

УДК 543.544; 615.074

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК: ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Н. А. Эпштейн^{1*}

Резюме. Рассмотрены теоретические и практические основы исследования робастности хроматографических методик с использованием планов Плакетта – Бермана. Пошагово, с пояснениями и примерами рассмотрено установление значимых (потенциально критических) факторов, а также определение допустимых пределов изменения значимых факторов и откликов. Оценка этих пределов важна для обоснования требований к пригодности хроматографической системы. Даны рекомендации по выполнению необходимых вычислений в Excel и оценке робастности хроматографических методик.

Ключевые слова: робастность, планы Плакетта – Бермана, риск, валидация, хроматографические методики, пригодность системы.

VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS: ROBUSTNESS INVESTIGATION WITH USE OF EXPERIMENTAL DESIGN

N. A. Epshtein^{1*}

Abstract. This article covers the theoretical and practical basics of research of the robustness of chromatographic methods on the base of Plackett – Burman design. Step by step, with explanations and examples, the estimation of significant (potentially critical) factors as well as the estimation of permissible limits of the changes of factors and responses are considered. The assessment of the limits is important for the justification of the requirements to the suitability of a chromatographic system. Also, we suggest the recommendations for performing necessary calculations in Excel and for the assessment of robustness of chromatographic methods.

Keywords: robustness, Plackett – Burman design, risk, validation, chromatographic methods, system suitability.

1 – АО «ШТАДА ФармДевелопмент» АО «НИЖФАРМ», 127273, Россия, г. Москва, ул. Отрадная, д. 2Б, стр. 9

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», SC «NIZHPHARM», 2B, b. 9, Otradnaya str., Moscow, 127273, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: naumepshtein@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Исследование робастности хроматографических методик является актуальной задачей фармацевтического анализа. В [1] был представлен новый подход к исследованию робастности хроматографических методик, включающий анализ рисков. При этом было обращено внимание на то, что метод математического планирования экспериментов (МПЭ) с использованием планов Плакетта – Бермана (Plackett – Burman design) имеет существенные преимущества по сравнению с «классическим» способом «One-factor-at-time». Однако математическое планирование экспериментов пока еще сравнительно редко применяют для исследования робастности хроматографических методик. Это вызвано прежде всего человеческим фактором – отсутствием необходимых знаний и в связи с этим преувеличенным представлением о сложности исследования робастности методик с использованием МПЭ.

Цель статьи – в доступной форме рассмотреть теоретические и практические основы исследования робастности хроматографических

методик с использованием планов Плакетта – Бермана и при этом пошагово пояснить необходимые действия, а также дать рекомендации по выполнению необходимых вычислений в Excel.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Определения основных терминов, связанных с исследованием робастности методик, таких как риск, критичность, вероятность, контролируемые отклики, критический фактор и т.д., приведены в [1]. Уточним только то, что следует понимать под терминами «отклик» и «фактор» при исследовании робастности аналитических методик.

Отклик (Response) – *измеряемое или вычисляемое на основании измерения количество, которое является предметом исследования.* При исследовании робастности хроматографических методик рассматривают такие отклики, как характеристики, указанные в требованиях к пригодности хроматографической системы (разрешение между определенными пиками R_s , фактор асимметрии пика $T_{0,05}$, число теоретических та-

релок N , отношение сигнал – шум базовой линии S/N), нормируемое содержание основных веществ и примесей, спектральная чистота пиков, а также другие отклики в зависимости от типа методики [1].

Фактор (Factor) – причина, связанная с исследуемой методикой, потенциально способная повлиять на значение отклика. Для методик ВЭЖХ факторами являются рН, скорость потока подвижной фазы (ПФ), длина волны, температура термостатирования колонки и образцов, длительность уравнивания системы до начала хроматографирования и в конце градиента, факторы, связанные с составом ПФ, серия сорбента и т.д. [1].

Из теории математического планирования экспериментов известно, что наиболее полную информацию об анализируемом объекте можно получить с помощью полного факторного эксперимента (Full Factorial Design, FLFD) [2–7]. Однако FLFD имеет существенный недостаток: он требует максимально большого количества экспериментов по сравнению с другими планами при одинаковом количестве рассматриваемых факторов. Поэтому полный факторный эксперимент очень редко используют для исследования робастности методики и при этом, как правило, рассматривают не более 3 факторов [8]. Обычно используют дробный факторный эксперимент (Fractional Factorial Design), причем наиболее часто применяют двухуровневые планы Плакетта – Бермана [2, 6, 7, 9–34]. В обзоре [29] даны ссылки на несколько публикаций, в которых для исследования робастности хроматографических методик (при валидации), помимо планов Плакетта – Бермана, использовали некоторые другие виды дробного факторного эксперимента.

Преимущество планов Плакетта – Бермана заключается в том, что они дают возможность исследовать влияние на отклики максимального количества факторов k при минимальном количестве экспериментов – строк в матрице планирования экспериментов N . Для планов Плакетта – Бермана $N=k+1$. Это означает, что количество экспериментов – условий хроматографирования – должно быть всего лишь на единицу больше, чем количество факторов.

Суть планов Плакетта – Бермана заключается в отсеивании незначимых/несущественных факторов (называемых иногда шумовым фоном [4]) и установлении **значимых факторов**, тех, которые статистически значимо влияют на отклики. Планы Плакетта – Бермана основываются на наиболее простой – линейной модели взаимосвязи между откликом и факторами:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i, \quad (1)$$

где Y – значение отклика, b_0 и b_i – коэффициенты, X_i – факторы. Из-за использования линейной модели существует риск потери части информации, связанный с возможностью влияния на отклики взаимодействия

факторов между собой. Однако было показано, что эта модель допустима для исследования робастности хроматографических методик, так как можно пренебречь взаимодействием факторов [6, 9].

Построение двухуровневых планов Плакетта – Бермана имеет следующие характерные особенности [4, 6]: факторы варьируют на двух уровнях – верхнем и нижнем, обозначаемых соответственно «+1» (или «+») и «-1» (или «-»). Используют число строк, кратное 4, то есть в общем случае $N=4, 8, 12, 16, 20, 24$ и т.д. Количество факторов должно быть $k=N-1$. Планы с $N=4$ не применяют по статистическим причинам.

Первая строка плана в зависимости от количества экспериментов N и, следовательно, количества факторов $k=N-1$, задается в виде:

$N=8$ ($k=7$): + + + - + - -

$N=12$ ($k=11$): + + - + + + - - - + -

$N=16$ ($k=15$): + + + + - + - + - - - - -

$N=20$ ($k=19$): + + - - + + + - + - - - - + +

$N=24$ ($k=23$): + + + + - + - + - - - + + - - + - - - -

Вторую и последующие строки получают путем сдвига всех элементов предыдущей строки на одну позицию вправо (или влево) и соответственно перестановки последнего (первого) элемента на первую (последнюю) позицию. Этот процесс повторяют $N-2$ раз. Последняя строка плана состоит только из элементов «-», то есть «-1».

В публикациях, а также в нашем примере (будет показано ниже) часто можно увидеть иное расположение «+» и «-» в строках планов Плакетта – Бермана. Это связано с тем, что обычно после формирования матрицы плана в ней дополнительно перемещают строки случайным образом, чтобы минимизировать влияние внешних факторов. Каждому фактору в матрице соответствует определенный столбец; не рекомендуется использовать для одного фактора несколько столбцов, так как это может приводить к неявному дополнительному влиянию случайных ошибок и двухфакторных взаимодействий [16].

Для исследования робастности методик определения примесей чаще всего применяют планы Плакетта – Бермана с $N=12$ ($k=11$), так как они, во-первых, дают возможность учесть в большинстве случаев все факторы высокого и среднего риска [1], и, во-вторых, после внесения в матрицу реальных факторов обычно остаются столбцы, которые можно рассматривать как **фиктивные (dummy) факторы** и использовать их для оценки значимости факторов.

При оценке статистической значимости влияния факторов на отклики с помощью t-критерия Стьюдента или методом ANOVA (дисперсионный анализ) используют не менее трех фиктивных факторов. Поэтому, когда количество реальных факторов $k>8$, мо-

жет потребоваться план Плакетта – Бермана с $N=16$ ($k=15$) [18]. В редких случаях применяют другие варианты плана Плакетта – Бермана, например так называемый Augmented Plackett – Burman of III resolution с дополнительными строчками в матрице, в которых все факторы находятся на номинальном уровне (0), для оценки воспроизводимости методики [35]. Однако мы будем рассматривать только те планы Плакетта – Бермана, которые получаются по классическому способу со случайной перестановкой строк.

ОЦЕНКА РОБАСТНОСТИ МЕТОДИК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАНОВ ПЛАКЕТТА – БЕРМАНА

Этап 1. Определение факторов высокого и среднего риска и контролируемых откликов. Задание допустимых пределов изменения факторов и допустимых пределов изменения откликов

Этот этап подробно рассмотрен в [1], поэтому не будем на нем останавливаться. Просто отметим, что в качестве примера в таблице 1 приведены допустимые пределы изменения факторов высокого и среднего риска, а в таблице 2 – контролируемые отклики и их допустимые пределы изменения для модельной градиентной методики ВЭЖХ определения содержания примесей (далее – методики определения примесей).

Таблица 1.

Факторы высокого и среднего риска [1] для исследования робастности методики

№	Факторы (Xi)	Единица измерения	Значение по методике	Предел изменения [1]	Значение на уровне (-1)	Значение на уровне (+1)
1.	Значение pH буфера, pH	pH	4,5	±0,1	4,4	4,6
2.	Скорость потока ПФ, Flow	мл/мин	1,0	±10%	0,9	1,1
3.	Градиент: начальная точка – % более сильной ПФ, Vmin	%	10	±2% отн.	9,98	10,2
4.	Градиент: конечная точка – % более сильной ПФ, Vmax	%	90	±2% отн.	88,2	91,8
5.	Длина волны, λ	нм	272	±2 нм	270	274
6.	Хроматографическая колонка (Column)*	–	–	–	1*	2*
7.	Температура колонки, T, °C	°C	30	±3 °C	27	33
8.	Концентрация соли в буфере, C _{Buff}	моль/л	0,01	±25%	0,0075	0,0125

Примечание: *Колонки с одинаковым сорбентом, но упакованные разными производителями.

Таблица 2.

Контролируемые отклики и их допустимые пределы изменения

	Отклики	Обозначение	Единица измерения	Допустимые пределы изменения откликов [1]
Y ₁	Содержание идентифицированной примеси	C _{ID}	%	Допустимый предел изменения отклика относительно значения полученного по методике: ±10% для примесей >1,0%; ±25% для примесей от > 0,1% до 1,0%; ±50% для примесей до 0,1%
Y ₂	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	C _U	%	То же
Y ₃	Сумма примесей	Σ _{imp}	%	То же для Σ _{imp}
Y ₄	Число теоретических колонок	N	т.т.	Не менее 2000 т.т. (требование по методике)
Y ₅	Фактор асимметрии пика основного вещества	T _{0,05}	–	более 1,5 (требование по методике)
Y ₆	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	R _S	–	Не менее 2,0 (требование по методике)
Y ₇	Разрешение между двумя пиками примесей, которые наиболее сильно перекрываются.	v	–	Peak-to-valley ratio v≥1,5
Y ₈	Относительное стандартное отклонение при хроматографировании раствора сравнения	RSD	%	Не более 5,0% (требование по методике)
Y ₉	Отношение сигнал – шум S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности системы	S/N	–	≥10 (требование по методике)
Y ₁₀	Время удерживания основного вещества	RT	мин	±15% (градиент)
Y ₁₁	Относительное время удерживания примеси, указанное в методике	RRT	–	±15% (градиент)
Y ₁₂	Спектральная чистота пика**	Purity	–	Пик должен быть спектрально чистым (СЧ)

Примечание: **Для методик определения примесей пики лекарственных веществ и пики примесей с поправочными коэффициентами должны быть СЧ.

Этап 2. Составление матрицы планирования экспериментов

Строят матрицу плана Плакетта – Бермана, изменяют в ней расположение строк случайным образом (рандомизацией). При этом к матрице планирования экспериментов можно для наглядности, но не обязательно, добавить справа столбцы контролируемых откликов, см. таблицу 3.

Этап 3. Проведение анализов и определение значений контролируемых откликов

При исследовании робастности хроматографических методик условия хроматографирования задают строки матрицы плана Плакетта – Бермана. Поэтому анализы проводят следующим образом:

- в соответствии с первой строкой матрицы (условия хроматографирования № 1) берут реальные значения факторов на верхнем пределе, если в строке для фактора стоит «+1», или на нижнем пределе, если стоит (-1). При этих значениях факторов хроматографируют растворы так, как это указано в валидируемой методике;
- в соответствии со второй строкой матрицы (условия хроматографирования № 2) берут реальные значения факторов и при этих значениях факторов хроматографируют растворы так, как это указано в валидируемой методике, и т.д.

Для каждой условия хроматографирования – строк матрицы определяют значения контролируемых откликов и заносят их в таблицу 3 или в отдельную

таблицу 4, имеющую такой же порядок строк, как и таблица 3.

После этого переходят к этапам статистического анализа полученных результатов.

Примечание. При исследовании робастности методик определения примесей рекомендуем определять/контролировать значения откликов при номинальных условиях (по методике) перед началом и по окончании исследования робастности, чтобы быть уверенными, что отклики и, следовательно, сама аналитическая система существенно не изменились в ходе исследования робастности.

Этап 4. Вычисление эффектов факторов

Этот этап является обязательным для первых пяти из шести способов определения значимых факторов, рассматриваемых в этой статье.

Для каждого фактора X_i вычисляют его эффект на отклик Y по формуле:

$$E_{X_i}^Y = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}, \quad (2)$$

где $Y(+)$ – сумма тех значений в столбце отклика Y , которым соответствует «+1» в столбце фактора X_i ; $Y(-)$ – сумма тех значений в столбце отклика Y , которым соответствует «-1» в столбце фактора X_i , N – количество строк в матрице планирования экспериментов. Значения $\sum Y(+)$ и $\sum Y(-)$ удобно вычислять в Excel с помощью функций типа

Таблица 3.

Матрица планирования экспериментов Плакетта – Бермана для исследования робастности методики определения примесей методом ВЭЖХ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				Z
№*	λ	Flow	Dum 1	V_{min} , %	V_{max} , %	pH	Dum 2	Column	T, °C	C_{Buff}	Dum 3	Y_1	Y_2	...	$Y_6(R_S)$...	Y_{12}
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1				2,22		
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1				2,77		
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1				2,85		
4	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1				2,49		
5	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1				2,69		
6	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1				2,62		
7	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1				2,92		
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1				2,14		
9	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1				2,18		
10	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1				2,88		
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1				2,57		
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1				2,77		

Примечание: *№ – порядковый номер эксперимента (каждая строка – это условия хроматографирования).

Столбцы 1÷11 – факторы из таблицы 1; столбцы 12÷Z – результаты определения значений контролируемых откликов Y (таблица 4); Dum – фиктивный (dummy) фактор. Выделена 8-я строка, так как она используется в примере по определению наихудшего случая для отклика R_S .

Таблица 4.

Результаты определения значений контролируемых откликов Y*

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂
№**	C _{ID}	C _U	Σ _{imp}	N	T _{0,05}	R _S	v	RSD	S/N	RT	RRT	Purity
1	0,20	0,14	0,45	2551	1,20	2,22	1,28	1,25	17	11,121	1,12	СЧ***
2	0,25	0,13	0,46	2535	1,13	2,77	1,52	0,92	33	12,175	1,18	СЧ
3	0,23	0,15	0,43	2539	1,25	2,85	1,67	1,35	18	11,023	1,17	СЧ
4	0,24	0,17	0,51	2537	1,23	2,49	1,84	0,98	27	11,521	1,11	СЧ
5	0,22	0,15	0,49	2529	1,28	2,69	1,56	1,21	26	11,655	1,13	СЧ
6	0,26	0,16	0,48	2537	1,16	2,62	1,76	0,86	21	11,075	1,15	СЧ
7	0,25	0,16	0,49	2524	1,28	2,92	1,97	1,26	18	12,633	1,10	СЧ
8	0,21	0,13	0,49	2534	1,24	2,14	1,66	0,94	13	11,027	1,12	СЧ
9	0,22	0,12	0,39	2537	1,19	2,18	2,42	0,99	28	12,004	1,14	СЧ
10	0,25	0,12	0,45	2539	1,15	2,88	2,08	1,28	23	11,156	1,09	СЧ
11	0,24	0,13	0,44	2534	1,12	2,57	2,15	0,87	19	12,215	1,16	СЧ
12	0,24	0,15	0,48	2533	1,20	2,77	1,82	1,14	22	11,121	1,12	СЧ

Примечание: * Расшифровка обозначений контролируемых откликов дана в таблице 2.

**№ – порядковый номер эксперимента в матрице планирования экспериментов (таблица 3);

***СЧ – пик лекарственного вещества спектрально чистый.

$$= \text{СУММЕСЛИ}(B5:B16; >> 0; M20:M31) / (N/2)$$

и

$$= \text{СУММЕСЛИ}(B5:B16; >< 0; M20:M31) / (N/2),$$

где B5:B16 – диапазон ячеек рассматриваемого фактора (столбец значений фактора X_i) в матрице планирования экспериментов (таблица 3), M20:M31 – диапазон ячеек рассматриваемого отклика (столбец значений отклика Y в таблице 3 или в таблице 4); N – количество строк в матрице планирования экспериментов¹.

Иногда используют нормализованные эффекты факторов:

$$E_{X_i}^Y (\%) = \frac{E_{X_i}^Y \cdot 100}{\bar{Y}}, \quad (3)$$

где \bar{Y} – среднее значение откликов в столбце отклика Y .

В таблице 5 в качестве примера приведены расчетные значения эффектов факторов на контролируемые отклики $E_{X_i}^Y$. В этой таблице каждый столбец – это эффекты всех факторов относительно отклика, указанного в заголовке столбца (расчет по формуле 2), а каждая строка – это эффекты фактора, указанного в начале строки, на все отклики.

Этап 5. Нахождение значимых (потенциально критических) факторов

Этот этап, по нашему мнению, является определяющим при исследовании робастности хроматографических методик, и к нему надо относиться с особым

вниманием. Как показала практика, при исследовании робастности методик, связанных с определением примесей, результат определения значимых факторов может зависеть от используемого критерия, то есть от способа оценки значимости факторов; при этом бывают ситуации, когда нельзя отдать предпочтение какому-то одному критерию [14]. Это наглядно показано ниже в разделе, посвященном алгоритму Донга. В связи с вышесказанным для повышения надежности исследования робастности методик определения примесей рекомендуем использовать не менее двух способов оценки значимых факторов.

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ЗНАЧИМЫХ ФАКТОРОВ

5.1. Графическая оценка значимых факторов по графику *Normal probability plot* или *Half-normal probability plot*

Normal probability plot

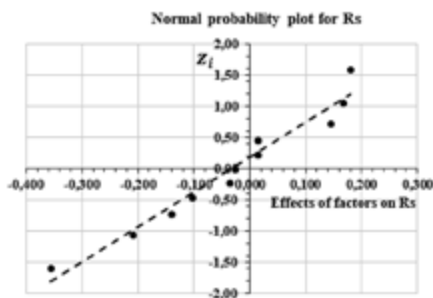
Для визуальной оценки значимых факторов нередко используют график нормального распределения, по-видимому, из-за того, что автоматическое построение графика нормального распределения включено во многие программы статистической обработки данных.

График нормального распределения можно легко построить «вручную». Пример построения графика нормального распределения для отклика R_S с использованием Excel представлен на рисунке 1 (верхний график). Для его построения использованы данные,

¹ Русскоязычная функция СУММЕСЛИ эквивалентна SUMIF.

Данные, использованные для построения графика Normal probability plot для отклика Rs

E_{Xi}^{Rs}	i	f_i	z_i
-0,357	1	0,06	-1,59
-0,210	2	0,14	-1,06
-0,140	3	0,23	-0,73
-0,103	4	0,32	-0,46
-0,037	5	0,41	-0,22
-0,027	6	0,50	0,00
0,013	7	0,59	0,22
0,013	8	0,68	0,46
0,143	9	0,77	0,73
0,167	10	0,86	1,06
0,180	11	0,94	1,59



Данные, использованные для построения графика Half-normal probability plot для отклика Rs

№	$ E_{Xi}^{Rs} $	Rankit	ME	SME	$ E_{Xi,critical}^Y $
1	0,013	0,06	0,412	0,653	0,291
2	0,013	0,17	0,412	0,653	0,291
3	0,103	0,29	0,412	0,653	0,291
4	0,140	0,41	0,412	0,653	0,291
5	0,143	0,53	0,412	0,653	0,291
6	0,180	0,67	0,412	0,653	0,291
7	0,210	0,81	0,412	0,653	0,291
8	0,357	0,98	0,412	0,653	0,291

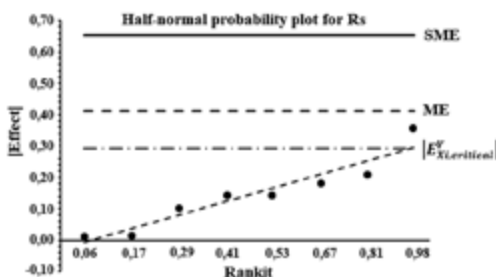


Рисунок 1. Графики Normal probability plot и Half-normal probability plot для определения змых факторов при $\alpha=0,05$ ($P=95\%$). Эффекты факторов E_{Xi}^{Rs} и их абсолютные величины расположены в таблицах по возрастанию значений (пояснения см. в тексте)

приведенные в таблице расположенной слева от графика. В первом столбце этой таблицы приведены значения эффектов факторов E_{Xi}^{Rs} в порядке возрастания, во втором столбце – номера строк (i), в третьем столбце – параметр f_i , который вычисляется по формуле [36]

$$f_i = (i - 0,375) / (n + 0,25), \quad (3)$$

где n – количество эффектов факторов (строк в таблице). В четвертом столбце – параметр z_i , вычисляемый в Excel по формуле =НОРМ.СТ.ОБР(f_i), которая возвращает обратное значение стандартного нормального распределения¹.

Теоретически график нормального распределения должен проходить через ноль. Поэтому как незна

Таблица 5.

Расчетные значения эффектов факторов E_{Xi}^Y на отклики Y

Фактор	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_{10}	Y_{11}	Y_{12}
	C_{ID}	C_U	Σ_{imp}	N	$T_{0,05}$	R_s	v	RSD	S/N	RT	RRT	$Purity$
λ	-0,008	-0,005	0,000	3,500	-0,002	0,013	-0,282	0,018	2,500	-0,145	0,020	-
Flow	0,015	-0,005	-0,003	1,833	-0,058	0,143	-0,035	-0,028	-0,500	0,076	0,013	-
Dum 1	-0,008	-0,005	-0,030	5,833	0,005	-0,037	-0,032	0,138	0,167	-0,704	-0,003	-
$B_{min}, \%$	0,002	-0,012	-0,030	0,500	-0,042	-0,140	0,105	-0,198	-0,167	-0,209	0,030	-
$B_{max}, \%$	-0,015	-0,015	-0,017	5,833	-0,028	-0,357	0,188	-0,072	-1,833	-0,368	-0,007	-
pH	-0,005	0,018	0,023	2,500	0,048	-0,103	-0,228	0,038	-6,167	-0,582	-0,013	-
Dum 2	0,008	0,012	0,007	-5,500	0,015	-0,027	0,278	-0,118	2,167	0,319	0,003	-
Column	-0,018	-0,008	-0,003	-1,500	0,035	-0,210	-0,152	0,015	0,833	0,156	0,010	-
T, °C	0,008	0,002	0,033	-1,167	-0,008	0,013	-0,148	-0,112	3,500	-0,512	0,000	-
C_{Buff}	0,012	-0,002	-0,017	-1,167	0,005	0,180	0,212	0,085	4,833	0,122	-0,013	-
Dum 3	-0,002	-0,005	0,003	-5,167	0,035	0,167	0,075	0,128	-5,167	-0,146	-0,020	-
Критические значения эффектов факторов по отношению к откликам – $E_{Xi,critical}^Y$, вычисленные с использованием t-критерия Стьюдента по формуле (5)												
$\alpha=0,05$	0,020	0,023	0,052	16,080	0,065	0,291	0,489	0,375	9,449	1,326	0,035	
$\alpha=0,1$	0,013	0,015	0,034	10,384	0,042	0,188	0,316	0,242	6,102	0,856	0,022	
Критические значения эффектов факторов по отношению к откликам – ME и SME, вычисленные по формулам (9) и (10)												
ME ($\alpha=0,05$)	0,038	0,023	0,046	6,373	0,080	0,412	0,423	0,211	7,482	0,750	0,036	
ME ($\alpha=0,1$)	0,027	0,019	0,037	5,140	0,064	0,332	0,341	0,170	6,034	0,605	0,029	
SME ($\alpha=0,05$)	0,043	0,037	0,072	10,119	0,127	0,653	0,671	0,335	11,879	1,191	0,058	

¹ Функция НОРМ.СТ.ОБР эквивалентна NORM.S.INV.

чимые/несущественные факторы рассматривают те, для которых значения z_i располагаются вблизи линии тренда, проходящей около нуля, а как значимые/существенные – те, которые существенно отклоняются от линии тренда. Из рисунка 1 видно, что существенно отклоняется от линии тренда только крайняя точка справа, ей соответствует эффект $E_{X_i}^{Rs} = 0,180$. Для того чтобы определить, какому фактору соответствует это значение, смотрим таблицу 5, столбец Rs, находим в нем число 0,180 и по строке определяем фактор – C_{Buff} . На основании полученного результата можно было бы предположить, что концентрация буфера является значимым (потенциально критическим) фактором. Однако это предположение в дальнейшем не подтвердилось. В общем случае более надежным, по нашему мнению, является определение значимых факторов с использованием графика Half-normal probability plot.

Half-normal probability plot

Построение этого графика будет рассмотрено ниже, в разделе, посвященном алгоритму Донга. Отметим только то, что для отклика Rs на графике Half-normal plot более четко (чем на Normal probability plot) видна отклоняющаяся от тренда точка – крайняя справа: $E_{X_i}^{Rs} = -0,357$ (рисунок 1). Она соответствует фактору B_{max} в таблице 5 и указывает на значимое влияние «% более сильной ПФ» в конце градиента; это подтвердилось в дальнейшем.

Подчеркнем, что определение значимых факторов с помощью графика Normal probability plot или Half-normal probability plot полезно, но недостаточно, так как в значительной мере субъективно, и его можно использовать только как дополнение к статистической оценке значимых факторов.

5.2. Определение значимых факторов с использованием t-критерия Стьюдента [16]

Для каждого фактора X_i можно выразить значение t-критерия Стьюдента в виде:

$$t = \frac{|E_{X_i}^Y|}{SD_Y}, \quad (4)$$

где $|E_{X_i}^Y|$ – абсолютное значение эффекта фактора X_i относительно отклика Y , вычисленное по формуле (2); SD_Y – стандартное отклонение, рассчитанное определенным образом (см. ниже). Подставив в (4) табличное (критическое) значение t-критерия Стьюдента (t_{tab}), получаем выражение для критического значения эффекта фактора X_i относительно отклика Y :

$$|E_{X_i, \text{critical}}^Y| \equiv E_{X_i, \text{critical}}^Y = t_{\text{tab}} \cdot SD_Y. \quad (5)$$

Из формулы (5) следует, что для вычисления $E_{X_i, \text{critical}}^Y$ необходимо знать величину стандартного отклонения SD_Y , а также критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента t_{tab} при заданных значениях числа степеней свободы f и уровня значимости α . Берут односторонний t-критерий Стьюдента, так как речь идет о предельных значениях. Значение t_{tab} можно вычислить в Excel с помощью формулы =СТЬЮДЕНТ.ОБР((1- α); f). В этой формуле число степеней свободы $f=n-1$, где n – количество точек данных при определении SD_Y ; α – уровень значимости – вероятность отвергнуть нулевую гипотезу (о том, что эффект фактора является значимым), когда гипотеза на самом деле верна: $\alpha=1-P$, где P – доверительная вероятность, выраженная в долях от единицы. Чаще всего берут $\alpha=0,05$ ($P=95\%$) и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$), очень редко – $\alpha=0,01$ ($P=99\%$)¹.

Эффект фактора X_i относительно отклика Y является значимым при заданном уровне значимости α , если $|E_{X_i}^Y| > E_{X_i, \text{critical}}^Y = t_{\text{tab}} \cdot SD_Y$.

Способы определения стандартного отклонения SD_Y

Вычисление SD_Y с использованием эффектов фиктивных (dummy) факторов. Этот способ вычисления SD_Y основан на априорном предположении, что все фиктивные эффекты являются незначимыми. Для вычисления SD_Y применяют формулу:

$$SD_Y = \sqrt{\frac{\sum E_{\text{dummy}; Y}^2}{n_{\text{dummy}}}}, \quad (6)$$

где $\sum E_{\text{dummy}; Y}^2$ – сумма квадратов эффектов фиктивных (dummy) факторов для рассматриваемого отклика Y ; n_{dummy} – число фиктивных факторов в матрице планирования экспериментов. Алгоритм действий следующий. Для каждого контролируемого отклика вычисляют SD_Y по формуле (6), подставляют его в формулу (5) и вычисляют критические значения эффектов для заданных уровней значимости (обычно для $\alpha=0,05$ и $\alpha=0,1$). Анализируют столбцы в таблице эффектов факторов на наличие в столбце значений, превышающих по абсолютной величине критическое значение эффекта для соответствующего отклика $E_{X_i, \text{critical}}^Y$. Те отклики, для которых $|E_{X_i}^Y| > E_{X_i, \text{critical}}^Y$, рассматриваются как значимые для заданного уровня значимости α .

Недостатком этого способа вычисления SD_Y является то, что для обеспечения статистической достоверности оценки SD_Y необходимо включать не менее 3 фиктивных факторов. При $N=8$ и использовании 3 фик-

¹ Функция СТЬЮДЕНТ.ОБР эквивалентна T.INV.

тивных факторов для определения SD_Y остается только 4 столбца для включения реальных факторов, однако этого в большинстве случаев недостаточно для методик определения примесей, так как для них количество факторов высокого и среднего риска обычно больше, чем 4 [11]. Как следствие, приходится использовать матрицу с $N=12$ (можно включить до 8 реальных факторов), а это существенно увеличивает объем работ.

Вычисление SD_Y в ходе определения внутрилабораторной прецизионности методики. В [9, 16] предложено в качестве SD_Y в формуле (5) использовать результаты, полученные при исследовании внутрилабораторной прецизионности методики. Такая возможность подтверждена пока только на примере методики количественного определения [9]. С теоретической точки зрения значения SD_Y можно было бы определять и в ходе исследования внутрилабораторной прецизионности методик определения примесей, однако это связано с риском неправильных выводов в случае очень близко расположенных или частично перекрывающихся примесей. Поэтому надежнее и проще использовать фиктивные факторы для определения SD_Y .

Пример определения значимых факторов в таблице 5 с использованием t-критерия Стьюдента. В верхней части этой таблицы приведены расчетные значения эффектов факторов $E_{X_i}^Y$ на отклики Y , вычисленные по формуле (2), а в нижней – критические значения эффектов $E_{X_i, critical}^Y$ для каждого столбца при уровнях значимости $\alpha=0,05$ ($P=95\%$) и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$). Для определения значимых факторов в таблице 5 последовательно рассматривают столбцы (они содержат эффекты факторов для отклика, указанного в названии столбца) и сравнивают абсолютные значения эффектов факторов в каждом из столбцов с критическими значениями $E_{X_i, critical}^Y$, расположенным в нижней части столбца. Такой анализ таблицы 5 показывает следующее. При $\alpha=0,05$ критическое значение превышено только в столбе R_s : в нем у фактора V_{max} абсолютное значение эффекта, равное $-0,357$ (выделено жирным шрифтом), больше, чем $E_{X_i, critical}^Y = 0,291$. Следовательно, с доверительной вероятностью 95% только фактор V_{max} , то есть «% более сильной ПФ в конце градиента», является значимым. При $\alpha=0,1$ ($P=90\%$) значимых факторов существенно больше – они отмечены курсивом, но меньше вероятность того, что эти факторы действительно являются значимыми.

5.3. Определение и графическое представление значимых факторов с помощью стандартизованной диаграммы Парето (Standardized Pareto Chart)

Этот способ оценки значимых факторов по своей сути аналогичен способу, рассмотренному выше, и не имеет перед ним преимуществ за исключением

возможности наглядно иллюстрировать определение значимых факторов, а это иногда важно для презентации результатов.

Для каждого отклика Y вычисляют стандартизованные значения эффектов факторов $|E_{X_i}^Y| / SD_Y$, то есть отношение абсолютного значения эффекта фактора X_i по отклику Y к стандартному отклонению рассматриваемого отклика. Значения $E_{X_i}^Y$ вычисляют по формуле (2), а SD_Y – как описано выше, в разделе 5.2. Строят диаграмму, например, следующим образом (рисунок 2, верхняя диаграмма). Слева от оси ординат наносят названия факторов, причем факторы располагаются сверху вниз в порядке убывания величины стандартизованных значений эффектов. Справа от оси ординат, напротив названий факторов, наносят узкие прямоугольники, длина которых пропорциональна стандартизованным значениям эффектов факторов [24]. Так как $|E_{X_i}^Y| / SD_Y$ является t-критерием Стьюдента, то для определения значимых факторов на график Парето наносят вертикальную линию – критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента для заданной доверительной вероятности, например $P=95\%$ ($\alpha=0,05$). При таком построении диаграммы значимыми (с соответствующей доверительной вероятностью) являются те факторы, у которых прямоугольник пересекает вертикальную линию табличного значения t-критерия Стьюдента: у этих факторов экспериментальное значение t-критерия Стьюдента больше, чем табличное значение.

Вместо горизонтальной диаграммы Парето, как на рисунке 2 сверху, можно построить диаграмму с вертикальными столбцами – рисунок 2, нижняя диаграмма. На такой диаграмме значимыми (с соответствующей доверительной вероятностью) являются те факторы, у которых прямоугольник заканчивается выше линии табличного значения t-критерия Стьюдента. Недостатком такой диаграммы является то, что при презентации на ней труднее читать названия факторов, так как они расположены под углом к оси абсцисс.

На рисунке 2 в качестве примера приведена стандартизованная диаграмма Парето для отклика R_s . Она наглядно показывает, что при доверительной вероятности $P=95\%$ ($\alpha=0,05$) значимым фактором является только V_{max} , то есть «% более сильной ПФ в конце градиента».

Примечание: для определения значимых факторов в зависимости от уровня значимости на диаграмму Парето наносят линии табличных значений критерия Стьюдента, соответствующие не только уровню значимости $\alpha=0,05$ ($P=95\%$), но и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$), а иногда и $\alpha=0,01$ ($P=99\%$).

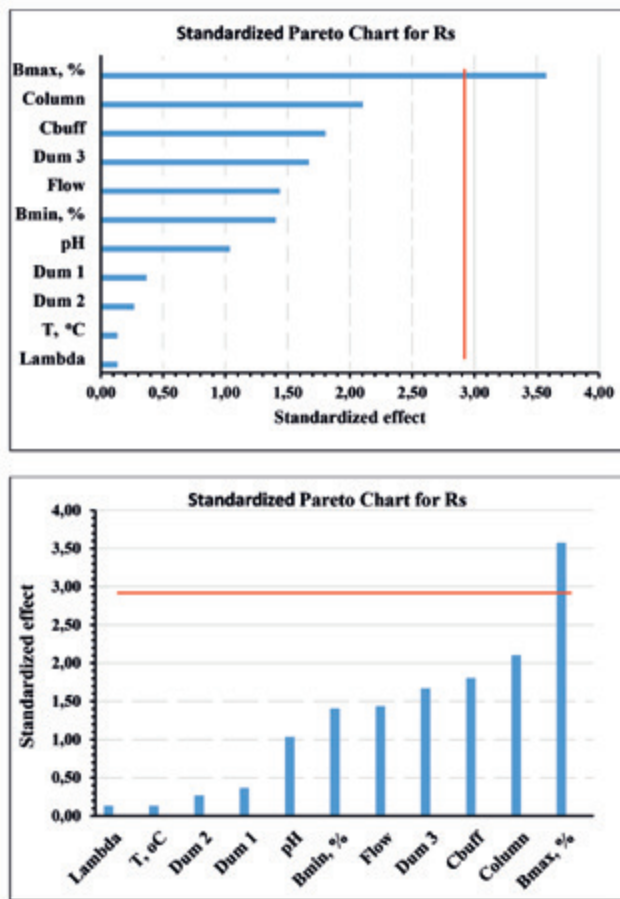


Рисунок 2. Два вида стандартизированной диаграммы Парето. На верхней диаграмме ось ординат – факторы; прямоугольник рядом с фактором – стандартизированное значение эффекта фактора $|E_{X_i}^Y|/SD_Y$. Вертикальная красная линия – критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента для вероятности P=95% ($\alpha=0,05$). На нижней диаграмме обозначения такие же (пояснения см. в тексте)

5.4. Определение и графическое представление значимых факторов с использованием алгоритма Донга; критерии ME и SME

В настоящее время для оценки значимости эффектов наиболее часто применяют алгоритм Донга (Dong) [16, 37], так как он не требует использования фиктивных факторов. Это дает возможность для многих методик определения примесей перейти от матрицы планирования экспериментов с N=12 к N=8 и значительно сократить объем экспериментальных работ.

Алгоритм Донга заключается в следующем.

1. Вычисляют исходную оценку ошибки (initial error estimate) по формуле:

$$SD_0^Y = 1,5 \cdot \text{median} |E_X^Y|, \quad (i=1, 2, \dots, N) \quad (7)$$

где $\text{median} |E_X^Y|$ – медиана абсолютных значений эффектов всех факторов относительно рассматриваемого отклика Y; N – число строк в матрице планирования

экспериментов. На практике это означает, что для каждого отклика Y – столбца в таблице 5 – вычисляют медиану абсолютных значений эффектов факторов (функция МЕДИАНА или MEDIAN в Excel) и умножают ее на 1,5.

2. Вычисляют стандартную ошибку (standard error) по формуле:

$$SD_1^Y = \sqrt{\frac{\sum (E_X^Y)^2}{m}} \quad \text{для} \quad |E_X| \leq 2,5 \cdot SD_0, \quad (8)$$

где $\sum (E_X^Y)^2$ – сумма квадратов эффектов тех факторов (относительно рассматриваемого отклика Y), у которых абсолютное значение меньше или равно $2,5SD_0$; m – число таких эффектов.

Примечание. Если окажется, что доля значимых эффектов велика (ориентировочно $\geq 50\%$), то с теоретической точки зрения можно использовать алгоритм Донга с итерацией. Для этого в формулу (8) в условие $|E_X| \leq 2,5SD_0$ вместо SD_0 подставляют SD_1 , заново определяют SD_1 и т.д. Однако в таких случаях лучше использовать фиктивные факторы, даже если для этого надо будет увеличить размер матрицы планирования экспериментов [16].

3. Вычисляют критическое значение эффекта фактора, называемое Margin of Error (предел погрешности):

$$ME = t_{(1-\alpha/2; df)} \cdot SD_1^Y, \quad (9)$$

где t – критерий Стьюдента для уровня значимости α ; $df=m$ – число степеней свободы, где m – число эффектов, абсолютное значение которых меньше $2,5SD_0$. Значение $t_{(1-\alpha/2; df)}$ можно определять в Excel с помощью функции =СТЮДЕНТ.ОБР(значение $1-\alpha/2$; значение m).

При большом числе факторов повышается вероятность того, что какой-то незначимый эффект фактора превысит значение ME. Поэтому Донг рекомендует использовать еще и дополнительный критерий оценки значимости эффектов факторов, называемый Simultaneously Margin of Error:

$$SME = t_{(1-\alpha^*/2, df)} \cdot SD_1^Y, \quad (10)$$

где t – критерий Стьюдента для уровня значимости $\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$. При этом любой эффект, который превышает ME, но ниже SME, рассматривается как «возможно значимый», а эффект, который превышает SME, как «значимый». Значение $t_{(1-\alpha^*/2, df)}$ можно определять в Excel с помощью функции =СТЮДЕНТ.ОБР(значение $1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$; значение m).

Таблица 6.

Значения Rankit в зависимости от порядкового номера (№) абсолютного эффекта фактора $|E_{X_i}^Y|$ в таблице для построения графика Half-normal probability plot (рисунок 1) и количества строк N в плане Плакетта – Бермана [16]

Порядковый номер эффекта	Rankit		
	Для N=8	Для N=12	Для N=16
1	0,09	0,06	0,04
2	0,27	0,17	0,12
3	0,46	0,29	0,21
4	0,66	0,41	0,29
5	0,90	0,53	0,38
6	1,21	0,67	0,47
7	1,71	0,81	0,57
8		0,98	0,67
9		1,19	0,78
10		1,45	0,89
11		1,91	1,02
12			1,18
13			1,36
14			1,61
15			2,04

При исследовании робастности методик рекомендуется рассматривать как значимые те факторы, у которых абсолютное значение эффекта превышает ME [16]. Это повышает надежность исследования робастности методик, хотя и увеличивает вероятность того, что как значимый будет рассмотрен возможно значимый эффект фактора.

Значимые эффекты факторов определяют по таблице 5 таким же образом, как и в примере в разделе 5.3, но абсолютные значения эффектов факторов сравнивают со значениями ME для $\alpha=0,05$ (P=95%), а также для $\alpha=0,1$ (P=90%). Из таблицы 5 видно, что, во-первых, всегда $ME < SME$, во-вторых, при одинаковом значении α для одних откликов $ME > E_{X, critical}^Y$, а для других, наоборот, $E_{X, critical}^Y > ME$. Это указывает на необходимость использования нескольких критериев при исследовании робастности хроматографических методик определения примесей.

Для визуального представления/оценки значимости эффектов факторов при применении алгоритма Донга целесообразно использовать график Half-normal probability plot (рисунок 1, нижний график). Его можно построить с использованием таблицы, расположенной слева от графика. Отметим, что в таблице присутствуют только реальные факторы (нет фиктивных факторов). В соответствии с этой таблицей строят график зависимости абсолютных значений эффектов факторов $|E_X^Y|$ (расположенных по возрастанию) от значений Rankit (ранг; таблица 6) и наносят на этот график линию предела погрешности ME. Значимыми будут те факторы, у которых точки эффектов расположены выше линии ME. Для сравнения на рисунке 6 дополнительно нанесены еще 2 предела: SME и $E_{X, critical}^Y$ (критическое значение, основанное на t-критерии Стьюдента; раздел 5.3). Видно, что $SME \gg ME$, а ME (в этом примере, но не в общем случае) больше $E_{X, critical}^Y$.

5.5. Определение значимых факторов методом дисперсионного анализа (ANOVA) и фиктивных факторов [13]

Этот способ не имеет существенного преимущества перед методом с использованием t-критерия Стьюдента [11], поэтому не будем на нем останавливаться. Отметим только, что у значимых факторов расчетное значение F-критерия больше, чем табличное (критическое) значение F-критерия для заданого уровня значимости α , а расчетная оценка уровня значимости p меньше, чем α .

5.6. Определение значимых факторов с использованием теста рандомизации (Randomization test).

Этот тест подробно рассмотрен в [22]. Он связан с перебором всевозможных комбинаций полученных результатов, требует большого объема вычислений, но на современных компьютерах это занимает немного времени. Преимуществом теста рандомизации является то, что он не связан с каким-то заданным распределением случайной величины, его эффективность в оценке значимых факторов высокая, сравнимая с методом Донга; при этом тест рандомизации в некоторых случаях указывает на большее количество значимых факторов по сравнению с методом Донга, а в других случаях – наоборот. Однако в общем случае авторы публикации [22] все-таки отдают предпочтение методу Донга.

6. Статистическая оценка допустимых пределов изменения для значимых факторов [16]

После того как установлены значимые факторы, для реальных значимых факторов проводят оценку их допустимых пределов изменения относительно номинального значения, а также допустимых границ изменения.

Допустимый предел изменения:

$$\Delta X = \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| \cdot E_{X, critical}^Y}{2|E_X^Y|} \tag{11}$$

Допустимая нижняя граница:

$$X_0 - \Delta X. \quad (12)$$

Допустимая верхняя граница:

$$X_0 + \Delta X, \quad (13)$$

где X_0 , $X_{(1)}$ и $X_{(-1)}$ – реальные значения фактора X для уровней (0), (1) и (-1) соответственно; E_X^Y – эффект фактора X по отклику Y (формула 2); $E_{X,critical}^Y$ – критическое значение эффекта фактора X по отклику Y (формула 5) или аналогичное ему по смыслу значение по методу Донга – МЕ (формула 9).

Пример. Согласно таблице 5 для уровня значимости $\alpha=0,05$ имеется один значимый фактор – V_{max} для отклика Rs . Для этого фактора $|E_X^Y| = 0,357$;

$E_{X,critical}^Y = 0,291$; $X_0=90,0\%$, $X_{(1)}=91,8\%$; $X_{(-1)}=88,2\%$. Подстановка этих значений в формулы (11), (12) и (13) дает допустимый предел изменения $\Delta V_{max}=\pm 1,47\%$ и, соответственно, допустимые границы $90,0\pm 1,47\%$. Для $ME=0,412$ получается больший допустимый предел изменения $\Delta V_{max}=\pm 2,08\%$ и более широкие допустимые границы $90,0\pm 2,08\%$. Берем меньшее значение допустимого предела изменения $\pm 1,47\%$ и проверяем, что суммарная погрешность мерной посуды, используемой для приготовления подвижной фазы (ПФ), плюс точность смешения ПФ в хроматографе (в %) не превышает $\Delta V_{max}=\pm 1,47\%$. Если все-таки превышает, то для приготовления ПФ рекомендуется использовать взвешивание вместо смешения объемов [1].

7. Статистическая оценка допустимых пределов изменения откликов для наихудших случаев с целью уточнения требований к пригодности хроматографической системы

В [16] для статистической оценки допустимых пределов изменения откликов предложено использовать **наихудшие случаи (the worst-case situation)** – комбинации факторов, дающих наихудшее значение отклика на основании исследования робастности методики, например наихудшее разрешение Rs , наибольшее значение коэффициента асимметрии и т.д. При этом для определения наихудших условий рассматриваются статистически значимые факторы при $\alpha=0,05$ и те, которые близки к ним (значимы при $\alpha=0,1$). Факторы, которые статистически незначимы при $\alpha=0,1$, считаются неважными и их эффекты, как полагают, происходят только из экспериментальной ошибки.

Теоретический расчет (прогноз) допустимых пределов изменения откликов. Для теоретического расчета допустимых пределов изменения откликов применяют формулу:

$$Y_{worst-case,j} = b_0 + \frac{E_{F_1}}{2} \cdot F_1 + \frac{E_{F_2}}{2} \cdot F_2 + \dots + \frac{E_{F_k}}{2} \cdot F_k, \quad (14)$$

где $Y_{worst-case,j}$ – прогнозируемое значение рассматриваемого отклика Y_j для наихудшего случая, b_0 – средний результат для этого отклика (the average design result), то есть среднее значение в столбце отклика Y_j , E_{F_i} – эффект фактора i и F_i – соответствующий ему уровень (-1) или (+1) или (0) для худшего из экспериментально полученных значений Y_j . Множитель F_i для значимых факторов равен (-1) или (+1) в соответствии с матрицей планирования экспериментов, а для незначимых факторов значения (-1) или (+1) в матрице планирования экспериментов заменяются на (0): $F_i=0$ (то есть считается, что незначимые факторы не влияют на наихудшие случаи). Теоретический расчет допустимых пределов изменения откликов по формуле (14) привлекателен. Однако наш и литературный опыт (например, [27]) показывает, что результат теоретического расчета может иногда существенно отличаться от результата экспериментальной оценки допустимого предела изменения отклика.

Пример. В таблице 5 для отклика Rs значимыми факторами на уровнях $\alpha=0,05$ и $\alpha=0,1$ являются V_{max} ($E_{F_i} = -0,357$) и Column ($E_{F_i} = -0,210$) – колонки с одинаковым сорбентом, но упакованные разными производителями. Среднее значение эффектов для отклика Rs в таблице 4 $b_0=2,58$, а худшее (наименьшее) значение для отклика Rs равно 2,14; это значение соответствует строке 8 в матрице Плакетта – Бермана, а в строке 8 у значимых факторов – V_{max} и Column уровни равны +1, то есть для них $F_i=+1$. Для остальных факторов $F_i=0$. Подставив данные для E_{F_i} и F_i в формулу (14), получаем $2,58 - 0,357/2 - 0,214/2=2,29$. Так как $2,29 > 2,14$ (худший экспериментальный результат), это указывает на плохую точность прогноза наихудшего случая для отклика Rs .

Экспериментальная оценка допустимых пределов изменения откликов. В матрице откликов – таблица 5 – помечают те отклики, для которых имеются статистически значимые факторы при $\alpha=0,05$, и те, которые близки к ним – значимы при $\alpha=0,1$. Для каждого из таких откликов в таблице 5 находят наихудший случай, например для Rs это значени 2,14 в восьмой строке. Ему соответствует такая же строка в матрице планирования экспериментов (таблица 3). В этой строке для всех незначимых факторов по рассматриваемому отклику заменяют уровни +1 или -1 на 0 и получают условия эксперимента (хроматографирования) для наихудшего случая по отклику Rs :

λ	Flow	V_{max} , %	V_{max} , %	pH	Column	T, °C	C_{Buff}
0	0	0	1	0	1	0	0

При этой комбинации факторов, выраженных в фактических значениях, проводят не менее 3 параллельных определений отклика и вычисляют допустимый предел изменения отклика в соответствии с формулами.

В случае нижней границы:

$$Y_L = \bar{Y}_{\text{worst-case}, j} - t_{\alpha, n-1} \frac{SD_j}{\sqrt{n}}. \quad (15)$$

В случае верхней границы:

$$Y_U = \bar{Y}_{\text{worst-case}, j} + t_{\alpha, n-1} \frac{SD_j}{\sqrt{n}}, \quad (16)$$

где $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j}$ и SD_j соответственно среднее значение и стандартное отклонение отклика Y_j для наихудшего случая; $t_{\alpha, n-1}$ – односторонний критерий Стьюдента для 95%-й доверительной вероятности; n – число параллельных определений. Для отклика R_s в нашем примере $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j} = 2,14$, $t_{\alpha, n-1} = 2,92$, $SD_j = 0,04$. Подставив эти значения в формулу (15), получаем $Y_L = 2,07$. Это значение удовлетворяет требованию к R_s по методике ($R_s \geq 2,0$), и, следовательно, нет необходимости в коррекции требования к разрешающей способности хроматографической системы. В то же время экспериментальное значение R_s для наихудшего случая 2,07 существенно меньше теоретического расчета 2,29. В связи с этим и со сказанным выше рекомендуем не ограничиваться теоретической оценкой допустимых пределов изменения откликов.

Примечание. Если для отклика отсутствуют значимые эффекты и, следовательно, отсутствуют упомянутые выше наихудшие случаи, то его допустимые пределы изменения можно определять аналогичным образом, проводя параллельные определения при номинальных значениях всех факторов (то есть при условиях по валидируемой методике) и подставляя в формулы (15) или (16) среднее значение отклика \bar{Y}_j вместо $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j}$ [16].

8. Компьютерные программы для статистической обработки данных и планирования экспериментов, которые могут быть использованы для определения значимых факторов

В публикации [29] дан обзор по применению математического планирования экспериментов в хроматографии, а также даны ссылки на 15 основных компьютерных программ, которые были применены в хроматографических исследованиях. Отметим, что некоторые из этих программ могут быть использованы для определения значимых факторов. Среди них можно выделить: STATISTICA (StatSoft) – <http://statsoft.ru/resources/support/download.php>, версия для Windows –

<http://soft.mydiv.net/win/download-STATISTICA.html>; STATGRAPHICS (Statpoint Technologies) – <http://www.statgraphics.com/> и SPSS (IBM) – <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пошагово рассмотрено исследование робастности хроматографических методик с использованием планов Плакетта – Бермана. При этом даны пояснения, рекомендации и примеры, что чрезвычайно важно для практического применения метода планирования экспериментов при валидации робастности хроматографических методик. Основное внимание уделено определению значимых факторов, то есть тех, которые потенциально могут быть критическими для откликов. Показано, что для повышения надежности исследования робастности методик определения примесей следует использовать не менее двух способов оценки значимых факторов.

Если у валидируемой методики все факторы высокого и среднего риска [1] являются незначимыми, то она *a priori* является робастной.

Если имеются значимые факторы для некоторых откликов, то выполняют следующие действия:

- для значимых факторов вычисляют допустимые пределы их изменения и при необходимости учитывают их в методике (см. пример в разделе 6);
- для откликов, для которых имеются значимые факторы, определяют наихудший случай и на его основании – допустимые пределы изменения отклика [формулы (15) и (16)]. Если эти допустимые пределы укладываются в исходные требования к пригодности хроматографической системы, то методика робастная. Если нет, то рассматривают возможность коррекции допустимого предела изменения отклика в требованиях к пригодности хроматографической системы в соответствии со значениями, полученными по формулам (15) и (16). Если эта коррекция невозможна, то делают вывод о необходимости доработки методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Исследование робастности при валидации методик ВЭЖХ и УЭЖХ: современный подход, включающий анализ рисков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 140–153. [Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Issledovanie robastnosti pri validatsii metodik VEZhKh i UEZhKh: sovremenniy podkhod, vkluchayushchii analiz riskov // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Robustness study in the validation of HPLC and HPLC techniques: a modern approach, including risk analysis // Development and registration of drugs]. 2018. № 1(22). P. 140–153.]
2. Vander Heyden Y., Nassart D. L. Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry // Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products / Ed. by Hendriks M.W.B., de Boer J.H., Smilde A.K.. – Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1996. P. 79–147.

3. *Montgomery D. C.* Design and analysis of experiments. 5th ed. – N.Y.: John Wiley & Sons, Inc. 2001. 684 p.
4. *Кононюк А. Е.* Основы научных исследований (Общая теория эксперимента). Кн. 2. – Киев. КНТ. 2010. 452 с. [Kononyuk A. E. Osnovy nauchnykh issledovaniy (Obshchaya teoriya eksperimenta). Kn. 2. Kiev. KNT. [Fundamentals of scientific research (General theory of the experiment). Book. 2.] – Kiev. CST. 2010. 452 p.]
5. *Ott R. L., Longnecker M.* An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 6th Ed. – Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning. 2010. 1273 p.
6. *Эрмер Й., МакБ. Миллер Д. Х.* Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с. [Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice / Ed. by Remer J., Miller J. H. – Wenham: Wiley-VT Verlag GmbH & Co. Ka. 2005. 403 p.]
7. *Bartolucci A., Singh K. P., Bae S.* Introduction to Statistical Analysis of Laboratory Data. Chart 8. Robustness and Ruggedness. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. 256 p.
8. *Ganorkara S. B., Dhumal D. M., Shirkhedkar A. A.* Development and validation of simple RP-HPLC-PDA analytical protocol for zileuton assisted with Design of Experiments for robustness determination // *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. V. 10. P. 273–282.
9. *Vander Heyden Y., Luypaert K., Hartmann C. et al.* Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopoeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental design and statistical interpretations // *Analytica Chimica Acta*. 1995. V. 312. P. 245–262.
10. *Fabre H.* Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996. V. 14. P. 1125–1132.
11. *Cuadros Rodriguez L., Blanc Garcia R., Garcia Campana A. M., Bosque Sendra J.M.* A new approach to a complete robustness test of experimental nominal conditions of chemical testing procedures for internal analytical quality assessment // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998. V. 41. P. 57–68.
12. *Jimidar M., Niemeijer N., Peeters R., Hoogmartens J.* Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets // *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 1998. V. 18. P. 479–485.
13. *Vander Heyden Y., Jimidar M., Hunda E. et al.* Determination of system suitability limits with a robustness test // *J. Chromatography A*. 1999. V. 845. P. 145–154.
14. *Hund E., Vander Heyden Y., Haustein M. et al.* Comparison of several criteria to decide on the significance of effects in a robustness test with an asymmetrical factorial design // *Analytica Chimica Acta*. 2000. V. 404. P. 257–271.
15. *Ragonese R., Mulholland M., Kalman J.* Full and fractional experimental designs for robustness in the high-performance liquid chromatographic analysis of co-deine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation // *J Chromatogr A*. 2000. V. 870. P. 45–51.
16. *Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J. et al.* Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2001. V. 24. № 5–6. P. 723–753.
17. *Hund E., Massart D. L., Smeyers-Verbeke J.* Robust regression and outlier detection in the evaluation of robustness tests with different experimental designs // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V. 463, P. 53–73.
18. *Hund E., Vander Heyden Y., Massart D. L., Smeyers-Verbeke J.* Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2002. V. 30. P. 1197–1206.
19. *Jimidar M., Van Ael W., De Smet M., Coccaerts P.* Method Validation and Robustness Testing of an Enantioselective CE Method for Chemical Quality Control, LC-GC Europe, April, 2002. P. 2–9.
20. *Yong-Guo Li, Hong Liu, Y. Vander Heyden et al.* Robustness tests on the United States Pharmacopoeia XXVI HPLC assay for ginsenosides in Asian and American ginseng using an experimental design // *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 536. P. 29–38.
21. *Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y.* The variance of screening and supersaturated design results as a measure for method robustness // *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 544. P. 28–279.
22. *Dejaegher B., Capron X., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y.* Randomization tests to identify significant effects in experimental designs for robustness testing // *Analytica Chimica Acta*. 2006. V. 564. P. 184–200.
23. *Dejaegher B., Dumarey M., Capron X., Bloomfield M.S., Vander Heyden Y.* Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 595. № 1–2. P. 59–71.
24. *Jimidar M. I., Heylen P., De Smet Ma.* Method Validation // *Separation Science and Technology*. 2007. V. 8. P. 441–458.
25. *Durden D. A.* Using Plackett – Burman partial factorial designs for method robustness testing. By D. A. Durden. Canadian Food Inspection Agency Calgary Laboratory 3650 36 St NW Calgary, AB. http://www.traceorganic.com/2007/presentations/DaveDurden_Using%20Plackett%20Burman%20partial%20factorial%20designs%20for%20method.pdf (accessed 09.08.2018).
26. *Dejaegher B., Vander Heyden Y.* Robustness testing of CE methods // *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis* / Ed. by Ahuja S. and Jimidar M.I. – Elsevier Inc., 2008. V. 9.
27. *Mašković M., Jančić-Stojanović B., Malenović A. et al.*, Assessment of Liquid Chromatographic Method Robustness by Use of Plackett – Burman Design // *Acta Chromatographica*. 2010. V. 22. № 2. P. 281–296.
28. *Chakravarthy V. K., Kishore Babu G. K., Dasu R. L. et al.* The role of relative response factor in related substances method development by high performance liquid chromatography (HPLC) // *Rasayan J. Chem.* 2011. V. 4. № 4. P. 919–943. URL: <http://www.rasayanjournal.co.in/vol-4/issue-4/37.pdf> (accessed 09.08.2018).
29. *Brynn Hibbert D.* Experimental design in chromatography: A tutorial review // *J. Chromatography B*. 2012. V. 910. P. 2–13.
30. *Stojanovic B. J., Rakic T., Slavkovic B. et al.* Systematical approach in evaluation of LC method for Determination of raloxifene hydrochloride and its impurities employing experimental design // *J. Pharm. Analysis*. 2013. V. 3. № 1. P. 45–52.
31. *Luciana F. Oliveira, Soraia C. G. N. Braga, Paulo R. Filgueiras et al.*, Assessment of robustness on analysis using head space solid-phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography through experimental designs // *Talanta*. 2014. V. 129. P. 303–308.
32. *Schmidt A. H., Stanica M., Molnár I.* In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling–Case study pramipexole // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2014. V. 91. P. 97–107.
33. *Mokhtara H. I., Abdel-Salamb R. A., Haddab G.M.* Development of a fast high performance liquid chromatographic screening system for eight antidiabetic drugs by an improved methodology of in-silico robustness simulation // *J. Chromatography A*. 2015. V. 1399. P. 32–44.
34. *Prafulla Kumar Sahu.* Definition of System Suitability Test Limits on the Basis of Robustness Test Results // *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2017. V. 8. № 2. P. 1–6. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/definition-of-system-suitability-test-limits-on-the-basis-of-robustness-testresults-2155-9872-1000363.php?aid=90748&view=mobile> (accessed 08.08.2018).
35. *Szerkusa O., Jacynaa J., Gibasb A. et al.* Robust HPLC–MS/MS method for levofloxacin and ciprofloxacin determination in human prostate tissue // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2017. V. 132. P. 173–183.
36. *How to Draw a Normal Probability Plot By Hand.* Url: <http://www.statisticshowto.com/normal-probability-plot/> (accessed 09.08.2018).
37. *Dong F.* On the identification of active contrasts in unreplicated fractional factorials // *Statistica Sinica*. 1993. V. 3. P. 209–217.