

Statistische Versuchsplanung

Abschätzung der Robustheit und Optimierung einer LC-MS/MS-Multi-Methode

Methoden

Design of Experiment (DOE):

Dieses moderne Verfahren beruht auf einer mathematischen Theorie, die es ermöglicht alle potentiellen Einstellvariablen gleichzeitig zu untersuchen und dabei statistisch sichere Rückschlüsse auf alle einzelnen Faktoren ziehen zu können. Außerdem erfolgt beim DOE eine Minimierung des Einflusses des experimentellen Fehlers auf das Ergebnis, da alle Versuchsergebnisse zusammen betrachtet werden und nicht einzeln, wie bei klassischen Verfahren. Das DOE besitzt dadurch eine Vielzahl von Vorteilen:

- Mit der Auswahl des Versuchsdesigns steht die benötigte Versuchsanzahl fest
- Untersuchung von Einzeleffekten als auch von Wechselwirkungen sind unabhängig voneinander möglich
- Vorhersagen können in einem gewissen Rahmen getroffen werden
- Über die Signifikanz der beobachteten Effekte lassen sich echte Effekte von zufälligen Schwankungen unterscheiden
- Es wird ein maximaler Informationsgehalt mit relativ geringem Versuchsaufwand erhalten

Vor der Durchführung eines DOE müssen die abhängigen Variablen (Zielvariablen) und unabhängigen Variablen (Einflussvariablen) mit ihren Levels (Parametereinstellungen) definiert werden. Anhand der Variablenanzahl ergibt sich das Versuchsdesign. Ein Versuchsdesign kann z.B. als Kurzschreibweise 2^2 bzw. 2^3 lauten, was bedeutet, dass 2 bzw. 3 Einflussvariablen auf jeweils 2 Level gesetzt werden. Mit Hilfe solcher Designs können nur lineare Abhängigkeiten ermittelt werden, weshalb sie meistens nur zum Screening von Einflussgrößen angewendet werden. Nachdem die wichtigsten Einflussgrößen statistisch ermittelt wurden, kann durch Anwendung etwas komplexerer Versuchsplanung eine Optimierung des Systems vorgenommen werden.

Central Composite Design (CCD)

Das Central Composite Design setzt sich aus einem 2^n faktoriellen Design (Cube-Levels), 2^n so genannter Star Point Design (α -Levels) und m Wiederholungen des Zentrums (0-Level) zusammen. Nach folgender Formel lässt sich die Anzahl N an benötigten Experimenten mit einem CCD berechnen [2].

$$N = 2^n + 2n + m$$

Die statistische Versuchsplanung findet immer mehr Anwender in der Entwicklung von Prozessen und Produkten in vielen Bereichen der Industrie [1]–[3]. So fand insbesondere auch dadurch in den letzten Jahren eine verstärkte Implementierung statt, weil viele Unternehmen auf die so genannte 6 sigma Strategie übergehen, in der statistische Methoden, wie z.B. die Versuchsplanung, ein unentbehrliches Werkzeug darstellten. Auch in der analytischen Methodenentwicklung und -validierung gibt es vereinzelt Beispiele der Anwendung dieses Werkzeugs [4]–[5]. Sehr wenige Beispiele gibt es in der Methodenentwicklung der LC-MS, wobei sich unserer Meinung nach gerade die Parametereinstellungen im Massenspektrometer sehr gut dazu eignen mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung zu untersuchen und auch zu optimieren. Das hier angeführte Beispiel der Bestimmung von 84 Pestiziden in Trinkwasser verwendet die Response Surface Methodology zur Optimierung der Parameter einer Multimethode der LC-MS [6].

Durch die Kombination des 2^n faktoriellen Design und dem Star Point Design werden bei dem CCD für drei oder mehr Variablen weniger Versuche benötigt als im Vergleich zu einem 3^n faktoriellen Design [2]. In Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung des CCD für zwei Design Variablen abgebildet. Neben dem Zentrumspunkt befinden sich die so genannten Cube Points (± 1 level). Die Star Points werden meist als $\pm \alpha$ Levels bezeichnet.

Response Surface Methodology (RSM)

Die Response Surface Methodology ist ein mathematisches und statistisches Werkzeug, welches zur Auffindung von lokalen Optima und zum Abschätzen der Prozessrobustheit verwendet wird. Bei der Auswertung eines Versuchsdesigns gemäß der RSM wird ein Model erzeugt, welches den Einfluss von mehreren Design-Variablen (unabhängige Variablen) auf die Zielvariable (Response variable) berechnet. Reine 2^n

Designs¹ benötigen nur ein Minimum an Experimenten, jedoch lassen sich mit ihnen nur Einflüsse, die sich linear verhalten, darstellen.

Zu den am häufigsten verwendeten Versuchsplänen gehören neben dem oben beschriebenen Central Composite Design auch das Box-Behnken- und 3^n -Design. Aufgrund der höheren Levelanzahl lassen sich mit diesen Designs auch Krümmungen darstellen.

Die durch die RSM erzeugten 3-dimensionale Hyperflächen bzw. Contour Plots ermöglichen nicht nur eine einfache Abschätzung der Robustheit in den dargestellten Variablen, sondern auch die Ermittlung optimaler Parametereinstellungen (vgl. Abbildung 2). Aufgrund seiner fünf Levels pro unabhängiger Variable wurde für die Validierung der Multi-Methode das Central Composite Design ausgewählt. Trotz der fünf Levels benötigt dieses Design eine recht moderate Anzahl an Versuchen und eignet sich deshalb besonders zur Abschätzung der Robustheit und Optimierung einer LC-MS-Multimethode.

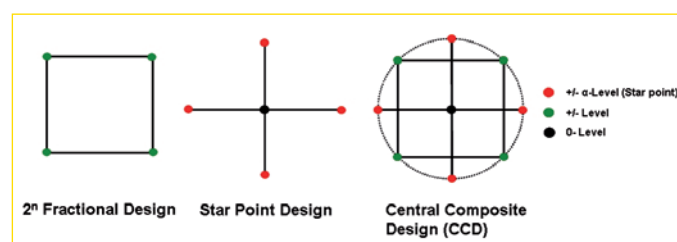


Abb. 1: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Versuchsdesigns

¹ n = Anzahl der Variablen

2 = Anzahl der Levels pro Variable

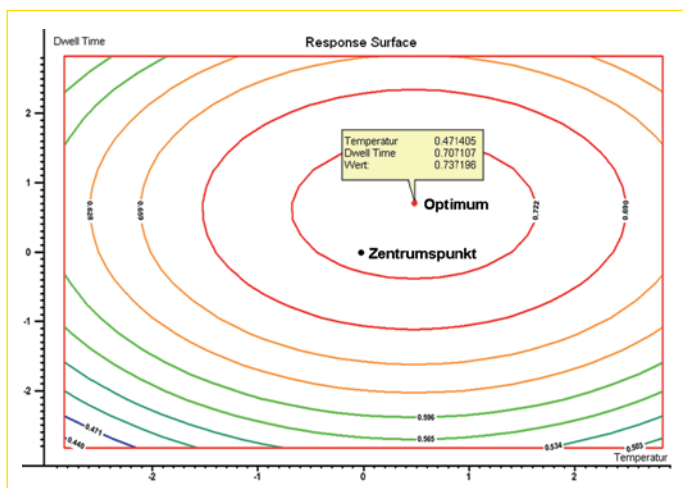


Abb. 2: Contour Plot der signifikanten Variablen Dwell Time und Temperatur

Experimentelles Standards/Chemikalien

Hypergrade Methanol und Ammonium Acetat wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Standardlösungen der 84 Pestizide waren von der Firma Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland). Das verwendete HPLC-Wasser wurde aus deionisiertem Wasser mittels eines Millipore MilliQ Systems (Schwalbach, Deutschland) hergestellt.

Flüssigkeitschromatographie

Für die chromatographische Trennung wurde ein Agilent 1100 Series HPLC-System mit Degassereinheit, Autosampler und einem Säulenofen mit einem Umschaltventil verwendet. Die Ofentemperatur war auf 25°C eingestellt. Die Trennung der Analyte erfolgte mit einer Phenomenex Synergi Fusion Säule (RP 80 A, 50 x 2.00 mm, 4 µm). Die chromatographischen Parameter wurden in Anlehnung an die in Referenz [6] beschriebene Methode für Sulfonylharnstoffherbizide gewählt (Tabelle 1).

Massenspektrometrie

Für die Detektion wurde ein MDS Sciex API 4000 Qtrap Triple-Quadrupole-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems mit einer Turbo Ion Spray (electrospray) Ionisationseinheit verwen-

det. Die Ionenquelle wurde im positiven Modus betrieben (Tabelle 2). Die Massenübergänge wurden mit dem MS/MS-Multiple-Reaction-Monitoring-Mode (MRM-Mode) mit einer 10 ms Dwell Time detektiert.

Die massenspektrometrischen Daten für eine Auswahl an Massenübergängen sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Software

Die statistische Auswertung des Versuchsplans erfolgte mit der Statistiksoftware Uncrambler v.9.6 und v.9.7 [8].

Ergebnisse und Diskussion

Der Erfolg eines statistischen Versuchsplans hängt stark von der Auswahl der Design Variablen und der Definition der Response Variablen ab. Für die beschriebene LC-MS/MS-Multi-Methode wurden mehr als 20 mögliche Design Variablen gefunden, jedoch konnten aufgrund softwaretechnischer Begrenzung nur sechs Design Variablen berücksichtigt werden. Die Auswahl erfolgte anhand von Erfahrungswerten (siehe Tabelle 4). Der Zentrumspunkt (0-Level) jeder Design Variable entspricht der Parametereinstellung der zu validierenden Methode.

Als Grundlage für die Response Variable der massenspektrometrischen Detektion diente das

Injektion	20 µl
Fluss	0,60 ml/min
Eluent A	H ₂ O/5 mM Ammonium-Acetat
Eluent B	Methanol/5 mM Ammonium-Acetat
Gradient	Zeit (min) 0 13 15 15.01 20
	Eluent B (%) 20 80 80 20 20

Tab. 1: HPLC-Parameter

Curtain gas	25 psi
Spraying gas	50 psi
Drying gas	50 psi
Ionisation temperature	500 °C
Collision gas value	5 (range 1–12)
Ionspray voltage	5000 V

Tab. 2: MS-Parameter

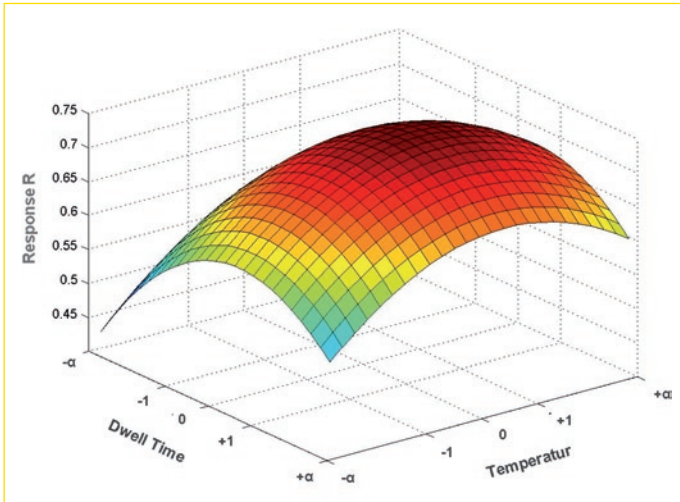


Abb. 3: 3D Response Surface der Variablen Dwell Time und Temperatur²

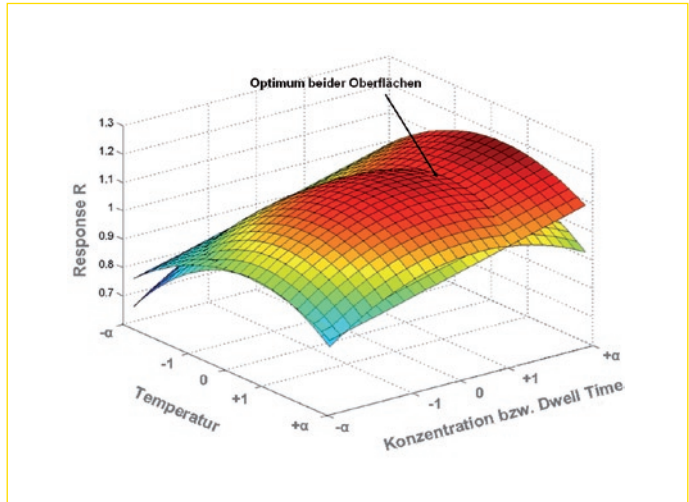


Abb. 4: Schnittfläche zweier Oberflächen²

Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N). Die Response Variable R wurde als der Anteil von Massenübergängen, die ein vorgegebenes S/N-Limit (z.B. S/N=10 für die Bestimmungsgrenze) überschreiten, definiert. Für die Durchführung eines Central Composite Designs für sechs Design Variablen und 15 Wiederholversuchen des Zentrums (0-Level) waren 91 Experimente nötig.

Für die 91 Versuche wurde jeweils die entsprechende Response R berechnet und in die Statistiksoftware eingegeben. Bei der Auswertung der Ergebnisse mittels Varianzanalyse (Analysis of Variance; ANOVA) konnten drei signifikante Haupteffekte (Konzentration, Ionisierungstemperatur und Dwell Time) bestimmt werden, aber keine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Design Variablen. Die beste Anpassung an die experimentell ermittelten Daten ist in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt. Die Design Variable Konzentration besitzt allerdings nur einen linearen Einfluss auf die Response R. Der signifikante Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Signal ist Grundvoraussetzung für eine Analysenmethode und war schon vor der Durchführung des statistischen Versuchsplans bekannt. Jedoch wurde diese Design Variable bewusst in diesem berücksichtigt, damit noch weitere Validierungsparameter, wie z.B. Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, aus den Daten bestimmt werden konnten.

Für alle Design Variablen, die entsprechend der Varianzanalyse keinen signifikanten Einfluss auf die Response R haben, kann die Methode als

robust betrachtet werden. Um die Methodenrobustheit für die signifikanten Haupteffekte abschätzen zu können, erfolgt eine Auswertung der Daten mittels der Response Surface Methodology (RSM). In Abbildung 2 und Abbildung 3 ist die Oberfläche der Response R für die Design Variablen Ionisierungstemperatur und Dwell Time zum einen als Contour Plot und zum anderen als dreidimensionale Darstellung abgebildet. Der Zentrums punkt, welcher die Parametereinstellungen der Methode widerspiegelt, befindet sich hier auf einem relativ flachen Plateau nahe des Optimums auf der Hyperfläche. Anhand des Gradienten im Optimum der Response Surface kann die Robustheit der Multimethode abgeschätzt werden. Je geringer die Krümmung, desto geringer der Einfluss von Schwankungen der Variablen Temperatur und Dwell Time auf die Gesamtheit der Analyte. Aufgrund dieser Gegebenheit kann die Methode auch für die beiden signifikanten Haupteffekte als robust eingestuft werden.

Befindet sich jedoch der Zentrums punkt an einer Flanke der Oberfläche, kann die Analysenmethode für diese Haupteffekte nicht als robust eingestuft werden, da geringe Abweichungen von den Ausgangseinstellungen der beiden Parameter große Auswirkungen auf die Response R haben.

Neben einer sehr guten Abschätzung der Robustheit ermöglicht die RSM außerdem noch eine relativ einfache Optimierung von Multi-Methoden. Für die Optimierung der beschriebenen Methode müssen nur die Parametereinstellungen der zwei Design Variablen am Optimum der Oberfläche (Abb. 2) ermittelt werden. Infolge der geringen Distanz zwischen Optimum und Zentrums punkt weichen die optimierten Einstellungen der Design Variablen in diesem Fall von den Ausgangswerten nur gering ab (Tabelle 5). Die

² Abbildungen wurden mit der Software Matlab 6.5 erstellt

	$-\alpha$ Level	-1 Level	0- Level	+1 Level	$+\alpha$ Level
Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	5.9	15.0	20.0	25.0	34.1
Fluss [ml/min]	0.46	0.55	0.60	0.65	0.74
Gradient [min]	12.1	12.7	13.0	13.3	13.9
Ionisationstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	330.3	440.0	500.0	560.0	669.7
Zerstäuber-Gas [psi]	21.7	40.0	50.0	60.0	78.3
Curtain-Gas [psi]	10.9	20.0	25.0	30.0	39.1
Dwell Time [ms]	2.9	7.5	10.0	12.5	17.1

Tab. 4: Sechs Design Variablen mit den entsprechenden fünf Levels

Design Variable	Ausgangswert	Optimierte Einstellungen
Ionisierungstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	500.0	528.3
Dwell Time [ms]	10.0	11.8

Tab. 5: Optimierte Einstellungen

optimierten Einstellungen wurden mittels eines Bestätigungsexperiments überprüft. Weitere Versuche waren nicht nötig, da die Ergebnisse durch die Verwendung eines Versuchsplans hinreichend statistisch abgesichert sind.

Werden bei der Varianzanalyse mehrere signifikante Haupteffekte ermittelt, so steigt mit der Anzahl der Haupteffekte auch die Anzahl der bei der Optimierung zu berücksichtigenden Hyperflächen und der damit verbundene Auswerteaufwand. Für die Bestimmung der optimalen Parametereinstellungen müssen Schnittflächen der Oberflächen berechnet werden. In Abbildung 4 ist ein Schnitt zweier Hyperflächen exemplarisch für die Design Variablen Dwell Time, Ionisierungstemperatur und Konzentration der beschriebenen Methode abgebildet.

Für weitere Informationen über die Ergebnisse der ANOVA und der RSM sei an dieser Stelle auf die Referenz [7] verwiesen.

Zusammenfassung

Die Anwendung von statistischen Versuchsplänen ist für die Validierung von Multi-Methoden besonders geeignet. Am Beispiel einer LC-MS/MS-Multi-Methode für Pflanzenschutzmittel in Wasser konnte gezeigt werden, dass mittels eines Central Composite Designs für sechs Einflussvariablen eine sehr gute Abschätzung der Robustheit bei relativ geringer Versuchsanzahl möglich war. Die Auswertung erfolgte gemäß der Varianzanalyse und der Response Surface Methodology. Die erzeugten RSM-Diagramme erlaubten zudem eine einfache Optimierung der Multi-Methode. Durch die Berücksichtigung der Konzentration als Design Variable konnten weitere Validierungsmerkmale, wie die Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, direkt aus dem statistischen Versuchsplan ermittelt werden.

Literatur

- [1] Montgomery, DC. (2001): Introduction to Statistical Quality Control. Wiley and Sons Inc., New York
- [2] Kuehl, RO (2000): Design of Experiments Statistical Principles of Research Design and Analysis. Duxburg Verlag, Pacific Grove
- [3] Kellner, R.; Mermet, JM.; Otto, M.; Valcárcel, M.; Widmer, HM. (2004): A Modern Approach to Analytical Science. Analytical Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA, Weinheim
- [4] Anonymus (2002): Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. Official journal of the European Union: L221/13–30
- [5] Kromidas, S. (2005): Validierung in der Analytik. Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA, Weinheim
- [6] Seitz, W.; Schulz, W.; Weber, WH.: Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20: 2281–2285 (2006)
- [7] Müller, A.; Flottmann, D.; Schulz, W.; Seitz, W.; Weber, WH. (2007): Alternative Validation of a LC-MS/MS-Multi-Method for Pesticides in Drinking Water. Clean 35 (4) in press: DOI:10.1002/clen.200700014
- [8] Unscrambler1 v.9.6 respectively v.9.7, CAMO Software AS, N-0158 OSLO, Norway 1986–2007

► KONTAKT

Dipl.-Ing. (FH) Alexander Müller
Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz
Dipl.-Ing. (FH) Wolfram Seitz
Dr. rer. nat. Walter Weber
Zweckverband Landeswasserversorgung
Betriebs- und Forschungslaboratorium
Langenau
Tel.: 07345/9638-2291
Fax: 07345/9638-2290
schulz.w@lw-online.de
www.lw-online.de

Prof. Dr. Dirk Flottmann
Hochschule für Technik und Wirtschaft
Fakultät Chemie
Aalen