

Plaket-Burman dizajn u proceni robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata

**Slavica Kojić-Marinković¹, Mihaela Tumbas¹, Tijana Rakić²,
Biljana Jančić -Stojanović^{2*}**

¹ Pharma Swiss d.o.o., Batajnički drum 5A, Beograd – Zemun, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku: Tel: +381 11 3951 333; e-mail: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U ovom radu opisana je primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Kao faktori koji mogu uticati na robusnost metode ispitani su sadržaj acetonitrila, koncentracija natrijum-dihidrogenfosfata, pH vrednost mobilne faze, temperatura kolone, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije. U cilju kreiranja plana eksperimenta prema Plaket-Burman dizajnu, na 6 pravih faktora dodato je 5 veštačkih faktora i tako je ispitano 11 faktora izvođenjem 12 eksperimenata. Kao odgovori sistema praćeni su retenciono vreme, broj teorijskih platoa i simetrija pika kao kvalitativni odgovori, dok je kao kvantitativni odgovor praćena površina pika. Na osnovu dobijenih rezultata, a primenom odgovarajućih statističkih i grafičkih metoda, procenjen je uticaj ispitivanih faktora na posmatrane odgovore sistema. Pored toga, za značajne faktore određen je interval pouzdanosti tj. opseg u okviru koga se mogu menjati, a da to ne utiče značajno na odgovor sistema. Na kraju, na osnovu dobijenih rezultata, određeni su i parametri za proveru pogodnosti sistema.

Ključne reči: Plaket-Burman dizajn; robusnost; natrijum-valproat; tečna hromatografija

Uvod

Plaket-Burman dizajn predstavlja vrstu eksperimentalnog dizajna koji omogućava da se izvođenjem relativno malog broja dobro isplaniranih eksperimenata proceni uticaj pojedinačnih faktora na posmatrani odgovor sistema. S obzirom na to da daje informaciju o značajnosti uticaja faktora, smatra se posebno korisnim za procenu robusnosti metoda tečne hromatografije (eng. *Liquid Chromatography – LC*) koje su najzastupljenije metode u kontroli lekova. Robusnost metode predstavlja deo procesa validacije i preporuka je da se izvodi nakon optimizacije metode, a pre ispitivanja ostalih parametara validacije. Prema definiciji Međunarodne konferencije za harmonizaciju tehničkih zahteva za registraciju farmaceutskih proizvoda za humanu upotrebu (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH*), robusnost metode koja se koristi u kontroli lekova mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u parametrima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene [1]. ICH smernice takođe navode da „jedna od posledica procene robusnosti treba da bude i određivanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema, kako bi se obezbedila pouzdanost analitičke metode kada god se koristi“. Naime, podaci dobijeni iz testa robusnosti mogu se upotrebiti za definisanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests – SST*). Ovakav način definisanja SST limita na osnovu eksperimentalnih podataka pouzdaniji je i značajniji od arbitrarnog pristupa koji se zasniva na iskustvu analitičara.

Cilj ovog rada bio je da se prikaže primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti LC metode za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Natrijum-valproat je oficinalan u Ph. Eur. 7 [2] dok je valproinska kiselina oficinalna u Ph. Eur. 7 i USP 35/NF 30 [2, 3]. Kao antiepileptici u terapiji se mogu koristiti pojedinačno u obliku različitih preparata za *per os* primenu, ali i zajedno u obliku tableta sa produženim oslobađanjem. Za određivanje sadržaja natrijum-valproata i valproinske kiseline Ph. Eur. 7.0 propisuje titraciju uz potenciometrijsko određivanje završne tačke [2], dok USP 35/NF 30 [3] propisuje metodu gasne hromatografije (eng. *Gas Chromatography – GC*). GC metoda opisana je i za određivanje magnezijumove soli valproinske kiseline [4], kao i za određivanje nečistoća dimera natrijum-valproata [5]. LC metoda primenjena je za određivanje valproinske kiseline i njenih soli nakon derivatizacije sa fenacil-bromid – trietilaminom u etanolu [6], dok je LC spregnuta sa *Evaporative Light Scattering* detektorom (ELSD) primenjena za određivanje 4 antiepileptika (valproinska kiselina, natrijum-valproat, primidon i karbamazepin) u biološkom materijalu [7]. U dosadašnjoj literaturi opisana je jedna LC metoda sa UV detekcijom za određivanje količine oslobođenog natrijum-valproata iz tableta [8]. U ovom radu opisana je primena Plaket-

Burman dizajna u ispitivanju robusnosti LC metode sa UV detekcijom za određivanje natrijum-valproata.

Procena robusnosti LC metode primenom eksperimentalnog dizajna

Savremeni trendovi u kontroli lekova nameću obavezu da se nakon razvoja metode koja će imati određenu namenu u kontroli lekova, najpre vrši procena robusnosti metode, a zatim da se ispituju ostali parametri validacije. U cilju dobijanja maksimalnog broja podataka i sagledavanja otpornosti metode, na moguće promene u parametrima metode preporuka je da se primeni eksperimentalni dizajn. Kako je u proceni robusnosti metode cilj definisanje da li neki faktor utiče ili ne na kvalitativne i kvantitativne odgovore sistema, onda je opravdana primena tzv. skrining vrsta dizajna. U literaturi se može naći primena Plaket-Burman dizajna [9–11], kao i punog faktorskog [12–16] i frakcionog faktorskog dizajna [17–21]. S obzirom da je u ovom radu primenjen Plaket-Burman dizajn, onda će on ovde i biti detaljnije opisan.

Plaket-Burman dizajn

Plaket-Burman dizajn je vrsta frakcionog faktorskog dizajna koji podrazumeva da se interakcije između faktora zanemaruju dok se glavni efekti računaju iz redukovano broja eksperimenata. Ovo je vrsta dizajna koji se izvodi na dva nivoa pri čemu se N-1 faktora ispituje u N eksperimenata (N je deljivo sa 4). Potreban broj eksperimenata za određeni broj faktora može se naći u referenci [22]. Način kreiranja matrice dizajna dat je u referenci [23]. S obzirom da ukupan broj eksperimenata treba da bude deljiv sa 4, može se desiti da ne postoji dovoljan broj faktora, pa se u takvim slučajevima dodaju tzv. veštački faktori (*dummies*) za koje važi da promena sa nivoa -1 na nivo +1 nema fizičko značenje. Dodatak veštačkih faktora u matricu eksperimenta korisiti se u statističkoj analizi faktorskih efekata i poželjno je da se doda najmanje 3 veštačka faktora. Matematički model koji opisuje Plaket-Burman dizajn može se prikazati na sledeći način:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_{N-1}x_{N-1} + b_Nx_N \quad (1)$$

pri čemu je y – odgovor sistema, x – ispitivani faktori, b_0 – odsečak i $b_1 - b_n$ – koeficijenti matematičkog modela.

Analiza Plaket-Burman dizajna

Efekti faktora izračunavaju se prema sledećem izrazu [23]:

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

gde je E_X efekat odgovarajućeg faktora, $\sum Y(+)$ i $\sum Y(-)$ sume odgovora gde je X na ekstremnim (+) i (-) nivoima, a N broj eksperimenata definisanog dizajna. Za identifikaciju značajnih efekata koriste se statističke i grafičke metode.

Za statističku procenu značajnosti E_X koristi se *statistički t test* [24]:

$$t = \frac{|E_X|}{(S.E.)_e} \quad (3)$$

gde je E_X efekat određenog faktora, a $(S.E.)_e$ standardna greška efekta. Izračunata t vrednost se poredi sa tabelarnom vrednošću, t_{tab} . Efekti kod kojih je $t \geq t_{\text{tab}}$ su značajni, dok vrednosti za $t \leq t_{\text{tab}}$ ukazuju na neznačajne efekte. Iz prethodnog izraza može se izvesti izraz za određivanje kritične vrednosti E ($E_{\text{kritično}}$):

$$E_{\text{kritično}} = t_{\text{tab}} (S.E.)_e \quad (4)$$

gde je $E_{\text{kritično}}$ kritični efekat odgovora. Efekti faktora se smatraju značajnim ako je $|E_X| \geq E_{\text{kritično}}$. Vrednost t_{tab} zavisi od broja stepeni slobode za $(S.E.)$ i primenjenog nivoa značajnosti α . Greška $(S.E.)_e$ može biti procenjena na različite načine koji uključuju Dong-ov algoritam i određivanje preko efekata koji se mogu zanemariti [24].

Grafičko tumačenje značajnosti efekata postiže se najčešće primenom *half-normal probability* grafikona. U cilju kreiranja *half-normal probability* grafikona, efekti su rangirani u nizu prema svojim apsolutnim vrednostima. „Neznačajni“ faktori su oni čiji su efekti pozicionirani oko nule, dok efekti značajnih faktora znatno odstupaju od te vrednosti. Prema tome, „neznačajni“ efekti koji imaju normalnu raspodelu sa središtem oko nule su grupisani oko prave linije, dok značajni efekti odstupaju od te prave [24]. Iako je upotreba *half-normal* grafikona preporučljiva u odabiru statistički značajnih efekata, u nekim slučajevima primena *Pareto* dijagrama takođe može biti korisna i dati dobre rezultate.

Iz rezultata koji se dobijaju iz Plaket-Burman dizajna mogu se izračunati intervali pouzdanosti za značajne faktore, kao i SST limiti. Način izračunavanja i određivanja opisan je u referenci [24], a primena ovog pristupa može se naći u referenci [20].

Eksperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu Dionex Ultimate 3100, Thermo-Fisher Scientific koji se sastoji iz *Quaternary mixing*, UHPLC pumpe LPG-3400, *Diode Array* detektora i Chromeleon Dionex 7.1.0.898 softvera za prikupljanje i obradu podataka.

Reagensi. Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (*Merck*, Darmstadt, Nemačka), natrijum-dihidrogenfosfat, monohidrat (*Merck*, Darmstadt, Nemačka), natrijum-hidroksid (*Merck*, Darmstadt, Nemačka) i prečišćena voda HPLC kvaliteta.

Standardi. Natrijum-valproat, radni standard, serijski broj 751.11.08.01, proizvođač Katwijk Chemie bv, Holandija.

Rastvori. Odmereno je tačno 18,75 mg natrijum-valproata, standardne supstance i dodato 0,5 mL acetonitrila i stavljeno u ultrazvučno kupatilo 10 minuta. Nakon toga, dodato je 2 mL 0,1 M natrijum-hidroksida i stavljeno u ultrazvučno kupatilo još 5 minuta. Jedan mL ovog rastvora otipetiran je u odmerni sud od 25 mL i sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake ($c_{\text{natrijum-valproata}} 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$).

Izvođenje eksperimenata za procenu robusnosti metode

Matrica eksperimenta prikazana je u Tabeli I.

Tabela I Plaket-Burman dizajn eksperimenta

Table I Plackett-Burman design of experiments

Faktori											
Br. Eksper.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
5	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
6	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
7	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
8	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
10	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
12	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1

Faktor A – sadržaj acetonitrila, %

Faktor C – molaritet pufera, mM

Faktor E – pH mobilne faze

Faktor G – temperatura kolone, °C

Faktor J – talasna dužina, nm

Faktor L – protok, mL min.⁻¹

Faktor B – veštački faktor 1

Faktor D – veštački faktor 2

Faktor F – veštački faktor 3

Faktor H – veštački faktor 4

Faktor K – veštački faktor 5

Faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Faktori i njihove donje, nominalne i gornje vrednosti

Table II Factors and their lower, nominal and upper values

Faktorski nivoi Promenljiva	Donji (-1)	Nominalni (0)	Gornji (+1)
Acetonitril (%)	48	50	52
NaH ₂ PO ₄ (mM)	90	100	110
pH mobilne faze	1,8	2,0	2,2
Protok (mL min ⁻¹)	0,9	1,0	1,1
Temperatura (°C)	20	25	30
Talasna dužina (nm)	209	210	211
Veštački faktor 1	-1	0	+1
Veštački faktor 2	-1	0	+1
Veštački faktor 3	-1	0	+1
Veštački faktor 4	-1	0	+1
Veštački faktor 5	-1	0	+1

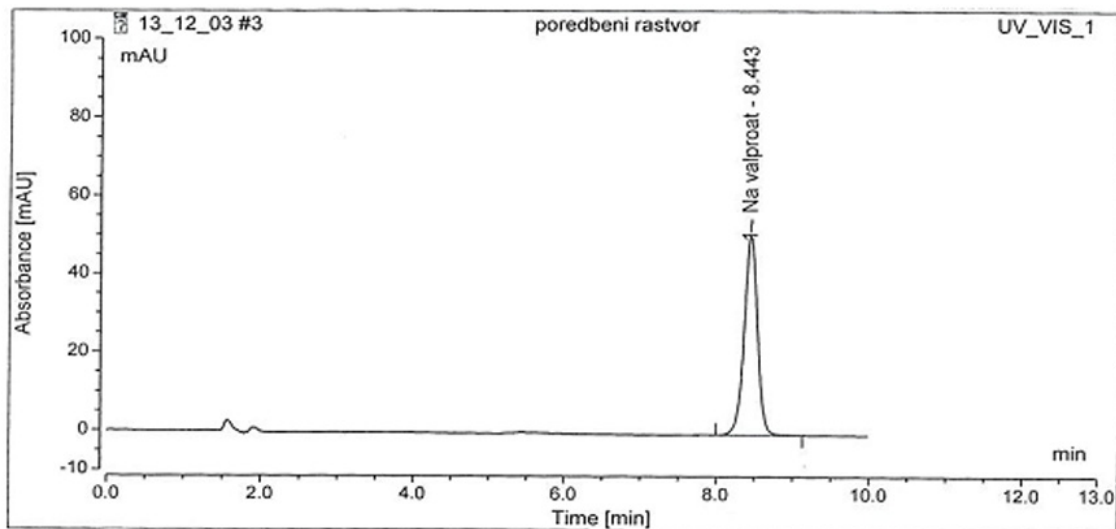
Kada su definisani faktori, njihovi nivoi, plan eksperimenta i odgovori sistema koji će se pratiti, pristupilo se izvođenju eksperimenata prema definisanoj matrici. Eksperimenti su izvedeni randomizirano – nasumično, čime je izbegnut uticaj nekontrolisanih faktora koji postoje u svakom sistemu.

Optimalni hromatografski uslovi. Kolona: Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 µm veličine čestica; mobilna faza: smeša acetonitril – 0,1 M natrijum-dihidrogenfosfata (50 : 50 v/v, pH 2,0 podešen koncentrovanom *orto*-fosfornom kiselinom). Protok mobilne faze je 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 25 °C i talasna dužina detekcije 210 nm.

Statistička obrada rezultata. Za statističku obradu rezultata korišćen je DesignExpert 7.0.0 softver.

Rezultati i diskusija

U ovom radu opisano je sistematično izvođenje procene robusnosti za LC metodu za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Optimalni hromatografski uslovi prikazani su u Eksperimentalnom delu. Hromatogram natrijum-valproata pod optimalnim hromatografskim uslovima prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Hromatogram pri optimalnim hromatografskim uslovima: Kolona: Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 μm veličine čestica, mobilna faza: acetonitril – 0,1 M natrijum-dihidrogenfosfat (50 : 50 v/v), pH 2,0 podešen koncentrovanom *orto*-fosfornom kiselinom; protok mobilne faze 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 25 °C i talasna dužina detekcije 210 nm.

Figure 1. Chromatogram obtained under optimal chromatographic conditions: column Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 μm particle size, mobile phase consisted of mixture acetonitrile – 0.1 M sodium-dihydrogenphosphate in the range 50 : 50 v/v, pH of the mobile phase 2.0 adjusted with conc. *orto*-phosphoric acid, flow rate 1 mL min⁻¹, column temperature 25 °C and wavelength 210 nm.

Definisani optimalni uslovi bili su osnova za pravljenje plana za procenu robusnosti metode. Za početak, kao faktori koji će se ispitivati pri proceni robusnosti metode izabrani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%), koncentracija natrijum-dihidrogenfosfata (mM), pH mobilne faze, temperatura kolone (°C), protok (mL min⁻¹) i

talasna dužina detekcije. U cilju procene robusnosti metode izabran je Plaket-Burman dizajn kao vrsta skrining dizajna koji omogućava da se ispita uticaj velikog broja faktora izvođenjem relativno malog broja eksperimenata. S obzirom da procena robusnosti metode podrazumeva proveru ponašanja sistema koje nastaje malim i namernim promenama parametara metode, nivoi ispitivanja faktora biraju se tako da imaju mala variranja u odnosu na optimalne uslove. Definisani faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli II. Na 6 pravih faktora dodato je 5 veštačkih faktora, što je neophodno za kreiranje plana eksperimenta za Plaket-Burman dizajn. Na ovaj način definisan je eksperimentalni protokol. U sledećoj fazi definisani su odgovori koji će se pratiti tokom procene robusnosti metode. Kao kvalitativni odgovori sistema praćeni su retenciono vreme (R_1), broj teorijskih platoa (R_3) i simetrija pika određena prema Ph. Eur. [2] (R_4), dok je kao kvantitativni odgovor praćena površina pika (R_2).

Dobijene vrednosti odgovora prikazane su u Tabeli III.

Tabela III Plan eksperimenta za testiranje robusnosti i dobijeni rezultati (promene veštačkih faktora nisu naznačene)

Table III Plan of experiments for robustness testing and obtained results (changes of dummies are not given)

Br	A	C	E	G	J	L	R_1	R_2	R_3	R_4
1	48	90	1,8	20	209	0,9	10,194	11,343	11982	1,004
2	52	110	2,2	20	211	1,1	6,344	9,295	11620	1,056
3	52	110	1,8	30	209	0,90	7,787	11,25	12618	0,988
4	52	90	2,2	20	209	0,9	7,904	11,132	12568	1,042
5	48	110	2,2	20	211	0,9	10,032	11,548	12031	0,967
6	52	90	1,8	20	211	1,1	6,689	9,323	11510	0,991
7	48	110	1,8	20	209	1,1	8,513	9,297	11212	1,006
8	52	90	2,2	30	209	1,1	6,124	9,123	11853	1,012
9	48	110	2,2	30	209	1,1	9,294	9,379	11307	0,962
10	52	110	1,8	30	211	0,9	7,803	11,487	12635	0,984
11	48	90	2,2	30	211	0,9	9,061	11,537	12372	0,991
12	48	90	1,8	30	211	1,1	7,847	9,49	11513	0,973

A – sadržaj acetonitrila

C – mM pufera

E – pH mobilne faze

G – temperatura kolone

J – talasna dužina

L – protok

R_1 – retenciono vreme

R_2 – površina pika

R_3 – broj teorijskih platoa

R_4 – simetrija pika

Nakon toga, vršena je procena uticaja faktora i to primenom statističkih i grafičkih metoda.

Značajnost faktora najpre je procenjena statističkim metodama i to primenom Dong-ovog algoritma i metode efekata koji se mogu zanemariti, način izračunavanja dat je u referenci [24]. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli IV.

Tabela IV Efekti faktora i rezultati za $E_{critical}$ i ME*

Table IV Factor effects and obtained results for $E_{critical}$ and ME

<i>Faktori</i>	<i>Efekti</i>			
	<i>Površina pika</i>	<i>Broj teorijskih platoa</i>	<i>Retenciono vreme</i>	<i>Simetrija pika</i>
A – sadržaj ACN	-0,164	397,83	-2,048	0,0372
B – veštački faktor 1	0,0177	-2,167	0,156	0,0048
C – mM pufera	0,0513	-62,5	0,3257	-0,0172
D – veštački faktor 2	-0,0337	97,5	-0,4467	0,0138
E – pH mobilne faze	-0,0293	46,83	-0,0123	0,0052
F – veštački faktor 3	0,00667	-21,167	0,2523	-0,0128
G – temperatura kolone	0,05467	229,167	-0,2933	-0,0348
H – veštački faktor 4	-0,008	-4,8333	-0,19667	-0,00217
J – talasna dužina	0,1927	23,5	-0,34	0,00017
K – veštački faktor 5	-0,0083	67,167	-0,191	-0,01017
L – protok mobilne faze	-2,065	-865,167	-1,328	0,01283
E kritično ($\alpha=0,05$)	0,0363	108,487	0,5427	0,0199
ME (0,975; m)	0,2681	204,6425	0,6174	0,0396

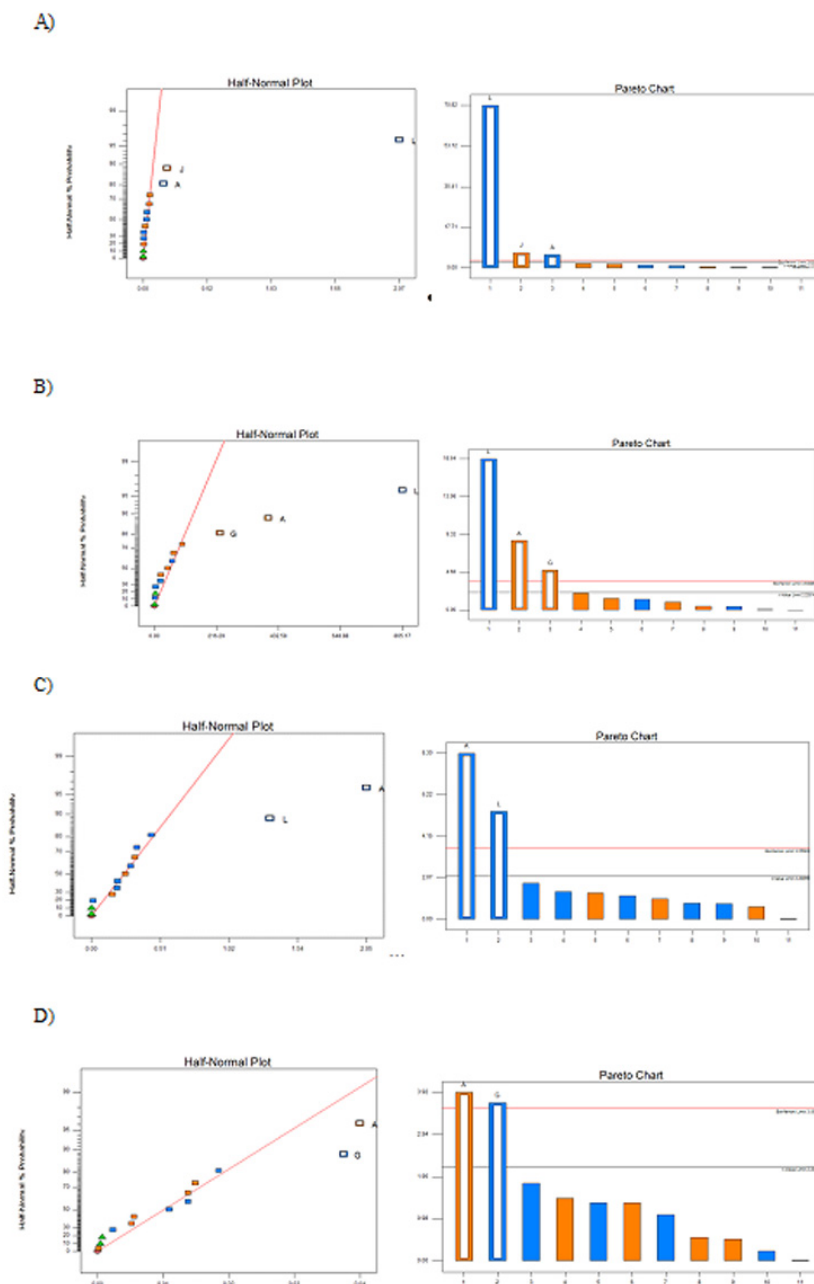
* ME – *Margin of Error*

Poređenjem apsolutnih vrednosti dobijenih efekata faktora sa vrednostima $E_{\text{kritično}}$ i ME (eng. *Margin of Error* – ME) jasno je da na površinu pika natrijum-valproata najveći uticaj ima brzina protoka mobilne faze, a zatim talasna dužina, kao i sadržaj acetonitrila. Na broj teorijskih platoa najznačajniji uticaj ima brzina protoka mobilne faze, zatim sadržaj acetonitrila i temperatura kolone. Retenciono vreme najviše zavisi od sadržaja acetonitrila i brzine protoka mobilne faze. Simetrija pika je najstabilniji faktor i na njega faktori imaju najmanji uticaj. Od svih faktora na simetriju pika najviše utiče sadržaj acetonitrila. Uticaj ostalih faktora je zanemarljiv.

Postoji preporuka da se procena uticaja faktora uvek vrši na više načina tj. primenom i statističkih i grafičkih metoda, zato je ovde izvršena procena faktorskih efekata primenom Pareto dijagrama i *half-normal probability* grafikona koji su prikazani na Slici 2.

Sa Slike 2 A. iz Pareto dijagrama vidi se da površina pika kao posmatrani odgovor zavisi od brzine protoka mobilne faze (faktor L), jer ovaj faktor prelazi vrednost t -limita. Sadržaj acetonitrila i temperatura kolone takođe se nalaze iznad vrednosti t -limita, ali je njihov uticaj na posmatrani odgovor manje izražen. Sa Slike 2 B. se vidi da na broj teorijskih platoa, kao odgovor sistema, utiču brzina protoka mobilne faze, sadržaj acetonitrila i temperatura kolone i da se ti faktori moraju strogo kontrolisati. U odnosu na promene pH mobilne faze, talasnu dužinu i jonsku jačinu pufera, metoda se može smatrati robusnom, jer su vrednosti efekta ispod t -limita. Sa Slike 2 C. vidi se da na retenciono vreme, kao odgovor sistema, utiče sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, kao i brzina protoka i ti faktori se moraju strogo kontrolisati. Vrednosti ostalih efekata nalaze se ispod t -limita, pa se može zaključiti da je u ispitivanom opsegu faktora ovaj odgovor robusan. Sa Slike 3 D. vidi se da simetrija pika zavisi od sadržaja acetonitrila i temperature kolone jer su vrednosti dobijene za te odgovore iznad t -limita. Za ostale faktore odgovor je robusan.

Prednost pristupa testiranju robusnosti primenom eksperimentalnog dizajna ogleda se i u mogućnosti izračunavanja intervala pouzdanosti za značajne faktore. Kada faktor ima značajan efekat na odgovor, potrebno je odrediti u kom intervalu nivoi faktora treba da budu kontrolisani, da bi se eliminisao efekat. Određeni su intervali pouzdanosti za značajne faktore i to za faktore koji su procenjeni kao značajni na osnovu Dongovog algoritma za $\alpha = 0,05$. Izračunati intervali pouzdanosti za sve odgovore koji su praćeni dati su u Tabeli V.



Slika 2. A. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za površinu pika;
 B. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za broj teorijskih platoa
 C. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za retenciono vreme i
 D. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za simetriju pika.

Figure 2. A. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for peak area;
 B. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for number of theoretical plates
 C. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for retention time and
 D. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for peak symmetry.

Tabela V Intervali pouzdanosti za značajne faktore preračunati na osnovu Dongovog algoritma

Table V Intervals of reliability for important factors obtained on the basis of Dong algorithm

Odgovor	Značajni faktori	Interval pouzdanosti na osnovu Ekritično iz <i>Dong</i> -ovog algoritma $\alpha = 0,05$
Površina pika	L	0,98 – 1,02
Broj teorijskih platoa	A	49,45 – 50,55
	G	0,63 – 5,37
	L	0,99 – 1,01
Retenciono vreme	A	49,47 – 50,53
	L	0,96 – 1,04
Simetrija pika	A	48,96 – 51,07
	G	22,14 – 27,86

A - sadržaj acetonitrila u %; G – temperatura kolone (°C); L - brzina protoka mobilne faze (mL min.⁻¹)

Na kraju, određen je SST limit tj. izvedeni su ponovljeni eksperimenti pod uslovima koji daju „najgori“ odgovor iz datog seta eksperimenata. Dobijeni su rezultati za retenciono vreme 6,442 minuta, za broj teorijskih platoa 11190,18 i za simetriju pika 1,0012. S obzirom da se metoda primenjuje za određivanje sadržaja natrijum-valproata može se definisati da je hromatografski sistem pogodan ako je broj teorijskih platoa veći od 10000 i ako je simetrija pika manja od 1,2.

Na ovaj način izvršena je procena robusnosti metode tačne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata, a takođe su iz istog seta podataka dobijene i vrednosti intervala pouzdanosti za značajne faktore, kao i odgovarajući limiti za procenu pogodnosti sistema. Pristup koji uključuje eksperimentalni dizajn omogućio je da se iz rezultata malog broja dobro isplaniranih eksperimenata izvuče veliki broj podataka koju su značajni za postavljenu LC metodu.

Zaključak

U radu je opisana primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti LC metode za određivanje sadržaja natrijum-valproata. U cilju ispitivanja uticaja izabranih faktora (sadržaj acetonitrila, molaritet natrijum-dihidrogenfosfata, pH mobilne faze, temperatura kolone, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije) kreirana je matrica eksperimenata za Plaket-Burman dizajn. Praćena su 3 kvalitativna odgovora sistema (retenciono vreme, broj teorijskih platoa i simetrija pika) i 1 kvantitativni odgovor (površina pika). Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su efekti faktora, a zatim, primenom statističkih i grafičkih postupaka procenjen njihov uticaj na posmatrane odgovore sistema. Takođe, izračunat je interval pouzdanosti za značajne faktore i određeni su parametri za proveru pogodnosti sistema.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za podršku u okviru istraživanja na Projektu 172052.

Literatura

1. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Text on Validation of Analytical Procedures, 1994.
2. European Pharmacopoeia, 7th edition, 2011, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg
3. *The United States Pharmacopeia, 35th edition, National formulary 30*, United States Pharmacopeial Convention, 2011, Rockville, USA.
4. Ambasana MA, Kaila HO, Thakkar RS, Saravaia HT, Shah AK. Validation of an analytical method for assay of magnesium valproate by gas chromatography. *Inter J ChemTech Res* 2011;3:342–47.
5. Subastranjan A, Suresh P, Srinivasulu S, Hemant R. A validated stability-indicating gas chromatography method for determination of divalproex sodium impurities in pharmaceutical preparation. *Drug Test Anal* 2010; 2:182–87.

6. Lau-Cam CA, Roos RW. HPLC method with precolumn phenacylation for the assay of valproic acid and its salts in pharmaceutical dosage forms. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 1997; 20: 2075–87.
7. Manoj Babu MK. Simultaneous separation and quantitation of four antiepileptic drugs – a study with potential for use in patient drug level monitoring. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34:315–24.
8. Gupta RK, Singh UK, Kumar S, Moothan B. Estimation of sodium valproate in tablet dosage form by RP HPLC without prior derivatization: Application to dissolution studies. *Int J Pharm Sci Drug Res* 2009; 1 (2): 103–06.
9. Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of liquid chromatographic method robustness employing Plackett-Burman design. *Acta Chromatogr* 2010;22:281–96.
10. Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander Heyden Y. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim Acta* 2007;595:59–71.
11. Mašković M, Dotsikas Y, Malenović A, Jančić-Stojanović B, Ivanović D, Medenica M. Validation of an oil-in-water microemulsion liquid chromatography method for analysis of perindopril *tert*-butylamine and its impurities. *J AOAC* 2011;94:723–34.
12. Ragonese R, Mulholland M, Kalman J. Full and fractionated experimental design for robustness testing in the high-performance liquid chromatographic analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical preparation. *J Chromatogr A* 2000;870:45–51.
13. Orwa JA, Van Gerven A, Roets E, Hoogmartens J. Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of colistin sulphate. *Chromatographia* 2000;51:433–36.
14. Chepkwony HK, Vermaelen A, Roets E, Hoogmartens J. Development and validation of an reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of spiramycin and related substances. *Chromatographia* 2001;54:51–6.
15. Chepkwony HK, Roets E, Hoogmartens J. Liquid chromatography of troleandomycin. *J Chromatogr A* 2001;914:53–68.
16. Orwa JA, Govaerts C, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Liquid chromatography of gramicidin. *Chromatographia* 2001;53:17–21.
17. Hund E, Vander Heyden Y, Hausteim M, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial design. *J Chromatogr A* 2000;874:167–85.
18. Li YG, Liu H, Vander Heyden Y, Chen M, Wang ZT, Hu ZB. Robustness tests on the United States Pharmacopeia XXVI HPLC assay for ginsenosides in Asian and American ginseng using an experimental design. *Anal Chim Acta* 2005;536:29–38
19. Yekkala RS, Vandenwayenberg S, Hoogmartens J, Adams E. Evaluation of an International Pharmacopeia method for the analysis of nelfinavir mesylate by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2006;1134:56–65.

20. Kasagić Vujanović I, Jovanović M, Rakić T, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna. *Arh farm* 2012;62:475–88.
21. Marengo E, Gennaro MC, Gianotta V, Angelino S. A test of robustness in IIR-RP-HPLC separation of nine priority pollutant phenols. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2001;24:341–53.
22. Araujo PW, Brereton RG. Experimental design. I Screening. *Trends Anal Chem* 1996;15:26–31.
23. Armstrong NA. *Pharmaceutical experimental design and interpretation*. Taylor & Francis Group, USA; 2006.
24. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24:723–53.

Plackett-Burman design in robustness testing of liquid chromatographic method for determination of sodium-valproat

Slavica Kojić-Marinković¹, Mihaela Tumbas¹, Tijana Rakić,
Biljana Jančić-Stojanović^{2*}

¹ Pharma Swiss d.o.o., Batajnički drum 5A, Beograd – Zemun, Srbija

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

* Corresponding author: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs;

tel.: +381 11 3951 333; fax.: +381 11 3972 840;

Summary

In this paper, application of Plackett-Burman design in robustness testing of liquid chromatographic method for determination of sodium valproate. As factors which could have influence on method's robustness content of acetonitrile, concentration of sodium dihydrogenphosphate, pH of the mobile phase, column's temperature, flow rate and wavelength were investigated. In aim to create plan of experiments for Plackett-Burman design on six real factors, 5 dummies were added. In total, 11 factors were investigated through 12 experiments. As qualitative responses retention times, number of theoretical plates and peak symmetry were followed while as quantitative response peak area was followed. On the basis of the obtained results with statistical and graphical methods, influence of investigated factors on system responses were defined. Further, for significant factors non-significant interval was defined e. g. range in which factor could be change without influence on response. Finally, results were used for determination of parameters for system suitability tests.

Key words: Plackett-Burman design; Robustness; Sodium valproate,
Liquid chromatography
