

Udvikling af omvendt fase HPLC-metode - sammenligning af manuel og automatiseret optimering

Traditionel metodeudvikling er ofte tidskrævende. Ved udvikling af en omvendt fase HPLC-metode til melperon er traditionel metodeudvikling sammenlignet med udvikling vha. modelleringsværktøjerne MODDE og DryLab

Af David Elsner, Lars Lauritzen, Jette Tjørnelund, H. Lundbeck A/S

Melperon fremstilles hos H. Lundbeck A/S i to formuleringer, som tablet og injektionsvæske i ampul. Handelsnavnet er Buronil, og rettighederne er for nylig solgt til Ovation Pharmaceuticals, Inc.

Buronil findes som 10, 25 og 50 mg tablet og 25 mg/mL injektionsvæske konserveret med benzylalkohol, og det er et højdosis antipsykotikum.

Hos Lundbeck skulle udvikles en ny omvendt fase HPLC-metode til melperon-assay og urenhedsanalyse (strukturer i figur 1).

Der blev opstillet en række ønsker til den nye analysemetode (tabel 1). Ud over disse konkrete krav var det målet at sammenligne de to kommercielt tilgængelige modelleringsværktøjer DryLab og MODDE med den mere

Ønsker til metode
Isokratisk metode
$R_s = 2,0$
Analysetid < 10 min.
En metode til assay og urenheder til bade tabletter og injektionsvæske
Hurtig prøveopbehandling, der er kompatibel med robot

Tabel 1. Ønsker til ny omvendt fase HPLC-analysemetode.

traditionelle manuelle fremgangsmåde, hvor en parameter testes ad gangen. Værktøjernes brugbarhed til optimering af analysemetoden skulle endvidere vurderes.

Screening

Som udgangspunkt for screeningen af metoden blev de to kolonne-typer XTerra C-8 og Symmetry C-18 valgt. Begge kolonner har lav silanolaktivitet, hvilket gør toppene smallere (reducerer tailing).

Korte kolonner (hhv. 100x3 mm og 75x4,6 mm) med lille partikelstørrelse (3,5 µm) blev valgt for at minimere analysen-tiden og opnå god separation. I figur 2 ses k' (faktaboks 1) for stofferne analyseret på Symmetry C-18 ved forskellige acetonitril-koncentrationer (ACN) med isokratisk eluering. Det fremgår, at melperon er væsentligt mere påvirkelig af ændringer i ACN-koncentrationen.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\alpha - 1)}{4\alpha} \frac{k'}{(1 + k')}$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t}{w_b} \right)^2$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

, hvor R_s er resolutionen mellem toppene. N er kolonne effektiviteten. w_b er topbredden i halv tophøjde. t er tid for elueret top og t_0 er tid for dødvolume i systemet. α er selektiviteten. k' er kapacitetsfaktoren.

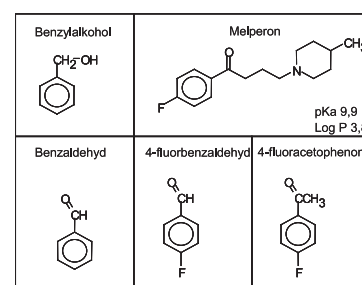
Faktaboks 1. Definition af parametre.

Forløbene af kurverne ligner det for XTerra C-8 (ikke vist), men der er dårligere separation af benzaldehydene og mindre plads til melperon mellem benzylalkohol og benzaldehyd. Methanol blev også afprøvet som organisk fase, men gav generelt dårligere resolution end med ACN (ikke vist).

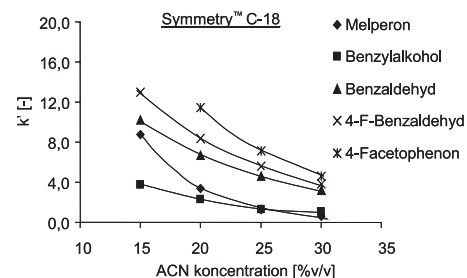
Som udgangspunkt for optimeringen blev Symmetry C-18 valgt som stationær fase, og acetonitril (15–20%v/v) i fosfatbuffer blev valgt som mobilfase med isokratisk eluering.

Optimering - manuel

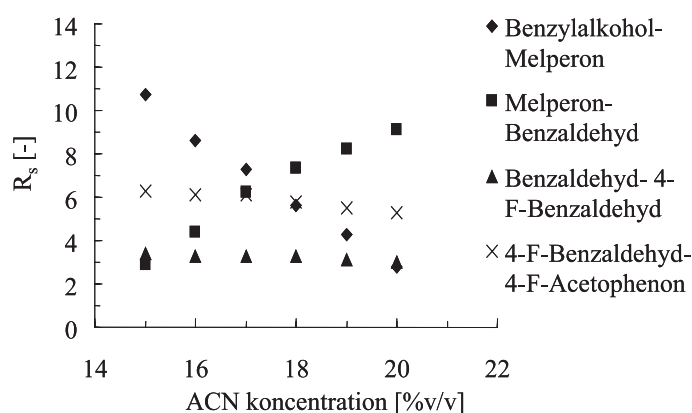
Under den manuelle del af optimeringen blev parametrene i tabel 2 testet i de angivne intervaller. I figur 3 ses igen, hvor påvirkelig melperon er af koncentrationen af den organiske fase, da resolutionen (R_s) mellem melperon og dets to nabotoppe hurtigt ændres. Resolutionen mellem de andre toppe ændres væsentligt mindre og udviser en faldende trend med stigende ACN-koncentration. Det ses, at imellem 15 og 20%v/v ACN er benzaldehydene de kritiske toppe med minimal resolution på 3–3,5. Det er også det mest robuste interval, da den minimale R_s er næsten konstant og det ønskede mål på 2,0 er opfyldt. Retentionstiden for



Figur 1. Strukturformler af melperon (intern standard) og dets UV-detekterbare nedbrydningsprodukter 4-fluorbenzaldehyd og 4-fluoracetophenon samt konserveringsmidlet benzylalkohol til injektionsvæsken og dets nedbrydningsprodukt benzaldehyd.



Figur 2. Screening af k' for stofferne i tabel 1 ved forskellige acetonitril-koncentrationer for Symmetry C-18 (k1) (75x4,6 mm, 3,5 µm) ved 45°C, inj. vol. 5 µl, 1,5 ml/min, 20 mM fosfatbuffer pH 3,0. Alle k' er bestemt med isokratisk eluering.



Figur 3. Resolution R_s som funktion af acetonitrilkoncentrationen (%v/v) mellem de angivne toppe. Symmetry C-18 kolonne (k1), 45°C, 1,5 ml/min inj. vol. 5 µl og 20 mM phosphatbuffer pH 3,0. Alle R_s er bestemt med isokratisk eluering.

den sidst eluerede top er under 10 min, hvilket også opfylder det ønskede. De fastlagte parameterværdier fra den manuelle optimering er vist i tabel 2.

Optimering - automatiseret

Design of Experiments

MODDE blev afprøvet til screening og optimering af parametrene. I tabel 3 ses 7 parametre, og de intervaller der er benyttet til »design of experiments« i MODDE, hvor en simpel lineær model med 8 forsøg ved de angivne betingelser blev valgt.

Optimeringsparameter	Interval	Endeligt fastlagte værdier	Enhed
Acetonitril-koncentration	15 – 20	16	[%v/v]
Temperatur	25 – 50	45	[°C]
Phosphatbuffer-koncentration	2,5 – 50	25	[mM]
pH	2,8 – 3,2	3,0	[-]
Flow	1,0 – 1,5	1,5	[ml/min]
Kolonne	ny1 – ny2	-	[-]

Tabel 2. Optimeringsparametrene og intervaller testet under den manuelle optimering og de endeligt fastlagte parameterværdier.

Screening af de enkelte parametres signifikans for resolutionen mellem toppene er vist i figur 4, side 66, hvor de skalerede og centrerede koefficienter for de enkelte parametre er vist for hver resolution. Det ses bl.a. i figur 4,1, at for benzylalkohol- og melperontoppene har acetonitrilkoncentrationen, temperaturen samt antal injektioner (kolonne k1 har været udsat for mange injektioner) negativ effekt på resolutionen. Bufferkoncentrationen, pH og antal injektioner (k2 har været udsat for færre injektioner) har positiv effekt på resolutionen. De resterende parametres injektionsvolumen og dummyanalyse (blank, normal) har ingen effekt på resolutionen. Det var som forventet, da der ellers ville være noget grundlæggende galt med metoden eller udstyret. Antal injektioner, kolonnen har

BROEN BOSS Quick Connect

- det fleksible laboratorie virkeliggjort

NY PRODUKT SERIE



Med os på "BIOTECH FORUM + SCANLAB" messen i Bella Center 5-7 oktober 2004 på stand C4-034

BROEN

for the Professional user

BROEN LAB GROUP producerer og markedsfører en række kvalitetsprodukter til fremføring og aftapning af medier, sammen med produkter som giver sikkerhed på arbejdspladsen. Produkterne henvender sig primært til den professionelle bruger i alle typer af laboratorier, uddannelsessektoren, sundhedssektoren og i industrien generelt.

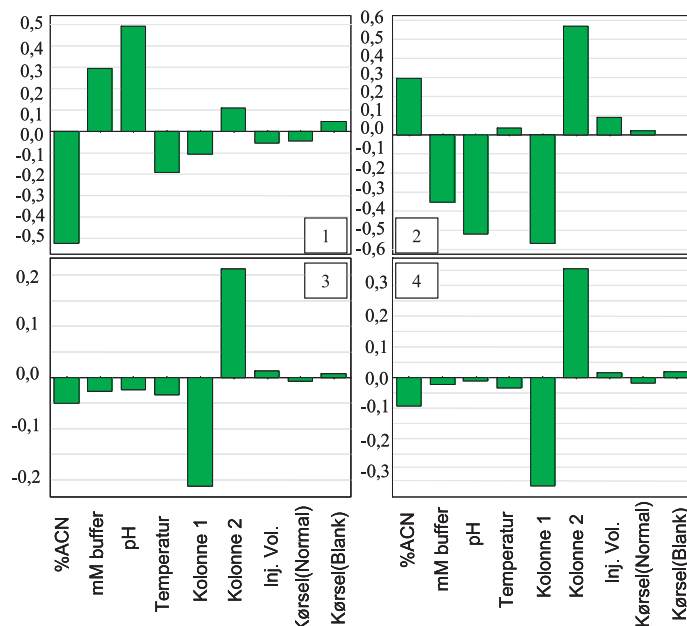
BROEN LAB GROUP · Skovvej 30 · DK-5610 Assens · Tlf. 64 71 20 95 · Fax 64 71 24 76 · E-mail: lab@broen.com

www.broen.com

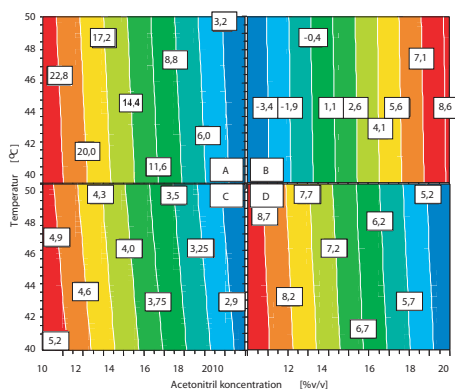


Forsøgsnr. Variabel	1	2	3	4	5	6	7	8
Org. Fase [%]	16,20	16,20	16,20	16,20	15,80	15,80	15,80	15,80
Buffer [mM]	55,00	55,00	45,00	45,00	55,00	55,00	45,00	45,00
pH [-]	3,20	2,80	3,20	2,80	3,20	2,80	3,20	2,80
Temp. [°C]	47,00	47,00	43,00	43,00	43,00	43,00	47,00	47,00
Kolonne [-]	ny 1	ny 2	ny 1	ny 2	ny 2	ny 1	ny 2	ny 1
Injk. Vol. [µl]	7,00	3,00	3,00	7,00	7,00	3,00	3,00	7,00
Kørsel [-]	Normal	Blank	Blank	Normal	Blank	Normal	Normal	Blank

Tabel 3. Parametre og intervaller til »design of experiments« i MODDE. Den lineære model Fractionel Factoriel Resolution III er brugt (8 eksperimenter).



Figur 4. MODDE koefficientplot for R_s mellem 1: benzylalkohol – melperon, 2: melperon – benzaldehyd, 3: benzaldehyd – 4-fluorbenzaldehyd samt 4: 4-fluorbenzaldehyd – 4-fluoracetophenon.

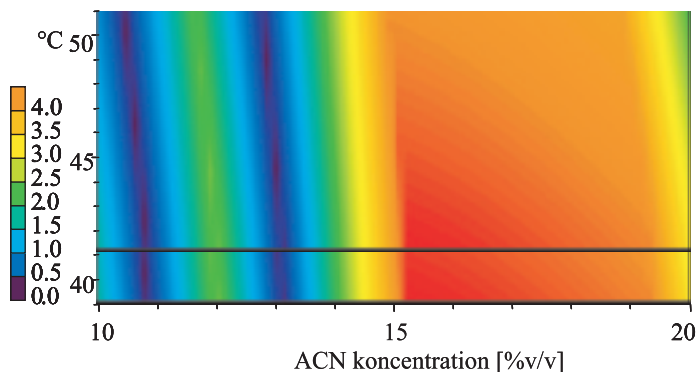


Figur 5. MODDE ekstrapolerede konturplots af resolutionen R_s som funktion af acetonitrilkoncentrationen (%v/v) og temperaturen (°C) ud fra forsøgsopstillingen i tabel 3.

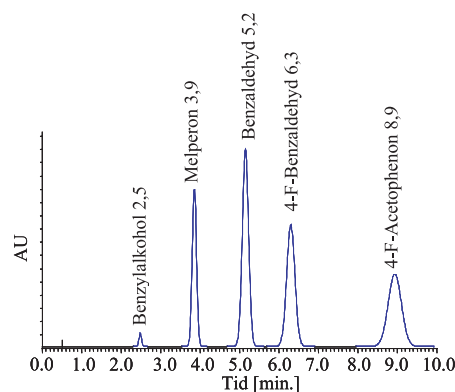
A: R_s mellem benzylalkohol og melperon. B: R_s mellem melperon og benzaldehyd. C: R_s mellem benzaldehyd og 4-fluorbenzaldehyd. D: R_s mellem 4-fluorbenzaldehyd og 4-fluoracetophenon.

været udsat for, har stor indflydelse på resolutionen mellem flere af toppene. Forringelsen i resolution skyldes primært, at toppenes facon ændres og bliver bredere. Melperons afhængighed af bufferkoncentrationen blev undersøgt nærmere manuelt. Melperon skifter retentionsid fra 1,8 til 4,4 min, når koncentrationen ændres fra 2,5 til 50 mM, hvor de andre toppe ligger konstant (ikke vist).

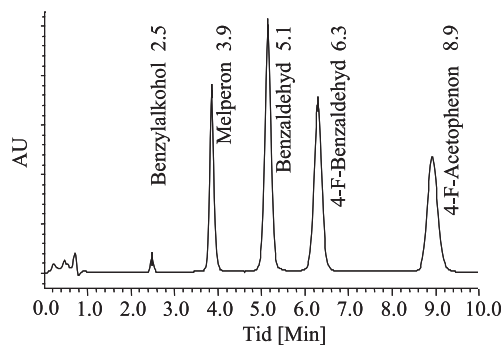
I figur 5 ses fire ekstrapolerede konturplots af MODDE, hvor resolutionen mellem toppene er vist som funktion af ACN-koncen-



Figur 6. DryLab 3D minimum resolutionsplot. Den minimale R_s er plottet (farver) som funktion af acetonitrilkoncentrationen (%v/v) og temperaturen (°C) på Symmetry C-18 (k2). Beregnet ud fra 4 kalibreringseksperimenter ved 14–18%v/v ACN og 40–50°C, hvor 1,5 ml/min, 25 mM fosfatbuffer pH 3,0 er benyttet.



Figur 7. DryLab simuleret kromatogram. 16%v/v ACN, 25 mM fosfatbuffer pH 3,0, 45°C, 1,5 ml/min.



Figur 8. Kromatogram for endelig HPLC-metode, Symmetry C-18, 16%v/v ACN, 25 mM fosfatbuffer pH 3,0, 45°C, 1,5 ml/min, inj. vol. 5 µl, 254 nm.

trationen og temperaturen. Det ses, at det optimale findes som et kompromis omkring 16–17%v/v ACN som under den manuelle optimering. R_s er svagt faldende ved stigende temperatur. Den af MODDE beregnede optimale kombination af værdierne af parametrene er 16%v/v ACN, 26 mM fosfatbuffer, pH 3,04 og en temperatur på 46°C. De ligger tæt på de endelige fastlagte værdier vist i figur 8.

Modellering

Det andet benyttede modelleringsværktøj var DryLab og i figur 6 ses en simulering i DryLab baseret på fire kalibreringsforsøg, af hvordan resolutionen afhænger af ACN-koncentrationen og temperaturen - der er maksimal resolution mellem 15,0 og 19,5%v/v

Optimerings metode	Styrke	Svaghed	Antal forsøg
Manuel	Viser det reelle	Overser covarians Mange forsøg	> 4-8 forsøg pr. parameter
MODDE®	Hurtig screening af mange parametre. Ser covarians	Mindre præcis end manuel og DryLab	8 forsøg til 7 parametre (kan varieres)
DryLab®	Hurtigere end manuel Mere præcis end MODDE	Max. to parametre ad gangen Flere forsøg end MODDE	4 forsøg pr. 2 parametre

Tabel 4. Styrker og svagheder ved hver optimeringsmetode og antal forsøg pr. parameter.

Navn	Retention	USP
	Tid [min]	Resolution [-]
Benzylalkohol	2.48	
Melperon	3.85	8.4
Benzaldehyd	5.15	5.5
4-fluorbenzaldehyd	6.29	3.7
4-fluoracetophenon	8.92	6.6

Tabel 5. Data til kromatogram af endelig metode vist i figur 8.

ACN (rødt område). Intervallet er det mest robuste, da R_s kun ændres marginalt ved ændringer i ACN-koncentrationen, som også blev vist manuelt. Ved stigende temperatur er resolutionen svagt faldende (som vist med MODDE). I figur 7 er toppene i kromatogrammet simuleret i DryLab ved 16%v/v ACN og 45°C. Der ses en god overensstemmelse mellem det simulerede og det reelle ved sammenligning med kromatogrammet i figur 8.

Konklusion

Kromatogram og parameterverdier er vist i figur 8, og de resulterende resolutioner er vist i tabel 5. Det ses, at metoden opfylder de opstillede ønsker i tabel 1. De vigtigste punkter er, at metoden er isokratisk, analysetiden er på under 10 min, og den minimale resolution er på 3,7. Det er et robust område, hvor små ændringer ikke påvirker R_s væsentligt. Derudover kan metoden bruges til assay og urenheder/nedbrydning ud fra den samme prøveopbehandling og til både tabletter og ampuller.

Det blev vist, at MODDE og DryLab er gode og brugbare modelleringsværktøjer, der kan reducere antallet af nødvendige analyser under optimeringen betragteligt (tabel 4). MODDE viste sig specielt egnet til screening af mange parametre på få eksperimenter. MODDE viste de samme trends under optimeringen som DryLab og den manuelle fremgangsmåde, men da det var en simpel model, var den mere upræcis. DryLab krævede flere analyser, men gav også en mere præcis kromatografisk simulering ved sammenligning med den manuelle fremgangsmåde.

Samlet set er MODDE i vores tilfælde mest velegnet til at give et hurtigt overblik, hvor DryLab er mere egnet til den mere forfinede optimering, hvor de sidste detaljer fastlægges.

E-mail-adresse
David Elsner: dae@lundbeck.com

Er det sådan du ville beskrive en zebrafisk?

Så kender du sikkert allerede styrken i FEMLAB. Ellers venter en spændende nyhed.

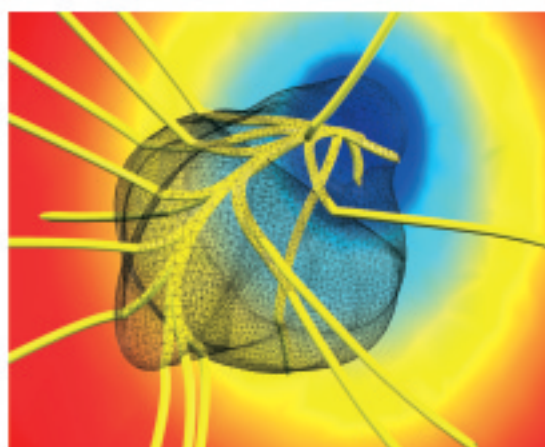
FEMLAB er et miljø til modellering af alle typer af fysiske fænomener inden for alle teknologiske og videnskabelige områder. Nøglefærdige anvendelsesområder gør FEMLAB let at bruge.

Muligheden for at kombinere alle områder med egen definerede ligninger gør det fleksibelt.

Se alt på www.comsol.dk

TILBUD!

Bestil din FEMLAB informationspakke nu. Gratis CD med mange færdige modeller og en viewer følger med. I vieweren kan du selv udforske og efterbehandle modellerne inden for bl.a. strømning, diffusion, reaktioner, varmeudbredelse, elektromagnetisme osv.



Figuren viser partialtrykket for oxygen omkring et zebrafiskæstet i vand.

WWW.COMSOL.DK

