

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Μιχαήλ Α. Κουμπάρης, Νικόλαος Κ. Μέγκουλας
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Παν/μίου Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα 157 71, koupparis@chem.uoa.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την επικύρωση (validation) μιας βελτιστοποιημένης μεθόδου είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί, εκτός από τα άλλα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, και η ανθεκτικότητά της (robustness ή ruggedness). Ως ανθεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα της μεθόδου να παράγει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα όταν επιφέρονται σκοπούμενες μικρο-αλλαγές των πειραματικών συνθηκών, που είναι δυνατόν να εμφανισθούν κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε βάθος χρόνου. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει ένας πειραματικός σχεδιασμός μεταβολών των κρίσιμων παραμέτρων και να γίνει αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για τη δήλωση ανθεκτικότητας της μεθόδου στο εύρος των παραμέτρων που έγινε η μελέτη. Στην παρουσίαση περιγράφεται η μέθοδος μερικού παραγοντικού σχεδιασμού Plackett και Burman για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας και δίδονται χαρακτηριστικά παραδείγματα.

Από τις μελέτες βελτιστοποίησης και ανθεκτικότητας γίνεται φανερό ποιες παράμετροι επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου και για τις παραμέτρους αυτές τίθενται όρια ανοχής έτσι, ώστε ο αναλυτής να είναι προσεκτικός στην επιλογή και χρήση του κύριου και βοηθητικού εξοπλισμού και στον έλεγχο των πειραματικών συνθηκών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αιτία μείωσης της αξιοπιστίας μιας μεθόδου με το χρόνο είναι η ευαισθησία της σε μικρο-αλλαγές των πειραματικών συνθηκών της διαδικασίας, όπως μεταβολές στη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, της ταχύτητας θέρμανσης, κλπ. Κάποιος μπορεί να δοκιμάσει νέες μεθόδους και να δει πως συμπεριφέρονται σε βάθος χρόνου, αλλά είναι προτιμότερο να αποκτηθεί μια ιδέα της αναμενόμενης αξιοπιστίας κατά το στάδιο της επικύρωσης / επαλήθευσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση της ευαισθησίας της μεθόδου σε μικρές μεταβολές.

Είναι πρόδηλο ότι η μη ευαισθησία σε μικρές αλλαγές στη πορεία είναι ένα σημαντικό προσόν για μια αναλυτική μέθοδο. Επομένως αυτό το χαρακτηριστικό, που έχει ονομασθεί “ruggedness ή robustness κατά ICH” (ελληνικά ανθεκτικότητα και σε μερικές οδηγίες επιδεκτικότητα), μπορεί να θεωρηθεί ως κριτήριο αξιολόγησης. Μια μη ικανοποιητικά «ανθεκτική» μέθοδος μπορεί να εμφανίσει επίσης ένα μεγάλο συστηματικό διεργαστηριακό σφάλμα (laboratory bias). Είναι σαφώς γνωστό ότι κατά τη μεταφορά προτεινόμενων μεθόδων της βιβλιογραφίας στα εργαστήρια δεν λαμβάνονται πάντοτε καλά αποτελέσματα. Το διεργαστηριακό συστηματικό σφάλμα μπορεί να προσδιορισθεί με διεργαστηριακά ερευνητικά προγράμματα χρησιμοποιώντας την ANOVA. Αυτά τα διεργαστηριακά προγράμματα απαιτούν σημαντική οργανωτική προσπάθεια και επομένως δεν είναι εφαρμόσιμα σε κάθε προτεινόμενη μέθοδο σε ένα πρώιμο στάδιο της εφαρμογής της. Στην περίπτωση αυτή θα είναι χρήσιμη μια εκ των προτέρων προσέγγιση που θα επιτρέπει την πρόβλεψη του αναμενόμενου διεργαστηριακού συστηματικού σφάλματος. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η μέτρηση της ανθεκτικότητας παρέχει μια ιδέα των

αναμενόμενων αποκλίσεων μεταξύ ημερών και μεταξύ εργαστηρίων. Αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας μεθόδους που αρχικά αναπτύχθηκαν από τους Plackett και Burman [1] και εισήχθησαν στην Αναλυτική Χημεία από τους Youden και Steiner [2]. Στην περίπτωση αυτή για τη μελέτη μικρών και αναπόφευκτων μεταβολών μπορεί να χρησιμοποιηθεί «Μερικός Παραγοντικός Σχεδιασμός Δύο Επιπέδων» (Two Level Partial Factorial Design).

ΜΕΡΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΔΥΟ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Κατά το μερικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων, το ένα επίπεδο (συμβολιζόμενο ως +) και καλούμενο «ονομαστικό (nominal)» είναι αυτό που αντιστοιχεί στην κανονική τιμή της εξεταζόμενης παραμέτρου και το άλλο (συμβολιζόμενο ως -) και καλούμενο «ακραίο (extreme)» αντιστοιχεί σε μια μικρή απόκλιση της τιμής της παραμέτρου που λογικά μπορεί να επισυμβεί σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Σε αυτού του τύπου τις μελέτες μπορεί κάποιος να εισαγάγει ένα μεγάλο αριθμό εξεταζόμενων παραμέτρων και να έτσι να εισαχθούν πολλοί παράγοντες στο σχεδιασμό. Για n παραμέτρους και για πλήρη σχεδιασμό (τριών επιπέδων - 0 +) απαιτούνται 2^n πειράματα. Καθώς ο αριθμός παραγόντων είναι μεγαλύτερος από 5, είναι σαφές ότι ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δεν είναι συχνά πρακτικός γιαυτό το σκοπό. Έτσι έχουν αναπτυχθεί διάφοροι σχεδιασμοί, εκ των οποίων ο μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων είναι ο πλέον συνήθης και για n παραμέτρους απαιτούνται $n+1$ πειράματα.

Ένα απλό παράδειγμα αυτού του σχεδιασμού για 3 εξεταζόμενες παραμέτρους φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων για 3 παραμέτρους

Πείραμα	Παράμετρος			Μέτρηση
	A	B	C	
1	+	+	+	Y_1
2	-	+	-	Y_2
3	+	-	-	Y_3
4	-	-	+	Y_4

Για τη μελέτη 3 παραμέτρων (A, B, C) απαιτούνται $3+1 = 4$ πειράματα. Στο 1^ο πείραμα και οι 3 παράμετροι έχουν την κανονική τιμή (+). Στα υπόλοιπα πειράματα κάποια(-ες) παράμετροι έχουν την κανονική τιμή και οι υπόλοιπη(-ες) την ακραία τιμή (-). Έτσι στα πειράματα κάθε παράμετρος εξετάζεται 2 φορές σε κανονική τιμή (+) και δυό φορές σε ακραία τιμή (-). Ως μέτρηση Y_i σε κάθε πείραμα λαμβάνεται η συγκέντρωση του αναλυόμενου δείγματος ή η ανάκτηση της μεθόδου από ενισχυμένα ή συνθετικά δείγματα.

Για τη μελέτη της επίδρασης της μεταβολής μιας παραμέτρου, έστω της A, από την κανονική τιμή (+) στην ακραία τιμή (-) συγκρίνονται οι μέσοι όροι των μετρήσεων που πάρθηκαν στα δύο επίπεδα, δηλαδή:

$$D_A = \frac{Y_1 + Y_3}{2} - \frac{Y_2 + Y_4}{2}$$

Έτσι για κάθε παράμετρο που εξετάζεται A, B, C χωρίζονται τα αποτελέσματα σε 2 ομάδες. Η μια ομάδα αφορά τα αποτελέσματα που πάρθηκαν με την κανονική τιμή

(+) της παραμέτρου και άλλη με την ακραία τιμή (-). Σε κάθε ομάδα οι άλλες παράμετροι βρίσκονται μια φορά στην (+) και μια φορά στην (-) τιμή και όταν αφαιρούνται οι μέσοι όροι των ομάδων των μετρήσεων η επίδραση της μεταβολής των άλλων παραμέτρων αναιρείται. Αυτό προϋποθέτει μη αλληλεπίδραση των παραμέτρων μεταξύ τους, αλλά επειδή οι σκοπούμενες μεταβολές είναι μικρές αυτό γενικά ισχύει.

Οι υπολογιζόμενες διαφορές D_i αξιολογούνται ως προς τη σημαντικότητά τους σε σχέση με το πειραματικό σφάλμα που υπολογίζεται από πολλαπλές μετρήσεις με όλες τις παραμέτρους σε κανονικές συνθήκες. Στην πράξη χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση της μεθόδου που προσδιορίστηκε για την επαναληψιμότητα S_r κατά την επικύρωση. Η τυπική απόκλιση του μέσου όρου των 2 μετρήσεων της ομάδας θα ισούται με $S_r/\sqrt{2}$ και η τυπική απόκλιση S_D των δύο μέσων όρων θα είναι:

$$S_D = \frac{\sqrt{2S_r^2}}{\sqrt{2}} = S_r$$

Μια διαφορά D_i δεν είναι σημαντική και επομένως η αντίστοιχη παράμετρος δεν επηρεάζει τη μέθοδο όταν:

$$D_i < \sqrt{2}S_D = \sqrt{2}S_r$$

Στα πραγματικά πειράματα, εάν μια παράμετρος είναι σημαντική και επηρεάζει τη μέθοδο, είτε γίνεται προσπάθεια να εξαληφθεί αυτή η επίδραση, ή επειδή αυτό είναι συνήθως αδύνατο, το πρωτόκολλο της μεθόδου πρέπει να αναφέρει σαφώς τα όρια ανοχής για τη δεδομένη παράμετρο.

Με την παραπάνω μεθοδολογία μπορούν να σχεδιασθούν πειράματα για περιττό αριθμό παραμέτρων 3, 5, 7 κλπ με αριθμό πειραμάτων 3+1, 5+1, 7+1 κλπ. έτσι, ώστε να συγκρίνονται οι μέσοι όροι δύο ομάδων με ίδιο αριθμό πειραμάτων. Στην περίπτωση ζυγού αριθμού παραμέτρων, π.χ. 4, 6, 8 κλπ, ακολουθείται η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιώντας μια επιπλέον παράμετρο “dummy parameter” και εκτελώντας 4+2, 6+2, 8+2 πειράματα. Για την “dummy parameter” η διαδικασία μοιάζει με το να σηκώνουμε ένα ποτήρι με σοβαρότητα, να το κοιτάμε προσεκτικά και να το ξαναβάζουμε κάτω. Στον πίνακα 2 φαίνεται ο μερικός παραγοντικός σχεδιασμός για 6 παραμέτρους στον οποίο μια παράμετρος G είναι “dummy parameter”.

Πίνακας 2. Μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων για 6 παραμέτρους

Πείραμα	Παράμετρος						Μέτρηση
	A	B	C	D	E	F	
1	+	+	+	+	+	+	Y_1
2	+	+	-	+	-	-	Y_2
3	+	-	+	-	+	-	Y_3
4	+	-	-	-	-	+	Y_4
5	-	+	+	-	-	+	Y_5
6	-	+	-	-	+	-	Y_6
7	-	-	+	+	-	-	Y_7
8	-	-	-	+	+	+	Y_8

Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα δεδομένα μερικού παραγοντικού σχεδιασμού 3 παραμέτρων για μια φωτομετρική αναλυτική μέθοδο. Οι προς έλεγχο παράμετροι μπορεί να είναι ο χρόνος αντίδρασης, η θερμοκρασία αντίδρασης, το pH, η συγκέντρωση του αντιδραστήριου, κλπ. Έστω ότι θεωρούνται ως κρίσιμες οι 3 παράμετροι pH, θερμοκρασία και συγκέντρωση αντιδραστήριου.

Παράμετρος A:	pH	+ Επίπεδο: 8,0	- Επίπεδο: 8,5
Παράμετρος B:	Θερμοκρασία	+ Επίπεδο: 20 °C	- Επίπεδο: 22 °C
Παράμετρος C:	Συγκέντρωση:	+ Επίπεδο: 0,10 M	- Επίπεδο: 0,12 M

Η τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας S_r , που πάρθηκε από πολλαπλές μετρήσεις απορρόφησης ενός δείγματος με κανονικές συνθήκες (+ επίπεδο) είναι 0,010. Όταν $|D|$ είναι μεγαλύτερη από $\sqrt{2} S_r = 0,014$, τότε η παράμετρος αυτή επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα.

Πίνακας 3. Μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων για 3 παραμέτρους μιας φωτομετρικής μεθόδου

Πείραμα	Παράμετρος			Μέτρηση Απορρόφηση
	A (pH) +: 8,0 -: 8,5	B (Θερμοκρασία) +: 20 °C -: 22 °C	C (Συγκέντρωση) +: 0,10 M -: 0,12 M	
1	+	+	+	$Y_1 = 0,200$
2	-	+	-	$Y_2 = 0,218$
3	+	-	-	$Y_3 = 0,240$
4	-	-	+	$Y_4 = 0,206$
$D_A = \frac{Y_1 + Y_3}{2} - \frac{Y_2 + Y_4}{2} = 0,008 < 0,014$ Μη σημαντική επίδραση				
$D_B = \frac{Y_1 + Y_2}{2} - \frac{Y_3 + Y_4}{2} = -0,014 = 0,014$ Μη σημαντική επίδραση				
$D_C = \frac{Y_1 + Y_4}{2} - \frac{Y_2 + Y_3}{2} = -0,026 > 0,014$ Σημαντική επίδραση				

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η παράμετρος C (συγκέντρωση αντιδραστήριου) έχει σημαντική επίδραση και πρέπει να ελεγχθεί περισσότερο αυστηρά. Αυτό μπορεί να επισημανθεί στην οδηγία της μεθόδου, γράφοντας ως συγκέντρωση 0,100 M ή $0,100 \pm 0,005$ M.

Οι κρίσιμες παράμετροι προς έλεγχο κατά τη μελέτη της ανθεκτικότητας (ruggedness ή robustness) εντοπίζονται κατά το στάδιο της ανάπτυξης / βελτιστοποίησης της μεθόδου. Για τις μεθόδους HPLC, που είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες σε αναλύσεις ρουτίνας φαρμάκων και τροφίμων οι κρίσιμες παράμετροι προς έλεγχο μπορούν να χωρισθούν σε δύο ομάδες:

1. Συνθήκες HPLC
 - a. Στήλη HPLC (παρτίδα, ηλικία, κατασκευαστής)
 - b. Σύσταση κινητής φάσης (pH \pm 0,05, ποσοστό οργανικού διαλύτη \pm 2%)

- c. Οργανολογία HPLC (νεκρός όγκος, μήκος κύματος ανίχνευσης ± 2 nm, θερμοκρασία στήλης ± 5 °C, ταχύτητα ροής)
2. Προετοιμασία δείγματος
- Διαλύτης δείγματος (pH \pm 0,05, ποσοστό οργανικού διαλύτη $\pm 2\%$)
 - Διαδικασία προετοιμασίας δείγματος (χρόνος ανακίνησης, διαφορετικά φίλτρα διήθησης)
 - Σταθερότητα διαλύματος εργασίας για HPLC.

Στον πίνακα 4 φαίνεται ο μερικός παραγοντικός σχεδιασμός 3 παραμέτρων δύο επιπέδων για μια μέθοδο HPLC για τον προσδιορισμό δραστικής ουσίας σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. Ως «Μέτρηση» λαμβάνεται η ανάκτηση από συνθετικό δείγμα που προέκυψε από την προσθήκη προτύπου διαλύματος καθαρής φαρμακευτικής ουσίας σε διάλυμα εκδόχων (λευκό δείγμα, blank). Οι κρίσιμες παράμετροι προς έλεγχο ήταν:

Παράμετρος A: Συγκέντρωση βουτανosuλφονικού νατρίου (αντιδραστήριο σχηματισμού ζεύγους ιόντων) στην κινητή φάση:

+ Επίπεδο: 0,010 M - Επίπεδο: 0,011 M

Παράμετρος B: Σύσταση κινητής φάσης HCOOH-Μεθανόλη-Νερό:

+ Επίπεδο: 0,4 / 15 / 85 - Επίπεδο: 0,3 / 14 / 86

Παράμετρος C: Ταχύτητα ροής κινητής φάσης:

+ Επίπεδο: 2,0 mL/min - Επίπεδο: 1,9 mL/min

Πίνακας 4. Μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων για 3 παραμέτρους μιας μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό φαρμακευτικής ουσίας σε σκεύασμα

Πείραμα	Παράμετρος			Μέτρηση % Ανάκτηση
	A Συγκέντρωση αντιδραστηρίου	B Σύσταση κινητής φάσης	C Ταχύτητα ροής	
1	+	+	+	Y ₁ = 98,97 S _r = 0,11 (n = 6)
2	-	+	-	Y ₂ = 98,99 S _r = 0,02 (n = 3)
3	+	-	-	Y ₃ = 98,98 S _r = 0,004 (n = 3)
4	-	-	+	Y ₄ = 98,97 S _r = 0,02 (n = 3)
$D_A = \frac{Y_1 + Y_3}{2} - \frac{Y_2 + Y_4}{2} = -0,005 < \sqrt{2} \times 0,11 = 0,16$ Μη σημαντική επίδραση				
$D_B = \frac{Y_1 + Y_2}{2} - \frac{Y_3 + Y_4}{2} = 0,005 < 0,16$ Μη σημαντική επίδραση				
$D_C = \frac{Y_1 + Y_4}{2} - \frac{Y_2 + Y_3}{2} = -0,015 < 0,16$ Μη σημαντική επίδραση				

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι καμία από τις μικρομεταβολές στις εξεταζόμενες παραμέτρους δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα και η μέθοδος τεκμηριώνεται ότι είναι ανθεκτική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. R. L. Plackett and J.P. Burman, *Biometrika*, 23 (1946) 305.
2. W. J. Youden and E.H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1975.
3. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y.Michotte, and L. Kaufman, *Chemometrics: a Textbook*, Elsevier, 1988, p. 101-106.