

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJAN BRUDAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



DEJAN BRUDAR

**OPTIMIZACIJA PARAMETROV KROMATOGRFSKE
LOČBE Z UPORABO EKSPERIMENTALNIH NAČRTOV**

**PARAMETER OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC
SEPARATION WITH THE DESIGN OF EXPERIMENTS**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljal v Razvojnem centru Lek-a Ljubljana, članu skupine Sandoz, pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja.

Zahvala

Za pomoč, strokovne nasvete in vodenje pri pripravi magistrske naloge se zahvaljujem mentorju doc. dr. Jožku Cesarju.

Prav tako gre zahvala dr. Simoni Bohanec in Juretu Zakrajšku univ. dipl. inž. farm., ki sta mi z ogromno strokovnimi in tudi prijateljskimi nasveti izdelavo magistrske naloge olajšala, ter seveda Razvojnemu centru Lek-a, da mi je omogočil izvedbo praktičnega dela naloge.

Zahvala tudi domačim in prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja.

Dejan Brudar

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. Načrtovanje poskusov	2
1.1.1. Faktorski načrti.....	6
1.1.2. Plackett-Burman-ovi načrti	10
1.1.3. D-optimalni modeli načrtov	11
1.2. Delna regresija najmanjših kvadratov	11
1.3. Kromatografske tehnike	12
1.3.1. Tekočinska kromatografija.....	12
1.3.2. Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti - UPLC	13
1.3.3. Ustreznost kromatografskega sistema.....	15
2. NAMEN DELA.....	19
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1. Aparature	20
3.2. Reagenti in topila.....	20
3.3. Izhodiščna UPLC metoda.....	21
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. Optimizacija izhodiščne UPLC metode z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom	23
4.1.1. Faktorji	23
4.1.2. Odzivi sistema.....	24
4.1.3. Priprava delnega dvonivojskega faktorskega načrta poskusov	26
4.1.4. Rezultati modela in razprava.....	30
4.1.5. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov	38
4.2. Optimizacija izhodišče metode s Plackett-Burman-ovim faktorskim načrtom	39
4.2.1. Priprava načrta poskusov po Plackett-Burman-u	40

4.2.2. Rezultati modela in razprava.....	41
4.2.3. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov	48
4.3. Optimizacija izhodiščne metode z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom	49
4.3.1. Faktorji	49
4.3.2. Priprava delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta poskusov .	50
4.3.3. Rezultati modela in razprava.....	52
4.3.4. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov	62
5. ZAKLJUČEK	64
6. VIRI IN LITERATURA.....	65

Povzetek

Cilj magistrske naloge je bila optimizacija UPLC metode za določanje sorodnih snovi in razpadnih produktov v izbranem farmacevtskem izdelku in učinkovini. Izhodiščna metoda namreč ni bila dovolj selektivna in ni omogočala dovolj dobre ločbe med vrhovi nečistot ter med vrhovi nečistot in vrhom aktivne substance. Hkrati smo želeli metodo tudi časovno optimirati.

Optimizacije smo se lotili z metodo načrtovanja poskusov - DOE. Ta vključuje statistični pristop, ki omogoča pridobivanje informacij iz bistveno manjšega števila poskusov in je časovno manj potraten, kot metoda poskusov in napak ("trial and error"). Z DOE pristopom lahko poleg vpliva faktorjev določimo tudi interakcije med posameznimi faktorji, modeliramo oziroma poiščemo relacije med faktorji in odzivi, ter z modeli napovedujemo odzive po celotnem delovnem območju metode oziroma prostoru, v katerem poskuse izvajamo. Poskuse smo načrtovali in dobljene podatke obdelovali s pomočjo računalniškega programa Modde 9.1.

Preučevali smo vplive šestih faktorjev, za katere smo glede na poznavanje metode in literature menili, da bi lahko vplivali na optimizacijo metode. Ti faktorji so: delež acetonitrila v mobilni fazi, čas spremembe gradienta, pH in molarost pufra, uporabljanega kot mobilna faza A, temperatura kolone in pretok mobilne faze skozi kolono.

Rezultat celotnega postopka optimiranja je selektivna, robustna in rigidna metoda, ki pa je žal nismo uspeli skrajšati. To je hkrati tudi edini cilj, ki ga nismo uspeli doseči. Prav tako smo dokazali, da dajejo statistični modeli, ki smo jih postavili, točne napovedi, kako bi se metoda ob spremembah preučevanih faktorjev obnašala.

Primerjava delnega dvonivojskega in Plackett-Burman-ovega faktorskega načrta je pokazala, da z obema načrtoma dobimo primerljiva modela, ki opisujeta delovno območje analitske metode, pri čemer je za izvedbo slednjega potrebnih skoraj polovico manj poskusov. Faktorje z največjim vplivom smo nadalje optimirali s pomočjo delnega večnivojskega faktorskega načrta D-optimal. Izkazalo se je, da z zadnjim korakom v našem primeru same metode nismo izboljšali, le delovno območje metode smo natančneje opisali.

Ključne besede

Optimizacija analitske metode, načrtovanje poskusov, faktorski načrti, UPLC

Abstract

The main goal of this research project was the optimization of UPLC method for the determination of related substances and degradation products of chosen active substance and pharmaceutical product. The selectivity and separation between peaks of impurities and between peaks of impurities and the peak of active substance of the current method should be improved. In addition, the run time should be optimized too.

We decided to optimize the method by the use of design of experiments - DOE. DOE is a statistical technique which allows us to get more information with fewer experiments compared to the "trial and error" method. With DOE approach not just the effects of factors but also the effects of interactions between factors can be determined. In addition, it is also possible to model the experimental area, i.e., to find the relationships between factors, interactions and responses, and to predict responses in the experimental area. The experiments were planned and the resulting data were processed by a computer program Modde 9.1.

We studied the effects of six factors, which could, by our knowledge of the method and literature, have the most significant impact on the method. These factors are: the content of acetonitrile in mobile phase, a gradient time, pH, molarity of the buffer used as mobile phase A, column temperature and flow rate of the mobile phase.

The result of the whole optimization process is selective, robust and rigid method, but unfortunately we were not able to shorten the run time. That was the only goal that we have not achieved. We have proven that statistical models we built on the basis of obtained experimental data, give us accurate predictions of analytical method behaviour if the studied factors would be changed. Comparison of partial two-level and Plackett-Burman factorial designs showed that both give us comparable models that describe behaviour of analytical method in predefined working area, but the Plackett-Burman experimental design requires fewer experiments compared to partial factorial design. Factors with the most significant effect were further optimized using a partial factorial multi-level D-optimal design. It turns out that with last step we did not obtain any additional information, only more detailed description of experimental area.

Keywords

Optimization of analytical method, design of experiments, factorial designs, UPLC

Seznam okrajšav

ACN - Acetonitril	<i>Acetonitrile</i>
API - Zdravilna učinkovina	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
DOE - Načrtovanje poskusov	<i>Design Of Experiments</i>
HPLC – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
PDA – Detektor z nizom foto diod, Foto diodni detektor	<i>Photo Diode Array Detector</i>
PLS algoritem - Delna regresija najmanjših kvadratov	<i>Partial least square algoritm</i>
SST – Test ustreznosti kromatografskega sistema	<i>System Suitability Test</i>
UPLC - Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

1. UVOD

Zdravila morajo biti varna, učinkovita in kakovostna. Pod pojmom kakovost ne mislimo samo na kakovost izdelka kot takega, temveč na kakovost celotnega proizvodnega procesa. Na proizvodni proces vpliva veliko zelo različnih faktorjev in za študij le teh se dandanes vedno več uporablja statistično načrtovanje poskusov in modeliranje, ki postajata pomemben člen v procesu zagotavljanja kakovosti. Omogočata nam, da že v fazi razvoja izdelka in procesa uspemo preko poznavanja vplivov vhodnih parametrov (faktorjev) obvladovati izdelek in proces ter tako vplivati na kakovost izdelka in ekonomičnost procesa.

Povečanje produktivnosti in izboljšanje kakovosti sta v sedanjem času pomembna cilja oziroma vrednoti v vsakem podjetju, ne glede na to, kaj le to proizvaja. Vsak izdelek, ki ga sestavlja več komponent, zahteva sistematičen pristop k optimizaciji izdelave, saj različne lastnosti in vsebnosti posameznih komponent pogojujejo njegove končne lastnosti. Metode vrednotenja, kako povečati produktivnost in izboljšati kakovost, se vse bolj razvijajo in postajajo eno ključnih orodij za doseg teh ciljev. Spremenile so se iz dragih in zamudnih t.i. metod poskusov in napak ("*trial and error*"), ki zahtevajo veliko število poskusov in nepredvidljiv čas izvedbe, hkrati pa v veliki večini primerov ne dajo želenih rezultatov, v elegantne in stroškovno učinkovite statistične metode. Potrebno pa se je zavedati, da nam nek zastavljen načrt lahko ponudi le toliko odgovorov, kolikor dobro izbranih faktorjev in njihovih vrednosti (nivojev) smo za ta načrt izbrali. Načrtovanje poskusov se osredotoča na določanje vplivov faktorjev in njihovih interakcij, ki jih z metodami poskusov in napak ne zaznamo [1 - 3].

Tudi na analitski postopek lahko gledamo kot na kompleksen proces, na katerega vpliva veliko faktorjev. V zadnjem času se tudi pri razvoju in optimizaciji analitskih postopkov uporablja načrtovanje eksperimentov. Predvsem to velja za kompleksne analitske postopke, kot so postopki osnovani na tekočinski kromatografiji. V farmacevtski industriji so to predvsem postopki, s katerimi določamo vsebnost sorodnih snovi v učinkovini ali pa vsebnost sorodnih snovi in razpadnih produktov v končnem izdelku.

1.1. Načrtovanje poskusov

Izraz poskus oziroma eksperiment je opredeljen kot sistematičen postopek, ki poteka pod nadzorovanimi pogoji in se uporablja za odkrivanje neznanih vplivov pri potrjevanju postavljene hipoteze, ali za ponazoritev oziroma potrditev že znanega vpliva.

Pri analizi procesa se poskusi pogosto uporabljajo za ocenjevanje, kateri vhodni parametri (v nadaljevanju faktorji), imajo pomemben ali prevladujoč vpliv na sam proces, kateri delujejo v povezavi in kakšna naj bo ciljna stopnja posameznih vložkov, da na koncu dobimo želeni rezultat. Upoštevati pa je potrebno tudi vplive motenj. Poskusi so lahko za zbiranje informacij zasnovani na več različnih načinov, kot posamezni ali kot niz le-teh. V veliki meri temeljijo na izkušnjah, pridobljenih v preteklosti, na podatkih iz literature, včasih pa tudi le na vztrajnosti in odločnosti raziskovalcev.

Načrtovanje poskusov (*Design Of Experiments - DOE*) je sistematičen pristop k analizi sistema ali procesa ter izvedbi poskusov tako, da dobimo maksimalno količino informacij z minimalnim številom poskusov. Ponuja veliko več kot posamezni, naključni poskusi, kjer se običajno spreminja le po en faktor naenkrat. Omogoča nam tako določanje vpliva spremembe posameznih faktorjev kot tudi interakcij le-teh na opazovane odzive [1 - 4].

Za uspešnost izboljšanja procesa ali kakovosti izdelka je zelo pomembno poznavanje problematike. V ta namen se mora vedno najprej sestaviti projektna ekipa, sestavljena iz ljudi, ki dobro poznajo tehnologijo procesa. Zelo natančno je potrebno opredeliti problem, kaj, oziroma katere lastnosti izdelka ali procesa želimo analizirati [5 - 11].

DOE uporabimo za iskanje odgovorov v situacijah, kot so:

- kaj je glavni vzrok za naš problem?
- kako se obnaša naš proces v prisotnosti neke motnje?
- katera kombinacija faktorjev nam zagotavlja najbolj robusten sistem?

Z DOE načrtujemo vrsto strukturiranih poskusov nekega sistema ali procesa, kjer vrednosti faktorjev načrtno spreminjamo. Nato ocenimo rezultate teh sprememb na preddefiniranem izhodu (v nadaljevanju odzivu). V vseh primerih uporabimo DOE za iskanje odgovorov, edina razlika je določitev različnih faktorjev, ki se bodo v načrtovanem poskusu uporabili, kar prikazuje slika 1 [9, 11 - 13].



Slika 1: Shema enostavnega procesa / sistema

Poleg faktorjev, ki jih v sistem vnašamo, in jih opredeljujemo kot faktorje, ki jih lahko kontroliramo, na sistem vplivajo tudi faktorji, ki jih ne moremo kontrolirati, oziroma se jih niti ne zavedamo. Običajno so to časovno odvisni faktorji. Vplive nekontroliranih faktorjev skušamo zmanjšati s čim bolj premišljeno zastavljenimi eksperimentalnimi načrti.

V tej fazi, ki je ključna za uspeh načrtovanih poskusov, se predvideva prepoznavanje ključnih faktorjev in motenj, ki lahko vplivajo na karakteristiko opazovanih odzivov. Nekateri avtorji zavzemajo stališče, da dobra organizacija dela in pravilna definicija problema predstavlja kar 70 % uspeha raziskovalnega dela.

Pri poskusih s spremembo enega faktorja naenkrat obstaja velika nevarnost, da raziskovalec sicer določi vpliv tega faktorja na sistem, vendar pri tem zanemari, kako hkratna sprememba drugih faktorjev vpliva na delovanje opazovanega procesa (interakcija, parametri so lahko medsebojno odvisni) in posledično odzivov le-tega. To se običajno zgodi predvsem zaradi želje, da se poskuse čim prej zaključi in sicer takoj, ko se odkrije vplivni faktor. Odkritje interakcij med faktorji je v veliki meri prepuščeno preizkuševalcu in sicer v upanju, da vodi poskuse v pravo smer [1, 12 - 14].

Pri DOE že v osnovi predvidevamo možnost interakcij in predvidimo, katere podatke potrebujemo za to oceno, torej, katere spremembe vhodnih faktorjev se izvede pri posameznih poskusih. Načrtovanje poskusov raziskovalcem omogoča istočasno določanje vplivov faktorjev in njihovih interakcij na opazovani sistem. Na ta način nam omogoča dobro poznavanje sistema in njegove posamezne dele, ki lahko bistveno vplivajo na proizvodni proces ali pa na kakovost končnega izdelka. Raziskovalci imamo možnost, da določimo kritične dele sistema in morebiti odpravimo težave ter tako dobimo robustnejši in donosnejši produkt za končno praktično uporabo. Kritični del načrtovanja poskusov je izbor faktorjev, njihovih nivojev ter odzivov sistema, ki jih je potrebno spremljati [7, 9, 10, 15, 16].

Proces pristopa k DOE prikazuje slika 2.



Slika 2: Proces pristopa k DOE

Identifikacija oziroma določitev faktorjev je izbor vseh možnih parametrov, ki bi po naših izkušnjah lahko vplivali na spremljane odzive. V tem koraku se lahko uporabijo različne metode, kot so:

- t.i. viharjenje možganov (*Brainstorming*),
- diagram ribje kosti (*Fish-bone diagram*),
- CTQ drevo (*Critical to quality tree*).

Zelo pomembno je, da že vnaprej predvidevamo, kako bomo faktorje pri želenih vrednostih nivojev nadzorovali. Prav tako moramo paziti, da upoštevamo vse faktorje, za katere menimo, da bi lahko imeli vpliv na odzive našega sistema ali procesa.

Na osnovi določenih faktorjev in njihovih nivojev izberemo matriko poskusov. Pri določitvi matrike si lahko pomagamo z različnimi računalniškimi programi, ki nam pomagajo izdelati različne vrste faktorskih načrtov [11,13].

Obstajajo štirje osnovni načini zbiranja podatkov za učinkovito načrtovanje poskusov in sicer:

- s pridobivanjem podatkov iz preteklosti,
- z zbiranjem novih podatkov,
- z izvajanjem posebnih poskusov, pri katerih načrtno uvajamo spremembe v raziskovani sistem in potem opazujemo odzive nanje,

- ter z načrtovanjem poskusov na strukturiran, matematičen način.

Poskuse, ki jih predvidi zastavljeni eksperimentalni načrt, moramo izvesti s čim manj motnjami in s čim manjšo merilno napako. Metode, s katerimi vrednotimo vplive faktorjev morajo biti preverjene, priporočljivo pa je, da meritve izvaja ena oseba in da so poskusi izvedeni v čim krajšem časovnem obdobju, saj bodo motnje manjše, dobljeni rezultati pa posledično bolj reprezentativni.

Strukturirane podatke, pridobljene z DOE, lahko uporabimo za multivariantno analizo podatkov, ter za multivariantno modeliranje. Modeli postavljeni na osnovi teh podatkov so običajno stabilni in robustni.

Računalniški programi nam omogočajo grafično in numerično analizo rezultatov pridobljenih s poskusi. Pri statistični analizi oziroma obdelavi je bistvo v izgradnji zaupanja v dobljene rezultate, zato je smiselno uporabiti več metod, kot so grafi normalne porazdelitve (*normal probability plot*), PLS algoritem in druge [10, 12, 13, 17].

Največ koristnih podatkov o vplivih na opazovani sistem nam dajejo popolni faktorski načrti, vendar pa zahtevajo tudi največ poskusov, torej časa in materiala. V primeru, da ocenimo, da interakcije višjega reda nimajo bistvenega vpliva na naše odzive, lahko izberemo delne faktorske načrte, ki zahtevajo manjše število poskusov. V tem primeru interakcij faktorjev višjega reda ne bo možno določiti.

Delne faktorske načrte lahko uporabimo tudi za tako imenovano reševanje (*screening*) vplivnih faktorjev. To je poskus z velikim številom vhodnih faktorjev, ki nam pomaga prepoznati le faktorje, ki imajo največji vpliv na opazovane odzive. Velja pa pravilo, da se zaradi možne napake meritve raje odločimo izvesti dve ponovitvi enakega poskusa z različnima načrtoma.

Če vnaprej vemo, kateri faktorji in kateri križni učinki le-teh vplivajo na kakovost nekega procesa ali izdelka, lahko s pomočjo DOE število poskusov precej zmanjšamo. Kvalitetno izvedena določitev faktorjev in njihovih nivojev lahko močno poveča možnost za uspeh. Načrtovanje poskusov se lahko uporablja kot vzvod za zmanjševanje stroškov in optimizacijo procesov, ki jih lahko s popolnim obvladovanjem procesa načrtovanja poskusov pospešimo. Zmanjšuje zahtevnost in običajno tudi obseg dela. DOE je močno orodje za doseganje prihrankov pri proizvodnih in ostalih stroških, in sicer z zmanjševanjem sprememb v samem procesu, zmanjšajo pa se lahko tudi predelava,

morebitni ostanki procesa, in potreba po nenehnem pregledovanju in zagotavljanju zelene kakovosti izdelka. Prav tako sta že na začetku določeni dolžina trajanja poskusov in vsa potrebna sredstva [5, 11 - 13, 18].

1.1.1. Faktorski načrti

Eksperimentalni načrti so predpis (shema poskusov), kako spreminjati vrednosti faktorjev oziroma njihovih nivojev tako, da s poskusi enakomerno pokrijemo celoten eksperimentalni prostor. Na ta način dobimo na osnovi minimalnega števila poskusov maksimalno količino informacij.

Poznamo več tipov eksperimentalnih načrtov, ki se med seboj razlikujejo glede na število faktorjev, število poskusov, število nivojev, oziroma vrednosti faktorjev, pri katerih naj se poskusi izvajajo, ter razporeditvijo poskusov po eksperimentalnem prostoru, v katerem poskuse izvajamo.

Izbor eksperimentalnega načrta je odvisen od stopnje poznavanja sistema, števila izbranih faktorjev, morebitnih medsebojnih interakcij le-teh ter ciljev načrtovanega poskusa. S številom faktorjev ter njihovih nivojev število potrebnih poskusov zelo hitro narašča. Običajno v začetni fazi študije uporabimo načrte poskusov z več faktorji in manj nivoji, kasneje pa število nivojev povečujemo, število faktorjev pa zmanjšujemo.

V začetni fazi nas zanimajo predvsem velikosti vplivov posameznih faktorjev, da ločimo statistično pomembne (signifikantne) od statistično manj pomembnih (nesignifikantnih). V ta namen uporabimo delne dvonivojske faktorske načrte. Rezultat poskusov so kvantitativni vplivi posameznih faktorjev in njihovih interakcij na opazovani sistem. Na osnovi sprememb opazovanih odzivov ločimo pomembnejše faktorje od manj pomembnih. Ko so pomembnejši faktorji izbrani, pa nas zanima njihovo obnašanje (vpliv) po celotnem prostoru izvajanih poskusov. V ta namen uporabimo večnivojske faktorske načrte. Končni rezultat so modelne funkcije, ki opisujejo obnašanje sistema v celotnem prostoru poskusov v odvisnosti od vrednosti nivojev izbranih faktorjev.

Dimenzije eksperimentalnega prostora so odvisne od števila faktorjev in števila njihovih nivojev. V splošnem velja, da morajo poskusi čim bolj enakomerno pokrivati celoten eksperimentalni prostor [19].

Faktorski načrti so ena od skupin načrtov poskusov, ki so v splošnem zelo ekonomični, saj z njihovo pomočjo že iz razmeroma majhnega števila poskusov, dobimo veliko informacij.

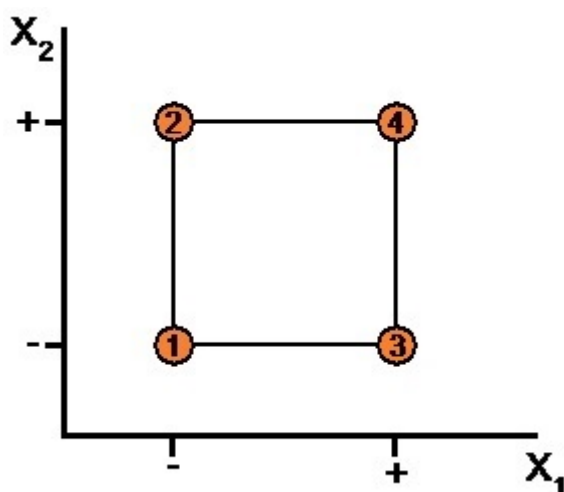
Ločimo popolne, delne, Plackett-Burman-ove in D-optimalne faktorske načrte. Popolne in delne faktorske načrte nadalje ločimo glede na:

- število faktorjev in sicer na dvo-, tro- in več-faktorske načrte,
- ter glede na število nivojev na dvo-, tro- ali več-nivojske načrte.

Popolni faktorski načrti

Pri uporabi popolnega faktorskega načrta (*Full factorial designs*) izvedemo poskuse pri vseh možnih kombinacijah faktorjev in pri vseh njihovih različnih nivojih. Število poskusov (A) je odvisno od števila faktorjev (B) in števila nivojev (c): $A = c^B$

Primer najenostavnejšega popolnega faktorskega načrta je 2-faktorski 2-nivojski popolni faktorski načrt s štirimi (2^2) poskusi. Poskusi ležijo v dvo-dimenzionalnem poskusnem prostoru, kjer se vrednosti za prvi faktor X_1 nahajajo na abscisi, vrednosti za drugi faktor X_2 pa na ordinati. Poskusi takega faktorskega načrta leže v kotih kvadrata, kar prikazuje slika 3:



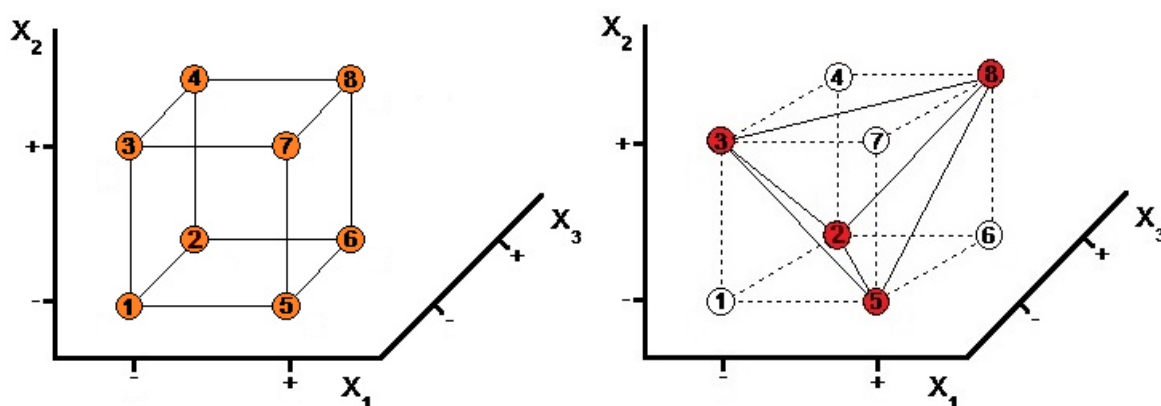
Slika 3: 2-faktorski 2-nivojski popolni faktorski načrt

Nivoja sta označena z oznakama »-« in »+«. Oznaka »-« ustreza najnižji, oznaka »+« pa najvišji vrednosti faktorja. V danem primeru je možna samo interakcija med faktorjema X_1 in X_2 , kar označimo kot mešani produkt $X_1 \cdot X_2$, vrednosti katerega dobimo z množenjem oznak »-« in »+«. Interakcije običajno pišemo le pri popolnih faktorskih, vsebujejo pa vse faktorje in vse možne interakcije med njimi, kar prikazuje preglednica I.

Preglednica I: Tabela poskusov za popolni 2-faktorski 2-nivojski načrt poskusov

Poskus	X_1	X_2	$X_1 \cdot X_2$
1	–	–	+
2	–	+	–
3	+	–	–
4	+	+	+

Najpogosteje uporabljeni popolni faktorski načrt je 3-faktorski 2-nivojski načrt z osmimi (2^3) poskusi, kar prikazuje preglednica II. Tu poskusi leže v tro-dimenzionalnem prostoru oziroma v ogliščih kocke, kar prikazuje slika 4 levo.



Slika 4: Levo je prikazan popolni 3-faktorski 2-nivojski faktorski načrt, desno pa polovični delni faktorski načrt, ki ga dobimo iz popolnega 3-faktorskega 2-nivojskega faktorskega načrta

Medtem ko popolne 2-nivojske faktorske načrte uporabljamo predvsem za ocenjevanje vplivov izbranih faktorjev na opazovane odzive, popolne 3-nivojske faktorske načrte poleg tega uporabimo tudi za določanje velikostnega (kvantitativnega) vpliva posameznih faktorjev na odzive oziroma za modeliranje poskusnega prostora.

Število poskusov s številom faktorjev in s številom njihovih nivojev pri popolnem faktorskem načrtu zelo hitro narašča in prav to je njihova slabost, zato namesto popolnih velikokrat uporabimo delne faktorske načrte.

Preglednica II: Tabela poskusov za popolni 3-faktorski 2-nivojski načrt

Poskus	X_1	X_2	X_3	$X_1 \cdot X_2$	$X_1 \cdot X_3$	$X_2 \cdot X_3$	$X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$
1	–	–	–	+	+	+	–
2	–	–	+	+	–	–	+
3	–	+	–	–	+	–	+
4	–	+	+	–	–	+	–
5	+	–	–	–	–	+	+
6	+	–	+	–	+	–	–
7	+	+	–	+	–	–	–
8	+	+	+	+	+	+	+

Delni faktorski načrti

Delni faktorski načrti (*Fractional factorial designs*) so podmnožica popolnih in vključujejo le del kombinacij nivojev faktorjev. Tu so določene interakcije iz popolnih načrtov zamenjane z novimi faktorji. Z zamenjavo ene interakcije z novim faktorjem dobimo iz popolnega polovični delni faktorski načrt, kar v praksi pomeni zmanjšanje števila poskusov na polovico, medtem ko sta pri četrtnskih dve interakciji zamenjani z novima faktorjema in se posledično število poskusov zmanjša na četrtno. Število poskusov (A) je odvisno od števila faktorjev (B), števila nivojev (c) in števila interakcij zamenjanih z novim faktorjem (D): $A = c^{B-D}$

Eden od mogočih različic polovičnega faktorskega načrta je načrt, ki ga dobimo iz 3-faktorskega 2-nivojskega popolnega faktorskega načrta. Medtem ko pri slednjem poskusi leže v vseh ogliščih kocke, so v polovičnem faktorskem načrtu le poskusi, ki v kocki tvorijo tetraeder in so na sliki 4 desno označeni z rdečimi krogi.

Število poskusov (A) se pri polovičnem faktorskem načrtu, ki ima (B) faktorjev in (c) nivojev, zmanjša za polovico, ker eno od interakcij zamenjamo z novim faktorjem in sicer:

$$A = c^{B-D} = 2^{3-1} = 2^2 = 4$$

Če mešani produkt $X_1 \cdot X_2$ popolnega 2-faktorskega načrta, prikazanega v preglednici I, zamenjamo s tretjim faktorjem X_3 , dobimo delni faktorski načrt, ki je prikazan v preglednici III.

Preglednica III: Zamenjava mešanega produkta $X_1 \cdot X_2$ s tretjim faktorjem X_3 pri popolnem 2-faktorskem načrtu poskusov

Poskus	X_1	X_2	X_3
1	–	–	+
2	–	+	–
3	+	–	–
4	+	+	+

Tako dobimo štiri poskuse, ki v prostoru tvorijo tetraeder, in je na sliki 4 desno označen z rdečimi krogi. Če primerjamo preglednico III in omenjeni tetraeder vidimo, da poskus 1 ustreza točki 2, poskus 2 točki 3, poskus 3 točki 5 in poskus 4 točki 8.

Pri zamenjavi interakcij z novimi faktorji pa je potrebno ravnati premišljeno in preudarno, saj s tem, ko neko interakcijo med dvema ali tremi faktorji nadomestimo z novim faktorjem, povzročimo mešanje vplivov zamenjane interakcije in tega novega faktorja. Če vemo, da je vpliv interakcije zanemarljiv, kar je bil tudi poglavitni razlog za nadomestilo te interakcije z novim faktorjem, lahko celoten vpliv pripišemo novemu faktorju.

1.1.2. Plackett-Burman-ovi načrti

V skupino delnih faktorskih načrtov spada tudi ciklični faktorski načrt, ki sta ga osnovala Plackett in Burman (*Plackett-Burman designs*), in ima lahko različno število faktorjev. Ciklični jim pravimo tudi zato, ker se nivoji faktorjev pri shemi poskusov ciklično spreminjajo. Za razliko od popolnih in delnih faktorskih načrtov, ki vsebujejo mešane produkte in jih zato lahko uporabimo za oceno vplivov interakcij med njimi, ga lahko uporabljamo le za oceno vplivov faktorjev.

Plackett-Burman-ovi načrti se izkažejo kot izredno koristni predvsem v začetni fazi načrtovanja poskusov, ko sistema popolnoma ne poznamo, ali v primeru rešetanja (*screeninga*) z večjim številom faktorjev, kjer želimo predvsem dobiti informacije, kateri od faktorjev so nepomembni in kateri imajo velik vpliv na opazovani sistem in jih je potrebno nadalje obravnavati. Ko so vplivni faktorji določeni in hočemo določiti interakcije med njimi, pa je bolje, da uporabimo popolne faktorske načrte, ki nam

omogočajo kombinacije med izbranimi faktorji na vseh nivojih in kar je najpomembneje, zagotavljajo tudi podatke o interakcijah med njimi.

Plackett-Burman-ove načrte je še posebej koristno uporabiti kadar želimo dokazati rigidnost oziroma robustnost opreme ali postopkov, ter pri več-faktorskih dvonivojskih načrtih. Njihova glavna prednost je, da nam omogočajo študij vpliva številnih faktorjev na spremembe v opazovanem sistemu z minimalnim številom opravljenih poskusov.

Obstaja tudi slabost uporabe Plackett-Burman-ovih načrtov, ki se jih morajo raziskovalci zavedati in sicer je z omenjenimi načrti nemogoče preveriti vplive interakcij med posameznimi faktorji [8, 10, 17, 19 - 24].

1.1.3. D-optimalni modeli načrtov

Kadar pri optimizaciji in reševanju velikega števila faktorjev klasičnih modelov ne moremo uporabiti, se pogosto uporabljajo tako imenovani D-optimalni modeli (*D-optimal designs*). Le-ti so ena od oblik modelov načrtovanja poskusov, ki so podprti z različnimi računalniškimi algoritmi. Te vrste računalniško podprtih modelov so še posebej uporabne takrat, kadar modeli klasičnih faktorskih načrtov ne veljajo. Za razliko od klasičnih modelov, kot so popolni ali delni faktorski načrti, tu zasnovane D-optimalne matrike običajno niso pravokotne, ocene učinkov pa korelirajo.

D-optimalne modele načrtov namesto klasičnih faktorskih načrtov uporabljamo predvsem zato, ker standardni popolni faktorski oziroma delni faktorski načrti zahtevajo od načrtovalcev preveliko število poskusov glede na količino sredstev in časa, ki ga imajo ponavadi na razpolago [10, 25, 26].

1.2. Delna regresija najmanjših kvadratov

Delna regresija najmanjših kvadratov (*Partial least square regresion - PLS*) je statistična multivariantna regresijska metoda za modeliranje. Raziskave na področju znanosti in tehnike pogosto vključujejo uporabo faktorjev, ki jih je enostavno nadzorovati in/ali izmeriti in ki pojasnjujejo, urejajo, ali napovedujejo obnašanje odzivov na te izbrane faktorje. Ko je teh faktorjev malo in le ti niso signifikantno različni (nelinearni), ter imajo nam dobro razumljen odnos do dobljenih odzivov, potem za pretvorbo teh podatkov v nam

razumne informacije uporabimo metodo tako imenovane multiple linearne regresije (MLR).

Vendar pa se v realnosti raziskovalec oziroma načrtovalec poskusov včasih sooča z velikim številom spremenljivk in zato slabše razume razmerja med njimi, kar mu otežuje pot k zastavljenemu cilju, ki je osnovati dober, obvladljiv in napovedljiv model poskusov.

PLS je statistična metoda, ki nam kljub temu, da je faktorjev veliko, lahko tudi več kot spremljanih odzivov, in so signifikantno zelo različni, omogoča postavitev statističnih modelov, saj zajema tudi njihove kovariance. Zavedati se je potrebno, da je poudarek predvsem na napovedovanju odzivov in ne v poskušanju razumevanja temeljnega razmerja med faktorji.

Lahko se zgodi, da pri modelu z veliko faktorji spregledamo ali pa preprosto zanemarimo faktorje, ki jih na prvi pogled (še) ne opazimo, ker so prikriti (latentni), saj več pozornosti posvečamo vplivnim, odločujočim. Posledično lahko v takih primerih dobimo model, ki se sicer popolnoma prilega podatkom, pridobljenim iz poskusov, vendar pa so napovedi takšnega modela nezanesljive. V takšnih primerih, čeprav obstaja veliko očitnih faktorjev, lahko le nekaj prikritih faktorjev predstavlja večino variabilnosti spremljanih odzivov. Namen PLS je, da skušamo identificirati te prikrite faktorje in zagotoviti čim boljši statistični model [10, 27].

1.3. Kromatografske tehnike

1.3.1. Tekočinska kromatografija

Kromatografija je laboratorijska tehnika ločevanja zmesi kjer separacijski postopek temelji na različnem porazdeljevanju komponent vzorca med mobilno in stacionarno fazo.

Do kromatografske separacije vzorca na komponente pride zaradi razlik v hitrosti potovanja le-teh skozi kolono z mobilno fazo. Komponente se selektivno zadržujejo na stacionarni fazi, kjer se medsebojno ločijo, bodisi ker imajo različne kemijske ali različne fizikalne lastnosti. Molekule komponent pri svoji poti skozi kolono, napolnjeno s stacionarno fazo, neprestano prehajajo med mobilno in stacionarno fazo in se med njima porazdelijo. Ko posamezne komponente zapuščajo kolono, se eluirajo, pridejo na detektor, ta pa njihove električne signale – odzive pošilja v računalnik. Zapisu posameznih signalov rečemo kromatografski vrh neke komponente, celotni sliki vseh eluiranih komponent pa

kromatogram. Kromatogram predstavlja zapis o ločbi komponent vzorca, tako o retencijskih časih kot njihovih površinah. V večini primerov je v določenem območju površina pod krivuljo sorazmerna koncentraciji, kar nam poleg kvalitativnega omogoča tudi kvantitativno vrednoteje komponent.

Glede na lastnosti mobilne in stacionarne faze ter prevladujoč tip interakcij, na podlagi katerih poteka ločba, lahko tekočinsko kromatografijo razdelimo na štiri glavne tipe:

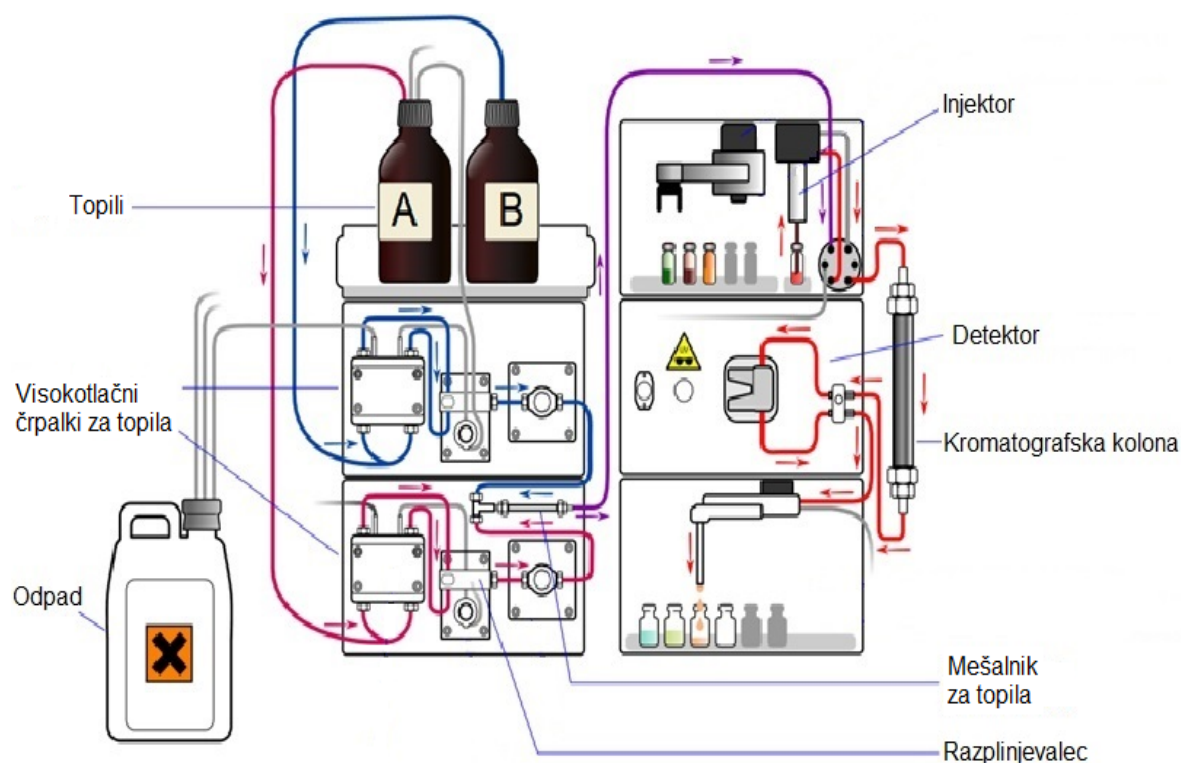
- normalno fazna kromatografija (*Normal-phase chromatography*),
- reverzno fazna kromatografija (*Reversed-phase chromatography*),
- ionsko izmenjevalna kromatografija (*Ion-exchange chromatography*),
- velikostno izključitvena kromatografija (*Size-exclusion chromatography*) [28, 29].

1.3.2. Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti - UPLC

Mobilna faza je pri UPLC analizah tekočina ali mešanica različnih tekočin, odvisno od posamezne analitske metode. Za določanje nečistot se največkrat uporablja gradientna ločba. To pomeni, da se za delo ponavadi uporabljata dve topili ali kombinaciji topil, kjer je ena bolj na vodni, druga pa bolj na organski osnovi. Kot organske faze običajno uporabljamo acetonitril, metanol, tetrahidrofuran, kot vodne pa različne raztopine pufrov z različnimi pH vrednostmi. Navadno so UPLC kolone dimenzij med 5 cm in 15 cm. Delci stacionarne faze so pri UPLC metodah običajno v velikostnih razredih pod 2 μm , najpogosteje 1,7 μm . Mobilno fazo skozi kolono potiska visokotlačna črpalka, tlak v koloni pa lahko naraste celo do velikosti 1000 barov.

UPLC kromatografija je zanesljiva, ponovljiva in tudi precej robustna in je zato primerna tudi za najbolj zahtevne separacije vzorcev. Velika prednost UPLC analiz je tudi njihov čas trajanja glede na nekoliko starejšo tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), kar pomeni prihranek pri času in materialu. Poleg tega je potrebno omeniti, da UPLC zaradi majhnih delcev stacionarne faze omogoča bistveno boljšo ločbo komponent ter višjo hitrost kromatografije [30 - 33].

Slika 5 prikazuje UPLC aparaturo in njene osnovne sestavne dele, hkrati pa puščice prikazujejo tudi pot vzorca skozi omenjeni sistem. Nekoliko podrobnejši opis ključnih elementov UPLC-ja sledi v nadaljevanju.



Slika 5: Shematski prikaz UPLC aparature in poti vzorca skozi sistem [34]

Visokotlačna črpalka

Dve visokotlačni črpalki skrbita za konstanten pretok topil skozi celoten sistem. Prednosti mešanja pri visokem tlaku sta predvsem velika ponovljivost gradienta in majhen volumen zakasnitve. Kljub temu, da je pred uporabo potrebno vsa topila razpliniti, saj se sicer lahko zaradi zračnih mehurčkov pojavlja večje nihanje tlaka na sistemu, pa imata visokotlačni črpalki vgrajena še dodatna razplinjevalca, ki omogočata konstantno sestavo mobilne faze, ki ju črpalki črpata skozi sistem tekom analize.

Avtomatski vzorčevalnik z injektorjem

Sestavlja ga komora, ki ima možnost ohranjanja konstantne temperature vzorcev, ki jih želimo analizirati, v območju med 4°C do 40°C. Temperatura vzorcev je pomembna posebej takrat, kadar imamo opravka z vzorci, ki so v topilu termolabilni, oziroma imamo v topilu hlapne organske komponente (npr. tetrahidrofuran). Te pri višjih temperaturah lahko hlapijo iz vial, ki je bila že prebodena z iglo, s tem pa se koncentracija vzorca lahko med dolgotrajnejšo analizo spreminja.

Injektorski del z iglo in zanko je namenjen odvzemu vzorca in vnosu le-tega v tok mobilne faze, s katerim potuje na kolono. Volumni vzorca, potrebnega za analizo, so lahko različni: od 3 μ L, pa vse do 100 μ L, vendar pri UPLC metodah običajno niso večji od 20 μ L. Zaradi tako velikega razpona ima aparatura možnost polnjenja zanke na več različnih načinov.

Kolona

Kromatografska kolona omogoča ločevanje vzorca na njegove komponente. Navadno so iz nerjavečega jekla, ki tvori ogrodje, napolnjene pa so, odvisno za katero vrsto kromatografije jih rabimo, z različnimi stacionarnimi fazami. Delci le-teh so različnih velikosti, njihova velikost pa vpliva na ločbo komponent in tlak v sistemu. Pri manjših delcih je ločba boljša, tlak pa večji in obratno. Ločijo se tudi glede na dolžino in sicer krajše omogočajo hitrejšo elucijo in manjšo resolucijo in obratno.

Termostat za kolone

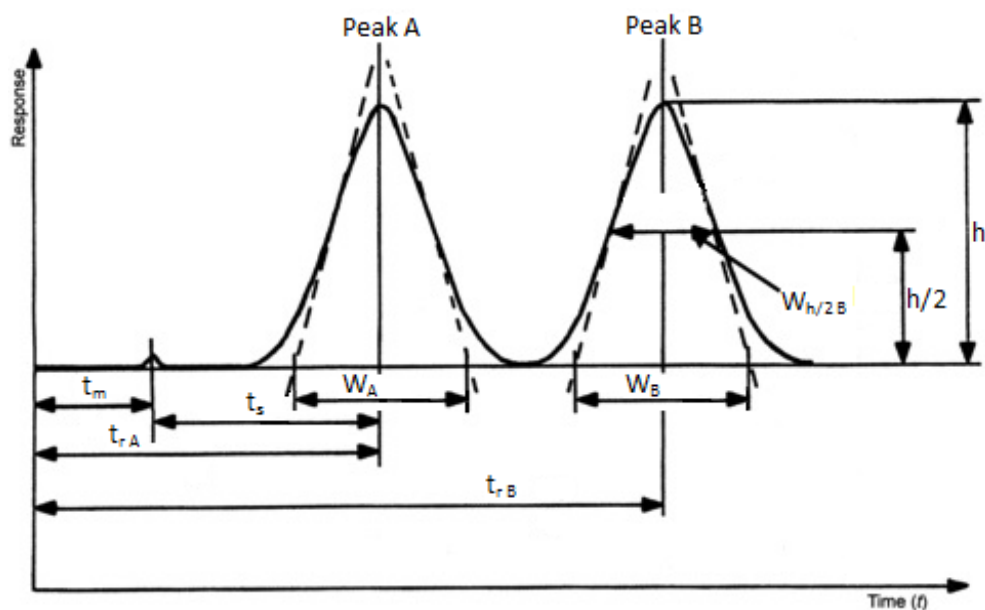
Na kromatografski koloni poteka separacija vzorca na posamezne komponente. Termostat vzdržuje in zagotavlja konstantne pogoje, ki jih želimo med analizo. Konstantni pogoji so pomembni zato, ker je kromatografska ločba odvisna tudi od temperature kolone. Splošno je znano, da se z višanjem temperature retencijski časi krajšajo in obratno.

PDA detektor

PDA detektor omogoča smemanje kromatogramov pri izbrani valovni dolžini ali v celotnem območju od 190 nm do 500 nm, kadar je to pomembno za identifikacijo komponent, tudi po obeh načinih hkrati [32, 35, 36].

1.3.3. Ustreznost kromatografskega sistema

Vsi, tekom opravljanja poskusov spremljani parametri, pa tudi nekateri dodatni, sodijo v sklop SST-ja (*System Suitability Test*), ki predstavlja integralni del kromatografske ločbe. Navadno so SST parametri predpisani za vsak analitski postopek, njihov nabor pa je odvisen od vrste kromatografije in izbrane analitske metode. Njihova ustreznost skozi celoten potek analize nam zagotavlja, da so resolucija, stabilnost kromatografskega sistema, separacija na koloni in analitsko delo ustrezni in ponovljivi.



Slika 6: Prikaz faktorjev za izračun parametrov kromatografske ločbe za enačbe 1 - 4 [28]

Retencijski čas (t_r) je čas med injiciranjem vzorca in časom, ko vrh analita doseže detektor na koncu kolone, ter je različen in hkrati karakterističen za vsako komponento analiziranega vzorca. Je seštevek časa, ko se ta komponenta nahaja v mobilni fazi (t_m) in časa, ko je v stacionarni fazi (t_s), kot to prikazuje enačba 1.

$$t_r = t_m + t_s \quad (\text{enačba 1})$$

Retencijski faktor (k') opisuje stopnjo zadrževanja analita na koloni. Gre za razmerje med časom, ko se ta komponenta nahaja v stacionarni fazi (t_s) in časom, ko je v mobilni fazi (t_m). Njegova vrednost je odvisna od posameznega primera, ponavadi je to v območju med dva in deset. Enačbo izračuna prikazuje enačba 2.

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{enačba 2})$$

Resolucija (R) nam pove, kako dobro sta vrhova komponent A in B v vzorcu z retencijskima časoma $(t_r)_A$ in $(t_r)_B$, ločena med sabo. Pri tem upoštevamo tako razliko v retencijskih časih kot širino vrhov na bazni liniji (W_A) in (W_B), oziroma njihovo širino na polovici višine ($W_{h/2,A}$) in ($W_{h/2,B}$), kot prikazuje enačba 3. Da sta vrhova ločena na bazni liniji, mora biti njena vrednost pri kvantitativnih analizah vsaj 1,5.

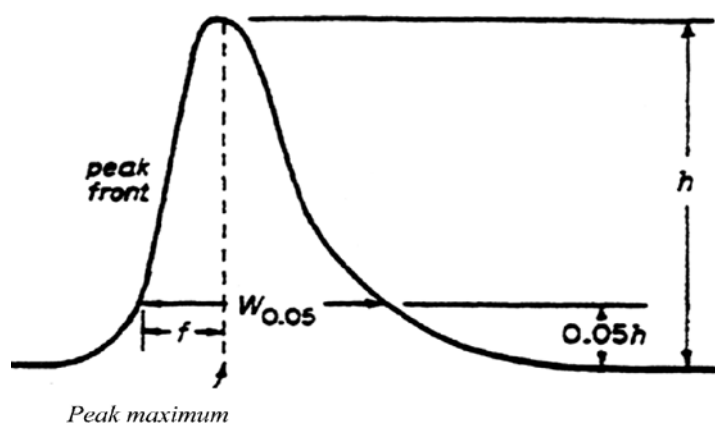
$$R = \frac{2 \times [(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B} = \frac{2 \times [(t_r)_B - (t_r)_A]}{1,7 \times (W_{h/2,A} + W_{h/2,B})} \quad (\text{enačba 3})$$

Število podov (N) je merilo za učinkovitost kolone, njihovo število pa vpliva na ločbo komponent v vzorcu. Pri optimalni učinkovitosti so vrhovi simetrični in dokaj ostri, ter ločeni do bazne linije. Za njihov izračun uporabimo retencijski čas komponente (t_r) in širino vrha te komponente na polovici njegove višine ($w_{h/2}$) ali pa retencijski čas komponente (t_r) in širino kromatografskega vrha na bazni liniji (W), kot to prikazuje enačba 4. W dobimo z ekstrapolacijo stranic tega vrha na bazno linijo.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (\text{enačba 4})$$

Faktor simetrije ali simetričnosti vrhov (tailing factor) je merilo simetričnosti kromatografskega vrha. Pri idealnih popolnoma simetričnih vrhovih je njegova vrednost ena, sicer pa je pri kvantitativnih analizah zaželjena vrednost med 0,8 in 1,5. Za izračun simetričnosti moramo poznati širino vrha na 5% višine od bazne linije ($W_{0,05}$) ter razdaljo od najvišje točke vrha do njegovega začetka, ki se prav tako meri na 5% višine od bazne linije (f), kot je prikazano v enačbi 5 in na sliki 7 [37, 38].

$$T = \frac{W_{0,05}}{2 \times f} \quad (\text{enačba 5})$$



Slika 7: Prikaz faktorja simetrije [39]

Parametri ustreznosti kromatografske ločbe nam med drugim zagotavljajo tudi, da je metoda:

- selektivna, kar predstavlja sposobnost le-te, da pravilno in specifično meri koncentracijo oziroma količino preiskovane snovi v vzorcu. Popolnoma selektivno metodo imenujemo tudi specifična metoda in kot taka nam mora, kljub morebitnim dodanim motečim snovem ali nečistotam, omogočati določiti izbran analit,
- rigidna, kar pomeni zmožnost le-te dajati ponovljive in obnovljive rezultate, ne glede na to, da analizo istega vzorca izvajamo pri različnih pogojih, ki se lahko odražajo v različnih analitikih, aparaturah, laboratorijih, ob različnih dnevih, urah in temperaturah, z drugimi serijami iste kolone ali drugačnih serij uporabljenih kemikalij in reagentov.
- robustna, kar je sposobnost metode, da se na namerno vnesene manjše motnje v sistem ne odziva oziroma nanje ni občutljiva. Te motnje se lahko odražajo v manjših spremembah pretoka mobilne faze skozi sistem, pH vrednosti pufra, uporabljenega za mobilno fazo, temperature kolone ali deleža ene od komponent mobilne faze [29, 33].

2. NAMEN DELA

Danes imamo na voljo številna orodja za načrtovanje eksperimentov, ki uporabljajo različne algoritme, zahtevajo različno število poskusov in so nenazadnje cenovno različno dostopna. Mi smo se odločili za uporabo programa Umetrics Modde 9.1 [40].

V okviru magistrske naloge želimo preveriti uporabnost različnih oblik DOE za proces optimizacije analiznih postopkov ter medsebojno primerjati posamezne DOE in njihove rezultate.

S pomočjo metode načrtovanja poskusov bomo poskušali izboljšati UPLC metodo za določanje vsebnosti sorodnih snovi v učinkovini, ter sorodnih snovi in razpadnih produktov v izbranem farmacevtskem izdelku.

Izhodiščna UPLC metoda ni selektivna in nam ne omogoča zadostne ločbe med vrhovi posameznih nečistot, predvsem kar se tiče resolucije med šesto in sedmo nečistoto, ter med vrhovi nečistot in vrhom aktivne substance. Z modernim statističnim pristopom načrtovanja poskusov bomo zato skušali razviti metodo, ki bo selektivna, robustna in rigidna. Hkrati bomo poskušali metodo tudi časovno optimirati.

Poudarek magistrske naloge bo na uporabi DOE pristopa kot načina, s katerim lahko elegantno izboljšujemo tako procese kot posamezne dele le-teh. Zato v nadaljevanju ne bomo govorili o konkretni učinkovini in strukturi nečistot.

Optimiranje metode bomo skušali izpeljati s pomočjo statističnega načrtovanja poskusov, pri čemer bomo uporabili različne vrste, saj bi radi ugotovili, katere so prednosti in slabosti različnih vrst načrtov. Za izbor statistično pomembnih faktorjev bomo v prvi fazi optimiranja uporabili dva faktorska načrta: delni dvonivojski faktorski načrt in Plackett-Burman-ov faktorski načrt. Za bolj natančen oris delovnega območja pa bomo vplive izbranih faktorjev v drugi stopnji optimiranja ovrednotili še z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Aparature

Waters Acquity UPLC sistem s PDA detektorjem s komponentami:

- Acquity Ultra performance LC™ PDA detektor,
- Acquity Ultra performance LC™ Sample manager,
- Acquity Ultra performance LC™ Binary solvent manager,

Osebni računalnik s programoma Empower 3 PRO in Umetrics Modde 9.1.

Laboratorijska steklovina (merilne bučke, čase, merilne pipete različnih volumnov).

Precizna analitska tehtnica, Mettler Toledo MX 5, International inc., Švica

pH meter SevenMulti, Mettler Toledo, International inc., Švica

Ultrazvočna kopel: Branson 8510, Emerson Industrial Automation, ZDA

Avtomatska pipeta 5-120µL in 1-5mL, Biohit, Sartorius AG, Nemčija

Aparatura za pripravo bidestilirane vode: Milli-Q® Water Purification System, Merck Millipore, ZDA

3.2. Reagenti in topila

- Acetonitril, CH₃CN, ACN, J. T. Baker
- Metanol, CH₃OH, MeOH, J. T. Baker
- Mravljična kislina, HCOOH, Merck, 98-100%
- Vodna raztopina amoniaka, NH₃, 25 %, Merck
- Pufer pH=4,0 za pripravo topila, 15mM: V 5000 ml bidestilirane vode (Lek, Ljubljana) odpipetiramo 2,83 ml mravljične kisline in nato z raztopino amoniaka nastavimo pH 4,0 ± 0,05
- Topilo: Pufer pH=4,0 : Metanol = 50 : 50 (V/V)

3.3. Izhodiščna UPLC metoda

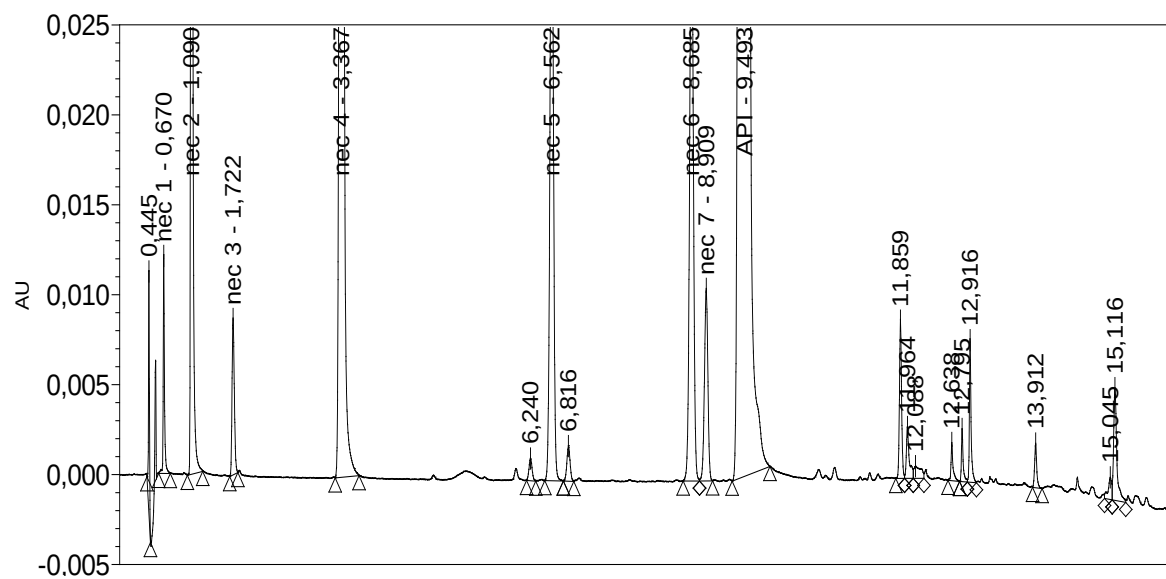
Kromatografski pogoji

- Mobilna faza A: Pufer pH=4,0; 15mM
- Mobilna faza B: ACN
- Kolona: Waters Acquity BEH C18, 1,7 μ m, 100 x 2,1 mm
- Temperatura kolone: 45° C
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 5° C
- Pretok: 0,5 mL/min
- Čas ekvilibracije kolone je 3 min
- Valovna dolžina detekcije: 248 nm (za sorodne snovi in razpadne produkte), hitrost vzorčenja: 20 točk/s, spektralna širina: 4,8nm
- Volumen injiciranja vzorca: 4 μ L

Gradient izhodiščne metode prikazuje preglednica V, kromatogram raztopine analita z dodanimi nečistotami, posnet glede na navedene kromatografske pogoje, pa slika 8.

Preglednica V: Časovni potek gradienta izhodiščne UPLC metode za določanje sorodnih snovi in razpadnih produktov v izbranem farmacevtskemu izdelku in učinkovini

Čas (min)	% A	% B
0	85	15
10	70	30
16	20	80
16,5	85	15



Slika 8: Kromatogram raztopine analita z dodanimi nečistotami, posnet z izhodiščno metodo

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Optimizacija izhodiščne UPLC metode z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom

Optimizacije izhodiščne metode smo se lotili z uporabo dveh najpogosteje uporabljenih načrtov poskusov za reševanje velikega števila dejavnikov vpliva in sicer z delnim faktorskim načrtom in kasneje za potrditev dobljenih rezultatov še s Plackett-Burman-ovim načrtom.

4.1.1. Faktorji

Najprej je bilo potrebno v analitskem postopku izhodiščne metode natančno definirati možne faktorje. Po razmisleku smo se odločili za uporabo šestih faktorjev iz preglednice VI, ki naj bi po našem mnenju imeli največji vpliv na analitsko metodo.

Preglednica VI: Faktorji, uporabljeni v delnem dvonivojskem faktorskem načrtu in območje, v katerem smo jih spreminjali

Ime faktorja	Območje
Delež ACN	-2% in +2%
Gradient	-1min in +1min
pH pufra	3,8 in 4,2
Molarnost pufra	7,5mM in 22,5 mM
Temperatura kolone	40°C in 50°C
Pretok	0,4mL/min in 0,6 mL/min

Kot prikazuje preglednica VI, smo spremljali:

- delež acetonitrila v mobilni fazi glede na gradient izhodiščne metode, ki smo ga zmanjšali za 2% in povečali za 2% glede na izhodiščni % v celotnem območju gradienta,
- časovni potek gradienta glede na izhodiščni gradient metode, ki smo ga skrajšali za 1 min. in podaljšali za 1min.,

- pH pufra, uporabljanega kot mobilno fazo A, ki smo ga glede na pH=4,0 izhodiščne metode zmanjšali na pH=3,8 in povečali na pH=4,2,
- molarnost pufra, uporabljanega kot mobilno fazo A, ki smo ga glede na molsko koncentracijo 15mM izhodiščne metode zmanjšali na 7,5mM in povečali na 22,5 mM,
- temperaturo kolone glede na izhodiščno metodo, ki smo jo zmanjšali za 5°C in povečali za 5°C,
- pretok mobilne faze skozi kolono glede na pretok izhodiščne metode, ki smo ga zmanjšali za 0,1 mL/min in povečali za 0,1 mL/min skozi celoten gradient.

Iz rezultatov smo želeli pridobiti informacije, kako vnešene spremembe deleža organske faze, časovnega poteka gradienta, spremembe pH vrednosti in molarnosti pufra, temperature kolone in pretoka mobilne faze skozi kolono vplivajo na ločbo komponent in njihove retencijske čase.

4.1.2. Odzivi sistema

Ko so bili faktorji izbrani, je bilo potrebno določiti še, katere odzive bomo spremljali, torej natančno opredeliti, kateri rezultati so za nas bistveni za pridobitev želenih informacij iz opravljenih poskusov. Ker smo že v zgodnji fazi želeli pridobiti čim več rezultatov, smo se odločili spremljati enajst odzivov in sicer:

- retencijski faktor nečistote 1 (k'), ki nam pove koliko časa se nečistota 1 zadržuje na koloni glede na mrtvi čas kolone (spojine, ki se na koloni ne zadržujejo – vrh topila),
- resolucije med vrhovi parov nečistot 1 in 2, 2 in 3, ter 6 in 7, ki so se glede na kromatograme izhodiščne metode nahajali preblizu skupaj, ali pa sploh niso bili ločeni na bazni liniji, ter med vrhom aktivne komponente in vrhom najbližje nečistote 7. Tu smo pričakovali informacije o tem, katera kombinacija faktorjev in njihovih nivojev nam bo dala najboljši možen rezultat glede resolucije med vsemi vrhovi nečistot in vrhom aktivne komponente v kromatogramu, kar je bil eden od osnovnih ciljev optimizacije,
- simetričnosti vrhov (tailing factor) nečistot 2, 4 in aktivne komponente, ki omogočajo pravilno integracijo kromatografskih vrhov,
- število podov aktivne komponente, ki kažejo na zadostno izmenjavo med molekulami aktivne komponente med uporabljenno mobilno fazo in med stacionarno fazo kolone ter posledično na učinkovitost kolone,

- retencijskega časa aktivne komponente, na podlagi katerega smo želeli dobiti informacijo o tem, ali bo čas izhodiščne metode mogoče skrajšati,
- tlak na koloni med analizo, oziroma najvišji tlak na koloni med analizo, kjer smo želeli dobiti potrditev, da najvišji tlak ne preseže vrednosti, ki jih sistem glede na specifikacije še dovoljuje.

Preglednica VII prikazuje spremljane odzive sistema, postavljene minimalne in maksimalne kriterije ter ciljne vrednosti izbranih odzivov, to so vrednosti, katerim bi se z optimizacijo metode radi približali.

Preglednica VII: Spremljani odzivi delnega dvonivojskega faktorskega načrta

Ime odziva	Oznaka	Min	Ciljna vrednost	Max
Retencijski faktor neč. 1	k'_1	0,4	0,6	
Resolucija med neč. 1,2	$RS_{1,2}$	6	10	
Resolucija med neč. 2,3	$RS_{2,3}$	6	10	
Resolucija med neč. 6,7	$RS_{6,7}$	2	4	
Resolucija med neč. 7, API	$RS_{7,API}$	3	4	
Simetričnost vrha neč. 2	T_2	0,8	1	2
Simetričnost vrha neč. 4	T_4	0,8	1	1,5
Simetričnost vrha API	T_{API}	0,8	1	1,5
Število podov API	N_{API}	50000	90000	
Retencijski čas API	Rt_{API}		9,5	11
Maksimalni tlak (bar)	P			760

Ciljne vrednosti odzivov v preglednici VII so postavljene pri vrednostih, ki bi se jim po postopku optimizacije želeli čimbolj približati in bi za nas pomenile doseg zastavljenega cilja. Minimalne in maksimalne vrednosti pa so tiste, s katerimi bi bili po optimizaciji sicer

zadovoljni, vendar bi jih poskušali s kakšnim na novo zastavljenim eksperimentalnim načrtom izboljšati.

4.1.3. Priprava delnega dvonivojskega faktorskega načrta poskusov

Število poskusov (A) se pri izbranem delnem faktorskem načrtu, ki ima (B) faktorjev in (c) nivojev, zmanjša za število interakciji zamenjanih z novim faktorjem (D) in sicer: $A = c^{B-D} = 2^{(6-2)} = 2^4 = 16$. Iz povedanega sledi, da moramo za pridobitev kakovostnih rezultatov opraviti 16 poskusov, pri katerih kombiniramo različne faktorje in njihove nivoje. Izvedli bomo še tri poskuse pri pogojih izhodiščne metode oziroma v tako imenovani centralni točki in sicer zato, da preverimo ponovljivost rezultatov oziroma delovanje UPLC sistema. Na ta način lahko sistem učinkovito nadzorujemo, saj nam večja odstopanja pri enakih kromatografskih pogojih dajo takoj vedeti, da s sistemom nekaj ni v redu ter, da so posledično tudi ostali poskusi in njihovi rezultati vprašljivi. Priporočljivo je, da se poskusi izvajajo v naključnem (randomiziranem) vrstnem redu, ki ga določi program, ter, da se v vsak naslednji izveden poskus vnese čim več možnih razlik glede določenih nivojev faktorjev in s tem posledično zmanjša možnost sistemskih napak. Matriko delnega dvonivojskega faktorskega načrta smo generirali s pomočjo programa Umetrics Modde 9.1. Prikazana je v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Matrika delnega dvonivojskega faktorskega načrta

Številka poskusa	Vrstni red poskusa	ACN (%)	Gradient	pH	Mol (mM)	T (°C)	Pretok (mL/min)
1	2	-2	-1	3,8	7,5	40	0,4
2	13	2	-1	3,8	7,5	50	0,4
3	17	-2	1	3,8	7,5	50	0,6
4	9	2	1	3,8	7,5	40	0,6
5	6	-2	-1	4,2	7,5	50	0,6
6	10	2	-1	4,2	7,5	40	0,6
7	19	-2	1	4,2	7,5	40	0,4
8	4	2	1	4,2	7,5	50	0,4
9	1	-2	-1	3,8	22,5	40	0,6
10	11	2	-1	3,8	22,5	50	0,6
11	12	-2	1	3,8	22,5	50	0,4
12	14	2	1	3,8	22,5	40	0,4
13	16	-2	-1	4,2	22,5	50	0,4
14	7	2	-1	4,2	22,5	40	0,4
15	3	-2	1	4,2	22,5	40	0,6
16	8	2	1	4,2	22,5	50	0,6
17	5	0	0	4	15	45	0,5
18	15	0	0	4	15	45	0,5
19	18	0	0	4	15	45	0,5

Priprava raztopin

Za načrt poskusov iz preglednice VIII smo pripravili osnovno raztopino pufra za pripravo mobilne faze A s koncentracijo 150mM HCOOH in sicer: v 500 mL bučko smo dali 2,83 mL HCOOH in jo dopolnili z bidestilirano vodo do oznake. pH smo uravnali na pH = 4.0 z vodno raztopino amonijaka.

Sledilo je redčenje osnovnega pufra in umerjanje pH dobljenih pufrov do vrednosti, ki smo si jih v načrtu poskusov zamislili kot mobilne faze A in sicer:

- pufer 0: 15 mM, pH 4,0

10,0 mL osnovne raztopine pufra smo odpipetirali v 100 mL bučko, dodali bidestilirano vodo do oznake in ustrezno uravnali pH.

- pufer A: 7.5 mM, pH 3,8

5,0 mL osnovne raztopine pufra smo odpipetirali v 100 mL bučko, dodali bidestilirano vodo do oznake in ustrezno uravnali pH z HCOOH.

- pufer B: 7.5 mM, pH 4,2

5,0 mL osnovne raztopine pufra smo odpipetirali v 100 mL bučko, dodali bidestilirano vodo do oznake in ustrezno uravnali pH z NH₃.

- pufer C: 22.5 mM pH 3,8

15,0 mL osnovne raztopine pufra smo odpipetirali v 100 mL bučko, dodali bidestilirano vodo do oznake in ustrezno uravnamo pH z HCOOH.

- pufer D: 22.5 mM, pH 4,2

15,0 mL osnovne raztopine pufra smo odpipetirali v 100 mL bučko, dodali bidestilirano vodo do oznake in ustrezno uravnamo pH z NH₃.

Osnovna raztopina analita

30 mg učinkovine smo natehtali v 10,0 mL bučko, jo raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli v metanolu in dopolnili do oznake. Koncentracija osnovne raztopine je bila 3 mg/mL.

Priprava raztopine analita z dodanimi nečistotami

K 1,5 mL osnovne raztopine analita smo dodali 3,0 mL bidestilirane vode in 4,5 mL metanola, ter po 50 µL nečistot od 1 do 7. Na voljo smo imeli koncentracije osnovnih raztopin nečistot, kot jih prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Seznam nečistot dodanih k osnovni raztopini analita in njihove koncentracije

Nečistota	Osnovne raztopine (mg/mL)	Koncentracija v končni raztopini (µg/mL)
1	0,5	2,67
2	2,0	10,7
3	0,5	2,67
4	1,0	5,35
5	0,5	2,67
6	0,5	2,67
7	0,5	2,67

Priprava UPLC sistema in instrumentalnih metod

Sledila je priprava UPLC sistema z vsemi predvidenimi raztopinami mobilnih faz, šibkega in močnega topila za spiranje sistema in injektorja, ter pritrditev kolone. V programu Empower Pro 3, s katerim upravljamo UPLC aparatur, zajemamo in obdelujemo podatke, smo v skladu z matriko eksperimentalnega načrta, prikazanega v preglednici VIII, generirali sedemnajst instrumentalnih metod ter z njimi posneli kromatograme raztopine analita z dodanimi nečistotami.

4.1.4. Rezultati modela in razprava

Preglednica X: Rezultati delnega dvonivojskega faktorskega načrta

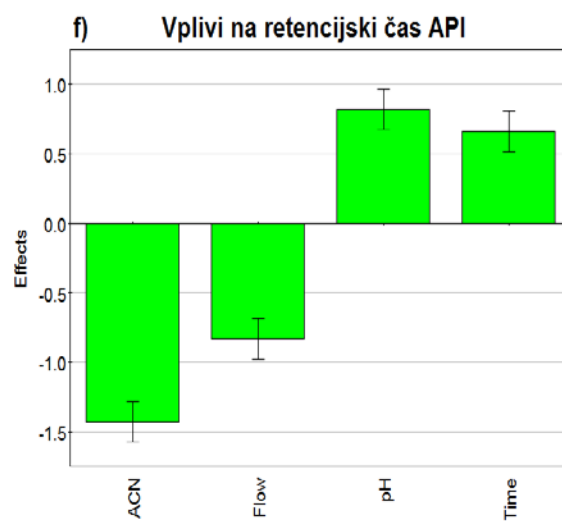
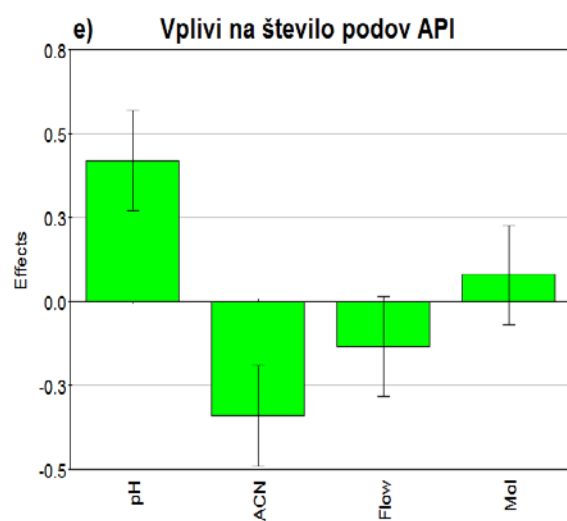
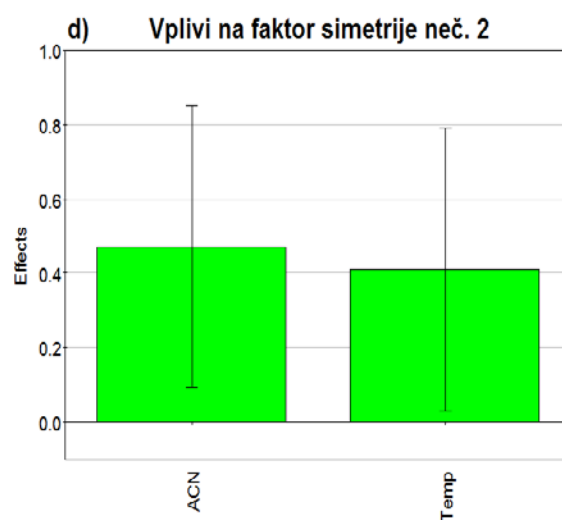
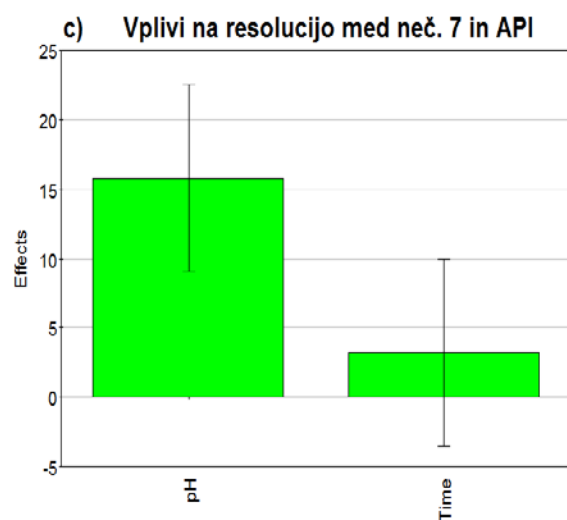
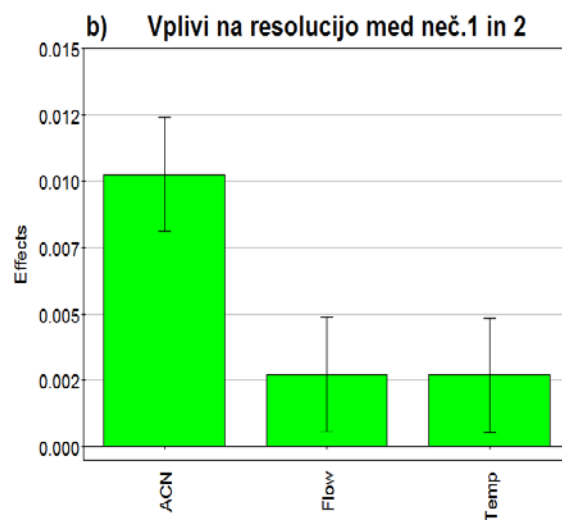
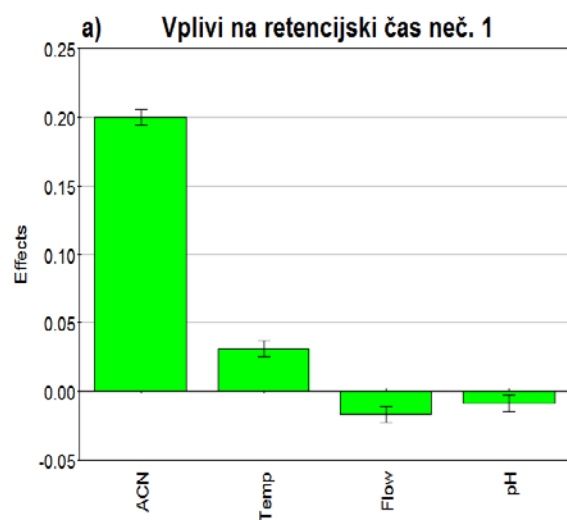
Številka poskusa	k'1	RS _{1,2}	RS _{2,3}	RS _{6,7}	RS _{7,API}	T ₂	T ₄	T _{API}	N _{API}	Rt _{API}	P
1	0,67	10,29	11,86	<i>n.d.</i>	3,69	1,47	1,13	2,55	70510	10,160	497,8
2	0,36	8,72	8,58	1,89	3,13	1,57	1,18	1,63	32875	7,814	433,0
3	0,62	10,48	11,33	<i>n.d.</i>	5,08	1,53	1,16	2,49	32040	9,710	637,1
4	0,40	8,38	9,35	2,23	2,01	1,66	1,20	2,75	17628	7,235	726,7
5	0,65	9,72	10,64	3,09	4,76	1,53	1,13	0,73	192064	9,968	639,8
6	0,41	8,37	9,31	<i>n.d.</i>	5,95	1,34	1,17	0,72	76953	7,854	723,3
7	0,69	11,75	13,39	0,99	4,89	1,38	1,09	0,72	296019	12,645	495,2
8	0,36	8,35	8,25	<i>n.d.</i>	5,20	1,58	1,17	0,67	74328	10,298	435,1
9	0,69	10,41	11,70	3,52	2,93	1,46	1,16	1,64	66999	8,918	727,1
10	0,38	8,30	8,48	4,16	2,76	1,69	1,22	1,33	48058	6,476	641,9
11	0,60	9,88	10,77	4,92	2,90	1,52	1,14	1,35	85591	11,345	429,5
12	0,38	9,28	9,74	<i>n.d.</i>	4,66	1,54	1,13	1,54	50605	8,777	497,5
13	0,62	10,58	11,39	<i>n.d.</i>	4,93	1,46	1,12	0,93	202022	10,948	431,3
14	0,39	9,16	9,60	2,96*	5,27	1,53	1,11	0,80	68203	9,331	499,9
15	0,72	10,51	11,72	1,88	6,05	1,48	1,13	0,76	135913	11,577	725,0
16	0,38	8,04	8,27	2,86	5,29	1,70	1,20	0,68	69151	8,634	643,3
17	0,50	9,04	9,76	2,17	5,19	1,62	1,17	0,94	97605	9,483	574,3
18	0,49	9,44	10,24	2,24	5,13	1,62	1,16	0,92	94793	9,482	571,6
19	0,51	10,05	10,86	2,21	5,20	1,59	1,16	0,83	92758	9,493	572,3

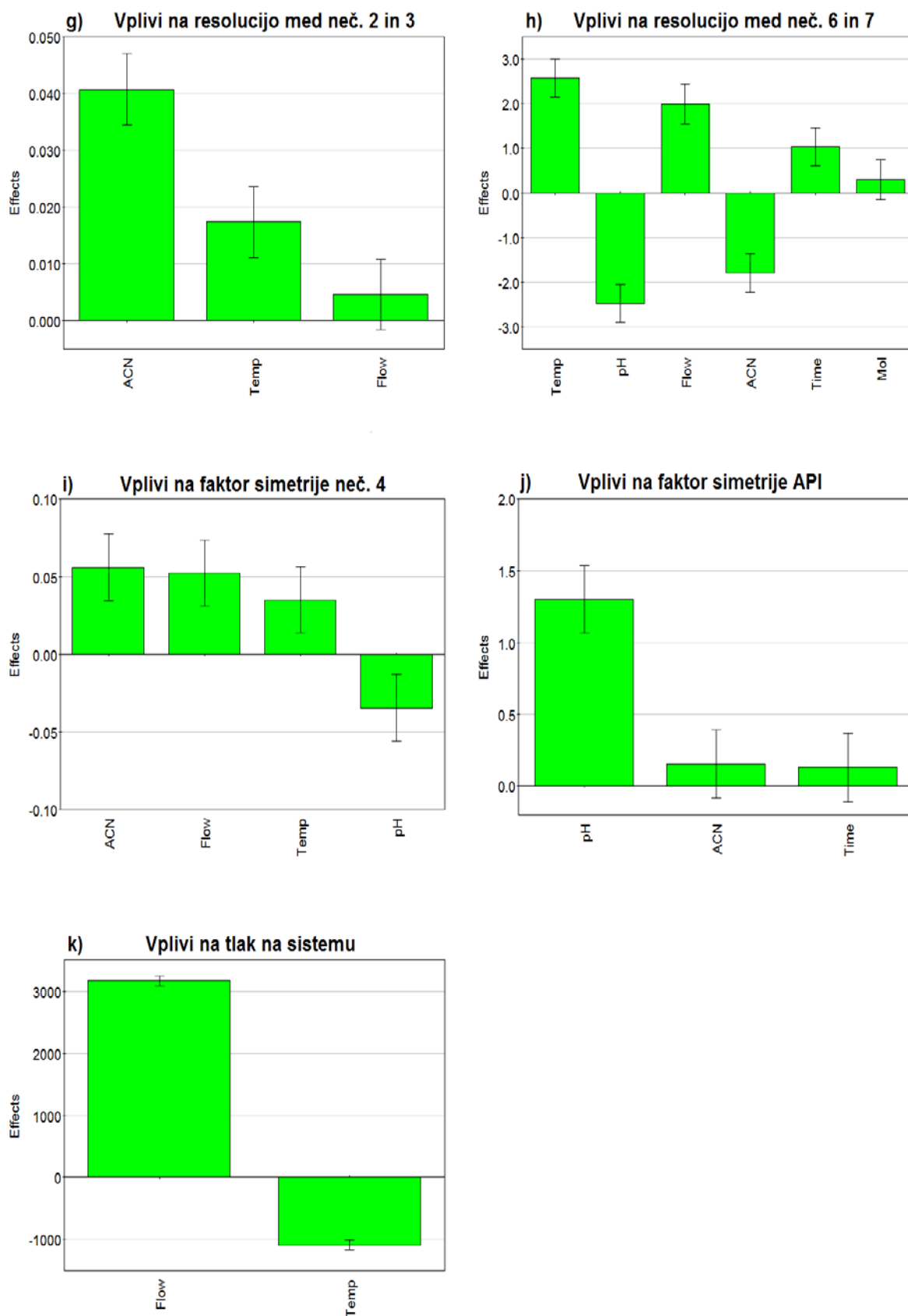
Rezultati posnetih kromatogramov analita z dodanimi nečistotami so zbrani v preglednici X. Rdeče so obarvane vrednosti, ki so sicer izven željenega območja, zastavljenega v preglednici VII, vendar še vedno predmet nadaljnje statistične obravnave. V stolpcu namenjenemu za ovrednotenje resolucije med vrhovoma nečistot 6 in 7, se nekajkrat pojavi polje, kjer je namesto številčnega rezultata zapisano *n.d.* To pomeni, da v teh primerih resolucije med vrhovoma tega para nečistot ni bilo mogoče številčno določiti, ker sta bila vrhova prekrita. Te meritve smo izločili iz nadaljnje statistične obdelave. Prav tako ima v tem stolpcu ena od vrednosti znak *, kar pomeni, da sta se retencijska časa vrhov obeh nečistot zamenjala, oziroma, da se je sicer sedma nečistota eluirala iz kolone prej kot šesta. Iz rezultatov pod zaporednimi številkami 17, 18 in 19, ki so bili izvajani kot kontrolni s parametri izhodiščne metode pri enakih pogojih, je mogoče zaslediti, da se vrednosti

opazovanih odzivov ne razlikujejo bistveno. Pridobljene informacije so nam potrdile, da je uporabljen sistem stabilen, da ne variira več, kot smo pričakovali, in da so pridobljeni rezultati zanesljivi.

Kljub temu, da smo spremljali veliko odzivov, so za nas najpomembnejši trije in sicer resolucija med parom vrhov nečistot 6 in 7, ki je bila v izhodiščni metodi najbolj kritična, med parom vrhov nečistote 7 in API ter število podov API. Vsi omenjeni odzivi naj bi bili številčno čim večji.

S pomočjo računalniškega programa Umetrics Modde 9.1 smo dobljene rezultate obdelali z uporabo PLS algoritma za prilagajanje in postavili statistični model delovnega območja analitske metode. Prav tako smo določili faktorje, ki najbolj vplivajo na posamezen odziv.

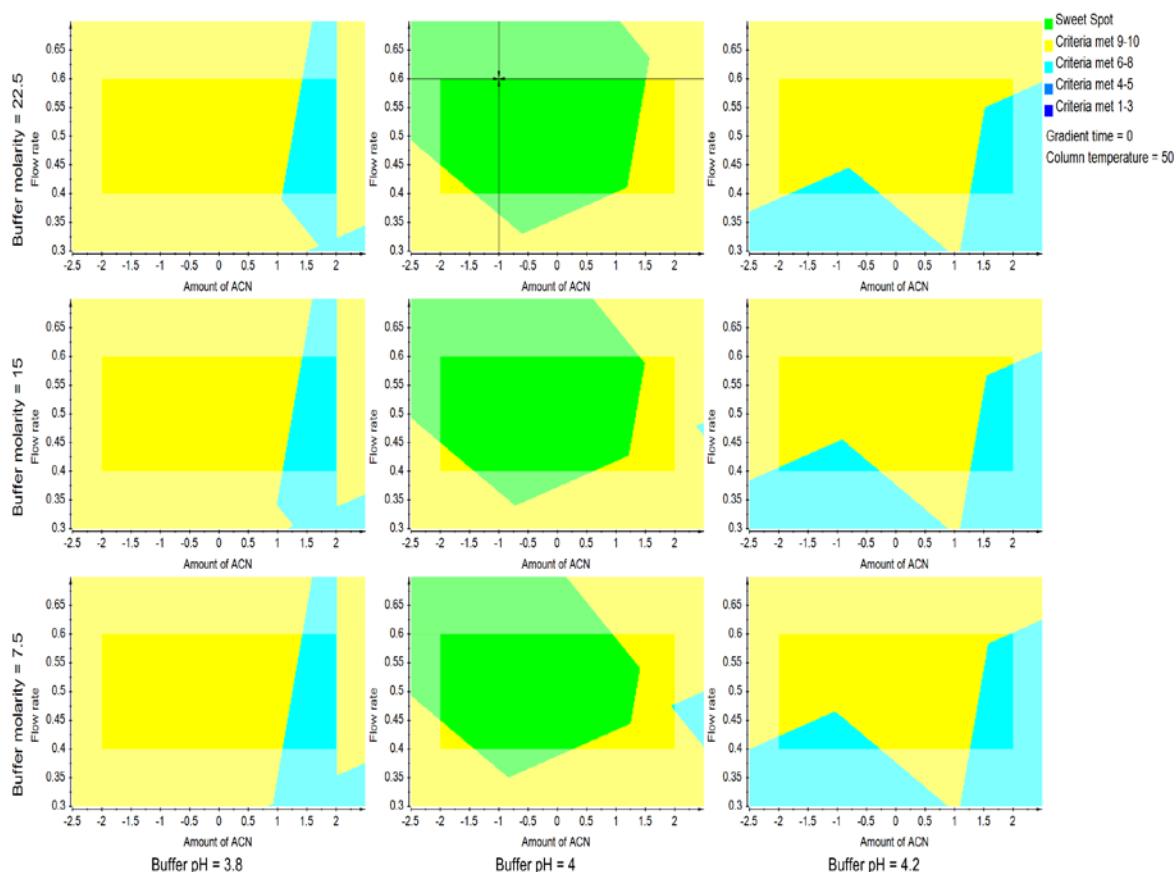




Slike 9 a - k: Vplivi posameznih izbranih faktorjev na spremljane odzive delnega dvonivojskega faktorskega načrta

Slike 9 a – k prikazujejo vplive posameznih izbranih faktorjev delnega dvonivojskega faktorskega načrta na spremljane odzive sistema. Na podlagi tako obdelanih rezultatov lahko sklepamo, da:

- ima na retencijski faktor nečistote 1 (k') največji vpliv delež ACN v mobilni fazi, kar prikazuje slika 9 a,
- prav tako ima delež ACN v mobilni fazi prevladujoč vpliv tudi na resolucijo med vrhoma prve in druge nečistote, precej manj, a v enaki meri pa nanjo vplivata tudi pretok mobilne faze in temperatura kolone, kar prikazuje slika 9 b,
- na resolucijo med vrhoma nečistote 7 in API ima prevladujoč vpliv pH pufra, sledi pa časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 9 c,
- na simetričnost vrha nečistote 2 imata skoraj enak vpliv delež ACN v mobilni fazi in temperatura kolone, kar prikazuje slika 9 d,
- število podov API je odvisno predvsem od pH pufra in deleža ACN v mobilni fazi, nekaj malega pa nanj vplivata še pretok mobilne faze in molarnost pufra, kar prikazuje slika 9 e,
- na retencijski čas API največ vpliva delež ACN v mobilni fazi, v medsebojno približno enakih, a manjših merah pa tudi pretok mobilne faze, pH pufra in časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 9 f,
- na resolucijo med vrhoma druge in tretje nečistote ima največji vpliv delež ACN, ki je približno enkrat večji kot vpliv temperature kolone, kar prikazuje slika 9 g,
- največ po prispevku približno podobnih vplivov zasledimo pri resoluciji med vrhoma šeste in sedme nečistote, ki je odvisna od temperature kolone, pH pufra, pretoka mobilne faze in deleža ACN v mobilni fazi, nezanemarljiv pa je tudi vpliv časovnega poteka gradienta, kar prikazuje slika 9 h,
- podobno velja za vplive na simetričnost vrha nečistote 4, le da imajo tu približno podobne deleže pretok mobilne faze, delež ACN v mobilni fazi, temperatura kolone ter pH pufra, kar prikazuje slika 9 i,
- na simetričnost vrha API največ vpliva vpliv pH pufra, v precej manjši meri pa nanj v približno enakem deležu vplivata še delež ACN v mobilni fazi in časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 9 j,
- tlak na koloni med analizo je pričakovano najbolj odvisen od pretoka mobilne faze, pomemben vpliv pa ima tudi temperatura kolone, kar prikazuje slika 9 k.



Slika 10: Prikaz idealne točke (*Sweet spot*) delnega dvonivojskega faktorskega načrta na podlagi algoritma PLS

Slika 10 grafično prikazuje delovno območje analitske metode glede na napoved modela, kjer je z barvami prikazano, koliko kriterijem v dani točki zadosti napoved izbranega modela. Abscisa os predstavlja spremembo deleža ACN, ordinatna os pa predstavlja spremembo vrednosti pretoka mobilne faze, glede na izhodiščno metodo. Stolpci predstavljajo pH pufra, vrstice pa molarost pufra uporabljenega za mobilno fazo A.

Barve predstavljajo število zadoščenim kriterijem za odzive vključene v izbrani model. Zelena barva pomeni, da vsi odzivi zadostijo kriterijem, rumena, da vsi razen enega odziva zadostijo kriterijem, svetlo modra pa, da kriterijem zadosti šest do osem odzivov. S križcem je označena optimalna točka ali t.i. *sweet spot*, kot jo je predvidel program. V tej točki so glede na izbran faktorski načrt in postavljen model vrednosti izbranih faktorjev optimalne, kar prikazuje preglednica XI. Časovni potek gradienta je ostal enak izhodiščni metodi.

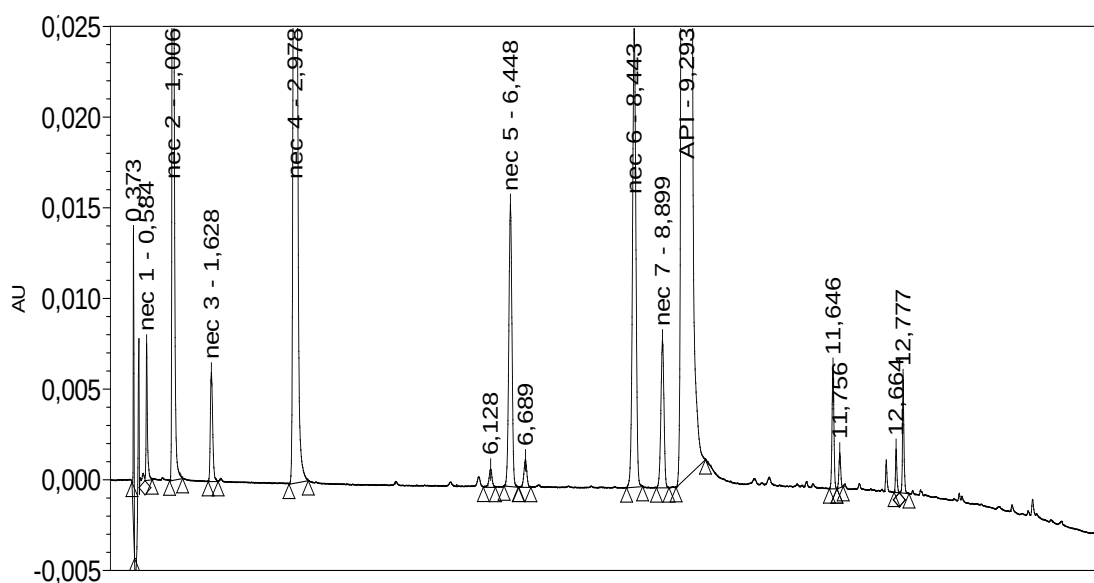
Vrednosti iz preglednice XI in XII smo nato uporabili za kreiranje metode za snemanje kromatograma, ki ga prikazuje slika 11.

Preglednica XI: Vrednosti faktorjev za analitsko metodo, optimizirano z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom, na podlagi slike 10

Ime faktorja	Vrednost
Delež ACN	-1%
Gradient	0
pH pufra	4,0
Molarnost pufra	22,5 mM
Temperatura kolone	50°C
Pretok	0,6 mL/min

Preglednica XII: Časovni potek gradienta metode, kot ga dobimo glede na idealno točko delnega dvonivojskega faktorskega načrta na podlagi algoritma PLS

Čas (min)	% A	% B
0	86	14
10	71	29
16	21	79
16,5	86	14



E	Name	Retention Time (min)	K Prime	USP Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1		0,373	-0,00		1,47	4111
2	nec 1	0,584	0,57	7,41	1,63	4853
3	nec 2	1,006	1,70	9,24	1,59	5321
4	nec 3	1,628	3,36	10,05	1,27	9432
5	nec 4	2,978	6,99	17,01	1,14	17432
6	nec 5	6,448	16,29	37,41	0,98	78164
7	nec 6	8,443	21,64	20,45	0,98	115758
8	nec 7	8,899	22,86	4,70	0,95	153921
9	API	9,293	23,91	3,76	0,92	104524

Slika 11: Kromatogram in rezultati, dobljeni pri optimiziranih vrednostih faktorjev po optimizaciji izhodiščne analitske metode z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom

4.1.5. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov

Preglednica XIII: Eksperimentalne vrednosti pri optimalnih pogojih, glede na postavljeni model, smo primerjali z napovedjo modela. Prikazuje zgornji in spodnji interval zaupanja (95%), izmerjene vrednosti spremljanih odzivov, ter izračunano razliko med napovedanimi in eksperimentalno dobljenimi vrednostmi izraženo v %

Spremljani odzivi	Napoved modela	Spodnji interval zaupanja	Zgornji interval zaupanja	Izmerjena vrednost	Razlika med napovedano in izmerjeno	Napaka napovedi (%)
Retencijski faktor neč. 1	0,56	0,55	0,57	0,57	-0,01	-1,75
Resolucija med neč. 1 in 2	9,36	9,04	9,72	9,24	0,12	1,30
Resolucija med neč. 2 in 3	10,09	9,74	10,45	10,05	0,04	0,40
Resolucija med neč. 6 in 7	4,85	4,46	5,24	4,70	0,15	3,19
Resolucija med neč. 7 in API	4,62	4,27	4,94	3,76	0,86	22,87
Simetričnost vrha neč. 2	1,56	1,50	1,62	1,59	-0,03	-1,89
Simetričnost vrha neč. 4	1,18	1,16	1,19	1,14	0,04	3,51
Simetričnost vrha API	0,99	0,92	1,06	0,92	0,07	7,61
Število podov API	87515	64680	118411	104524	-17009	-16,27
Retencijski čas API	9,37	9,20	9,54	9,29	0,08	0,86
Maksimalni tlak	645,2	640,5	650,0	670,7	-25,5	-3,80

Napoved modela je izračunana za idealno točko, ki smo jo določili po obdelavi delnega dvonivojskega faktorskega načrta na sliki 10, pri vrednostih faktorjev v preglednici XI in časovnem poteku gradienta metode iz preglednice XII. Kromatogram posnet pri kromatografskih pogojih idelane točke je prikazan na sliki 11. Ta točka ni sestavni del začetnega delnega eksperimentalnega načrta, zato lahko v tej točki neodvisno preverimo stopnjo ujemanja med napovedjo modela in eksperimentalno dobljenimi rezultati.

Napaka napovedi v % iz preglednice XIII nam pove, koliko se dejansko razlikujeta vrednosti napovedi programa za določen odziv in dejansko izmerjena vrednost, kot ga prikazuje slika 11 idealne točke delnega dvonivojskega faktorskega načrta na podlagi algoritma PLS, ter glede na vrednosti faktorjev za snemanje kromatograma po preglednici XI in časovnem poteku gradienta metode iz preglednice XII. V večini primerov vidimo, da je razlika pod 7%, kar pomeni, da je ujemanje napovedane in izmerjene vrednosti zelo dobro, in hkrati, da je bila napoved odzivov z uporabljenim programom precej natančna.

Nekoliko slabši sta bili napovedi števila podov API, kjer je bila napoved manjša, dejansko izmerjena vrednost pa večja. Pri napovedi resolucije med vrhovoma nečistote 7 in API pa je bilo ravno obratno, torej je bila napovedana vrednost večja kot izmerjena, vseeno pa je rezultat izmerjene vrednosti še vedno ustrezal kriterijem za ta odziv.

4.2. Optimizacija izhodišče metode s Plackett-Burman-ovim faktorskim načrtom

Da so naši rezultati, dobljeni po delnem dvonivojskem faktorskem načrtu pravilni in primerljivi, pa smo se nato s čim manj dela in čim manj izvedenimi poskusi želeli še nedvoumno prepričati. Zato smo se odločili, da uporabimo za optimizacijo metode še Plackett-Burman-ov faktorski načrt. Ta nam omogoča, da z minimalnim številom, v našem primeru s samo enajstimi poskusi, pridobimo nove, oziroma potrdimo predhodno pridobljene rezultate. Izbrani faktorji, uporabljeni za faktorski načrt po Plackett-Burman-u in območje, v katerem smo jih spreminjali so enaki tistim, ki smo jih uporabili pri delnem dvonivojskem faktorskem načrtu in so navedeni v preglednici VI.

Kot odzive smo spremljali iste parametre, kot pri optimizaciji z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom. Prikazani so v preglednici VII.

4.2.1. Priprava načrta poskusov po Plackett-Burman-u

Po vnosu faktorjev in njihovih nivojev v program je le-ta izdelal načrt poskusov, za katerega smo menili, da je dober, zato smo ga sklenili uporabiti. Iz načrta je izhajalo, da moramo za pridobitev kakovostnih rezultatov opraviti osem poskusov, ki so mešanica različnih kombinacij izbranih faktorjev in njihovih nivojev. Tako kot pri prvem eksperimentalnem načrtu, smo za kontrolo delovanja sistema tudi tu izvedli še tri poskuse pri pogojih izhodiščne metode, kar skupaj pomeni enajst poskusov. Tudi v tem primeru je priporočljivo, da se poskusi izvajajo v naključnem (randomiziranem) vrstnem redu, ki ga določi program ter, da se v vsak naslednji izveden poskus vnese čim več možnih razlik glede določenih nivojev faktorjev in s tem posledično zmanjša možnost sistemskih napak. Matriko faktorskega načrta po Plackett-Burman-u generiranega s pomočjo programa Umetrics Modde 9.1 prikazuje preglednica XIV.

Preglednica XIV: Matrika faktorskega načrta po Plackett-Burman-u

Številka poskusa	Vrstni red poskusa	ACN (%)	Gradient	pH	Mol (mM)	T (°C)	Pretok (mL/min)
1	5	2	-1	3,8	22,5	40	0,6
2	2	2	1	3,8	7,5	50	0,4
3	10	2	1	4,2	7,5	40	0,6
4	9	-2	1	4,2	22,5	40	0,4
5	8	2	-1	4,2	22,5	50	0,4
6	1	-2	1	3,8	22,5	50	0,6
7	7	-2	-1	4,2	7,5	50	0,6
8	4	-2	-1	3,8	7,5	40	0,4
9	3	0	0	4	15	45	0,5
10	11	0	0	4	15	45	0,5
11	6	0	0	4	15	45	0,5

Priprava UPLC sistema in instrumentalnih metod

Tudi v tem primeru je sledila je priprava UPLC sistema z vsemi predvidenimi raztopinami, ter pritrditev kolone. V programu Empower Pro 3, smo v skladu z matriko eksperimentalnega načrta, prikazanega v preglednici XIV, generirali devet instrumentalnih metod, ter z njimi posneli kromatograme raztopine analita z dodanimi nečistotami.

4.2.2. Rezultati modela in razprava

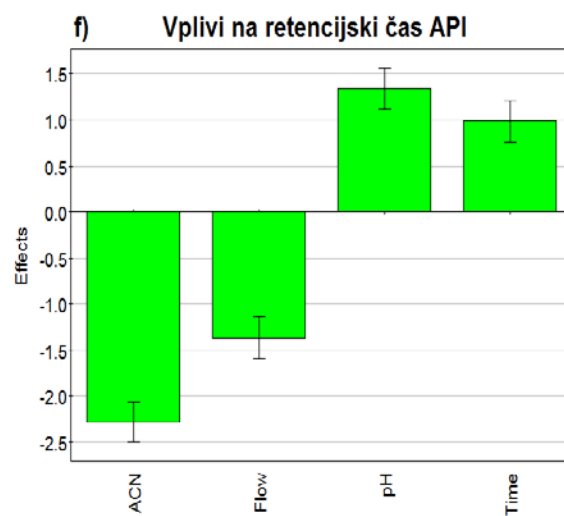
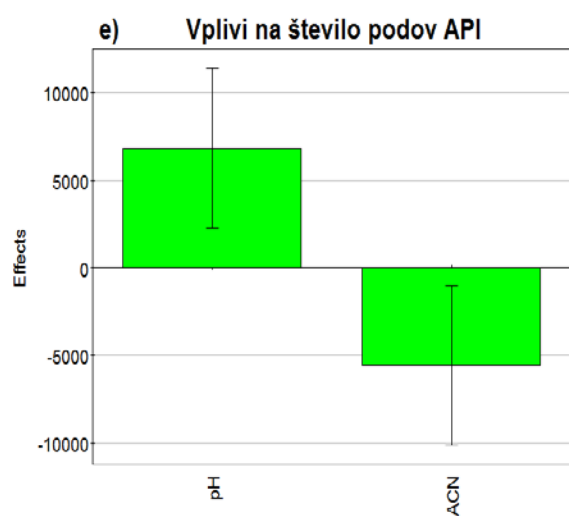
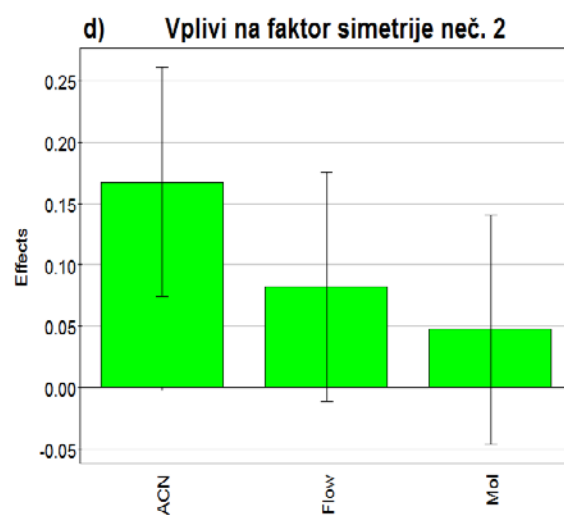
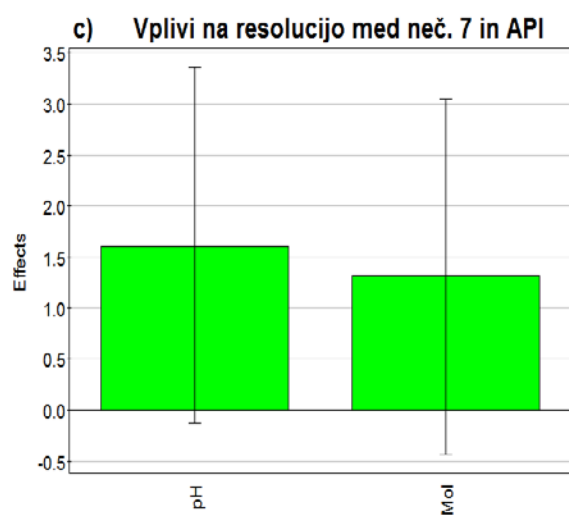
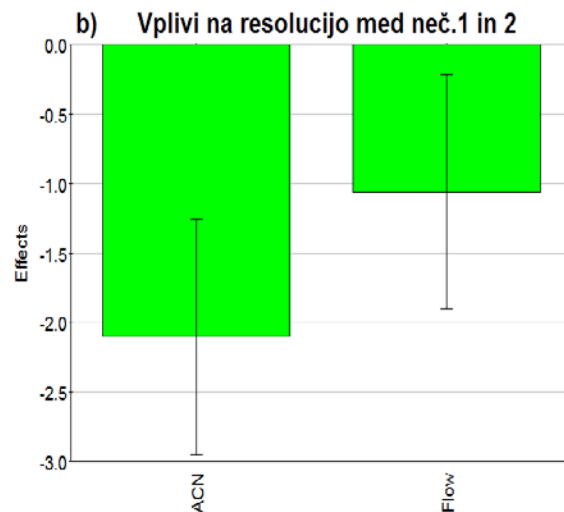
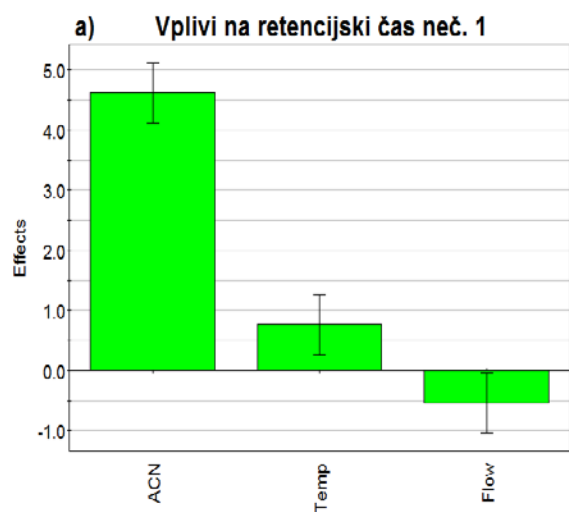
Preglednica XV: Rezultati načrta poskusov po Plackett-Burman-u

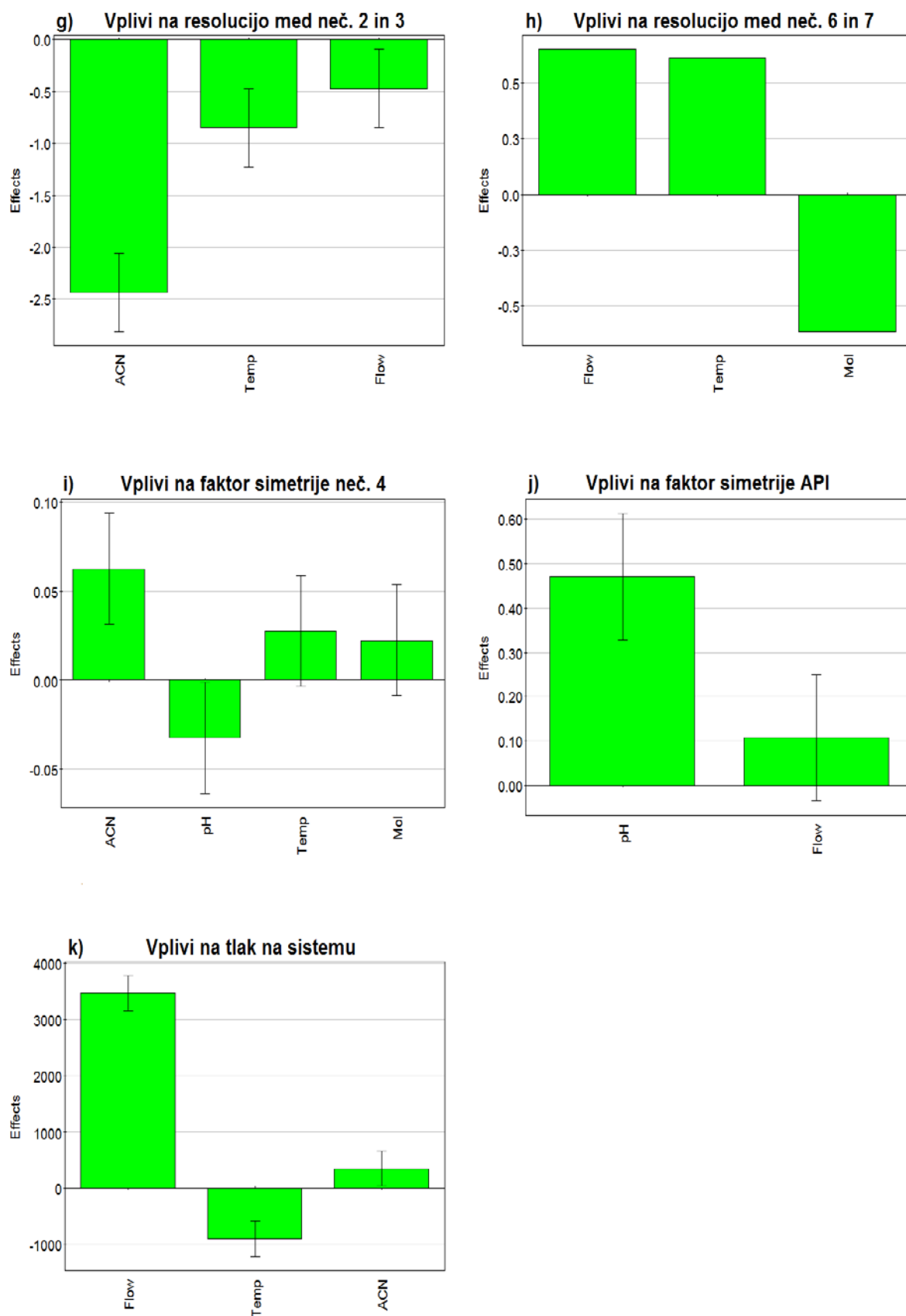
Številka poskusa	k'1	Rs _{1,2}	Rs _{2,3}	Rs _{6,7}	Rs _{7,API}	T ₂	T ₄	T _{API}	N _{API}	Rt _{API}	P
1	0,40	5,23	7,84	2,04	3,04	1,80	1,26	1,88	32946	6,642	758,1
2	0,36	7,02	7,46	2,62	2,19	1,71	1,25	2,94	23008	8,747	450,6
3	0,39	7,04	7,89	n.d.	5,33	1,69	1,18	0,85	65904	8,901	748,8
4	0,65	9,18	10,56	n.d.	4,48	1,53	1,15	1,12	352375	12,620	480,1
5	0,36	7,23	7,52	n.d.	6,21	1,70	1,24	0,75	71711	9,192	453,7
6	0,63	8,49	9,47	n.d.	6,26	1,63	1,20	1,77	43916	9,750	667,6
7	0,62	7,84	9,43	3,21	4,58	1,61	1,17	0,80	186286	10,014	667,5
8	0,66	9,42	10,99	n.d.	2,66	1,46	1,16	2,58	52756	10,226	501,3
9	0,47	7,65	8,39	2,60	4,67	1,76	1,22	1,12	86403	9,595	563,3
10	0,49	8,08	8,96	1,96	4,72	1,64	1,17	1,06	81320	9,636	592,5
11	0,49	8,02	9,01	2,12	4,83	1,69	1,20	1,06	84515	9,637	601,8

Rezultati posnetih kromatogramov analita z dodanimi nečistotami so zbrani tabeli XV. Rdeče so obarvane vrednosti, ki so sicer izven željenega območja, zastavljenega v preglednici VII, vendar še vedno predmet nadaljnje obravnave. Kot pri prejšnjem eksperimentalnem načrtu, se tudi tu v stolpcu, namenjenem za ovrednotenje resolucije med vrhovoma nečistot 6 in 7, nekajkrat pojavi polje, kjer je namesto številčnega rezultata zapisano *n.d.* To pomeni, da v teh primerih resolucije med vrhovoma tega para nečistot ni bilo mogoče številčno določiti, ker sta bila vrhova prekrita. Te meritve smo izločili iz nadaljnje statistične obdelave. Iz rezultatov pod zaporednimi številkami 9, 10 in 11, ki so bili v centralni točki izvajani kot kontrolni s parametri izhodiščne metode pri enakih pogojih je mogoče zaslediti, da se vrednosti opazovanih odzivov ne razlikujejo bistveno.

Pridobljene informacije so nam potrdile, da je naš sistem stabilen, da ne variira več, kot smo pričakovali, in da so pridobljeni rezultati zanesljivi.

S pomočjo računalniškega programa Umetrics Modde 9.1 smo dobljene rezultate obdelali s pomočjo PLS algoritma za prilagajanje in postavili statistični model delovnega območja analitske metode.

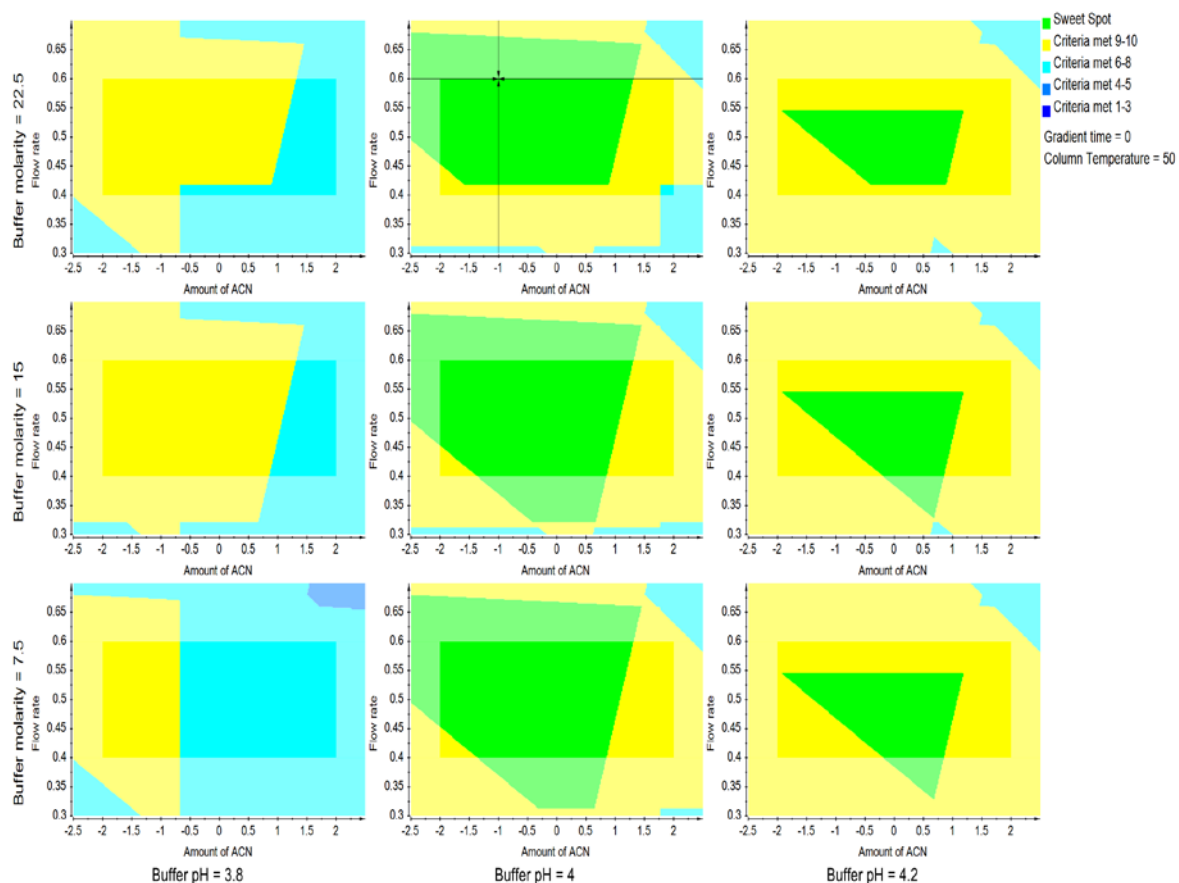




Slike 12 a - k : Vplivi posameznih izbranih faktorjev na spremljane odzive načrta poskusov po Plackett-Burman-u

Slike 12 a - k prikazujejo vplive posameznih izbranih faktorjev na spremljane odzive načrta poskusov po Plackett-Burman-u. Na podlagi tako obdelanih rezultatov lahko sklepamo, da:

- ima na retencijski faktor nečistote 1 (k') največji vpliv delež ACN v mobilni fazi, kar prikazuje slika 12 a,
- prav tako ima delež ACN v mobilni fazi prevladujoč vpliv na resolucijo med vrhoma prve in druge nečistote, precej manj pa nanjo vpliva pretok mobilne faze, kar prikazuje slika 12 b,
- na resolucijo med vrhoma nečistote 7 in API imata pH in molarnost pufra približno enak vpliv, kar prikazuje slika 12 c,
- na simetričnost vrha nečistote 2 ima prevladujoč vpliv delež ACN v mobilni fazi, polovico manjšega pa pretok mobilne faze in molarnost pufra, kar prikazuje slika 17 d,
- na število podov API v enaki meri vplivata pH pufra in delež ACN v mobilni fazi, kar prikazuje slika 12 e,
- na retencijski čas API največ vpliva delež ACN v mobilni fazi, v medsebojno približno enakih, a manjših merah pa tudi pretok mobilne faze, pH pufra in časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 12 f,
- na resolucijo med vrhoma druge in tretje nečistote ima največji vpliv delež ACN, ki je približno enkrat večji od vpliva temperature kolone, kar prikazuje slika 12 g,
- največ po prispevku približno podobnih vplivov zasledimo pri resoluciji med vrhoma šeste in sedme nečistote, ki je odvisna od temperature kolone, pretoka mobilne faze in molarnost pufra, kar prikazuje slika 12 h,
- na simetričnost vrha nečistote 4 ima največji vpliv delež ACN v mobilni fazi, polovico manjše, vendar približno enake deleže pa imajo temperatura kolone ter pH in molarnost pufra, kar prikazuje slika 12 i,
- na simetričnost vrha API ima prevladujoč vpliv pH pufra, v precej manjši meri pa nanj vpliva še pretok mobilne faze, kar prikazuje slika 12 j,
- tlak na koloni med analizo je pričakovano najbolj odvisen od pretoka mobilne faze, v zelo majhni meri pa nanj vpliva še temperatura kolone, kar prikazuje slika 12 k.



Slika 13: Prikaz idealne točke (*Sweet spot*) načrta poskusov po Plackett-Burman-u na podlagi algoritma PLS

Na sliki 13 gre za grafični prikaz delovnega območja analitske metode glede na napoved modela, kjer je z barvami prikazano, koliko kriterijem v dani točki zadosti napoved izbranega modela.

Pomen barv, abscisne in ordinatne osi, ter stolpcev in vrstic je razložen pod sliko 10. Časovni potek gradienta je ostal enak izhodiščni metodi.

Preglednica XVI: Optimizirane vrednosti faktorjev analitske metode, pridobljene s Plackett-Burman-ovim načrtom poskusov, na podlagi slike 13

Ime faktorja	Vrednost
Delež ACN	-1%
Gradient	0
pH pufra	4,0
Molarnost pufra	22,5 mM
Temperatura kolone	50°C
Pretok	0,6 mL/min

Preglednica XVII: Časovni potek gradienta metode, kot ga dobimo glede na idealno točko načrta poskusov po Plackett-Burman-u na podlagi algoritma PLS

Čas (min)	% A	% B
0	86	14
10	71	29
16	21	79
16,5	86	14

Po optimizaciji metode z načrtom poskusov po Plackett-Burman-u smo dobili popolnoma enake rezultate kot pri optimizaciji metode z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom. To je razvidno iz primerjave preglednic XI in XVI za vrednosti faktorjev, ter preglednic XII in XVII za časovni potek gradienta metode. Kromatogram v tej točki smo že posneli, prikazuje ga slika 11. Lahko vidimo, da sta sliki 10 in 13, ki prikazujeta delovno območje metode in optimalno točko po obeh načrtih zelo podobni. Na podlagi tega lahko rečemo, da so bili začetni poskusi in njihovi rezultati, ki smo jih izvedli pravilni, ter, da smo z obema načrtoma dobili skoraj povsem enake signifikantne vplive na spremljane odzive. Lahko tudi zaključimo, da sta postavljena modela delovnega območja metode zelo podobna, ter, da je območje, kjer vsi odzivi zadostijo kriterijem zelo podobno. Iz povedanega sledi, da smo z obema načrtoma poskusov prišli do enakih zaključkov.

To pomeni, da smo rezultate dvonivojskega delnega faktorskega načrta potrdili z načrtom poskusov po Plackett-Burman-u s skoraj polovico manj izvedenimi poskusi ter, da se lahko lotimo še podrobnejše analize optimiranja ključnih vplivnih faktorjev z uporabo delnega večnivojskega faktorskega načrta D-optimal.

4.2.3. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov

Preglednica XVIII: Eksperimentalne vrednosti pri optimalnih pogojih, glede na postavljeni model, smo primerjali z napovedjo modela. Prikazuje zgornji in spodnji interval zaupanja (95%), izmerjene vrednosti spremljanih odzivov, ter izračunano razliko med napovedanimi in eksperimentalno dobljenimi vrednostmi izraženo v %

Spremljani odzivi	Napoved modela	Spodnji interval zaupanja	Zgornji interval zaupanja	Izmerjena vrednost	Razlika med napovedano in izmerjeno	Napaka napovedi (%)
Retencijski faktor neč. 1	0,53	0,50	0,56	0,57	-0,04	-7,01
Resolucija med neč. 1 in 2	7,74	7,15	8,33	9,24	-1,50	-16,23
Resolucija med neč. 2 in 3	8,81	8,48	9,14	10,05	-1,24	-12,34
Resolucija med neč. 6 in 7	2,59	2,37	2,82	4,70	-2,11	-44,89
Resolucija med neč. 7 in API	5,11	3,96	6,25	3,76	1,35	35,90
Simetričnost vrha neč. 2	1,68	1,60	1,76	1,59	0,09	5,66
Simetričnost vrha neč. 4	1,21	1,18	1,24	1,14	0,07	6,14
Simetričnost vrha API	1,11	0,95	1,33	0,92	0,19	20,65
Število podov API	117192	76328	161681	104524	12668	12,12
Retencijski čas API	9,43	9,27	9,58	9,29	0,14	1,51
Maksimalni tlak	672,1	653,7	690,5	670,7	1,40	0,21

Napaka napovedi modela v % iz preglednice XVIII je izračunana za idealno točko, ki smo jo določili po obdelavi načrta poskusov po Plackett-Burman-u na sliki 13, pri vrednostih faktorjev iz preglednice XVI in časovnem poteku gradienta metode iz preglednice XVII. Kromatogram posnet pri kromatografskih pogojih idelane točke prikazuje slika 11. Tako kot pri prejšnjem eksperimentalnem načrtu, tudi tukaj idealna točka ni sestavni del začetnega Plackett-Burman-ovega načrta. Zato lahko v tej točki neodvisno preverimo stopnjo ujemanja med napovedjo modela in eksperimentalno dobljenimi rezultati.

V večini primerov vidimo, da je napoved tega načrta slabša kot je bila napoved delnega dvonivojskega faktorskega načrta. Nekoliko boljši sta bili le napovedi števila podov API in maksimalnega tlaka na sistemu. To je po našem mnenju lahko posledica manjšega števila opravljenih poskusov, kar posledično pomeni tudi slabše pokrito delovno območje analitske metode.

4.3. Optimizacija izhodiščne metode z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom

4.3.1. Faktorji

Ko smo preučili rezultate, pridobljene po prvem koraku optimizacije izhodiščne metode, kjer smo faktorje v bistvu samo reševali oziroma iskali, kateri od njih so najbolj pomembni, smo se, da bi dobili še bolj natančno informacijo o vplivu ključnih vplivnih faktorjev, optimiranja le teh lotili še z uporabo delnega večnivojskega faktorskega načrta. Po razmisleku smo se odločili za uporabo treh faktorjev, prikazanih v preglednici XIX. Ti so se v prvem koraku optimizacije izkazali kot tisti, katerih spremembe najbolj vplivajo na spremembo odzivov in sicer:

- delež acetonitrila v mobilni fazi, ki smo ga spremljali v petih točkah in sicer pri -4%, -3%, -2%, -1% glede na izhodiščni gradient, ter pri gradientu izhodiščne metode,
- temperaturo kolone, ki smo jo spremljali v treh točkah in sicer pri 45°C, 50°C in 55°C,
- pretok mobilne faze skozi kolono, ki smo ga prav tako spremljali v treh točkah in sicer pri 0,50 mL/min, 0,55 mL/min in 0,60 mL/min skozi celoten gradient.

Iz rezultatov smo želeli pridobiti informacije, kako vnešene spremembe deleža organske faze, temperature kolone in pretoka mobilne faze skozi vplivajo na ločbo komponent in njihove retencijske čase.

Časovni potek gradienta in pH pufra smo ohranili enaka, kot sta bila predvidena v izhodiščni metodi, saj smo ju s predhodnima načrtoma potrdili, molarost pufra pa smo iz 15 mM povečali na 22,5 mM, kot sta to po optimizaciji predvidela oba faktorska načrta.

Kot odzive smo spremljali iste parametre, kot v prvi stopnji optimizacije. Prikazani so v preglednici VII.

Preglednica XIX: Faktorji, uporabljeni pri delnem večnivojskem D-optimalnem faktorskem načrtu

Ime faktorja	Območje
Delež ACN	od -4% do 0%
Temperatura kolone	od 45°C do 55°C
Pretok	od 0,5 mL/min do 0,6 mL/min

4.3.2. Priprava delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta poskusov

Število poskusov pri delnem večnivojskem D-optimalnem faktorskem načrtu ni vnaprej določeno (ga ne izračunamo po formuli) pač pa ga določi program. Ta na podlagi vnesenih faktorjev in njihovih nivojev, sestavi vse možne kombinacije poskusov. Nekatere poskuse, ki niso smiselni, lahko izključimo. To pa zato, ker se včasih zgodi, da program pri sestavljanju eksperimentalnega načrta navede tako kombinacijo faktorjev, za katero vemo, da v praksi takega poskusa ne moremo izvesti. Na koncu program predlaga eksperimentalni načrt, s katerim naj bi z najnižjim številom poskusov pridobili največ informacij.

Preglednica XX: Matrika delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta

Številka poskusa	Vrstni red poskusa	ACN (%)	Pretok (mL/min)	Temp (°C)
1	2	-4	0,5	45
2	8	-4	0,6	45
3	5	-3	0,55	45
4	12	-1	0,5	45
5	20	-1	0,6	45
6	11	0	0,5	45
7	6	0	0,6	45
8	18	-4	0,6	50
9	4	-3	0,5	50
10	15	0	0,55	50
11	10	-4	0,5	55
12	17	-4	0,6	55
13	13	-4	0,55	55
14	9	-3	0,6	55
15	14	-1	0,5	55
16	19	0	0,5	55
17	7	0	0,6	55
18	3	-2	0,6	50
19	16	-2	0,6	50
20	1	-2	0,6	50

Priprava UPLC sistema in instrumentalnih metod

Sledila je priprava UPLC sistema. V programu Empower Pro 3, smo v skladu z matriko eksperimentalnega načrta, prikazanega v preglednici XX, generirali osemnajst instrumentalnih metod, ter z njimi posneli kromatograme raztopine analita z dodanimi nečistotami.

4.3.3. Rezultati modela in razprava

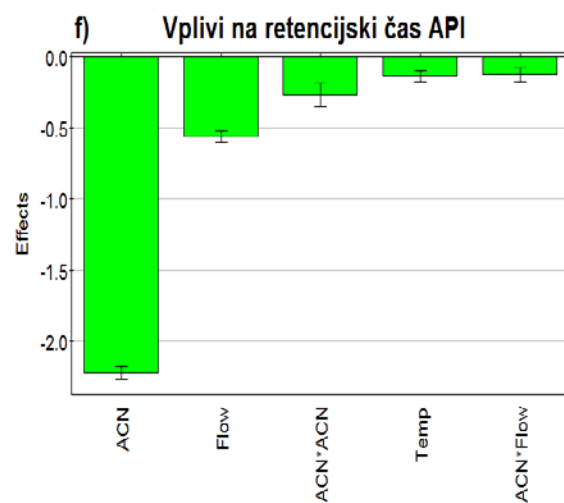
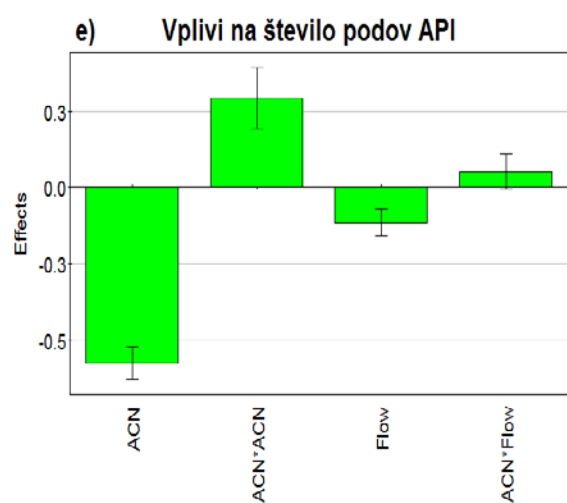
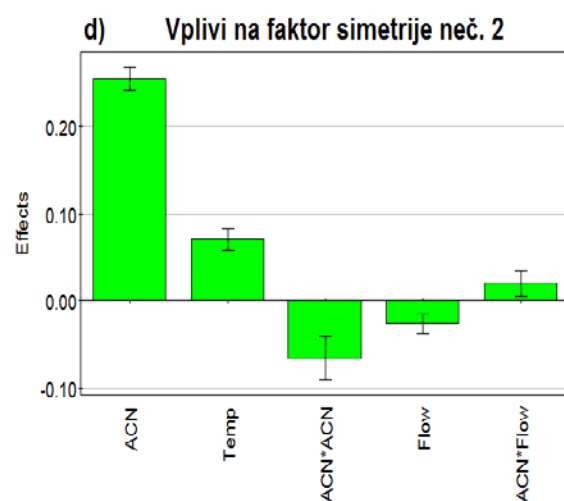
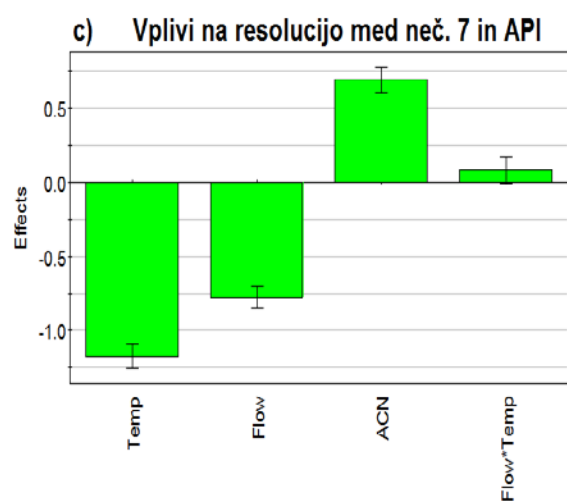
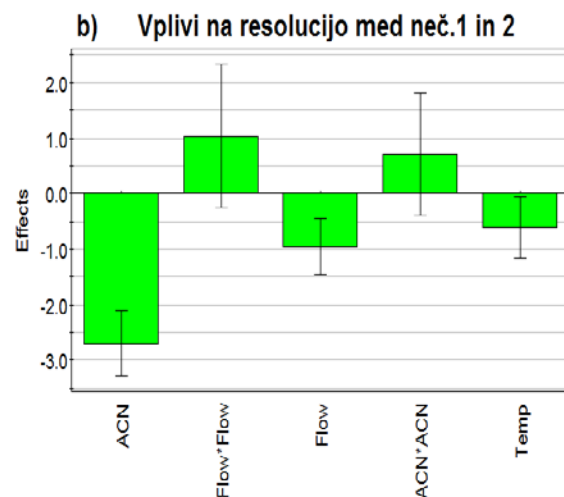
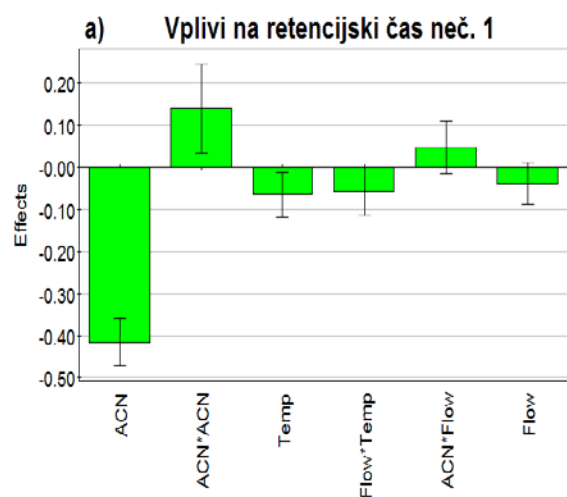
Preglednica XXI: Rezultati delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta

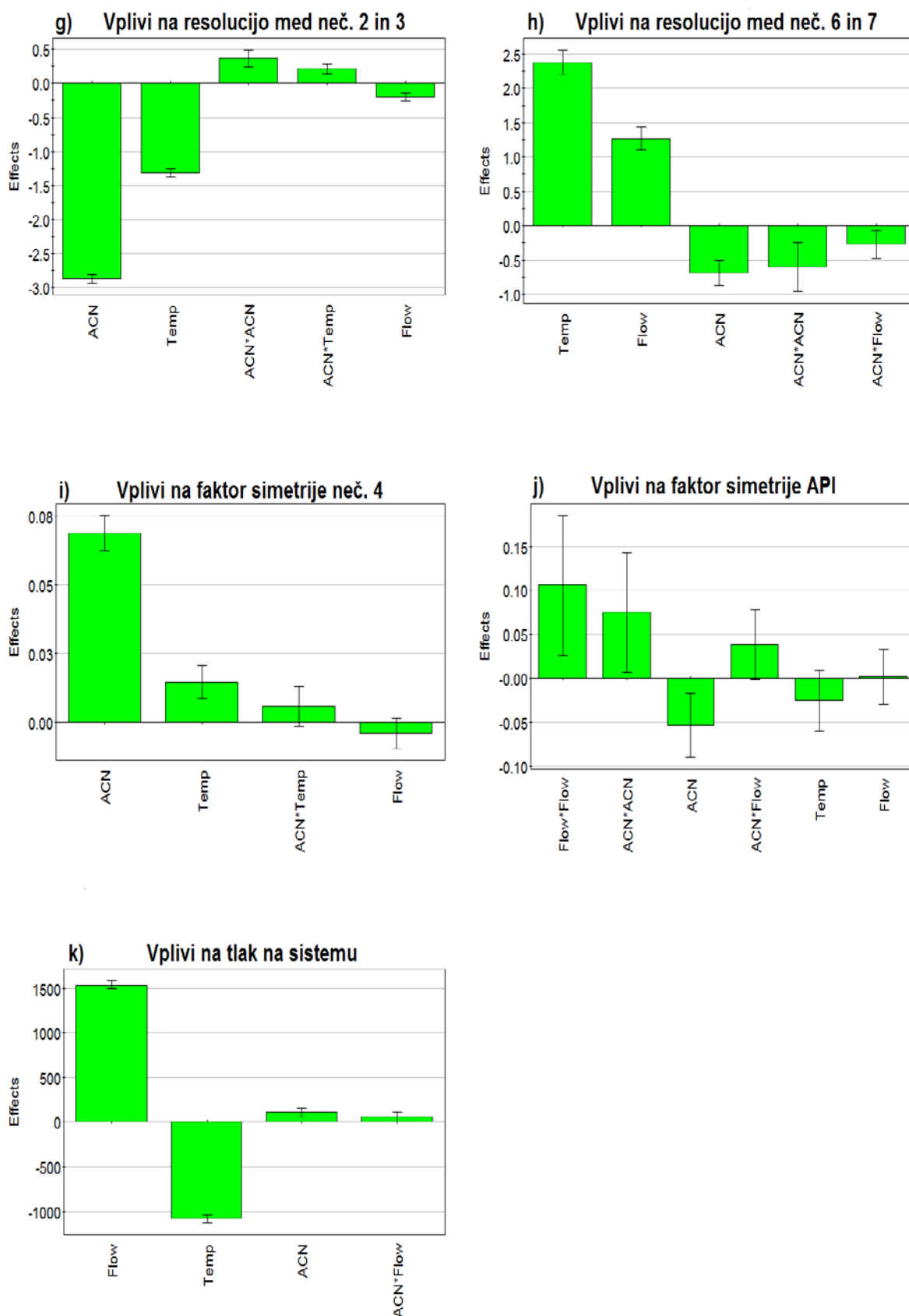
Številka poskusa	k'1	RS _{1,2}	RS _{2,3}	RS _{6,7}	RS _{7,API}	T ₂	T ₄	T _{API}	N _{API}	Rt _{API}	P
1	0,91	10,66	12,00	2,56	4,10	1,42	1,12	1,27	364574	11,562	588,5
2	0,91	8,95	11,74	4,10	3,36	1,38	1,10	1,08	280864	11,179	697,3
3	0,77	8,32	10,95	3,69	3,96	1,50	1,13	0,85	212044	11,004	644,1
4	0,56	8,48	9,50	1,96	5,05	1,63	1,17	0,94	102554	9,564	593,3
5	0,57	8,19	9,23	3,17	4,29	1,65	1,17	0,92	95978	8,940	704,2
6	0,49	8,00	8,94	2,21	4,94	1,64	1,17	0,88	89273	9,542	593,5
7	0,49	6,56	8,67	3,37	4,03	1,65	1,17	0,98	81112	8,873	704,3
8	0,86	9,72	11,09	5,58	2,91	1,41	1,11	0,92	273733	11,133	653,3
9	0,72	9,25	10,37	4,33	3,75	1,55	1,13	0,88	247208	11,193	551,8
10	0,47	6,36	8,19	4,05	3,90	1,70	1,19	0,87	85609	9,106	607,6
11	1,00	9,31	10,43	5,01	3,02	1,49	1,12	1,06	335514	11,483	517,0
12	0,80	9,16	10,25	6,81	2,20	1,45	1,12	0,99	258580	11,064	615,2
13	0,81	9,30	10,34	5,74	2,73	1,46	1,12	0,88	297536	11,278	566,5
14	0,55	8,51	9,47	6,53	2,39	1,54	1,14	0,93	125143	10,591	618,7
15	0,51	7,65	8,30	4,98	3,44	1,69	1,17	0,88	96413	9,991	519,6
16	0,45	7,21	7,75	4,66	3,59	1,74	1,20	0,92	86948	9,362	520,8
17	0,45	6,05	7,67	5,64	3,00	1,72	1,19	0,89	82360	8,716	632,3
18	0,62	7,11	9,42	5,22	3,13	1,58	1,15	0,94	100315	10,052	659,6
19	0,62	7,14	9,37	5,25	3,11	1,59	1,15	0,95	100074	10,047	656,7
20	0,63	7,26	9,66	5,02	3,22	1,56	1,14	0,92	100850	10,069	676,9

Rezultati so zbrani v preglednici XXI. Takoj lahko opazimo, da se tu glede na delni dvonivojski faktorski in Plackett-Burman-ov načrt, v stolpcu namenjenem za ovrednotenje resolucije med vrhovoma nečistot 6 in 7, ne pojavljata več polji z rezultatom *n.d.* in *. Pri D-optimalnem načrtu je bila torej napoved boljša, enako pa velja tudi za rezultate. Iz rezultatov pod zaporednimi števkami 18, 19 in 20 (z vrednostmi faktorjev, ki smo jih na podlagi rezultatov podatkov prvih dveh eksperimentalnih načrtov določili sami), ki so bili kot kontrolni izvajani pri enakih pogojih je mogoče zaslediti, da se rezultati opazovanih odzivov razlikujejo še bistveno manj, kot so se pri prvih dveh poskusih optimizacije. Kljub temu, da smo spremljali veliko odzivov, so nam bili najpomembnejši trije in sicer resolucija med parom vrhov nečistot 6 in 7, ki je bila v izhodiščni metodi najbolj kritična,

med parom vrhov nečistota 7 in API ter število podov API. Vsi omenjeni odzivi naj bi bili številčno čim večji. Predvsem pri najkritičnejšem paru vrhov nečistot 6 in 7 se je to, glede na izhodiščno metodo zgodilo, kar je za nas pomenilo, da smo na pravi poti k želeni optimizaciji analitske metode.

S pomočjo računalniškega programa Umetrics Modde 9.1 smo dobljene rezultate obdelali s PLS algoritmom za prilagajanje in postavili statistični model delovnega območja analitske metode.





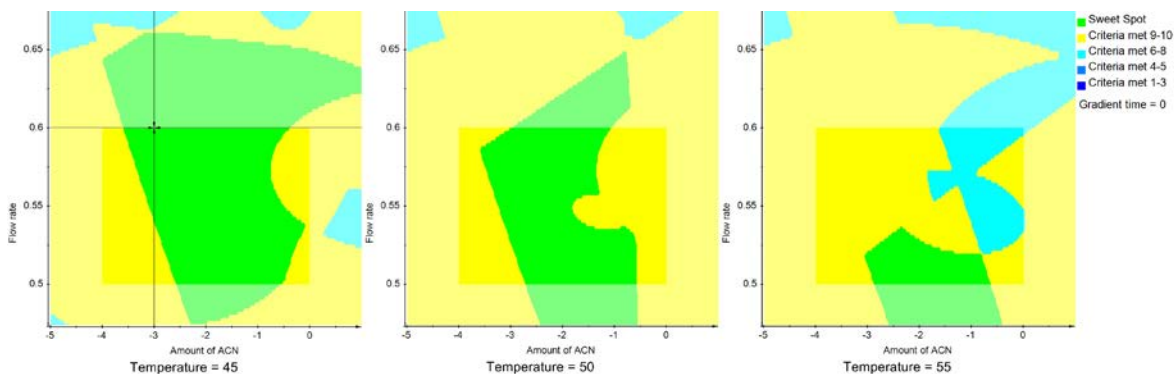
Slike 14 a - k: Vplivi posameznih izbranih faktorjev na spremljane odzive delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta

Slike 14 a - k prikazujejo vplive posameznih izbranih faktorjev na spremljane odzive delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta. Tu vidimo, da se za razliko od prejšnjih dveh eksperimentalnih načrtov, pojavljajo tudi interakcije izbranih faktorjev. Do tega pride, ker pri D-optimalnem načrtu odziv sistema ni linearna funkcija, kot je pri prejšnjih dveh, temveč je zaradi večih nivojev faktorjev kvadratna, ali pa tudi funkcija višjega reda.

Na podlagi tako obdelanih rezultatov lahko sklepamo, da:

- ima na retencijski faktor nečistote 1 (k') največji vpliv delež ACN v mobilni fazi, kar prikazuje slika 14 a,
- prav tako ima delež ACN v mobilni fazi prevladujoč vpliv tudi na resolucijo med vrhoma prve in druge nečistote, precej manj, a v enaki meri pa nanjo vplivata tudi pretok mobilne faze in temperatura kolone, kar prikazuje slika 14 b,
- na resolucijo med vrhoma nečistote 7 in API ima prevladujoč vpliv pH pufra, sledi pa časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 14 c,
- na simetričnost vrha nečistote 2 imata skoraj enak vpliv delež ACN v mobilni fazi in temperatura kolone, kar prikazuje slika 14 d,
- število podov API je odvisno predvsem od pH vrednosti pufra in deleža ACN v mobilni fazi, nekaj malega pa nanj vplivata še pretok mobilne faze in molarnost pufra, kar prikazuje slika 14 e,
- na retencijski čas API največ vpliva delež ACN v mobilni fazi, v medsebojno približno enakih, a manjših merah pa tudi pretok mobilne faze, pH pufra in časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 14 f,
- na resolucijo med vrhoma druge in tretje nečistote ima največji vpliv delež ACN, ki je približno enkrat večji kot vpliv temperature kolone, kar prikazuje slika 14 g,
- največ po prispevku približno podobnih vplivov zasledimo pri resoluciji med vrhoma šeste in sedme nečistote, ki je odvisna od temperature kolone, pH vrednosti pufra, pretoka mobilne faze in deleža ACN v mobilni fazi, nezanemarljiv pa je tudi vpliv časovnega poteka gradienta, kar prikazuje slika 14 h,
- podobno velja za vplive na simetričnost vrha nečistote 4, le da imajo tu približno enake deleže pretok mobilne faze, delež ACN v mobilni fazi, temperatura kolone ter pH pufra, kar prikazuje slika 14 i,

- na simetričnost vrha API prevladuje vpliv pH vrednosti pufra, v precej manjši meri pa nanj v približno enakem deležu vplivata še delež ACN v mobilni fazi in časovni potek gradienta, kar prikazuje slika 14 j,
- tlak na koloni med analizo je pričakovano najbolj odvisen od pretoka mobilne faze, pomemben vpliv pa ima tudi temperatura kolone, kar prikazuje slika 14 k.



Slika 15: Prikaz idealne točke delnega večnivojskega D-optimalnega faktorjskega načrta na podlagi algoritma PLS

Na sliki 15 gre za grafični prikaz delovnega območja analitske metode glede na napoved modela, kjer je z barvami prikazano, koliko kriterijem v dani točki zadosti napoved izbranega modela. Pomen barv, abscisne in ordinatne osi, ter stolpcev in vrstic je razložen pod sliko 10. Časovni potek gradienta je ostal enak izhodiščni metodi.

Vrednosti faktorjev iz preglednice XXII in XXIII smo nato uporabili za kreiranje metode za snemanje kromatograma, ki ga prikazuje slika 16.

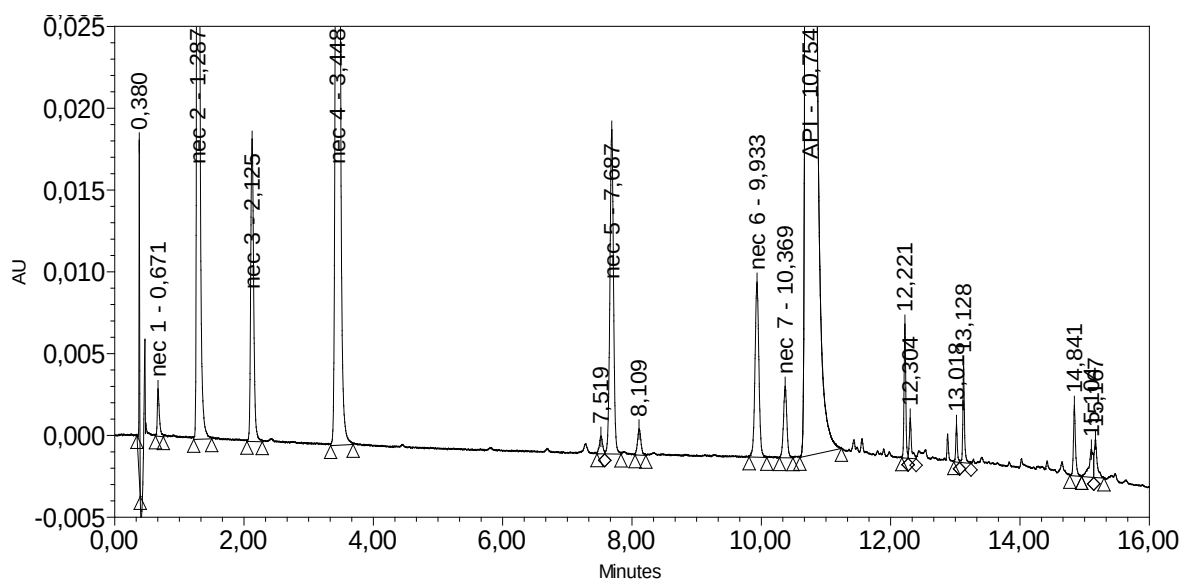
Iz slik 10, 13 in 15 lahko vidimo, da je idealno delovno območje metode pri delnem večnivojskem D-optimalnem faktorjskem načrtu v primerjavi z območjema, določenima pri delnem dvonivojskem in Plackett-Burman-ovem faktorjskem načrtu podobno, majhna razlika je le v deležu ACN v mobilni fazi in temperaturi kolone. So pa pri večnivojskem načrtu meje bolj natančno opisane, kar hkrati pomeni, da je tudi optimalna točka natančneje določena.

Preglednica XXII: Optimirane vrednosti faktorjev analitske metode, pridobljene z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom, na podlagi slike 15

Ime faktorja	Vrednost
Delež ACN	-3%
Gradient	0
pH pufra	4,0
Molarnost pufra	22,5 mM
Temperatura kolone	45°C
Pretok	0,6 mL/min

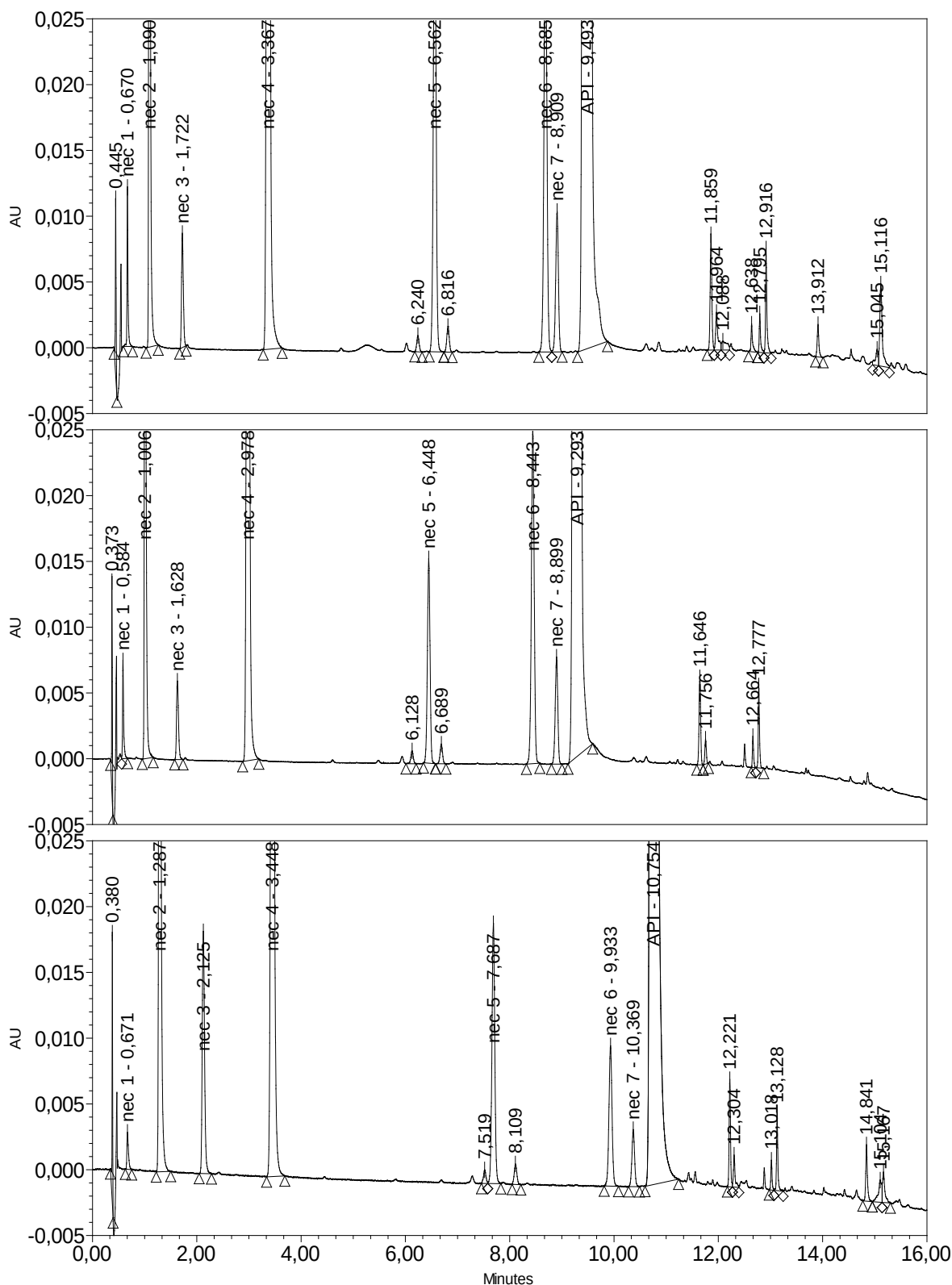
Preglednica XXIII: Časovni potek gradienta metode, kot ga dobimo glede na idealno točko delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta na podlagi algoritma PLS

Čas (min)	% A	% B
0	88	12
10	73	27
16	23	77
16,5	88	12



E	Name	Retention Time (min)	K Prime	USP Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1		0,380	0,00		1,38	7767
2	nec 1	0,671	0,77	8,16	1,63	2510
3	nec 2	1,287	2,39	9,61	1,50	4905
4	nec 3	2,125	4,59	10,82	1,22	11403
5	nec 4	3,448	8,07	14,27	1,16	17880
6	nec 5	7,687	19,23	41,03	1,00	94085
7	nec 6	9,933	25,14	21,29	1,02	136070
8	nec 7	10,369	26,29	4,21	1,04	203911
9	API	10,754	27,30	3,69	1,03	156645

Slika 16: Kromatogram in rezultati, dobljeni pri optimiziranih vrednostih faktorjev po optimizaciji izhodiščne analitske metode z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom



Slika 17: Primerjava kromatogramov, posnetih glede na vrednosti spremljanih faktorjev in časovni poteka gradienta (zgornji pred optimizacijo, srednji po prvi stopnji optimizacije z delnim dvonivojskim in Plackett-Burman-ovim faktorskim načrtom, spodnji po končani drugi stopnji optimizacije z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom)

Slika 17 prikazuje spreminjanje kromatogramov tekom optimizacije obravnavane analitske metode za določanje vsebnosti sorodnih snovi v učinkovini, ter razpadnih produktov in sorodnih snovi v izbranem farmacevtskem izdelku. Kromatogram zgoraj predstavlja izhodiščno, neoptimirano metodo. Srednji kromatogram predstavlja spremembe v analitski metodi, ki so bile posledica prvega koraka optimizacije in sicer glede na rezultate, pridobljene po delnem dvonivojskem faktorskem načrtu, kar smo potrdili še z rezultati načrta poskusov po Plackett-Burman-u.

Spodnji kromatogram je kromatogram po končni optimizaciji analitske metode, torej po uporabi delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta.

Kot je razvidno iz kromatogramov, se je retencija vrhov prvih treh nečistot nekoliko podaljšala in je sedaj ločba med njimi bistveno boljša, čeprav ta skupina že v začetni fazi ni bila kritična in zato tudi ni bila v prvem planu optimizacije.

Nečistota 4 ni bila zaradi »osamljenosti« nikoli vprašljiva, se pa je nekoliko spremenilo razmerje retencij okoli 5 nečistote. Lahko bi rekli, da na slabše glede na metodo, delno optimizirano po dvonivojskem delnem faktorskem načrtu, saj je neznana nečistota pred nečistoto 5 bližje le-tej. Kljub temu, da tega nismo pričakovali, pa je ločba še vedno dovolj dobra, da omogoča ovrednotenje obeh nečistot.

Primarni cilj optimizacije je bila ločba treh vrhov nečistot 6, 7 in API, kar smo z optimizacijo tudi dosegli. Optimizacija je prinesla želene izboljšave izhodiščne analitske metode in jo kot tako lahko ocenimo za uspešno.

4.3.4. Primerjava napovedi modela in eksperimentalnih rezultatov

Preglednica XXIV: Eksperimentalne vrednosti pri optimalnih pogojih, glede na postavljeni model, smo primerjali z napovedjo modela. Prikazuje zgornji in spodnji interval zaupanja (95%), izmerjene vrednosti spremljanih odzivov, ter izračunano razliko med napovedanimi in eksperimentalno dobljenimi vrednostmi izraženo v %

Spremljani odzivi	Napoved modela	Zgornji interval zaupanja	Spodnji interval zaupanja	Izmerjena vrednost	Razlika med napovedano in izmerjeno vrednostjo	Napaka napovedi (%)
Retencijski faktor imp 1	0,76	0,82	0,70	0,77	-0,01	-1,30
Resolucija med imp 1,2	8,61	9,08	8,14	9,61	-1,0	-10,41
Resolucija med imp 2,3	10,87	10,93	10,81	10,82	0,05	0,46
Resolucija med imp 6,7	4,23	4,39	4,07	4,21	0,02	0,48
Resolucija med imp 7 in API	3,54	3,62	3,46	3,69	-0,15	-4,07
Simetričnost vrha imp 2	1,47	1,48	1,46	1,50	-0,03	-2,00
Simetričnost vrha imp 4	1,12	1,13	1,12	1,16	-0,04	-3,45
Simetričnost vrha API	0,96	1,03	0,90	1,03	-0,07	-6,80
Število podov API	149208	162153	137296	156645	-7437	-4,75
Retencijski čas API	10,71	10,74	10,67	10,75	-0,04	-0,37
Pritisk na sistemu	694,7	697,3	692,1	701,7	-7,0	-1,00

Napaka napovedi v preglednici XXIV nam pove, koliko se razlikujeta vrednosti napovedi programa Umetrics Modde 9.1. za določen odziv delnega večnivojskega D-optimalnega faktorskega načrta in dejansko izmerjene vrednosti, ki jih prikazuje slika 16. V primerjavi z napovedjo delnega dvonivojskega faktorskega načrta (preglednica XIII) in Plackett-Burman-ovega faktorskega načrta (preglednica XVIII) so napovedi napake v povprečju precej nižje, kar pomeni, da je ta napoved dosti boljša. Nekoliko slabša je le napoved za resolucijo med vrhovoma nečistot 1 in 2. Predvsem je pomembno, da je bila napoved veliko boljša za najbolj kritična odziva, to sta resolucija med vrhovoma nečistot 6 in 7, ter resolucija med vrhovoma nečistot 7 in API.

Rezultat je bil pričakovan, saj je D-optimalni načrt, za razliko od prejšnjih dveh, večnivojski faktorski načrt in je zato pri njem modeliranje delovnega območja metode bolj natančno. Tu vsak faktor določa več točk, medtem, ko ga pri delnem dvonivojskem in Plackett-Burman-ovem faktorskem načrtu določata le dve.

5. ZAKLJUČEK

Danes imamo na voljo številna zmogljiva orodja za načrtovanje poskusov, zato smo z njihovo pomočjo želeli optimirati izbrano UPLC metodo.

V prvi stopnji smo izhodiščno analitsko metodo optimirali z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom in na osnovi 19 poskusov dobili bolj selektivno metodo od izhodiščne. Za potrditev rezultatov smo uporabili Plackett-Burman-ov načrt, ki vključuje le 11 poskusov. Dobljeni rezultati so bili popolnoma enaki tistim, dobljenim po delnem dvonivojskem faktorskem načrtu, kljub temu, da je bila napoved modela nekoliko slabša, prav tako tudi optimalna točka. Dobljeno delovno območje metode je za oba načrta zelo podobno. Z obema načrtoma smo dobili skoraj povsem enake signifikantne vplive na spremljane odzive. Ekonomičnost slednjega načrta prinaša približno 40% prihranek časa.

Po prvi stopnji optimiranja se je pokazal napredek v selektivnosti metode, kar je razvidno iz posnetega kromatograma.

V drugi stopnji smo z delnim večnivojskim D-optimalnim faktorskim načrtom, pri katerem je modeliranje delovnega območja metode veliko natančnejše, izvedli še dvajset poskusov. Slika 17 pokaže, da kljub dodatnim poskusom analitske metode nismo dodatno optimirali, smo pa dobili boljšo sliko delovnega območja analitske metode.

Kromatogram, dobljen po delnem dvonivojskem faktorskem načrtu je tisti, ki nam bolj ustreza. Opazimo namreč lahko, da je retencija prvih štirih nečistot približno enakega velikostnega razreda, smo pa dobili boljšo ločbo med tremi kritičnimi vrhovi, in sicer nečistot 6, 7 in API, kar je bil tudi primarni cilj optimiranja. Precej boljša je tudi ločba okoli nečistote 5, katere poslabšanje nas je v zadnjem koraku optimizacije negativno presenetilo. Zato smo se odločili, da za redno uporabo v analitiki kot metodo izbora določimo tisto, pridobljeno po prvi stopnji optimizacije, torej z delnim dvonivojskim faktorskim načrtom.

Iz navedenega lahko zaključimo, da je optimizacija analitske UPLC metode prinesla želene izboljšave in jo kot tako lahko ocenimo za uspešno. Načrtovnje eksperimentov se je izkazalo kot nadvse uporabno orodje, ki ob premišljeni uporabi daje željene rezultate z minimalno vloženimi sredstvi.

6. VIRI IN LITERATURA

- [1] Livingstone, David: A practical guide to scientific data analysis, 1st edition, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2009, Chapter 2 (25-55)
- [2] SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, North Carolina, USA, 2005; http://www.jmp.com/support/downloads/pdf/jmp_design_of_experiments.pdf, dostopano: Marec, April 2014
- [3] <http://www.dlib.si/preview/URN:NBN:SI:DOC-Y13PV8MT/a06e5de8-9eef-401d-832f-9b674b69bd7a>, dostopano: Marec, April 2014
- [4] Ellison, Stephen L. R., Barwick, Vicki, Farrant, Trevor J.: Practical statistics for the analytical scientist: A bench guide, 2th edition, The Royal Society of Chemistry, Chambridge, UK, 2009: Chapter 8 (114-142)
- [5] Hinkelmann, Klaus; Kempthorne, Oscar: Design and Analysis of Experiments, 2nd edition, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2008, Chapters 2, 3, 11
- [6] Miller, James N., Miller, Jane Charlotte: Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5th edition, Pearson Education Limited, UK, 2005: 181-208
- [7] Natrella, Mary Gibbons: Experimental statistics, 1st edition, Dover Publications, New York, USA, 2005: Chapters 11,12, 14
- [8] Anderson, Mark J., Whitcomb Patrick J.: DOE simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, 1st edition, Productivity Inc., Portland, USA, 2000, Chapters 1 (1-7), 3 (41-57), 5 (87-104), 6 (109-114), 7 (123-132)
- [9] Diamond, William J.: Practical experiment designs for engineers and scientists, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, USA, 2001: 3-23
- [10] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wilkström and S. Wold: Design of eksperiments - Principles and Applications, 3rd edition, Umertics academy, Sweden, 2008
- [11] <http://www.moresteam.com/toolbox/t408.cfm>, dostopano: Marec, April 2014
- [12] http://www.gorenjegroup.com/si/filelib/gorenje_group/corporate/professional_contritutions/gib_07-08_06_p13-16.pdf, dostopano: Marec, April 2014
- [13] http://thequalityportal.com/q_know02.htm, dostopano: Marec, April 2014
- [14] <http://www.processexcellencenetwork.com/glossary/design-of-experiments/>, dostopano: Marec, April 2014
- [15] http://www.home.agilent.com/upload/cmc_upload/All/DesignOfExperimentsTutorial.pdf?&cc=SI&lc=eng, dostopano: Marec, April 2014

- [16] http://www.camo.com/rt/Resources/design_of_experiment.html, dostopano: Marec, April 2014
- [17] Montgomery, Douglas C.: Design and analysis of experiments, 4th edition, John Wiley & Sons, New York, USA, 1996: Chapters 1, 6, 7, 8, 9, 10, 14
- [18] http://www.tvv.si/sl/Taguchijev_inzeniring_kakovosti_1/, dostopano: Marec, April 2014
- [19] dr. Simona Bohanec: Gradivo za predavanje pri predmetu Industrijski razvoj zdravil, Oktober 2011
- [20] Gore, Wilbert Lee: Statistical methods for chemical experimentation, 1st edition, Interscience Publishers Inc., New York, USA, 1952, Chapter 5 (61-103)
- [21] Casella, George: Statistical design, 1st edition, Springer Science + Business Media, New York, USA, 2008: 54-69
- [22] Moore, David S. , McCabe, George P.: Introduction to the practice of statistics, 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2006: 198-210
- [23] Federer, Walter Theodore, King, Freedom: Variations on split plot and split block experiment designs, 1st edition, John Wiley & Sons, New York, USA, 2007
- [24] StatSoft, Inc. (2013). Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/experimental-design/>, dostopano: Marec, April 2014
- [25] NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri521.htm> in [/eda/section3/normprpl.htm](http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri521.htm), dostopano: Marec, April 2014
- [26] Triefenbach, Fabian: Design of Experiments: The D-Optimal Approach and Its Implementation As a Computer Algorithm, Umea University, Sweden, 2008; <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.159.6913&rep=rep1&type=pdf>, dostopano: Marec, April 2014
- [27] Randall D. Tobias: An Introduction to Partial Least Squares Regression, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA; <http://www.ats.ucla.edu/stat/sas/library/pls.pdf>, dostopano: Marec, April 2014
- [28] <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html>, dostopano: 2013, 2014
- [29] Michael W. Dong: Modern HPLC for practising scientist, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2006, Chapter 1.2 (5-10), 9.3 (227-235), 9.4 (235-237)
- [30] M. Žorž: HPLC, Ljubljana, samozaložba, 1991

- [31] http://www.waters.com/waters/en_US/ACQUITY-UPLC-/nav.htm?locale=en_US&cid=514207, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [32] Waters Corporation: Presentation pdf files available on [www.waters.com /slides](http://www.waters.com/slides), 2007, <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002425en.pdf>, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [33] Patil V. P., Tathe R. D., Devdhe S. J., Angadi S. S. and Kale S. H: Ultra Performance Liquid Chromatography: A Review, Yash Institute of Pharmacy, Aurangabad, Maharashtra, India, 2011; http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/vol-2_issue-6/8.pdf, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [34] <https://www.google.si/search?q=uprl+chromatography+components+pictures&client=firefox>, dostopano: Avgust 2014
- [35] http://www.waters.com/waters/en_US/UPLC/nav.htm?cid=10125009&locale=en_US, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [36] Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757 USA, <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715002108rA.pdf> dostopano: Julij, Avgust 2014
- [37] <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm>, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [38] John W. Dolan: Peak Tailing and Resolution, LC Resources Inc., Walnut Creek, California, USA, 2002; <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/202002/19199/article.pdf>, dostopano: Julij, Avgust 2014
- [39] <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/a0691e05.htm>, dostopano: Avgust 2014
- [40] <http://www.umetrics.com/products/modde>, dostopano: 2013, 2014