ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΙΘΑΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΟΤΟΞΙΚΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΡΑΜΠΕΠΡΑΖΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Ρουμανά Ευαγγελία ,Μπουζούκας Χριστόφορος, Ντότσικας Ιωάννης
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
e-mails: v.aliaro0m@hotmail.gr, xristoforosmp@gmail.com

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η ανθεκτικότητα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό γονιδιοτοξικών προσμίξεων (CPAR, FBCI) της rabeprazole. Για τον έλεγχο χρησιμοποιείται κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δυο επιπέδων. Σε αυτόν μελετώνται 6 αποκρίσεις σε 19 πειράματα (5 παράγοντες και 3 επαναλήψεις της κεντρικής τιμής). Ακολουθείται μαθηματική εκτίμηση των επιδράσεων των παραγόντων σε όλες τις αποκρίσεις και γραφική αποτίμησή τους (διαγράμματα κανονικής, ημικανονικής πιθανότητας και διάγραμμα *Pareto).* Τέλος, υπολογίζονται τα διαστήματα των στατιστικά σημαντικών παραγόντων, εντός των οποίων η μέθοδος είναι ανθεκτική.

Λέξεις-Κλειδιά: έλεγχος ανθεκτικότητας, πειραματικός σχεδιασμός, HPLC, κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός

Abstract

In the present study robustness testing was conducted for a HPLC method used for the determination of rabeprazole genotoxic impurities (CPAR, FBCI). To this purpose, a 2-level fractional factorial design was utilized. This design included 19 experiments for studying 6 responses with 5 factors. A mathematical estimation of all effects took place along with their evaluation via graphs (normal plot, half-normal plot, Pareto chart). Finally, the non-significance intervals for the significant factors were estimated.

Keywords: robustness testing, experimental design, HPLC, fractional factorial design

1. Εισαγωγή

Ανθεκτικότητα (*robustness ή ruggedness*) μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται το μέτρο της ικανότητάς της να επαναλαμβάνεται υπό διαφορετικές συνθήκες ή σε διαφορετικά εργαστήρια, χωρίς αναμενόμενες διαφορές στα αποτελέσματα της. Ο έλεγχος

ανθεκτικότητας μιας μεθόδου αποτελεί το τελικό στάδιο της επικύρωσής της και εξετάζει το πόσο ανεπηρέαστη αυτή παραμένει σε μικρές, σκοπούμενες μεταβολές στις παραμέτρους της. Εισήχθη αρχικά για να αποφευχθούν προβλήματα στις διεργαστηριακές μελέτες και για να εντοπιστούν πιθανές αιτίες μεταβλητότητας στα αποτελέσματα. Ο έλεγχος ανθεκτικότητας μπορεί να διεξαχθεί πιο οργανωμένα με χρήση πειραματικού σχεδιασμού. Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι η συστηματική και στατιστική μελέτη των πειραματικών αποκρίσεων μέσω επιλεγμένων πειραμάτων που δίνουν τον μέγιστο αριθμό πληροφοριών μέσω του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματικών διαδικασιών. Ειδικά για τον έλεγχο ανθεκτικότητας, ενδείκνυνται οι παραγοντικοί σχεδιασμοί και ο Plackett-Burman. Ο παραγοντικός σχεδιασμός μπορεί να είναι πλήρης (*Full Factorial Design)*, ο οποίος περιέχει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των επιπέδων για τους παράγοντες που μελετώνται, και κλασματικός (*Fractional Factorial Design),* στον οποίο χρησιμοποιείται κλάσμα του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού με μικρότερο αριθμό πειραμάτων, συνήθως $2^{κ-1}$ (όπου κ ο αριθμός των παραγόντων). Το αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας είναι η εύρεση εκείνων των παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν τις αποκρίσεις της μεθόδου για τα επίπεδα που τέθηκαν. Στη συνέχεια, για αυτές τις παραμέτρους βρίσκονται με μαθηματική επεξεργασία τα όρια ανοχής για κάθε απόκριση.

2. Μεθοδολογία

Για τον έλεγχο ανθεκτικότητας της μεθόδου, επιλέξαμε κλασματικό πειραματικό σχεδιασμό δύο επιπέδων με 5 παράγοντες προς μελέτη και 6 αποκρίσεις.
Ειδικότερα οι παράγοντες που εξετάζονται είναι :

- το %ACN με κεντρική τιμή 31% και ως επίπεδα 33%, 29%,
- το pH κινητής φάσης με κεντρική τιμή 6,80 και ως επίπεδα 7,10 και 6,50,
- η συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος με κεντρική τιμή 11 mM και ως παράγοντες 13 και 9 mM,
- το $λ_{max}$ με κεντρική τιμή 263 και ως επίπεδα 265 και 261,
- η $u_{κιν.\ φάσης}$ με κεντρική τιμή 0,5 mL/min και ως επίπεδα 0,6 και 0,4 mL/min.

Όσον αφορά τις αποκρίσεις αυτές είναι :

- k'_{rabe}(ο χρόνος ανάσχεσης της rabeprazole)
- k'_{FBCI} (ο χρόνος ανάσχεσης του FBCI)
- k'_{CPA} (ο χρόνος ανάσχεσης του CPAR)
- $S_{(rab\text{-}FBCI)}$ (όπου ως διαχωριστικότητα S ορίζεται η απόσταση του τελευταίου σημείου της κορυφής της rabeprazole που προηγείται από το πρώτο σημείο της κορυφής της πρώτης προσμιξης FBCI)
- $Area_{CPAR}$ (το εμβαδον κορυφης του CPAR)
- $Area_{FBCI}$ (το εμβαδον κορυφης του FBCI)

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση του πειραματικού σχεδιασμού είναι το *Design Expert v. 10 (trial version).*

2.1. Εξοπλισμός-Αντιδραστήρια

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων αποτελείται από μια αντλία HPLC GBC LC 1150 με ανιχνευτή Υπεριώδους/Ορατού UV/Vis GBC LC 1210 και έναν απαερωτή (Biotech model 2003). Το σύστημα είναι εξοπλισμένο με ένα χειροκίνητο σύστημα έγχυσης, και ένα βρόγχο 20 μL Rheodyne 7725i S/Steel. Η έγχυση πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα με σύριγγα Agilent των 100 μL. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου *(*25 ± 2 °C) υπό ισοκρατικές συνθήκες. Η εξαγωγή και η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων εγινε με χρήση του λογισμικού *Empower Software (waters, Milford, MA, USA).*

Διαλυμα rabeprazole *sodium Randaxy* σε MeOH *Fisher Chemicals* συγκεντρωσης 500 μg/mL

Διάλυμα CPAR *TLC Pharmaceutical Standards* σε MeOH συγκέντρωσης 100 μg/mL

Διάλυμα FBCI *TLC Pharmaceutical Standards* σε MeOH συγκεντρωσης 100μg/mL

Ρυθμιστικά Διαλύματα $HCOONH_3$ *BDH chemicals Ltd Poole England* συγκεντρώσεων 9, 11 και 13 mM.

Διαλυμα NH_3 1% για τη ρύθμιση του pHμετρου

Διαλυμα Formic Acid 1% για τη ρύθμιση του pHμετρου

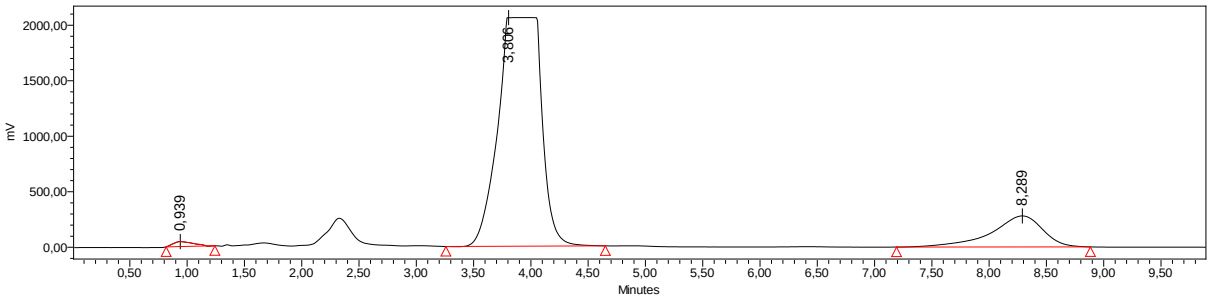
Διάλυμα ACN *HPLC gradient rate Fisher Chemicals*

3. Αποτελέσματα

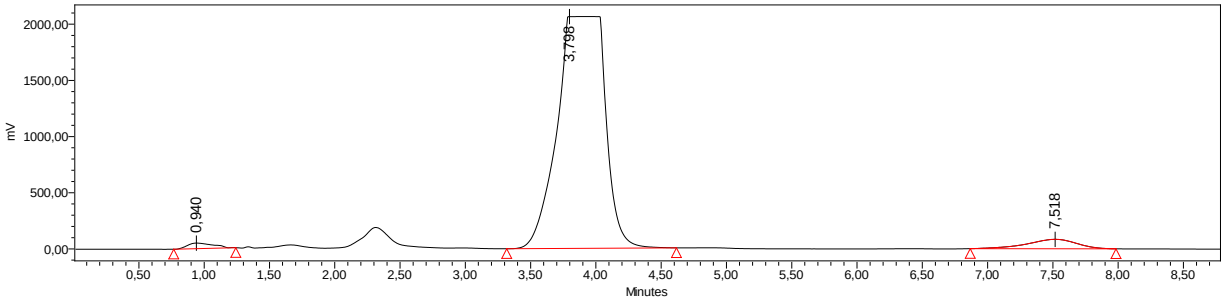
Παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα τα 19 πειράματα με τις αντίστοιχες τιμές των αποκρίσεων. Με κίτρινο είναι υπογραμμισμένες οι επαναλήψεις της κεντρικής τιμής

run	%ACN	pH	salt	flow rate	wavelenght	krab	Kcpar	Kfbci	S	AREA cpar	Area FBCI
1	29	7,1	9	0,4	261	4,22	11,52	9,44	3,9	8772079	2218370
2	29	7,1	9	0,6	265	4,23	11,65	9,44	2,75	7013222	1653337
3	33	7,1	9	0,4	265	2,58	6,71	6,15	2,15	10621526	2472142
4	29	6,5	13	0,6	265	5,08	13,89	10,82	3,18	5335911	1430998
5	33	7,1	13	0,4	261	4,08	6,47	6,21	2,66	8948527	2342660
6	31	6,8	11	0,5	263	3,05	7,83	7	2,38	8738764	2202380
7	29	7,1	13	0,4	265	6,41	18,26	13,77	6,28	7346316	2574425
8	29	6,5	9	0,4	265	4,41	12,64	9,73	4,55	9386622	1952465
9	31	6,8	11	0,5	263	3,34	8,62	7,64	2,66	8919955	2079995
10	33	6,5	9	0,6	265	2,52	6,31	5,92	1,78	6572511	1795178
11	33	6,5	13	0,4	265	4	10,13	8,54	3,38	8030924	1898364
12	33	6,5	9	0,4	261	2,55	6,34	6,04	2,48	9002261	2291767
13	33	7,1	9	0,6	261	2,71	6,96	6,3	1,55	6808311	1626629
14	29	7,1	13	0,6	261	6,55	18,73	13,8	4,7	6433916	1690404
15	31	6,8	11	0,5	263	3,3	8,56	7,55	2,65	9020170	2365298
16	33	6,5	13	0,6	261	4,02	9,94	8,39	1,91	5316033	1279784
17	29	6,5	9	0,6	261	4,11	11,31	9,45	2,72	6594363	1720044
18	29	6,5	13	0,4	261	5,27	14,21	11,07	4,66	6662302	1542311
19	33	7,1	13	0,6	265	2,58	6,43	5,9	1,83	7046159	1748089

Ακολούθως, παρατίθενται χρωματογραφήματα με τις κεντρικές τιμές των παραγόντων. Σε κάθε ένα από τα παρακάτω χρωματογραφήματα, ο νεκρός χρόνος είναι στα 0,9 min, η ραμπεπραζόλη εκλούεται στα 3,8 min, το CPAR στα 8,2 και το FBCI στα 7,5 min.



Εικόνα 1: Χρωματογράφημα rabe-CPAR



Εικόνα 2: Χρωματογράφημα rabe-FBCI

3.1. Υπολογισμοί των επιδράσεων

Αρχικά, υπολογίστηκαν οι επιδράσεις του κάθε παράγοντα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εξισώσεις από την βιβλιογραφία (Y.Vander Heyden et.al 2001). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των επιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$E_X = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2} \quad (1)$$

όπου x ο καθε παράγοντας, Ex η επίδραση του κάθε παράγοντα, ΣY(+) και ΣY(-) τα αθροίσματα των αποκρίσεων όταν ο x ειναι στα ακραία επίπεδα και N ο αριθμός των πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

Στην συνέχεια οι επιδράσεις κοινωνικοποιούνται ως προς τον μέσο όρο και υπολογιζεται το Ex (%) με βάση την εξίσωση:

$$E_X(\%) = \frac{E_X}{\bar{Y}} \times 100\%. \quad (2)$$

Όπου Y είναι η μέση τιμή των 3 επαναλήψεων της κεντρικής τιμής για την κάθε απόκριση.
Στην συνέχεια ακολουθεί η στατιστική αξιολόγηση των επιδράσεων. Η στατιστική ερμηνεία παρέχει στον χρήστη μια αριθμητική οριακή τιμή η οποία παρέχεται κυρίως μέσω t-test σύμφωνα με τη σχέση :

$$t = \frac{|E_X|}{(\mathrm{SE})_e} \qquad (3)$$

όπου SE ειναι το τυπικό σφάλμα μίας επίδρασης και δίνεται από τον τύπο:

$$(\mathrm{SE})_e = \sqrt{\frac{s^2}{N/2} + \frac{s^2}{N/2}} = \sqrt{\frac{4s^2}{N}} \qquad (4)$$

όπου s οι τυπικές αποκλίσεις των κεντρικών τιμών από τις 3 επαναλήψεις.
Υπολογίζεται στη συνέχεια η κρίσιμη τιμή E_{crit}

$$\mathbf{E_{crit} = T_{crit} * (SE)} \qquad (5)$$

Για 2 βαθμούς ελευθερίας και διάστημα εμπιστοσύνης 95% βρέθηκε από πίνακες ότι η T_{crit} ειναι ίση με 4,303. Επομένως ισχύει:

$$\mathbf{E_{crit} = 4{,}303 * (SE)} \qquad (6)$$

Αντίστοιχα με το Ex % υπολογίζεται και το $\mathbf{E_{crit}}$ **%**

Μία επίδραση θεωρείται σημαντικη όταν $|\mathbf{Ex}| > \mathbf{E_{crit}}$

Ακολούθως, για τους στατιστικά σημαντικούς παράγοντες υπολογίζονται τα μη σημαντικά διαστήματα, μέσω του τύπου:

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\mathrm{critical}}}{2|E_X|},\ X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\mathrm{critical}}}{2|E_X|} \right] \qquad (7)$$

Πίνακας 1: Επιδράσεις των παραγόντων στην απόκριση k_{rabe} (E_{crit}=0,3381)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	-1,905	0,175	1,332	-0,2125	0,1075
E_X(%)	-58,98	5,418	41,25	-6,579	3,328

Πίνακας 2: Επιδράσεις των παραγόντων στην απόκριση k_{CPAR} (E_{crit}=1,338)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	-6,615	0,245	3,077	0,0675	-0,1325
E_X(%)	-79,35	2,939	36,91	0,8097	-1,589

Πίνακας 3: Επιδράσεις των παραγόντων στην απόκριση k_{FBCI} (E_{crit}=1,054)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	-4,259	0,1312	2,004	-0,05375	-0,1162
E_X(%)	-57,57	1,7745	27,09	-0.7267	-1,572

Πίνακας 4: Επιδράσεις των παραγόντων στην απόκριση S (E_{crit}=0,48333)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	-1,875	0,145	0,84	0,165	-1,205
E_X(%)	-73,15	5,657	32,77	6,437	-47,01

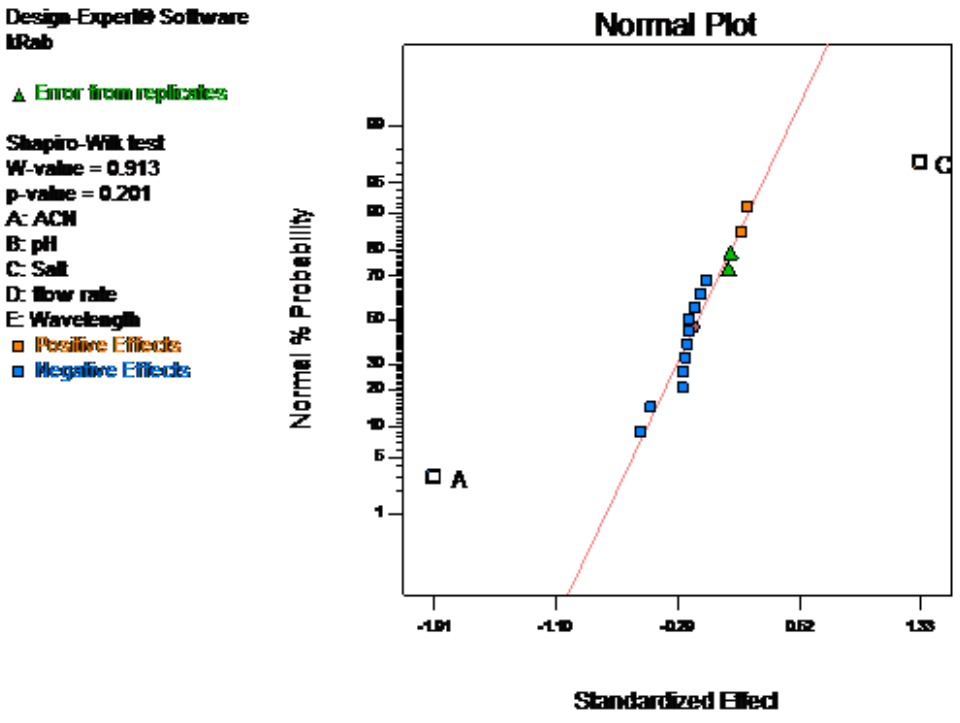
Πίνακας 5: Επιδράσεις των παραγόντων στην απόκριση Area CPAR (E_{crit}=433982,2)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	600190,1	761141,1	-1206351	351924,9	-2206266
E_X(%)	6,749046	8,558915	-13,5652	3,957341	-24,8091

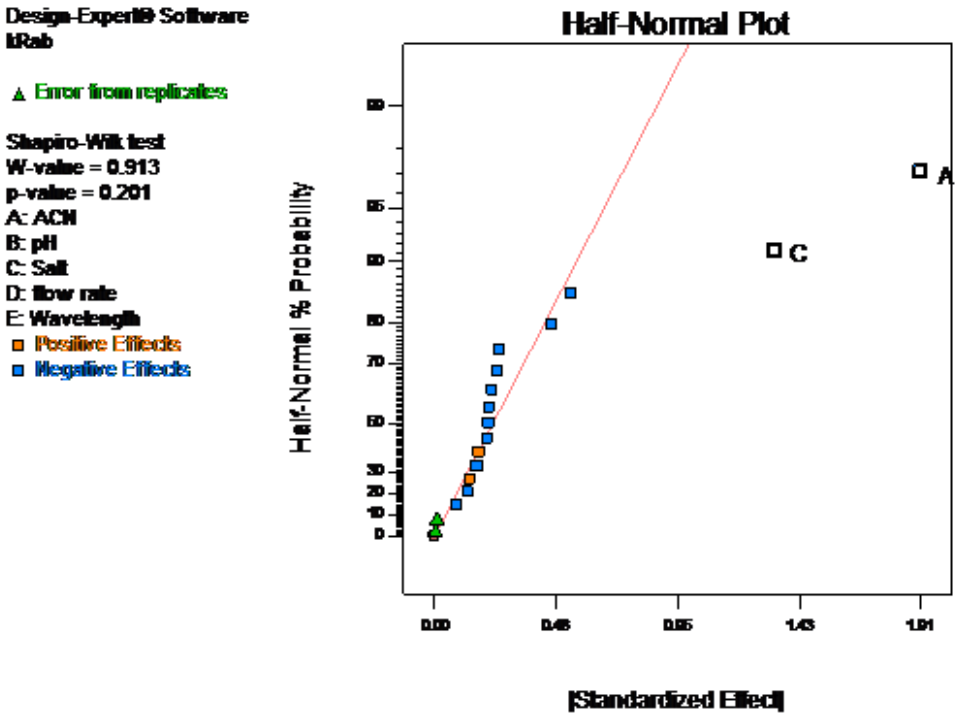
Πίνακας 6: Επίδρασεις των παραγόντων στην απόκριση Area FBCI (E_{crit}=435500,6)

	%ACN	pH	salt	λ_{max}	Ταχύτητα ροής
E_X	84032,38	301893,1	-152862	101628,6	-543505
E_X(%)	3,792261	13,62401	-6,89845	4,586355	4,586355

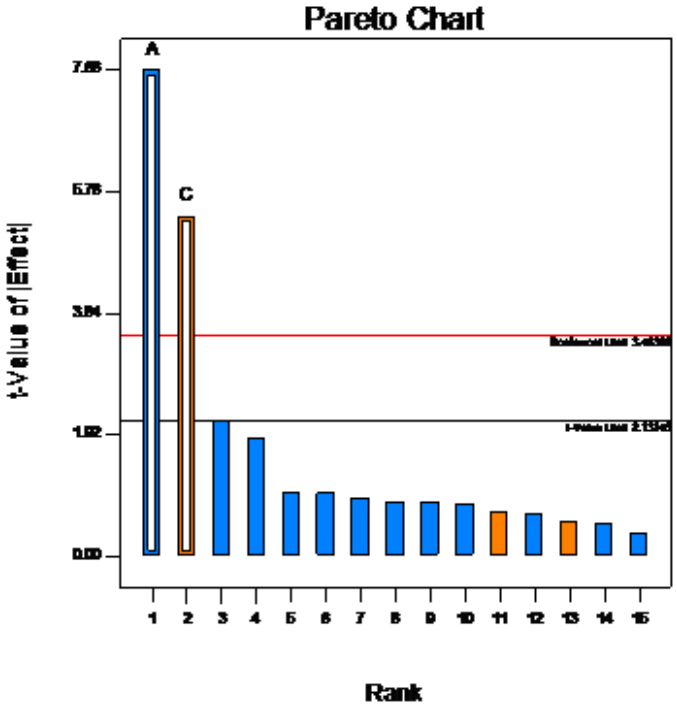
Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα διαπιστώνεται ότι για τις αποκρίσεις k'$_{rabe}$, k'$_{CPAR}$, k'$_{FBCI}$ οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες είναι το ποσοστό του ACN (%ACN) και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (*salt*) της κινητής φάσης. Για το S ειναι επιπλέον και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (*flow rate*). Για το AREA CPAR όλοι οι παράγοντες εκτός του μήκους κύματος (*wavelenght*) είναι στατιστικά σημαντικοί, ενώ για το AREA FBCI στατιστικά σημαντικός παράγοντας είναι μόνο η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (*flow rate*).
Αντίστοιχα συμπεράσματα εξάγονται και απο τα διαγράμματα κανονικής, ημικανονικής πιθανότητας, και Paretto.
Ενδεικτικά παρατίθενται τα διαγράμματα για την απόκριση k'$_{rabe}$



Εικόνα 3: Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας για την απόκριση k'$_{rabe}$



Εικόνα 4: Διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας για την απόκριση k'_{rabe}



Εικόνα 5: Διάγραμμα Pareto των τυποποιημένων επιδράσεων

4. Συμπεράσματα

Γίνεται προφανές ότι ο πειραματικός σχεδιασμός είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη ανθεκτικότητας αναλυτικών μεθόδων, καθώς με μόλις 19 πειράματα αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις 5 διαφορετικών παραγόντων.
Η αξιολόγηση έλαβε χώρα τόσο μέσω της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων όσο και μέσω των διαγραμμάτων, όπου φαίνεται ποιοι από τους παράγοντες ασκούν σημαντική επίδραση στις αποκρίσεις που μελετώνται.
Ωστόσο, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, επιτρέπει μια περισσότερο αντικειμενική εκτίμηση των επιδράσεων σε σχέση με τα διαγράμματα των οποίων η ανάλυση στηρίζεται κατά βάση στην οπτική παρατήρηση. Επιπλέον, μέσω της στατιστικής αξιολόγησης είναι δυνατός ο υπολογισμός των διαστημάτων μη σημαντικότητας, γεγονός που διευκολύνει τον ορισμό ορίων ανοχής της μεθόδου.

5. Βιβλιογραφία

1. Vander Heyden,Y. et. al. 2001, "Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation" Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (24):723-753.
2. Iliou, K. et. al. 2018, "Analysis of potential genotoxic impurities in rabeprazole active pharmaceutical ingredient via Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometry, following quality- by-design principles for method development" Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (149):410-418.
3. Ferreira, S. et. al. 2017, "Robustness evaluation in analytical methods optimised using experimental designs", Microchemical Journal (131):163-169.