

# Workflow

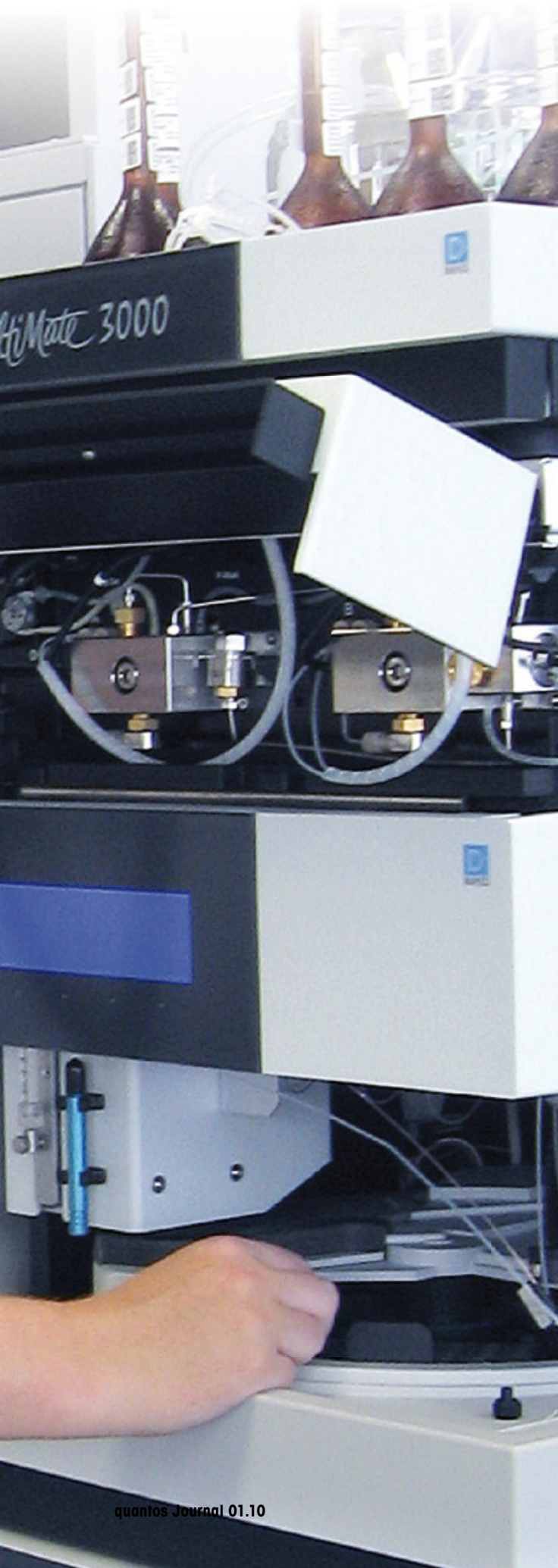
## ICH-Linearitätsstudien anhand von Automated Standard Preparation und UHPLC

Fraser McLeod, Dionex Softron GmbH



**Fraser McLeod** studierte Chemie an der Universität Strathclyde in Glasgow, Schottland, und schloss mit dem Master of Science in analytischer Chemie ab. Im Anschluss arbeitete er 10 Jahre in der pharmazeutischen Industrie, vor allem in der analytischen Entwicklung, bevor er in der Betreuung von Softwarelösungen für die pharmazeutische Industrie tätig wurde. Fraser McLeod ist ein gefragter Experte im Bereich Softwareanwendungen zur Verbesserung der Produktivität im Labor sowie für Systemrichtlinien, z.B. der Validierung nach 21 CFR Part 11 der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA). Nach seinem Wechsel zu Dionex war er dort zunächst für die Installation der Chromeleon-Software in Großunternehmen verantwortlich und wurde bald Product Manager für Chromeleon. Seit 2 Jahren ist Fraser McLeod Leiter des Product Managements der Life Sciences Business Unit und verantwortlich für die Einführung der UltiMate 3000 RSLC- und RSLCnano-Systeme, der Chromeleon-Software und der neuen UHPLC+-Systeme.





Gemäß der „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH) müssen als Teil einer Methodvalidierungsstudie analytische Methoden auf ihre Linearität getestet werden. Der gängige Prozess hierfür sieht vor, für fünf verschiedene Kalibrierungsstufen Standards vorzubereiten und jeden einzelnen Standard dreimal zu injizieren. Der Konzentrationsbereich liegt dabei in der Regel zwischen 70 % bis 130 % der Nennkonzentration.

Die Statistik empfiehlt, jede Kalibrierungsstufe einzeln vorzubereiten. Dadurch werden potenzielle Fehlerquellen, wie z. B. fehlerhaftes Einwiegen eines der Standards, randomisiert. In der Regel wird hiervon jedoch abgesehen, da es sich um einen zeitaufwändigen Prozess handelt. Stattdessen wird oft eine Stammlösung vorbereitet und diese anschließend auf die fünf unterschiedlichen Konzentrationsstufen verdünnt. Diese Methode hat den Vorteil der Schnelligkeit, sie hat jedoch auch einen gravierenden Nachteil: Jeder Fehler bei der Herstellung der Stammlösung überträgt sich auf die verdünnten Standards.

Viele chromatografische Methoden bestimmen mehr als einen Analyten, und jeder Analyt muss auf Linearität geprüft werden. Hierdurch werden der Zeitauf-

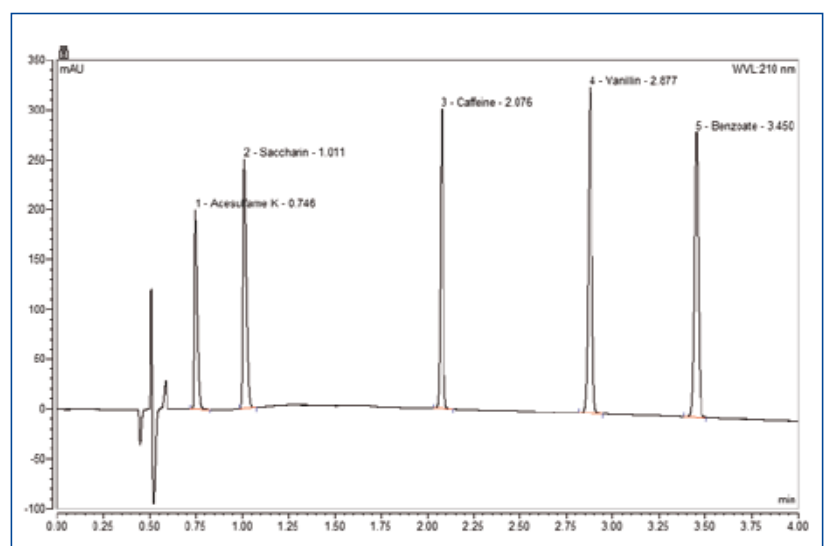


Abb. 1 Analyse von 5 Softdrink-Analyten in weniger als 5 Minuten

**Tab. 1** Konzentrationen der vom Quantos QB1-L-System vorbereiteten Softdrink-Analyte

Analyt	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Acesulfam-K	7,390	9,730	9,930	11,450	13,650
Saccharin	2,695	3,480	3,890	4,305	5,085
Koffein	2,800	3,700	3,995	4,355	5,220
Vanillin	6,285	8,110	8,995	9,860	11,655
Benzoot	14,050	18,100	19,965	21,910	25,855

**Tab. 2** Korrelationskoeffizienten aller Analyten

Analyt	R <sup>2</sup>
Acesulfam-K	0,99973
Saccharin	0,99989
Koffein	0,99939
Vanillin	0,99971
Benzoot	0,99964

wand (und die potenzielle Fehlerquote) der manuellen Vorbereitung und die Fehlerwahrscheinlichkeit bei Herstellung und Verdünnung der Stammlösung potenziert. Alle diese Strategien bringen also Nachteile mit sich.

Die Automatisierung der Standardvorbereitung mit dem neuen Quantos QB1-L-System von Mettler-Toledo stellt daher eine geeignetere Methode dar. Das System ermöglicht es, Analyten automatisch in HPLC-Probenflaschen oder Messkolben zu dosieren. Zur Herstellung einer gravimetrischen Lösung kann zudem die entsprechende Menge an Lösungsmittel eingewogen werden. Dieses Verfahren bietet für Linearitätsstudien viele Vorteile, der größte besteht jedoch darin, dass die Zeit kein kritischer Faktor mehr ist und ein statistisch korrekter Ansatz implementiert werden kann, bei dem jede Standardkonzentration einzeln angesetzt wird.

Im hier beispielhaft dargestellten Experiment wurde die Linearität von fünf typischen Analyten in Erfrischungsgetränken getestet. Es handelte sich dabei um Acesulfam-K, Saccharin, Koffein, Vanillin und Benzoesäure. Das Quantos-System wog automatisch die korrekte Menge jedes Analyten und anschließend

die korrekte Menge des Lösungsmittels (90:10 Wasser:Methanol) ein, um die in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen zu erreichen. Die zur Vorbereitung dieser Standards benötigte Zeit betrug lediglich 50 Minuten. Im direkten Vergleich zur manuellen Vorbereitung (ca. 3 Stunden für die Stammlösungs-Strategie oder ca. 4 Stunden für die manuelle Verdünnung in Einzelschritten) handelt es sich hierbei also um eine deutliche Zeitersparnis.

Nach der Vorbereitung der Standardlösungen folgt die eigentliche Analyse. Bei Verwendung der klassischen HPLC-Technik kann dieser Vorgang ca. 30 Minuten pro Analysenlauf in Anspruch nehmen. Die Gesamtzeit für das Linearitätsexperiment summierte sich demnach auf 7,5 Stunden (5 Kalibrierungsstufen x 3 Injektionen pro Stufe x 30 Minuten). Diese Analysenzeit kann mit UHPLC deutlich reduziert werden. Abbildung 1 zeigt die chromatografische Analyse aller fünf Analyten. Alle Substanzen wurden in weniger als 4 Minuten getrennt, die Gesamtzeitanalysenzeit beträgt lediglich 5 Minuten, so dass alle Injektionen in nur 1,25 Stunden abgearbeitet werden können.

Diese Analyse wurde mit dem Dionex UltiMate® 3000 Basic Automated-System durchgeführt – einem vollständig UHPLC-kompatiblen System der Einsteigerklasse. Das System unterstützt Drücke bis zu 620 bar bei Flussraten bis 10 mL/min und ist ideal für schnelle Routineanalysen. Eine weitere Beschleunigung des Analysenvorgangs kann mit dem UltiMate 3000 Rapid Separation LC-System erreicht werden, welches Drücke bis 1000 bar unterstützt.

Sobald alle Daten erfasst wurden, müssen die Ergebnisse berechnet werden. Die ICH fordert einen Bericht mit den folgenden Werten: Korrelationskoeffizient, y-Achsenabschnitt, Steigung der Regressionsgeraden und Summe der Fehlerquadrate. Außerdem muss

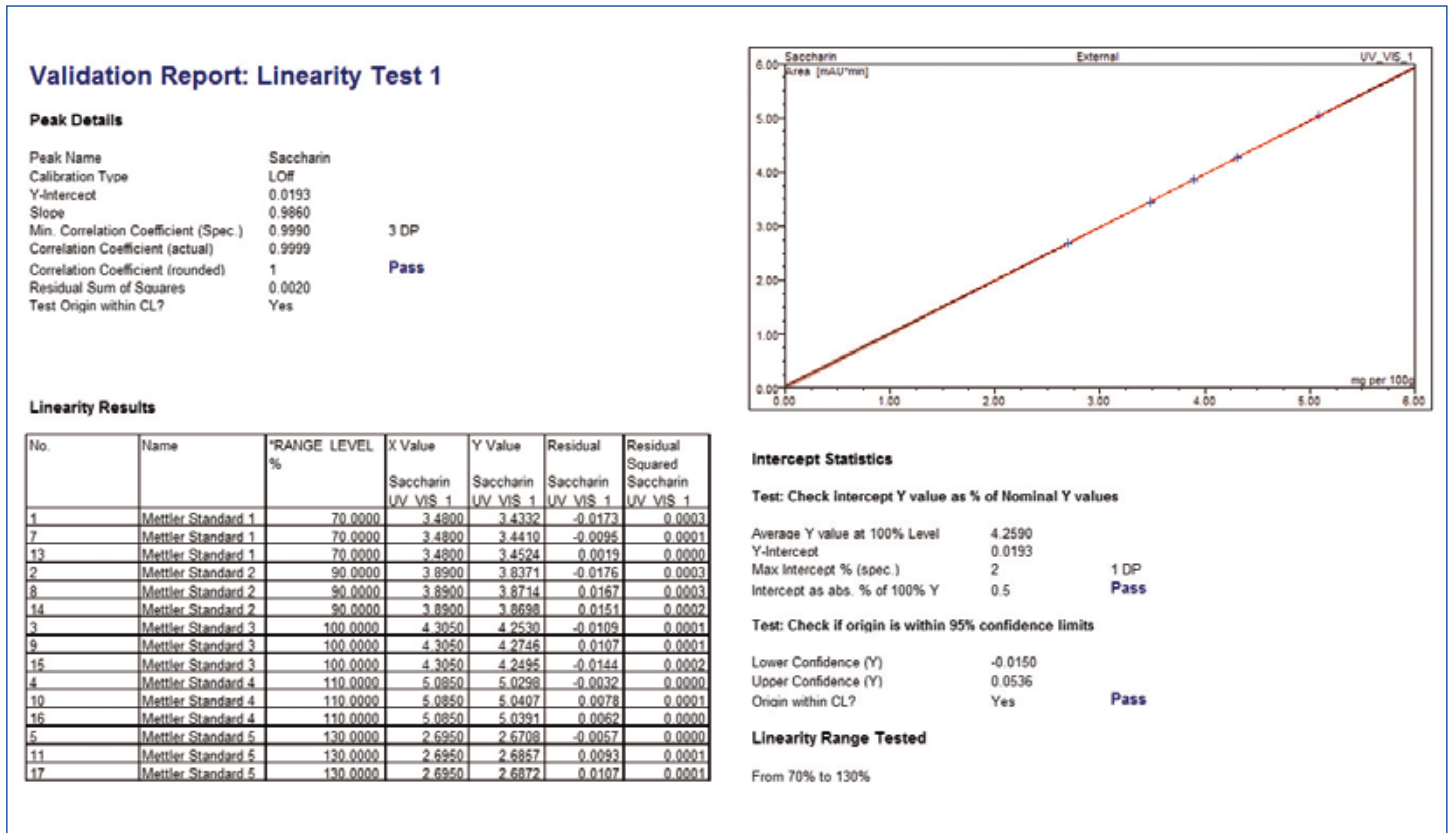


Abb. 2 Linearitätsbericht für Saccharin

geprüft werden, ob der Korrelationskoeffizient innerhalb der erwarteten Grenzwerte der Methode liegt (i. d. R.  $\geq 0,999$ ). Diese Berechnungen können sehr zeitaufwändig sein. Einige Labors verwenden Excel-Arbeitsblätter zur Beschleunigung des Prozesses, jedoch kann auch diese Methode sehr viel Zeit kosten, da die Benutzer die Werte in der Regel manuell eintragen und diese anschließend von einer weiteren Person geprüft werden müssen. Für die Beispielanalyse würde die Verwendung einer Tabellenkalkulation und die damit verbundene anschließende Prüfung ca. 2 Stunden in Anspruch nehmen. Mit dem Chromeleon® Chromatografie-Datensystem von Dionex kann diese Aufgabe vollständig automatisiert werden und die Ergebnisse für alle Analyten werden im Handumdrehen berechnet. Der Benutzer muss lediglich die Peaks benennen und die jeweiligen Konzentrationen eingeben – ein Vorgang, der nur 5 Minuten in Anspruch nimmt. Abbildung 2 zeigt den automatisch erstellten Bericht für den Analyten „Saccharin“.

Durch die kombinierte Verwendung der beiden Systeme konnten im Rahmen dieses Linearitätsexperiments hervorragende Ergebnisse erzielt werden (Tab. 2). Der  $R^2$ -Wert liegt für alle Analyten über 0,999.

Tab. 3 Benötigte Zeit zur Durchführung eines Linearitätsexperiments unter Verwendung des alten Prozesses und des neuen, automatisierten Prozesses

Schritt	Benötigte Zeit (alter Prozess)	Benötigte Zeit (neuer Prozess)
Probenvorbereitung	180 Minuten	50 Minuten
Analyse	450 Minuten	75 Minuten
Resultate	120 Minuten	5 Minuten
<b>Gesamt</b>	<b>750 Minuten</b>	<b>130 Minuten</b>

Darüber hinaus bietet die Automatisierung des Linearitäts-Workflows durch die Kombination des Quantos QB1-L-Systems mit dem UltiMate 3000-System und der Chromeleon-Software die Möglichkeit, deutliche Produktivitätsvorteile zu erreichen (Tab. 3).

■ [fraser.mcleod@dionex.com](mailto:fraser.mcleod@dionex.com)