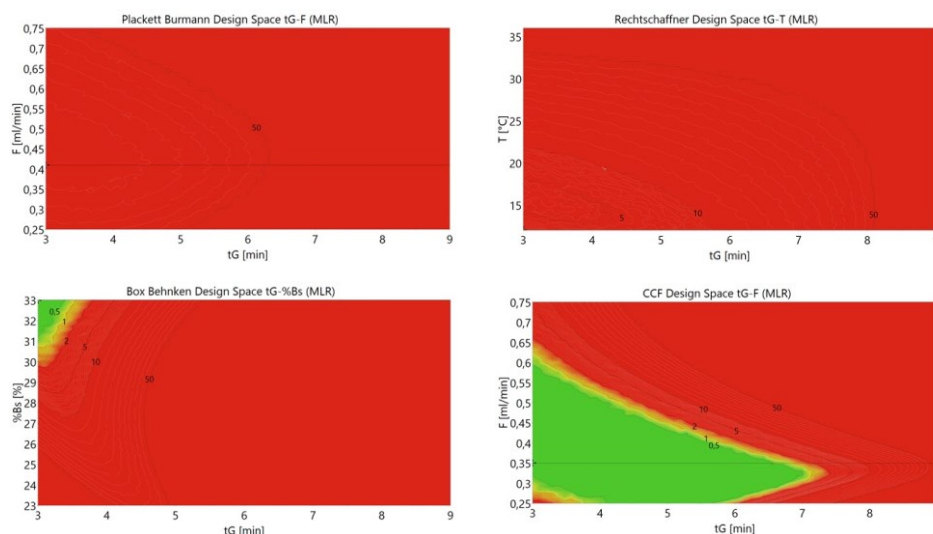


Abb.5: Design Space Plots der optimaler Arbeitspunkte der HPLC-Trennungsoptimierung in Abhängigkeit vom der Wahl des Design.

Robuster Arbeitspunkt:

Ausgehend von dem jeweiligen gefundenen optimalen Arbeitspunkt wird der Arbeitspunkt ermittelt, der in allen möglichen Raumrichtungen relativ zur Standardabweichung der Prognosen die größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen hat, dieser entspricht dem robustesten Arbeitspunkt (Abbildung 5), welcher dann ganz im Sinne des Quality by Design nicht die maximale Desirability, sondern die minimale zukünftig zu erwartende Probability of Failure besitzt.

Verlässliche robuste Arbeitspunkte im multidimensionalen Raum bei Wahl von mehreren Zielgrößen werden i. d. R. nur mit den Versuchsplänen CCF und Box Behnken gefunden. Im Plot der Einflussgrößen tG/F mit dem stärksten Einfluss auf die HPLC-Trennung (Abbildungen 7 und 9) wird der robuste Arbeitspunkt als Pfeilkreuz visualisiert. Das Akzeptanz-

kriterium ist auf 1% eingestellt und niedrigere Werte werden grün und höhere Werte rot gefärbt. Neben der Visualisierung des robusten Arbeitspunktes steht als zusätzliches grafisches Werkzeug der „Design space hypercube“ zur Verfügung [25]. Seine Ausdehnung im Design Space tG/F Plot wird durch den gestrichelten Rahmen dargestellt.

Nur für das CCF-Design wird ein größtmöglicher regulärer Hyperwürfel ausgewiesen. Die multidimensionale Ausdehnung dieses Design Space Hypercube über alle 7 Dimensionen wird durch grünen Balken in der Übersicht zum „Design Space Hypercube“ (Abbildung 7) dargestellt.

Die grünen Balken für alle Einflussgrößen in der CCF Design space hypercube-Tabelle zeigen die Hypercube-Bereiche der Einflussgrößen an, in denen alle Einflussgrößen gleichzeitig und ohne weitere Einschränkungen geändert werden können.

Für das Box Behnken Design (Abbildung 8) wird kein Hyperwürfel um den robusten Arbeitspunkt gefunden und in der Design space hypercube-Tabelle (Abbildung 9) werden für die Einflussgrößen F und %B_e keine Hypercube-Bereiche angezeigt.

Änderungen der Einstellungen der Einflussgrößen F und %B_e sind möglich und führen aber letztlich zu nicht robusten Hypercube-Bereichen (rote Balken) für alle Einflussgrößen (Abbildung 11).

Für der Ermittlung des robusten Arbeitspunktes einer HPLC-Trennoptimierung zur simultanen multidimensionalen Optimierung einer HPLC-Trennung mit mehreren Einflussgrößen (hier 6) und mehrern Zielgrößen (hier 9) ist in der Regel am besten das CCF-Design geeignet, welches auch den größten Aufwand erfordert.

Ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan, bzw. ein Central Composite Design CCD besteht aus einem vollfaktoriellen oder teilfaktoriellen Grundplan und einem mittigen Stern. Der CCF-Versuchsplan hat zwar keine orthogonale Versuchsanordnung, ist aber mit dreistufigem Aufbau ein guter Kompromiss zwischen statistischer Theorie und Praktikabilität. Durch die Sternpunkte können quadratische aber nicht kubische Modellterme berücksichtigt werden. Das F in CCF steht für Face, d.h. die Sternpunkte liegen in den Flächen – deshalb „praktikabel“ – bei CCO (O für Orthogonal) und CCC (C für Circumscribed) liegen die Sternpunkte weiter außen. [26].

Zusammenfassung

Die Quality by Design-Strategie für die Sicherung der Qualität von (U)HPLC-Trennungen verbindet die sehr effektiven Arbeitsweisen von Computer-unterstützter (U)HPLC-Trennoptimierung (CMD) und statistischer Versuchsplanung (DoE). QbD ist der effektivste Ansatz, um das Ziel der simultanen Optimierung einer (U)HPLC-Trennung mit mehreren Einflussgrößen (hier 6) und mehreren Zielgrößen (hier 9) zu erreichen.

Experimentelle Design				
	Blackett-Burmann	Rechtschaffner	Box-Behnken	CCF
Factor			Value	Value
tG			4,60	3,80
T	No robust setpoint was found with the current search criteria.	No robust setpoint was found with the current search criteria.	13,60	15,20
%Bs			32,33	31,67
%Be			66,33	65,67
pH			2,93	2,87
F			0,42	0,35

Abb.6: Robuste Arbeitspunkte der HPLC-Trennungsoptimierung in Abhängigkeit von der Wahl des Design.

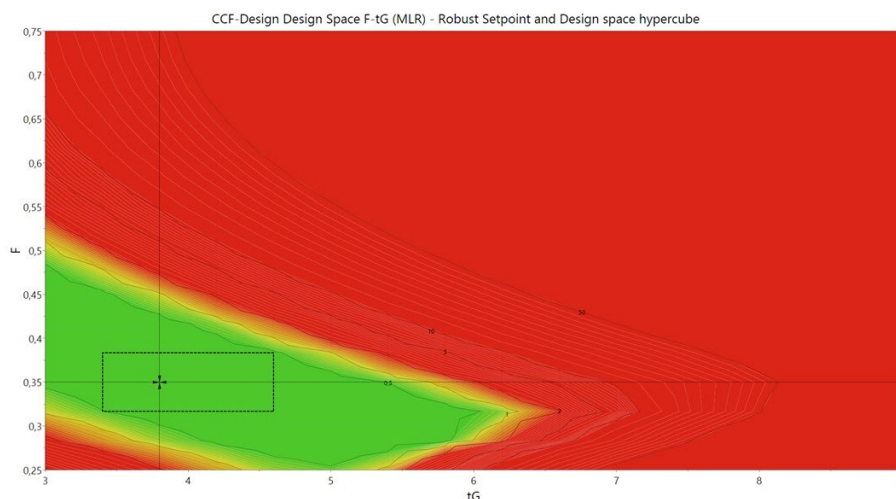


Abb.7: 2D-Design Space Plot des CCF-Design mit robustem Arbeitspunkt und mit dem größtmöglichen regulären Hyperwürfel.

Design space hypercube CCF Design				
Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,8	3,4	4,6	[3,4, 4,6]
pH	2,86667	2,8	3	[2,8, 3]
T	15,2	12	16,8	[12, 16,8]
F	0,35	0,316667	0,383333	[0,316667, 0,383333]
%Bs	31,6667	30,3333	33	[30,3333, 33]
%Be	65,6667	65,6667	67	[65,6667, 67]

Abb.8: Übersicht zum Design space hypercube des CCF Design.

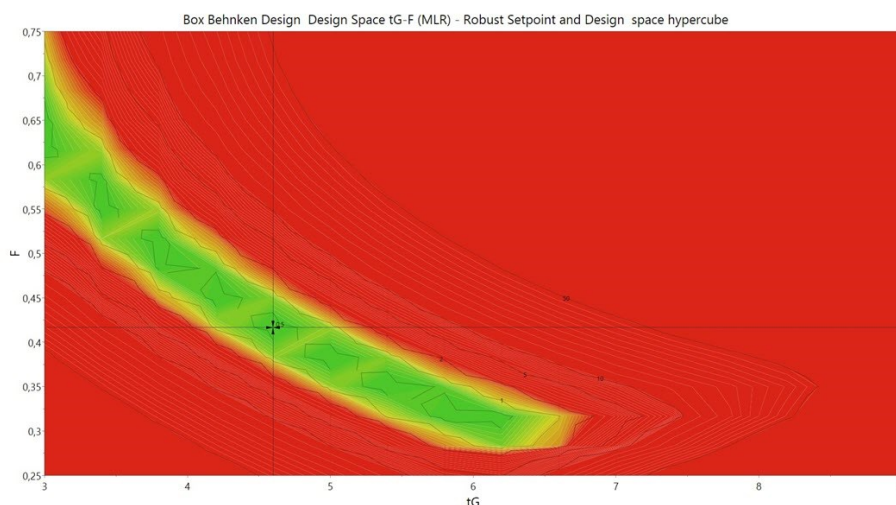


Abb.9: 2D-Design Space Plot des Box Behnken Design mit robustem Arbeitspunkt.

Nur die Findung des globalen/robusten Arbeitspunktes der HPLC-Trennung und des Design Space Hypercube (MODR) erlaubt allein die in allen möglichen Raumrichtungen des multidimensionalen Raums größte Distanz zu den Spezifikationsgrenzen zu ermitteln, das heißt die maximale Variation der Einflussgrößen zu erhalten, ohne die Design Space-Grenzen zu überschreiten.

Zur simultanen multidimensionalen Optimierung einer HPLC-Trennung mit mehreren Einflussgrößen (hier 6) und mehreren Zielgrößen (hier 9) ist in der Regel das CCF-Versuchsplan am besten geeignet und somit ist eine Möglichkeit gegeben, HPLC-Trennungen höchster Qualität und Robustheit zu entwickeln und regulatorische Flexibilität zu erhalten.

Referenzen

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

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

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

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

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

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

[7] H.W. Bilke und A. Orth, *Analytik NEWS* Sept. 2016

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

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

[10] H.W. Bilke, *Analytik News* 2018

[11] H.W. Bilke, *Analytik News*. 2018

[12] H.W. Bilke, *Analytik News* 2019

[13] 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

[14] A. Orth, „Robustheit von Chromatographiemethoden“, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 3/17

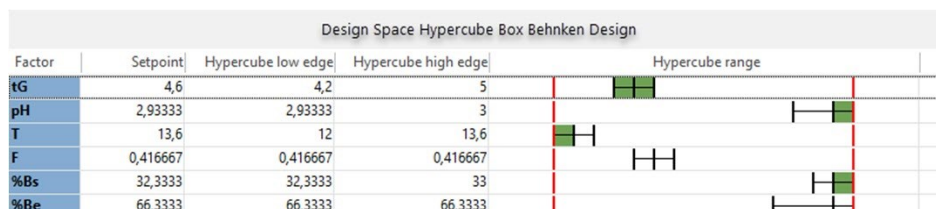


Abb.10: Übersicht zum Design space hypercube des Box Behnken Design.

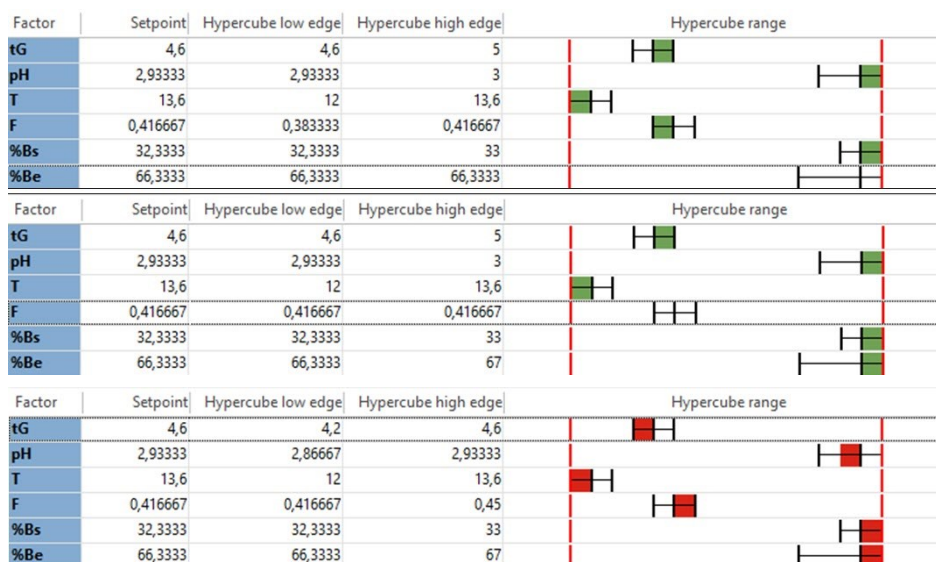


Abb.11: Design space hypercube des Box Behnken Design nach Änderung von F und %Be.

[15] K. Kessler, *DECHEMA-Kurs „Quality by Design (QbD): Wissenschaftliche Grundlagen“*, April 2012, Stuttgart.

[16] *Taschenbuch Versuchsplanung: „Praxisreihe Qualitätswissen“*, Wilhelm Kleppmann, Hanser Verlag, 2008, 323 Seiten.

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

[18] T. Welsch, *GDCH-Vortrag*.

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

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

[21] E.F. Hewitt, P. Lukulay, S.J. Galushko, *J. Chromatogr. A* 1107, 79 (2006).

[22] *MODDE®Pro 12.0.1*, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea 2017

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

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

[25] C. Vikström “*Robust Optimization*”, MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014).

[26] *Taschenbuch der statistischen Qualitäts- und Zuverlässigkeitsmethoden: Die wichtigsten Methoden und Verfahren für die Praxis / Autor und Hrsg.: Curt Ronniger, CRGRAPH-Verlag München*.2003.

[27] A. Orth, S. Soravia: *Design of Experiments*. Ullman’s Encyclopaedia of Industrial Chemistry, Editionen ab Sept. 2001; auch erschienen in *Ullman’s Modeling and Simulation* (2007) Wiley-VCH Verlag.

Anhang Versuchspläne

Exp Name	tG	T	%Bs	%Be	pH	F
N1	9	12	23	67	2	0,75
N2	9	36	23	57	3	0,25
N3	9	36	33	57	2	0,75
N4	3	36	33	67	2	0,25
N5	9	12	33	67	3	0,25
N6	3	36	23	67	3	0,75
N7	3	12	33	57	3	0,75
N8	3	12	23	57	2	0,25
N9	6	24	28	62	2,5	0,5
N10	6	24	28	62	2,5	0,5
N11	6	24	28	62	2,5	0,5
N12	6	24	28	62	2,5	0,5

Factors: 6 Responses: 9 Runs: 12 Objective: Screening Design: Plackett Burman, linear model

Anhang 1: Plackett Burmann-Versuchsplan

Exp Name	tG	T	%Bs	%Be	pH	F
N1	3	12	23	57	2	0,25
N2	3	36	33	67	3	0,75
N3	9	12	33	67	3	0,75
N4	9	36	23	67	3	0,75
N5	9	36	33	57	3	0,75
N6	9	36	33	67	2	0,75
N7	9	36	33	67	3	0,25
N8	9	36	23	57	2	0,25
N9	9	12	33	57	2	0,25
N10	9	12	23	67	2	0,25
N11	9	12	23	57	3	0,25
N12	9	12	23	57	2	0,75
N13	3	36	33	57	2	0,25
N14	3	36	23	67	2	0,25
N15	3	36	23	57	3	0,25
N16	3	36	23	57	2	0,75
N17	3	12	33	67	2	0,25
N18	3	12	33	57	3	0,25
N19	3	12	33	57	2	0,75
N20	3	12	23	67	3	0,25
N21	3	12	23	67	2	0,75
N22	3	12	23	57	3	0,75
N23	9	24	28	62	2,5	0,5
N24	6	36	28	62	2,5	0,5
N25	6	24	33	62	2,5	0,5
N26	6	24	28	67	2,5	0,5
N27	6	24	28	62	3	0,5
N28	6	24	28	62	2,5	0,75
N29	6	24	28	62	2,5	0,5
N30	6	24	28	62	2,5	0,5
N31	6	24	28	62	2,5	0,5
N32	6	24	28	62	2,5	0,5

Factors: 6 Responses: 9 Runs: 32 Objective: Optimization (RSM) Design: Rechtschaffner Res V, quadratic model

Anhang 2: Rechtschaffner Res V-Versuchsplan

Exp Name	tG	T	%Bs	%Be	pH	F
N1	3	12	23	57	2	0,75
N2	9	12	23	57	2	0,25
N3	3	36	23	57	2	0,25
N4	9	36	23	57	2	0,75
N5	3	12	33	57	2	0,25
N6	9	12	33	57	2	0,75
N7	3	36	33	57	2	0,75
N8	9	36	33	57	2	0,25
N9	3	12	23	67	2	0,75
N10	9	12	23	67	2	0,25
N11	3	36	23	67	2	0,25
N12	9	36	23	67	2	0,75
N13	3	12	33	67	2	0,25
N14	9	12	33	67	2	0,75
N15	3	36	33	67	2	0,75
N16	9	36	33	67	2	0,25
N17	3	12	23	57	3	0,25
N18	9	12	23	57	3	0,75
N19	3	36	23	57	3	0,75
N20	9	36	23	57	3	0,25
N21	3	12	33	57	3	0,75
N22	9	12	33	57	3	0,25
N23	3	36	33	57	3	0,25
N24	9	36	33	57	3	0,75
N25	3	12	23	67	3	0,25
N26	9	12	23	67	3	0,75
N27	3	36	23	67	3	0,75
N28	9	36	23	67	3	0,25
N29	3	12	33	67	3	0,75
N30	9	12	33	67	3	0,25
N31	3	36	33	67	3	0,25
N32	9	36	33	67	3	0,75
N33	3	24	28	62	2,5	0,5
N34	9	24	28	62	2,5	0,5
N35	6	12	28	62	2,5	0,5
N36	6	36	28	62	2,5	0,5
N37	6	24	23	62	2,5	0,5
N38	6	24	33	62	2,5	0,5
N39	6	24	28	57	2,5	0,5
N40	6	24	28	67	2,5	0,5
N41	6	24	28	62	2	0,5
N42	6	24	28	62	3	0,5
N43	6	24	28	62	2,5	0,25
N44	6	24	28	62	2,5	0,75
N45	6	24	28	62	2,5	0,5
N46	6	24	28	62	2,5	0,5
N47	6	24	28	62	2,5	0,5
N48	6	24	28	62	2,5	0,5

Factors: 6 Responses: 9 Runs: 48 Objective: Optimization (RSM) Design: CCF, quadratic model

Anhang 3: CCF-Versuchsplan

Exp Name	tG	T	%Bs	%Be	pH	F
N1	3	12	28	57	2,5	0,5
N2	9	12	28	57	2,5	0,5
N3	3	36	28	57	2,5	0,5
N4	9	36	28	57	2,5	0,5
N5	3	12	28	67	2,5	0,5
N6	9	12	28	67	2,5	0,5
N7	3	36	28	67	2,5	0,5
N8	9	36	28	67	2,5	0,5
N9	6	12	23	62	2	0,5
N10	6	36	23	62	2	0,5
N11	6	12	33	62	2	0,5
N12	6	36	33	62	2	0,5
N13	6	12	23	62	3	0,5
N14	6	36	23	62	3	0,5
N15	6	12	33	62	3	0,5
N16	6	36	33	62	3	0,5
N17	6	24	23	57	2,5	0,25
N18	6	24	33	57	2,5	0,25
N19	6	24	23	67	2,5	0,25
N20	6	24	33	67	2,5	0,25
N21	6	24	23	57	2,5	0,75
N22	6	24	33	57	2,5	0,75
N23	6	24	23	67	2,5	0,75
N24	6	24	33	67	2,5	0,75
N25	3	24	28	57	2	0,5
N26	9	24	28	57	2	0,5
N27	3	24	28	67	2	0,5
N28	9	24	28	67	2	0,5
N29	3	24	28	57	3	0,5
N30	9	24	28	57	3	0,5
N31	3	24	28	67	3	0,5
N32	9	24	28	67	3	0,5
N33	6	12	28	62	2	0,25
N34	6	36	28	62	2	0,25
N35	6	12	28	62	3	0,25
N36	6	36	28	62	3	0,25
N37	6	12	28	62	2	0,75
N38	6	36	28	62	2	0,75
N39	6	12	28	62	3	0,75
N40	6	36	28	62	3	0,75
N41	3	24	23	62	2,5	0,25
N42	9	24	23	62	2,5	0,25
N43	3	24	33	62	2,5	0,25
N44	9	24	33	62	2,5	0,25
N45	3	24	23	62	2,5	0,75
N46	9	24	23	62	2,5	0,75
N47	3	24	33	62	2,5	0,75
N48	9	24	33	62	2,5	0,75
N49	6	24	28	62	2,5	0,5
N50	6	24	28	62	2,5	0,5
N51	6	24	28	62	2,5	0,5

Factors: 6 Responses: 9 Runs: 51 Objective: Optimization (RSM) Design: Box Behnken, quadratic mode

Anhang 4: Box Behnken-Versuchsplan