

ЗАСТОСУВАННЯ МАТЕМАТИЧНОГО ПЛАНУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС

Ключові слова: математичне планування експерименту, рідинна хроматографія, мас-спектрометрія

Однією з найголовніших проблем сучасної фармацевтичної хімії є створення нових високоефективних методик визначення біологічно активних речовин (БАР) в хімічних сумішах, лікарських препаратах та біологічному матеріалі.

На сучасному етапі хіміко-аналітичних досліджень найбільшої значущості набувають хроматографічні методи аналізу, особливо у поєднанні зі УФ-спектрофотометрією та мас-спектрометрією.

Таким чином, розроблення та оптимізація методів хромато-мас-спектрометрії є актуальними, мають наукову новизну і практичну значущість [1, 2]. Однак це завдання ускладнюється наявністю багатьох факторів, що впливають на якість розділення, отримання інтенсивного та відтворюваного сигналу на мас-детекторі. Тому воно найефективніше може бути розв'язано з використанням хемометричних підходів. Хемометрика знаходиться на стику хімії та математики, вона використовує математичні, статистичні методи для конструювання оптимальних вимірювальних процедур і для вилучення достовірної хімічної інформації з експериментальних даних [3]. Хемометрика застосовує математичне планування експерименту з метою полегшення шляху встановлення математичної моделі умов розділення та визначення речовин.

Метою нашої роботи було підкреслення найважливіших факторів та параметрів оптимізації, узагальнення інформації щодо математичних методів планування експерименту, побудови математичних моделей, існуючих у разі розроблення хроматографічних та хромато-мас-спектрометричних методів аналізу.

Матеріали та методи дослідження

Здійснено аналіз та систематизацію джерел літератури, що описують використання хемометричних підходів для оптимізації хроматографічних умов.

Результати дослідження та обговорення

Згідно з даними літератури існують два основних підходи до виконання оптимізації:

- класичний підхід почергового дослідження кожного фактора;
- математичні методи багатофакторного аналізу.

У хроматографії методи оптимізації та планування експерименту використовують для вирішення багатьох завдань. По-перше, вивчення впливу різних факторів на аналітичний сигнал для того, щоб виявити найбільш значущі. У цьому разі застосовують факторні плани або планування Плакетта–Бурмана [4]. По-друге, пошук умов виконання методики, найкращих з точки зору правильності, відтворюваності, чутливості або деякої іншої аналітичної характеристики [4]. По-третє, оптимізація складу рухомих і нерухомих фаз. Можна застосувати планування для сумішей або центральний композиційний план [4].

У хромато-мас-спектрометрії можна виділити чотири стадії експерименту (рис. 1.)



Рис. 1. Стадії експерименту в хромато-мас-спектрометрії

Фактори оптимізації в ВЕРХ-МС можна розділити на три групи (рис. 2).



Рис. 2. Фактори оптимізації в ВЕРХ-МС

Оптимізація пробопідготовки (на прикладі ТФЕ – твердофазної екстракції) складається з чотирьох етапів.

1. Вибір внутрішнього стандарту.
2. Вибір виду сорбенту.
3. Вибір розміру патронів.
4. Вибір умов кондиціонування, посадки, промивання, змиву.

Оптимізація роботи мас-детектора складається з п'яти напрямів (рис. 3).

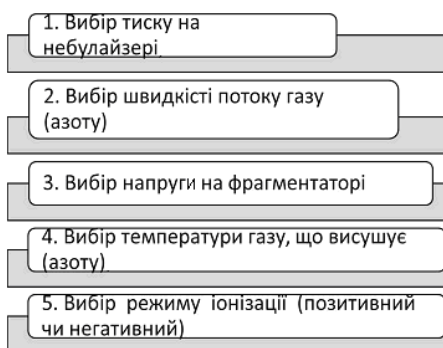


Рис. 3. Оптимізація роботи мас-детектора

Оптимізація хроматографічних умов складається із 5 найважливіших пунктів:

1. вибір початкової концентрації ацетонітрилу;
2. час підйому концентрації ацетонітрилу до 100%;
3. час на максимумі концентрації ацетонітрилу;
4. рН;
5. температура колонки.

Параметрами оптимізації хроматографічних умов можуть бути:

- ступінь вилучення;
- відношення сигнал/шум;
- загальний час аналізу;
- час утримування та інші параметри утримування;
- величина площі піка основного компонента;
- кількість розділених компонентів;
- чутливість (вона пов'язана з площею піка);
- відтворюваність;
- правильність;
- робастність.

Оптимізація послідовно по кожному фактору. У ранніх дослідженнях і тепер все ще використовують підхід, коли вибирається кожен чинник окремо і виконують дослідження щодо впливу його на критерії оптимізації.

Багатофакторні математичні методи. У сучасній літературі все частіше зустрічається підхід з використанням хемометричних методів оптимізації – багатофакторних математичних методів.

У монографії [4] описано методи, засновані на одночасному дослідженні впливу декількох факторів на функцію відгуку.

Важливим етапом в плануванні експерименту є вибір моделі залежності відгуку від факторів. Процес вибирання моделі полягає в тому, що треба вибрати вид функції, записати її рівняння. Потім треба запланувати та здійснити експеримент для визначення чисельних значень коефіцієнтів цього рівняння.

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n). \quad (1)$$

Наступним етапом є виконання регресійного аналізу функцій відгуку, а саме визначення рівняння регресії, що емпірично описує досліджувані процеси.

$$y = f(x_1, \dots, x_n; a_1 \dots a_m) + \varepsilon, \quad (2)$$

де a_1, \dots, a_m – деякі коефіцієнти; ε – похибка.

Планування експерименту залежить від рішення чотирьох завдань (рис. 4).



Рис. 4. Етапи створення та використання моделі

Графічне відображення залежності функції відгуку від x_1, x_2, \dots, x_n називають поверхнею відгуку.

Коли треба визначити вплив лише одного фактора x , знаходження функції відгуку дуже просте завдання. При цьому необхідно виконати декілька дослідів, в яких змінюється x , визначити відповідні значення функції, створити графік $f(x)$.

Використовуючи графік, можна підібрати математичний вираз функції відгуку. Необхідно оцінити відтворюваність дослідів, повторюючи їх декілька разів і одержати залежність з урахуванням розкиду дослідних даних.

Практично неможливо розв'язати це завдання у разі трьох і більше факторів. Знайдені рішення у вигляді сукупності виразів використовувати практично неможливо.

Деяку функцію можливо розкласти у ступеневий ряд у вигляді полінома, який можливо використовувати у разі ускладненого пошуку математичного вигляду функції:

$$y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n + a_{12}x_1x_2 + \dots + a_{mn}x_nx_{n-1} + a_{11}x_{12} + \dots + a_{nn}x_{n2} + \dots \quad (3)$$

Ступеневий вид полінома може бути записаний у такому вигляді:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{\substack{i=1, \dots, n-1 \\ j=i, \dots, n}} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i=1, \dots, n-2 \\ j=i, \dots, n-2 \\ k=j, \dots, n}} a_{ijk} x_i x_j x_k + \sum_{i=1}^n a_{iii} x_i^3 \dots \quad (4)$$

Експеримент потрібен для визначення коефіцієнтів полінома. Під час планування експериментів необхідно визначити число дослідів. У разі збільшення кількості коефіцієнтів збільшується кількість дослідів. Плануючи експерименти, треба мінімізувати кількість цих дослідів. Ми шукаємо такий поліном, який містить якнайменше коефіцієнтів, але задовольняє вимогам, що пред'являються до моделі.

Найменшу кількість коефіцієнтів мають поліноми першого ступеня. За допомогою цих поліномів можна передбачувати напрям найшвидшого поліпшення параметра оптимізації.

Але поліноми першого ступеня незадовільно описують область, близьку до оптимуму. Тому планування експерименту можна розділити на дві стадії: на першій стадії дослідження і використовують поліноми першого ступеня, і коли вони стануть неефективними, переходять до поліномів більш високих ступенів. Одержані функціональні залежності використовують для визначення оптимальних умов.

Факторний експеримент. Факторні плани найпростіші, зазвичай їх використовують для відсіювання великої кількості можливих факторів. Вони мають обмеження, однак легкі для розуміння.

Повний факторний експеримент для двох рівнів зазвичай використовують для відсіювання, тобто для визначення впливу численних ефектів на відгук, і для виключення малозначущих чинників; наступна стадія полягає в більш детальному дослідженні.

Кількість дослідів у повному факторному експерименті значно перевищує кількість визначуваних лінійних коефіцієнтів. Враховуючи, що найбільшу значущість зазвичай мають лінійні коефіцієнти, а коефіцієнти взаємодій, починаючи з потрійних і вище, часто незначущі, то виходить, що повний факторний експеримент має надмірність дослідів. Було б привабливим скоротити кількість дослідів за рахунок тієї інформації, яка не дуже істотна у разі побудови лінійних моделей. Тому існують методи, які дають змогу скоротити кількість дослідів [5]. Для цього використовують

дробовий факторний експеримент, плани Плакетт–Бурмана і планування Тагучі, калібрувальні плани.

Серед методів математичного планування також використовують *центральне композиційне планування, плани сумішей* [4].

В оглядових статтях [1, 2] описано математичні методи аналізу факторів, що впливають на хроматографічні параметри. В роботі [1] розглянуто методи, що ґрунтуються на вивченні поверхні відгуку: центральне композиційне планування, матриця Дехлера, дизайн Бокса–Бенкена. Обговорено ці методи і розглянуто їх застосування для оптимізації пробопідготовки (екстракції) і визначення експериментальних умов хроматографічного розділення. Показано використання оптимізації складу сумішей для оптимізації рухливих фаз. Автори детально описали реальний приклад оптимізації поділу. Обговорено валідацію одержаної моделі. Розглянуто додатки інших багатфакторних методів для оптимізації хроматографічних методик.

D. Brynn Hibbert [2] ретельно вивчав методи планування експерименту в хроматографічних методах аналізу. Показано застосування методу Плакетт–Бурмана, дробові факторні експерименти і центральні композиційні плани. Розглянуто планування Бокса–Бенкена, планування Дехлера, D-оптимальне планування. Обговорено приклади використання методів експериментального дизайну в хроматографії. Наведено рекомендації щодо публікації звіту про застосування методів експериментального дизайну в літературі. У цій роботі обговорено порівняння методів експериментального дизайну і методів, заснованих на дослідженні кожного фактора по черзі. У разі методу дослідження кожного фактора по черзі немає впевненості, що буде досягнуто оптимум умов розділення і визначення. Однак у разі використання центрального композиційного планування інформації про поверхні відгуку буде більше, ніж у спрощеному випадку.

Шлементьева зі співавт. описала оптимізацію умов пробопідготовки. Як функцію відгуку було обрано концентрацію фолієвої кислоти. Пошук оптимуму функції здійснювали за методом крутого сходження. Дослідження поверхні відгуку виконували з використанням центрального ортогонального композиційного планування. Після перевірки значущості коефіцієнтів за критерієм Стьюдента та адекватності моделі за критерієм Фішера, одержано рівняння регресії. Як чинники оптимізації було обрано: концентрацію хлороводневої кислоти, обсяг хлороводневої кислоти, температуру УЗ-ванни, час УЗ-обробки [6].

У роботі [7] у разі розроблення ВЕРХ-УФ і ВЕРХ-МС методики визначення торасеміду і його домішок було використано дробовий факторний 2^{4-1} і повний факторний 3^2 плани експерименту для оптимізації хроматографічних умов поділу. Оптимізувалася концентрація ацетонітрилу, рН розчину, температура колонки і концентрація буфера. Коефіцієнти ємності сполук використовували як відгук. Оптимізацію МС-умов здійснювали за допомогою проточно-інжекційного аналізу, простим почерговим варіюванням факторів. Валідацію було проведено згідно з інструкцією ICH [8].

Chang-Ping Jiaand і Fang Feng [9] здійснили оптимізацію розділення і визначення алкалоїдів нітідіна і хелерітріна в *Zanthoxylumnitidum* за допомогою ВЕРХ з Бокс–Бенкен-плануванням по поверхнях відгуку. Вибирали концентрацію іон-парного реагенту, склад рухомої фази, рН буфера. Згідно з планом виконали 17 експериментів. Одержали поліном другого порядку і на його основі передбачили оптимальні умови поділу.

Ana B. Varanda з співавт. [10] здійснили оптимізацію ВЕРХ з діодно-матричним детектуванням умов поділу п'яти блокаторів кальцієвих каналів з використанням дрібного факторного експериментального плану, центрального композиційного планування та мультисимплексної оптимізації. Варіювали концентрацію ацетонітрилу, рН, концентрацію буфера і температуру колонки. У підсумку одержали оптимальний поділ п'яти компонентів за мінімального часу аналізу. Як відгук використовували ступінь поділу двох піків.

Статтю авторів V. Houbart та ін. присвячено вивченню хроматографічної поведінки 9 пептидів. По-перше, на підставі скрінінгового плану, було визначено вплив важливих факторів, таких як природа та концентрація іон-парного реагенту, співвідношення органічного модифікатора, на характеристики утримання та інтенсивність відгуку (чутливість). Потім, після визначення важливих факторів, було використано повний факторний план для подальшого визначення впливу факторів на відгук. Оптимальні умови, які призводять до прийнятної чутливості та адекватного утримання пептидів без наложення піків [11].

Jančić B. та співавт. [12] використовували центральне композиційне планування для визначення впливу хроматографічних факторів на розділення праміпексолу та його домішок. Було визначено важливі фактори, впливаючі на утримання. Такі фактори як вміст ацетонітрилу, триетіламіну, рН спричинюють суттєвий вплив. Використовуючи математичну модель, можливо передбачити утримання за різних умов.

V. Harang зі співавторами [13] оптимізували ВЕРХ-методику розділення шести похідних піперидину на підставі математичного планування експерименту і симуляції хроматограм. Внаслідок оптимізації 6 піків було поділено протягом 11 хв. Було досліджено такі фактори: кількість ацетонітрилу в рухомій фазі, концентрація фосфатного буфера, концентрація октансульфоната в рухомій фазі.

Чітку послідовність дій у разі оптимізації ВЕРХ-методику розділення та визначення моксифлоксацину і кеторолаку трометаміну запропонували автори [14]. Математичне планування було використано для багатофакторної оптимізації експериментальних умов. По-перше, треба визначити мету оптимізації, а саме що рутинна методика має бути експресною, точною та специфічною. По-друге, треба оцінити критичні фактори, які впливають на критерії, такі як розділення, час аналізу, асиметрія піків тощо. По-третє, треба створити експериментальний план та математичну модель, що виявляє залежність між факторами та відгуком. У цій роботі важливі хроматографічні фактори було відібрано на підставі попередніх експериментів та аналізу літератури. Оптимізацію на підставі цих факторів було проведено з використанням центрального композиційного плану. Три незалежні фактора – вміст метанолу в рухомій фазі, рН буферного розчину, швидкість потоку – було застосовано для створення математичних моделей. Поверхні відгуку та глибину впливу цих незалежних факторів було досліджено за допомогою лицевого композиційного плану. Функцію бажаності Дерінжера було застосовано для одночасної оптимізації часу утримання останнього піка елюювання (кеторолак трометамін) та р-асиметрії моксифлоксацину. Було запропоновано розраховані оптимальні умови визначення. За оптимальних умов обидві речовини було розділено менше, ніж за 7 хв. Оптимізовані умови розділення було валідовано згідно з інструкцією ІСН [8] з метою підтвердження специфічності, лінійності, точності та прецизійності.

**Приклади використання математичних методів планування та оброблення
результатів експерименту в ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС**

Аналіти	Зразки	Математичний метод	Метод дослідження	Посилання
Фолієва кислота	БАД, харчові продукти, премікси	Центрального ортогонального композиційного планування з використанням методу крутого сходження	Пробопідготовка	[6]
Торасемід і його домішки	Таблеткі	Дробовий факторний і повний факторний плани	ВЕРХ-УФ і ВЕРХ-МС	[7]
Нітидин і хелеритрин	Трава	Бокс-Бенкен-планування по поверхням відгуку	ВЕРХ-ФД	[9]
П'ять блокувальних кальцієвих каналів (похідних 1,4-дигідропіридину)	Плазма	Дробовий факторний експериментальний план, центральне композиційне планування	ВЕРХ-ДМД	[10]
Деякі пептиди	Розчин стандартів	Повний факторний план	ВЕРХ-МС/МС	[11]
Праміпексол та його домішки	Розчин стандартів	Центральне композиційне планування	ВЕРХ-УФ	[12]
Шість похідних піперидину	Розчин стандартів	Центральне композиційне лицьове планування	ВЕРХ-УФ	[13]
Моксифлоксацин та кеторолак трометамін	Очні краплі	Лицьовий композиційний план	ВЕРХ-УФ	[14]

В и с н о в о к

Таким чином, на підставі аналізу даних наукової літератури встановлено, що існує багато прикладів використання математичних методів планування експерименту з метою визначення оптимальних умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС (таблиця). Сьогодні дослідники приділяють все більше уваги багатофакторній оптимізації на відміну від вивчення зміни кожного фактора за постійних значень інших факторів.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Ferreira S. L., Bruns R. E., da Silva E. G. et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1158. – P. 2–14.
2. *Hibbert D. B.* Experimental design in chromatography: A tutorial review // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 910. – P. 2–13.
3. *Дребуцук Т. Н.* Введение в хемометрику. Практика анализа экспериментальных данных: Уч. пособие. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2011. – 88 с.
4. *Breton R. G.* Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. – West Sussex: John Wiley & Sons Inc., 2002. – 489 p.
5. *Хамханов К. М.* Основы планирования эксперимента: Метод. пособие. – Улан-Удэ, 2001. – 50 с.
6. *Шлементьева О. В., Слепченко Г. Б., Австриевских А. Н.* Контроль содержания водорастворимых витаминов в биологически активных добавках, пищевых продуктах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Завод. лаб. диагн. матер.* – 2007. – Т. 74, № 5. – С. 6–8.

7. Jovic Z., Zivanovic L., Radisic M. et al. Chemometrically Assisted Development and Validation of LC–UV and LC–MS Methods for Simultaneous Determination of Torasemide and its Impurities // *J. Chromatogr. Sci.* – 2012. – V. 50. – P. 324–334.

8. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH guideline Q2 (R1), ICH, 2005. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.

9. Jia Ch.-P., Feng F. Optimization of the Separation and Determination of Nitidine and Chelerythrine in *Zanthoxylum nitidum* by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection // *J. Chromatogr. Sci.* – 2014. – V. 52. – P. 164–168.

10. Baranda A. B., Etxebarria N., Jiménez R. M., Alonso R. M. Improvement of the Chromatographic Separation of Several 1,4-Dihydropyridines Calcium Channel Antagonist Drugs by Experimental Design // *Ibid.* – 2005. – V. 43. – P. 505–512.

11. Houbart V., Rozet E., Matagne A. et al. Influence of sample and mobile phase composition on peptideretention behaviour and sensitivity in reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry // *J. Chromatogr. A* – 2013. – V. 1314. – P. 199–207.

12. Jančić B., Medenica M., Ivanović D., Malenović A. Experimental Design in Chromatographic Analysis of Pramipexole and its Impurities // *Acta Chim. Slov.* – 2007. – V. 54. – P. 49–54.

13. Harang V., Karlsson A., Josefson M. Liquid chromatography method development and optimization by statistical experimental design and chromatogram simulations // *Chromatographia*. – 2001. – V. 54, N 11–12. – P. 703–709.

14. Kalariya P. D., Namdev D., Srinivas R., Ganadhamu S. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops // *J. Saudi Chem. Soc.* – 2014. – P. 1–10.

Надійшла до редакції 20. 09. 2014.

Б. А. Варинский

Запорожский государственный медицинский университет

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ВЭЖХ И ВЭЖХ-МС

Ключевые слова: математическое планирование эксперимента, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия

А Н Н О Т А Ц И Я

Разработка новых высокоэффективных методик определения биологически активных веществ в химических смесях, лекарственных препаратах и биологическом материале является одной из актуальных задач современной фармации. В настоящее время наибольшее значение имеют хроматографические методы анализа с УФ- и масс-спектрометрической детекцией. Сложность оптимизации этих методов приводит к увеличению использования хемометрических подходов с применением математического планирования эксперимента. Количество таких публикаций растет. Обобщение информации о существующих средствах поиска наилучших условий определения биологически активных веществ является актуальной задачей. Нами были систематизированы данные источников литературы, посвященных этой тематике.

Отмечено преимущество математических методов планирования многофакторных экспериментов перед поочередными исследованиями каждого фактора в отдельности. Рассмотрены основные этапы осуществления эксперимента в жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Выделены факторы, подлежащие исследованию для разработки оптимальных условий разделения и определения. Отмечены факторы, необходимые для работы масс-спектрометрического детектора, а также факторы, влияющие на качество разделения в хроматографии.

Показаны параметры оптимизации. Приведены этапы построения экспериментальной модели в виде полиномов различных степеней. Упомянуты основные методы планирования эксперимента: факторные планы, дробные факторные планы, планирование Плакетт–Бурмана, планы Бокса–Бенкена, центральное композиционное планирование. Рассмотрены примеры применения математического планирования эксперимента для хроматографического анализа биологически активных веществ в БАД, пищевых продуктах, лекарственном растительном сырье, глазных каплях, таблетках. Изученные подходы могут быть использованы для создания новых методик.

APPLICATION OF MATHEMATICAL EXPERIMENTAL DESIGN FOR OPTIMIZATION OF HPLC AND HPLC-MC CONDITIONS

Key words: mathematical experimental design, liquid chromatography, mass spectrometry

ABSTRACT

Development of new methods for determination of biological active substances in chemical mixtures, pharmaceuticals and biological material is a very important problem. The chromatographic methods of analysis with UV and mass spectrometric detection are the most important currently. The complexity of these optimization techniques leads to an increase in the use of chemometric approaches with mathematical experimental design. The amount of such publications increases. Compile information on existing tools to discover the best conditions of the determination of biological active substances is an important task. We have systematized literature devoted to this subject.

The advantages of the mathematical methods of planning of multifactor experiments compare to studying each factor separately are explained. The main stages of the experiment in liquid chromatography-mass spectrometry have been described. The factors for development of the optimal conditions related to research of the separation and determination have been underlined. The factors important for mass spectrometric detection, as well as factors affecting the quality of separation in chromatography was marked.

The optimization parameters have been shown. The stages of the construction of the experimental model in the form of polynomials of different degrees have been presented. The basic methods of experimental design such as factorial designs, fractional factorial designs, Plackett–Burman design, Box–Behnken design, central composite design have been mentioned. The examples of application of mathematical experimental design for the chromatographic analysis of biological active substances in dietary supplements, foods, herbal drugs, eye drops, pills have been shown. Studied approaches can be used for creation of the new techniques.

Електронна адреса для листування з автором: varinsky@zsmu.zp.ua