



## Übersichtartikel

# Analytical Quality by Design – Optimierung einer HPLC-Trennung:

Dr. Hans-Werner Bilke

LC-Pharm-HPLC-Expert Service

### Einleitung

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 kommerziell erhältlichen flüssigchromatographischen Modellierungs-Programmen zur (U)HPLC-Methodenentwicklung ist jedoch zu beachten, dass mit der Ermittlung lokaler/optimaler Arbeitspunkte möglicherweise am „globalen, robusten Optimum“ vorbei optimiert wird, ohne dass eine Diagnostik oder eine Strategie existiert, um dies zu erkennen und zu verbessern [1].

Für eine effiziente und qualitätsgerechte Optimierung einer (U)HPLC-Trennung mit mehreren Einflussgrößen und mehreren Zielgrößen, die erforderlich sein können, um alle analytischen Ziele zu erreichen, ist allerdings alleinig die Ermittlung des tatsächlichen Optimums, d.h. des globalen/robusten Arbeitspunktes der (U)HPLC-Trennung zielführend.

Ein hochaktuelles Szenario in der Findung dieses Arbeitspunktes ist auf die Anwendung der Analytical Quality by Design (AQbD)-Strategie ausgerichtet [2-17]. Bei der Umsetzung dieser DoE-Methodik sind die Auswahl geeigneter Einflussgrößen und Zielgrößen sowie die Findung eines geeigneten Versuchsplanes (Design) entscheidend.

### Einflussgrößen, Zielgrößen, Versuchsplan

Die Qualität eines flüssigchromatographischen Trennprozesses hängt von einer Vielzahl von Einflussgrößen (Einflussfaktoren) und Zielgrößen ab. Solche Einflussgrößen sind u.a. 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  $R_s$ , die Retentionszeit des letzten Peaks im Chromatogramm  $t_{R,max}$  sowie die Zahl möglicher Peaks ZMP im Chromatogramm.

Die HPLC-Trennungsoptimierung selbst kann und muss mit den Methoden der Versuchsplanung (DoE) durchgeführt werden, da nur so zuverlässige Aussagen zum robusten Arbeitspunkt und den größtmöglichen Arbeitsbereich für jede Einflussgröße (MODR) erbracht werden können.

Probleme sind hierbei zu erwarten, wenn nicht alle für das Ergebnis wesentlichen Faktoren in relevanten Bereichen variiert werden und die Ergebnisse einzelner Versuche widersprüchlich sind. Wesentliche Effekte können sich überlagern und damit nicht unterscheidbar sein bzw.

sich abschwächen/aufheben oder verstärken (Antagonismen, Confounding, Synergien) [18].

Das für das Auffinden des tatsächlichen Optimums (globaler/robuster Arbeitspunkt) einer HPLC-Trennoptimierung benutzte QbD-Konzept beinhaltet

- Definition der Einflussgrößen (unabhängige Variablen),
- Definition der Zielgrößen (Zielvariablen, abhängige Variablen, Endpunkt),
- Wahl des Modells (Polynommodelle, wie z.B. lineare, interaktionelle und quadratische Modelle),
- Wahl experimentelle Design (Versuchsplan),
- Durchführung der Versuche,
- Analyse der Rohdaten,
- Modellierung
- Finden der Arbeitspunkte
- Ermittlung realistischer Spezifikationsgrenzen

und kann nur erfolgreich gelingen, wenn alle signifikanten Einflussgrößen (Abbildung 1) und alle wichtigen Zielgrößen (Abbildung 2) einer HPLC-Trennung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung gleichzeitig untersucht werden [19]. 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

Name	Abbr.	Units	Type	Settings
Gradientenzeit	tG	min	Quantitative	3 to 9
Säulentemperatur	T	°C	Quantitative	12 to 36
Startkonzentration organischer Eluent B	%Bs	%	Quantitative	23 to 33
Endkonzentration organischer Eluent B	%Be	%	Quantitative	57 to 67
pH wässriger Eluent A	pH	unit	Quantitative	2 to 3
Flussrate	F	ml/min	Quantitative	0,25 to 0,75

Abb.1: Einflussgrößen und ihre Variierung in der HPLC Pharma-Analytik.

sein [21]. Deshalb werden diese innerhalb des statistischen Versuchsplanes methodisch untersucht.

Die Ausführung der statistischen Datenanalyse sowie der Modellierung erfolgte mit dem DoE-Programm MODDE® (Version 12.0.1) [20].

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

Wichtige Zielgrößen der HPLC-Trennung sind die Auflösung  $R_s$  für eine selektive Trennung aller Peaks ( $R_{s1/2}$ ,  $R_{s2/3}$ ,  $R_{s3/4}$ ,  $R_{s4/5}$ ,  $R_{s5/6}$ ,  $R_{s6/7}$ ,  $R_{s7/8}$ ), die Retentionszeit des letzten Peaks  $t_{Rmax}$  zur Minimierung der Analysenzeit sowie die Anzahl der Peaks ZPM im Chromatogramm (Abbildung 2). Die Anzahl der Peaks im Chromatogramm ist die Zahl der Peak, die mit einer bestimmten Auflösung, in der Regel  $R_s=1.5$ , in einem definierten Retentionszeitfenster getrennt werden [22] und ist umso größer, je höher die Trennstufenzahl der Säule ist und je länger man gewillt ist, auf den letzten Peak zu warten [23].

Bei der Wahl der Zielgrößen (Abbildung 3) ist zu beachten, dass neben der Maximierung der Auflösung des kritischen Peakpaares (kritischen Zielgröße  $R_{s6/7}$ ) auch die Auflösung aller anderen 6 Peakpaare ( $pp^{1/2}$ ,  $pp^{2/3}$ ,  $pp^{3/4}$ ,  $pp^{4/5}$ ,  $pp^{5/6}$ ,  $pp^{7/8}$ ) in die HPLC-Trennungsoptimierung einbezogen werden müssen. Ferner ist die Zielgröße  $t_{Rmax}$  zu minimieren sowie die Zielgröße ZPM zu prognostizieren.

## Experimentelle Designs und Arbeitspunkte

### Experimentelle Designs [20]:

Um bei einer Multieinflussgrößen/Multizielgrößen-Optimierung vollständige quadratische Modelle schätzen zu können, wird ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan vom Typ CCF (Abbildung 4 im Anhang) verwendet [16].

Dieser besteht aus einem vollfaktoriellen Grundplan und einem mittigen Stern

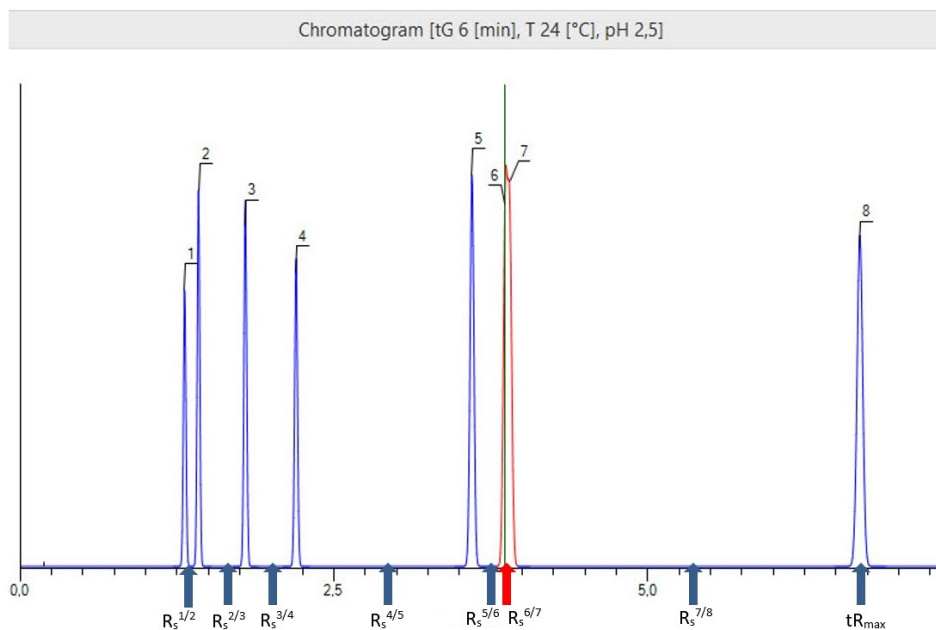


Abb.2: DryLab® – simuliertes Chromatogramm der HPLC-Trennung für den zentralen Arbeitspunkt des Versuchsplanes mit den Zielgrößen  $R_s$ ,  $t_{Rmax}$  und ZPM; Chromatographische Bedingungen: tG(6min), T(24°C), Eluent B (Acetonitril), %Bstart (28%), %Bend (62%), pH (2.5), F (0.5ml/min), Verweilvolumen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

(Abbildung 5). Das F steht für Face, die Stern-Punkte liegen in den Flächen. Durch den Stern können sowohl quadratische als auch kubische Modelle erstellt werden [24].

Der CCF-Versuchsplan ist eine Kombination eines mehrfaktoriellen Versuchsplanes (mehrere Einflussgrößen, eine Zielgröße) mit einem multivariaten Versuchsplan (mehrere Einflussgrößen, mehrere Zielgrößen) und erlaubt neben der Analyse der zugehörigen Haupteffekte die Analyse der wechselseitigen Interaktionen [24]. Das CCF-Design (Face Centered) ist bei Wahl von wenigen Faktoren (in der Regel nicht mehr als 5 oder 6) geeignet, aufwändigere quadratische Modelle zu entwickeln.

Eine 1%-igen Fehleraddition auf den Centerpoint wurde in den Experimenten des CCF-Versuchsplanes berücksichtigt.

### Optimaler Arbeitspunkt [25]:

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

Response	Criterion	Min	Target	Max
$R_{s1/2}$	Predicted			
$R_{s2/3}$	Predicted			
$R_{s3/4}$	Predicted			
$R_{s4/5}$	Predicted			
$R_{s5/6}$	Predicted			
$R_{s6/7}$	Maximize	1, 50	5, 43	
$R_{s7/8}$	Predicted			
$t_{Rmax}$	Minimize		2, 78	9, 00
ZPM	Predicted			

Abb.3: Zielgrößen, Zielgrößenkriterien, Zielgrößenpezifikationen der HPLC-Trennungsoptimierung.

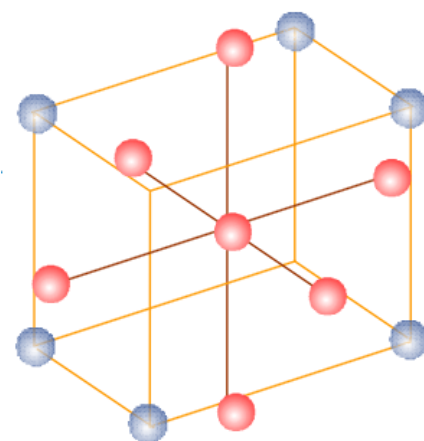


Abb. 5: Anordnung für einen CCF-Plan mit 3 Faktoren [24].

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 kumuliert, logarithmiert und als Wünschbarkeit (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 ausgehend berechnet. So kann der log(D)-Wert maximiert werden, der dann den optimalen/lokalen Arbeitspunkt für das CCF-Design darstellt.

In der Abbildung 6 ist das Ergebnis der Multieinflussgrößen/Multizielgrößen-Optimierung aufgezeigt.

Die gesetzten Spezifikationen (siehe Abbildung 3) werden für alle Zielgrößen eingehalten.

Die größte Wirkung auf die HPLC-Trennung weisen mit 67% die Einflussgrößen F (35.6%) und tG (31.4%) auf. Den geringsten Einfluss auf die HPLC-Trennung übt %B<sub>s</sub> aus, gefolgt vom pH. Nahezu gleicher Wirkung zeigen die Einflussgrößen %B<sub>e</sub> (12.6%) und T (12.5%).

Betrachtet man die Visualisierung der Einstellungen für den optimalen Arbeitspunkt zunächst im 2D-Plot der jeweiligen Einflussgrößen (Abbildung 6a), so sieht man in allen Plots genügend große Arbeitsbereiche (grüne Flächen).

Werden nicht nur 2 sondern mehrere Einflussgrößen wie z.B. F-tG-%B<sub>e</sub>-T gleichzeitig im 4-dimensionalen Design Space Plot betrachtet (Abbildung 7) ist auffallend, dass die Arbeitsbereiche (eingekreiste, gelbliche Fläche) drastisch eingeschränkt werden.

**Robuster Arbeitspunkt und Design Space Hypercube :**

Ausgehend vom 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 8), welcher dann ganz im Sinne des Quality by Design nicht die maximale Wünschbarkeit, sondern die minimale zukünftig zu erwartende Ausfallwahrscheinlichkeit besitzt [25].

Response	Criterion	Value	log(D)	Prob. of failure
pp1/2	Predicted	2,06		
pp2/3	Predicted	5,87		
pp3/4	Predicted	6,14		
pp4/5	Predicted	21,43		
pp5/6	Predicted	3,44		
pp6/7	Maximize	4,68	-1,46	0%
pp7/8	Predicted	29,41		
tRmax	Minimize	4,75	-1,00	0%
Number of peaks	Predicted	30,86		

Factor	Role	Value	Factor contribution
tG	Free	3,00	31,44
T	Free	12,00	12,47
%B <sub>s</sub>	Free	33,00	2,67
%B <sub>e</sub>	Free	66,95	12,64
pH	Free	3,00	5,23
F	Free	0,35	35,55

Abb.6 Einstellungen des optimalen Arbeitspunkt der HPLC-Trennungsoptimierung.

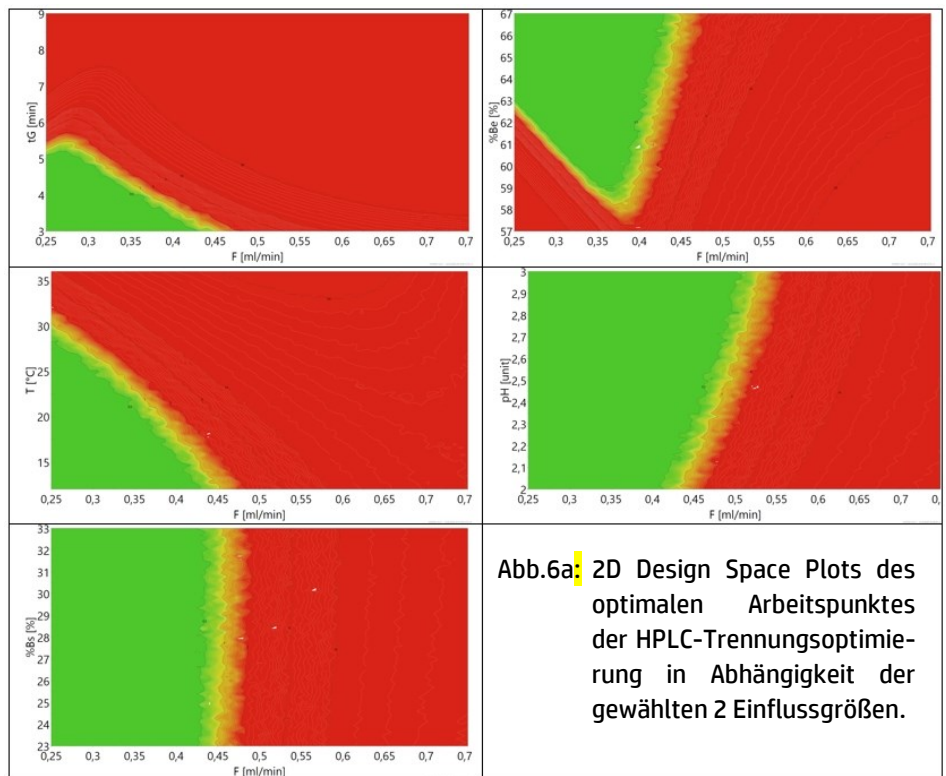


Abb.6a: 2D Design Space Plots des optimalen Arbeitspunktes der HPLC-Trennungsoptimierung in Abhängigkeit der gewählten 2 Einflussgrößen.

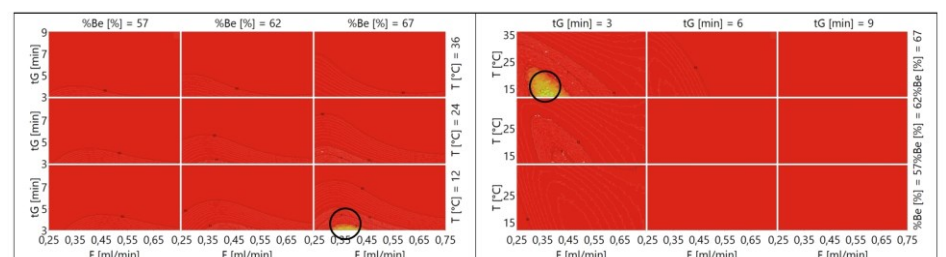


Abb.7: 4D Design Space Plots des optimalen Arbeitspunktes der HPLC-Trennungsoptimierung in Abhängigkeit von 4 Einflussgrößen bei konstanten Einflussgrößen pH und %B<sub>s</sub>.

**Hinweis:** Mit einem CCF-Versuchsplan wird im Gegensatz zur Anwendung von kommerziell erhältlicher HPLC-Modellierungs-Software zur HPLC-Trennungsoptimierung ein globaler robuster Arbeitspunkt im multidimensionalen Raum gefunden.

Im F/tG-Plot der Einflussgrößen mit dem stärksten Einfluss auf die HPLC-Trennung wird der robuste Arbeitspunkt als Pfeilkreuz visualisiert. Das Akzeptanzkriterium ist auf 1% eingestellt; 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 [26]. Seine Ausdehnung im Design Space F/tG-Plot wird durch den gestrichelten Rahmen dargestellt.

Die multidimensionale Ausdehnung dieses Design Space Hypercube über alle 7 Dimensionen wird durch grüne Balken in der Übersicht zum Design Space Hypercube (Abbildung 9) dargestellt.

Die grünen Balken für alle Einflussgrößen in der Tabelle des Design Space Hypercube zeigen die Hypercube-Bereiche der Einflussgrößen an, in denen alle Einflussgrößen gleichzeitig und ohne weitere Einschränkungen geändert (Abbildung 10) werden können.

Zur Ermittlung des robusten Arbeitspunktes einer HPLC-Trennoptimierung zur simultanen multi-dimensionalen Optimierung einer HPLC-Trennung mit mehreren Einflussgrößen (hier 6) und mehreren Zielgrößen (hier 9) ist in der Regel am besten das CCF-Design geeignet. Der CCF-Versuchsplan ist mit seinem 3-stufigen Aufbau ein guter Kompromiss zwischen statistischer Theorie und Praktikabilität [25].

Response	Criterion	Value	log(D)	Prob. of failure
pp1/2	Predicted	2,18		
pp2/3	Predicted	6,73		
pp3/4	Predicted	6,92		
pp4/5	Predicted	22,73		
pp5/6	Predicted	3,77		
pp6/7	Maximize	3,55	-0,64	0%
pp7/8	Predicted	30,80		
tRmax	Minimize	5,64	-0,68	0%
Number of peaks	Predicted	31,79		

Factor	Role	Value	Factor contribution
tG	Free	3,80	30,35
T	Free	15,20	11,66
%Bs	Free	31,67	2,81
%Be	Free	65,67	13,10
pH	Free	2,87	4,49
F	Free	0,35	37,58

Abb.8: Einstellungen des globalen, robusten Arbeitspunkt der HPLC-Trennungsoptimierung.

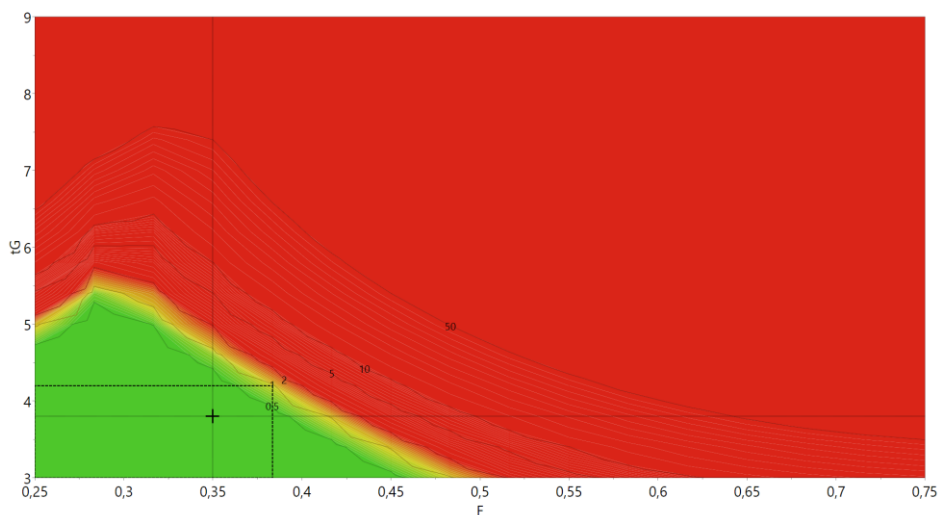


Abb.8a: 2D-Design Space Plot tG/F des CCF-Design mit robustem Arbeitspunkt und mit größtmöglichem regulären Hyperwürfel (Hypercube).

**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).

Die Umsetzung der AQBd-Strategie im flüssigchromatographischen Labor

- ergibt hohe Zeiteinsparung und drastische Kostenminimierung bei gleichzeitiger Qualitätssicherung im flüssigchromatographischen Labor,

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,8	3	4,2	[3, 4,2]
T	15,2	12	16,8	[12, 16,8]
%Bs	31,6667	30,3333	33	[30,3333, 33]
%Be	65,6667	65	67	[65, 67]
pH	2,86667	2,73333	3	[2,73333, 3]
F	0,35	0,25	0,383333	[0,25, 0,383333]

Abb.9: Übersicht zum Design Space Hypercube des CCF Design.

Factor	Setpoint	Hypercube low edge	Hypercube high edge	Hypercube range
tG	3,8	3	3,8	[3, 3,8]
pH	2,86667	2,53333	2,86667	[2,53333, 2,86667]
T	15,2	12	20	[12, 20]
F	0,35	0,283333	0,35	[0,283333, 0,35]
%Bs	31,6667	29	33	[29, 33]
%Be	65,6667	63	67	[63, 67]

Abb.10: Design Space Hypercube nach gleichzeitiger Änderung aller Einflussgrößen.

- ermöglicht eine schnelle, robuste Methodenentwicklung oder Methodenüberarbeitung
- mittels einer Multi-Einflussgrößen-/ Multi-Zielgrößen-Modellierung,
- ermöglicht eine realistische Schätzung eines multidimensionalen Design Space der (U)HPLC-Methode,
- führt zu zuverlässigen Aussagen über die größte mögliche zulässige „Operable Design Region“ (MODR),
- hilft bei der Findung des globalen Arbeitspunktes statt lokaler Arbeitspunkte der (U)HPLC-Trennung,
- ist alleinig zielführend in der Ermittlung realistischer Spezifikationsgrenzen (Proven Acceptable Range PAR) der (U)HPLC-Trennung,
- bietet ein erhebliches Potential zur Nachhaltigkeit im HPLC-Analysenlabor (Green Chromatography),
- ermöglicht regulatorische Flexibilität hinsichtlich Forderungen der Zulassungsbehörden.

## Referenzen

- [1] M. Pfeffer, 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 Nov. 2017*
- [11] H.W. Bilke, *Analytik NEWS Jan. 2018*
- [12] H.W. Bilke, *Analytik NEWS März 2018*
- [13] H.W. Bilke, *Analytik NEWS Feb. 2019*
- [14] H.W. Bilke, *Analytik NEWS April 2019*
- [15] H.W. Bilke, *Analytik NEWS Juni 2019*
- [16] H.W. Bilke, *Analytik NEWS Nov. 2019*
- [17] H.W. Bilke, *Analytik NEWS Dez. 2019*
- [18] M. Pauly, *Versuchsplanung*. Universität Ulm, Sommersemester 2015.
- [19] K. Kessler, *DECHEMA-Kurs „Quality by Design (QbD): Wissenschaftliche Grundlagen“*, April 2012, Stuttgart.
- [20] 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
- [21] *Taschenbuch Versuchsplanung: „Praxisreihe Qualitätswissen“*, Wilhelm Kleppmann, Hanser Verlag, 2008, 323 Seiten.
- [22] T. Welsch, *GDCH-Vortrag*.
- [23] V.R. Meyer, *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern*. Hüthig Verlag Heidelberg 1996, 24-27.
- [24] C. Ronniger, *Taschenbuch der statistischen Qualitäts- und Zuverlässigkeitsmethoden*, München 2013
- [25] A. Orth, *Umesoft GmbH Eschborn, Deutschland (2019)*, persönliche Mitteilung.
- [26] C. Vikström “Robust Optimization”, MKS Umetrics AB, IFPAC presentation (2014).

## Anhang

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

Abb.4: CCF-Design.