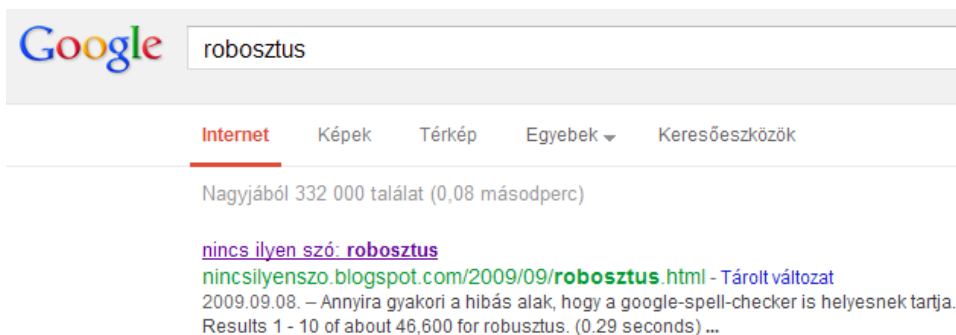


## Robusztus vagy robusztus?



## törülköző vagy törülközü?

Tényleg a végén és tényleg úgy kell végezni a robusztusság-vizsgálatot?

"The robustness/ruggedness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage"

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology

*(The Addendum dated November 1996 has been incorporated into the core guideline in November 2005).*

Igen jó anyag: Y. Vander Heyden, A.Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste and D.L. Massart: Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation, J Pharm Biomed Anal. 2001 Mar;24(5-6):723-53  
<http://www.vub.ac.be/fabi/tutorial/robust/guideline.doc>),  
bár nem minden részével értek egyet

Régebben:

- a validálás egyik utolsó lépése
  - a laboratóriumok közötti módszerátadás problémáinak megelőzésére
- Ha a módszer nem bizonyult robusztusnak, vissza kellett lépni a módszerfejlesztésbe.

Ezt elkerülendő: a robusztusság-vizsgálat megfelelő helye a módszerfejlesztés végén, a validálás előtt van.

Amiről szó lesz:

1. Azt szeretnénk kimondani, hogy a módszer robusztus, vagyis a vizsgált faktorok (az adott változtatási tartományban) nem befolyásolják a mérési eredményt.
2. Tudomásul vesszük, hogy a módszer érzékeny bizonyos faktorokra, ezt az érzékenységet számszerűsítjük, és megadjuk, hogy az illető faktort milyen (a szokásosnál szűkebb) tartományban kell tartanunk, ha azt akarjuk, hogy befolyása ne legyen zavaró.

+ (3.) Robusztussá tétel (Taguchi módszere)

# Robusztusság

1. példa  $2^{4-1}$  terv 2 centrumponttal

- a kolonnatér hőmérséklete a névleges érték körül  $\pm 2$  °C,
- az eluens szerves oldószer tartalma a névleges értéke körül  $\pm 1$  térfogat %-kal,
- az eluens névleges pH értéke körül  $\pm 0,2$ ,
- az eluens K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> névleges koncentrációja körül  $\pm 1$  mM

| Kísérlet | Hőmérséklet (°C) | Az eluens MeOH-tartalma (V/V %) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mM az eluensben | eluens pH |
|----------|------------------|---------------------------------|---|-----------|
| 1        | 32               | 14                              | 16  | 6.8       |
| 2        | 28               | 16                              | 14  | 7.2       |
| 3        | 32               | 14                              | 14  | 7.2       |
| 4        | 30               | 15                              | 15  | 7.0       |
| 5        | 28               | 14                              | 16  | 7.2       |
| 6        | 32               | 16                              | 16  | 7.2       |
| 7        | 32               | 16                              | 14  | 6.8       |
| 8        | 28               | 16                              | 16  | 6.8       |
| 9        | 30               | 15                              | 15  | 7.0       |
| 10       | 28               | 14                              | 14  | 6.8       |

Robusztusság

5

Hipotézisvizsgálat:  $H_0 : \beta_j = 0$   $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p$

$$t_0 = \frac{b_j}{s_{b_j}} \quad s_{b_j}^2 = \frac{s_y^2}{\sum_i x_{ji}^2} = \frac{s_y^2}{N} \quad y \text{ a mért hatóanyagtartalom}$$

| Effect Estimates; Var.: y; R-sqr=.41629; Adj.:.19392<br>2**(4-1) design; MS Residual=.2193651<br>DV: y |         |          |         |         |                |                |
|--|---------|----------|---------|---------|----------------|----------------|
| Factor   | Effect  | Std.Err. | t(21)   | p       | -95.% Cnf.Limt | +95.% Cnf.Limt |
| Mean/Interc.   | 101.025 | 0.09560  | 1056.69 | 0.00000 | 100.826        | 101.223        |
| Curvatr.   | 0.150   | 0.42755  | 0.351   | 0.72921 | -0.739         | 1.039          |
| (1)T   | -0.150  | 0.19120  | -0.784  | 0.44151 | -0.547         | 0.247          |
| (2)MeOH  | -0.183  | 0.19120  | -0.959  | 0.34856 | -0.581         | 0.214          |
| (3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | -0.266  | 0.19120  | -1.395  | 0.17770 | -0.664         | 0.131          |
| (4)pH  | -0.300  | 0.19120  | -1.569  | 0.13160 | -0.697         | 0.097          |
| 1 by 2   | 0.416   | 0.19120  | 2.179   | 0.04085 | 0.019          | 0.814          |
| 1 by 3   | -0.133  | 0.19120  | -0.697  | 0.49325 | -0.531         | 0.264          |
| 1 by 4   | 0.366   | 0.19120  | 1.918   | 0.06886 | -0.031         | 0.764          |

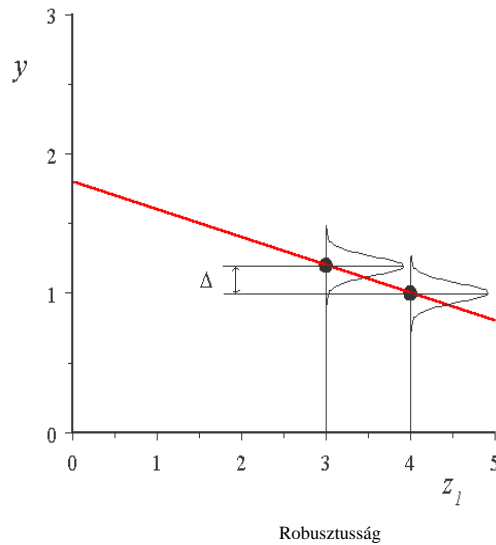
Ha elfogadjuk: nem tudjuk elutasítani, az adatok nem mondanak ellent, a hatás nem magaslik ki a véletlen ingadozásból  
Biztos, hogy ezt akarjuk kérdezni?

Robusztusság

6

# Robusztusság

Ha nagy a szórás, nem észleljük a hatást!



7

1. Azt szeretnénk kimondani, hogy a módszer robusztus, vagyis a vizsgált faktorok (az adott változtatási tartományban) nem befolyásolják a mérési eredményt.

Biztos?

Inkább azt, hogy a vizsgált faktorok nem befolyásolják a mérési eredményt jobban, mint...

Ehhez ki kell számolnunk, hogy mekkora változást okoznak  
→ az összefüggés becslése szükséges:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p$$

Robusztusság

8

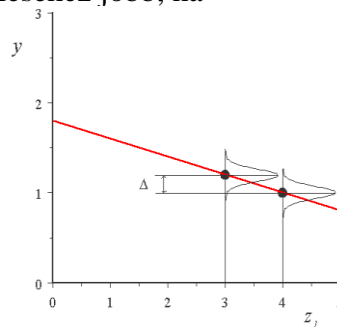
# Robusztusság

A faktorok kétfélék:

tipikusan mennyiségiek, amelyeket a módszerfejlesztésnél optimalizálunk

tipikusan minőségiek, amelyekkel nem foglalkozunk a módszerfejlesztésnél

A mennyiségi faktorok hatásának becsléséhez jobb, ha szélesebb tartományban változtatunk.



A módszerfejlesztésnél is használt

faktorok hatására már vannak kísérleteink!

2. Tudomásul vesszük, hogy a módszer érzékeny bizonyos faktorokra, ezt az érzékenységet számszerűsítjük, és megadjuk, hogy az illető faktort milyen (a szokásosnál szűkebb) tartományban kell tartanunk, ha azt akarjuk, hogy befolyása ne legyen zavaró. → ugyanez a technika

Maguk a kísérletek a módszerfejlesztési kísérletek, széles változtatási tartományokkal.

## 2. példa

J. S. Space, A. M. Opio, B. Nickerson, H. Jiang, M. Dumont, M. Berry: Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007) 1064 – 1071

1068

*J.S. Space et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007) 1064–1071*

Table 6  
Randomized split plot robustness design for the HPLC end analysis method and results

| Randomized robustness design |    |           |                            | Chromatographic setup |     |                    |                            | Acceptance criteria                            |                             |                           |
|------------------------------|----|-----------|----------------------------|-----------------------|-----|--------------------|----------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|
| Temperature                  | pH | Flow rate | Organic (acetonitrile) (%) | Temperature (°C)      | pH  | Flow rate (mL/min) | Organic (acetonitrile) (%) | Retention time $\geq 2.5$ and $\leq 4.5$ (min) | Peak efficiency $\geq 1000$ | Peak asymmetry $\leq 2.0$ |
| +                            | -  | -         | -                          | 45                    | 2.8 | 0.4                | 33                         | 5.6  | 5180                        | 1.1                       |
| +                            | -  | +         | +                          | 45                    | 3.2 | 0.6                | 33                         | 3.7  | 4879                        | 1.1                       |
| +                            | +  | -         | -                          | 45                    | 2.8 | 0.4                | 37                         | 3.1  | 5290                        | 1.0                       |
| +                            | +  | +         | +                          | 45                    | 3.2 | 0.6                | 37                         | 2.2  | 4612                        | 1.1                       |
| -                            | -  | -         | -                          | 35                    | 2.8 | 0.4                | 33                         | 6.5  | 5640                        | 1.0                       |
| -                            | +  | -         | -                          | 35                    | 2.8 | 0.4                | 37                         | 3.5  | 5117                        | 1.1                       |
| -                            | -  | +         | +                          | 35                    | 3.2 | 0.6                | 33                         | 4.4  | 4780                        | 1.0                       |
| -                            | +  | +         | +                          | 35                    | 3.2 | 0.6                | 37                         | 2.5  | 4262                        | 1.1                       |
| +                            | +  | -         | +                          | 45                    | 2.8 | 0.6                | 37                         | 2.1  | 4579                        | 1.1                       |
| +                            | -  | -         | +                          | 45                    | 2.8 | 0.6                | 33                         | 3.7  | 4691                        | 1.1                       |
| +                            | -  | +         | -                          | 45                    | 3.2 | 0.4                | 33                         | 5.7  | 5506                        | 1.1                       |
| +                            | +  | +         | -                          | 45                    | 3.2 | 0.4                | 37                         | 3.3  | 5542                        | 1.1                       |
| -                            | -  | +         | -                          | 35                    | 3.2 | 0.4                | 33                         | 6.6  | 5029                        | 1.1                       |
| -                            | +  | +         | -                          | 35                    | 3.2 | 0.4                | 37                         | 3.6  | 5192                        | 1.1                       |
| -                            | -  | -         | +                          | 35                    | 2.8 | 0.6                | 33                         | 4.4  | 4667                        | 1.0                       |
| -                            | +  | -         | +                          | 35                    | 2.8 | 0.6                | 37                         | 2.4  | 4453                        | 1.1                       |

"+" Refers to the high values in the chromatographic setup. "-" Refers to the low values in the chromatographic setup.

Robusztusság

11

Space\_JPBA\_44\_1064.sta

|    | 5<br>Temperatu<br>e (OC) | 6<br>pH | 7<br>Flow rate<br>(mL/min) | 8<br>Organic<br>(acetonitrile) (%) | 9<br>Retention<br>time =2.5<br>and=4.5<br>(min) | 10<br>Peak<br>efficienc<br>y =1000 | 11<br>Peak<br>asymmetry<br>=2.0 |
|----|--------------------------|---------|----------------------------|------------------------------------|---|------------------------------------|---------------------------------|
| 1  | 45                       | 2.8     | 0.4                        | 33                                 | 5.6   | 5180                               | 1.1                             |
| 2  | 45                       | 3.2     | 0.6                        | 33                                 | 3.7   | 4879                               | 1.1                             |
| 3  | 45                       | 2.8     | 0.4                        | 37                                 | 3.1   | 5290                               | 1.0                             |
| 4  | 45                       | 3.2     | 0.6                        | 37                                 | 2.2   | 4612                               | 1.1                             |
| 5  | 35                       | 2.8     | 0.4                        | 33                                 | 6.5   | 5640                               | 1.0                             |
| 6  | 35                       | 2.8     | 0.4                        | 37                                 | 3.5   | 5117                               | 1.1                             |
| 7  | 35                       | 3.2     | 0.6                        | 33                                 | 4.4   | 4780                               | 1.0                             |
| 8  | 35                       | 3.2     | 0.6                        | 37                                 | 2.5   | 4262                               | 1.1                             |
| 9  | 45                       | 2.8     | 0.6                        | 37                                 | 2.1   | 4579                               | 1.1                             |
| 10 | 45                       | 2.8     | 0.6                        | 33                                 | 3.7   | 4691                               | 1.1                             |
| 11 | 45                       | 3.2     | 0.4                        | 33                                 | 5.7   | 5506                               | 1.1                             |
| 12 | 45                       | 3.2     | 0.4                        | 37                                 | 3.3   | 5542                               | 1.1                             |
| 13 | 35                       | 3.2     | 0.4                        | 33                                 | 6.6   | 5029                               | 1.1                             |
| 14 | 35                       | 3.2     | 0.4                        | 37                                 | 3.6   | 5192                               | 1.1                             |
| 15 | 35                       | 2.8     | 0.6                        | 33                                 | 4.4   | 4667                               | 1.0                             |
| 16 | 35                       | 2.8     | 0.6                        | 37                                 | 2.4   | 4453                               | 1.1                             |

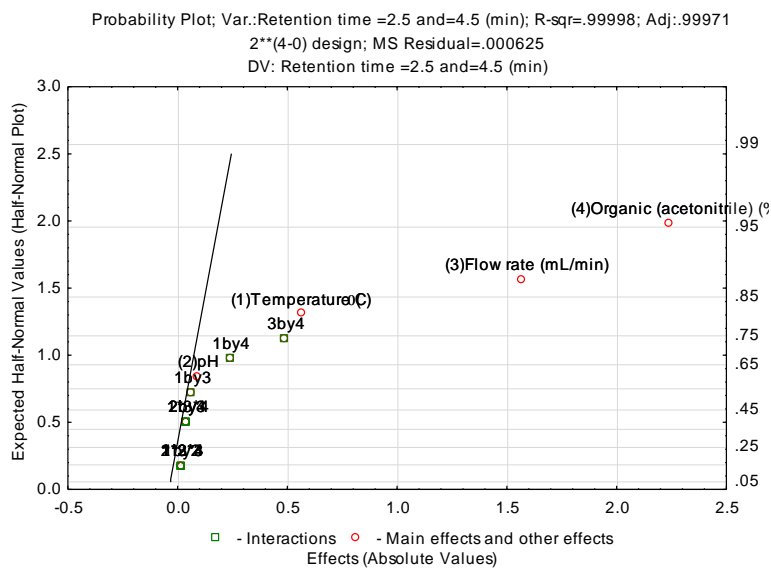
Robusztusság

12

# Robusztusság

| Effect Estimates; Var.:Retention time =2.5 and=4.5 (min); R-sqr=.99998; Adj.:99971<br>2**(4-0) design; MS Residual=.000625<br>DV: Retention time =2.5 and=4.5 (min) |        |          |        |        |                |                |        |
|---|--------|----------|--------|--------|----------------|----------------|--------|
| Factor  | Effect | Std.Err. | t(1)   | p      | -95.% Cnf.Limt | +95.% Cnf.Limt | Coeff. |
| Mean/Interc.  | 3.956  | 0.0062   | 633.0  | 0.0010 | 3.877          | 4.036          | 3.956  |
| (1)Temperature(°C)  | -0.562 | 0.0125   | -45.0  | 0.0141 | -0.721         | -0.404         | -0.281 |
| (2)pH   | 0.088  | 0.0125   | 7.0    | 0.0903 | -0.071         | 0.246          | 0.044  |
| (3)Flow rate (mL/min)   | -1.563 | 0.0125   | -125.0 | 0.0051 | -1.721         | -1.404         | -0.781 |
| (4)Organic (acetonitrile) (%)   | -2.238 | 0.0125   | -179.0 | 0.0036 | -2.396         | -2.079         | -1.119 |
| 1 by 2  | 0.012  | 0.0125   | 1.0    | 0.5000 | -0.146         | 0.171          | 0.006  |
| 1 by 3  | 0.062  | 0.0125   | 5.0    | 0.1257 | -0.096         | 0.221          | 0.031  |
| 1 by 4  | 0.237  | 0.0125   | 19.0   | 0.0335 | 0.075          | 0.396          | 0.119  |
| 2 by 3  | -0.037 | 0.0125   | -3.0   | 0.2048 | -0.196         | 0.121          | -0.019 |
| 2 by 4  | 0.037  | 0.0125   | 3.0    | 0.2048 | -0.121         | 0.196          | 0.019  |
| 3 by 4  | 0.487  | 0.0125   | 39.0   | 0.0163 | 0.325          | 0.646          | 0.244  |
| 1*2*3   | -0.012 | 0.0125   | -1.0   | 0.5000 | -0.171         | 0.146          | -0.006 |
| 1*2*4   | 0.012  | 0.0125   | 1.0    | 0.5000 | -0.146         | 0.171          | 0.006  |
| 1*3*4   | -0.037 | 0.0125   | -3.0   | 0.2048 | -0.196         | 0.121          | -0.019 |
| 2*3*4   | 0.013  | 0.0125   | 1.0    | 0.5000 | -0.146         | 0.171          | 0.006  |

Table 6  
Randomized split plot robustness design for t



# Robusztusság

| Regr. Coefficients; Var.:Retention time =2.5 and=4.5 (min); R-sqr=.99843; Adj.: 2**(4-0) design; MS Residual=.005625<br>DV: Retention time =2.5 and=4.5 (min) |                 |          |         |         |                |                |
|---|-----------------|----------|---------|---------|----------------|----------------|
| Factor  | Regressn Coeff. | Std.Err. | t(9)    | p       | -95.% Cnf.Limt | +95.% Cnf.Limt |
| Mean/Interc.  | 68.894          | 3.20684  | 21.483  | 0.00000 | 61.635         | 76.148         |
| (1)Temperature(C)   | -0.503          | 0.06831  | -7.361  | 0.00000 | -0.654         | -0.348         |
| (3)Flow rate (mL/min)   | -52.965         | 3.61272  | -14.662 | 0.00000 | -61.141        | -44.790        |
| (4)Organic (acetonitrile) (%)   | -1.644          | 0.08894  | -18.482 | 0.00000 | -1.845         | -1.443         |
| 1 by 3  | 0.062           | 0.03750  | 1.667   | 0.12990 | -0.022         | 0.147          |
| 1 by 4  | 0.012           | 0.00181  | 6.333   | 0.00014 | 0.000          | 0.016          |
| 3 by 4  | 1.219           | 0.09374  | 13.000  | 0.00000 | 1.007          | 1.431          |

nem új kísérlet, csak redukált modell

$$\hat{Y} = 68.9 - 0.503 \cdot T - 52.97 \cdot flow - 1.644 \cdot org \% + 0.062 \cdot T \cdot flow + 0.012 \cdot T \cdot org \% - 1.219 \cdot flow \cdot org \%$$

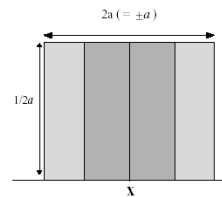
Hibaterjedési törvény:

$$\sigma_{\hat{Y}}^2 \approx \sum_{j=1}^r \left( \frac{\partial \hat{Y}}{\partial x_j} \right)^2 \sigma_{x_j}^2 \quad \frac{\partial \hat{Y}}{\partial T} = -0.503 + 0.062 \cdot flow + 0.012 \cdot org \%$$

GUM, Measurementuncertainty

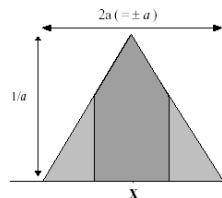
egyenletes eloszlásra

$$\sigma = \frac{a}{\sqrt{3}} = 0.577a$$



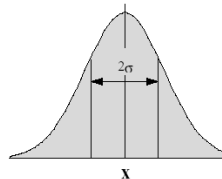
háromszögű eloszlásra

$$\sigma = \frac{a}{\sqrt{6}} = 0.408a$$



normális eloszlásra

$$\sigma = \frac{a}{\sqrt{9}} = 0.333a$$

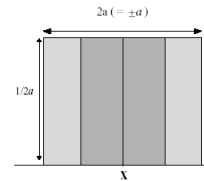




# Robusztusság

$$\hat{Y} = 68.9 - 0.503 \cdot T - 52.97 \cdot flow - 1.644 \cdot org \% + 0.062 \cdot T \cdot flow + 0.012 \cdot T \cdot org \% - 1.219 \cdot flow \cdot org \%$$

$$\sigma = \frac{a}{\sqrt{3}} = 0.577a$$



Ha pl. a hőmérsékletet  $\pm 1^\circ\text{C}$  pontossággal, az áramot  $\pm 0.05\text{mL/min}$  pontossággal, az acetonitril-koncentrációt  $0.5\%$  pontossággal tudjuk tartani,

$$\sigma_T = 0.577 \cdot 1 = 0.577^\circ\text{C},$$

a közepes beállításoknál:

$$\sigma_{flow} = 0.577 \cdot 0.05 = 0.028\text{mL/min}$$

$$T=40, flow=0.5, org\%=35$$

$$\sigma_{org\%} = 0.577 \cdot 0.5 = 0.28\%$$

$$\begin{aligned} \sigma_{Tr}^2 &= (-0.503 + 0.062 \cdot 0.5 + 0.012 \cdot 35)^2 \cdot 0.577^2 + \\ &+ (-52.97 + 1.219 \cdot 35)^2 \cdot 0.028^2 + (-1.644 + 0.012 \cdot 40 + 1.219 \cdot 0.5)^2 \cdot 0.28^2 = \\ &= 0.9 \cdot 10^{-3} + \textcircled{0.083} + 0.024 = 0.108 \end{aligned}$$

$$\Delta Tr = \frac{\sqrt{0.110}}{0.577} = 0.57$$

Robusztusság

17

Optimalizálás:

$$\hat{Y} = 68.9 - 0.503 \cdot T - 52.97 \cdot flow - 1.644 \cdot org \% +$$

$$+ 0.062 \cdot T \cdot flow + 0.012 \cdot T \cdot org \% - 1.219 \cdot flow \cdot org \%$$

$$\sigma_{Tr}^2 = (-0.503 + 0.062 \cdot flow + 0.012 \cdot org \%)^2 \cdot 0.577^2 +$$

$$org \% \rightarrow \max \text{ (de } 41\% \text{ alatt)} \quad + (-52.97 + 1.219 \cdot T)^2 \cdot 0.028^2 +$$

$$T \rightarrow \max \text{ (de } \sim 43^\circ\text{C} \text{ alatt)}$$

$$+ (-1.644 + 0.012 \cdot T + 1.219 \cdot flow)^2 \cdot 0.28^2$$

$$T \rightarrow \max$$

$$flow \rightarrow \max$$

$$T: 45, flow: 0.6, org\%: 40$$

$$\sigma_{Tr}^2 = 1.76 \cdot 10^{-4} + 2.78 \cdot 10^{-3} + 0.011 = 0.014$$

$$\Delta Tr = \frac{\sqrt{0.014}}{0.577} = 0.21$$

$$\sigma_{Tr}^2 = 2.29 \cdot 10^{-3} + 0.083 + 0.024 = 0.110$$

$$\Delta Tr = 0.57$$

Robusztusság

18

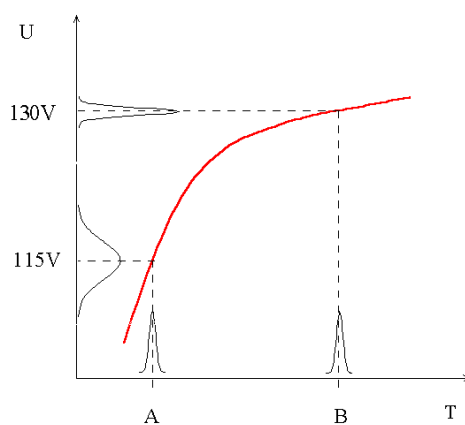
+ Robusztussá tétel (Taguchi módszere)

Zs. Romvári, J. Fekete, S. Kemény, G. Pokol, I. Gebefügi, A. Kettrup: Determination of two metabolites of albendazole, albendazole-sulfoxide and albendazole-sulfone in cow`s milk using an HPLC method - A systematic approach to optimise extraction conditions.  
Chromatographia, 48 777-784 (1998)

Zs. Romvári, S. Kemény, G. Pokol, J. Fekete: A new approach for development of rugged sample preparation of metabolites of albendazole in cow milk.  
Mikrochim. Acta 130 155-163 (1999)

144 kísérlet!

Taguchi tranzisztor-példája: a tranzisztor teljesítmény-tényezője függvényében az áramkör kimenő feszültsége:



A kimenő feszültség előírt értéke 115V

Nem az okot szüntettük meg, hanem a következményét csökkentettük

# Robusztusság

## kézbenttartható faktorok

|   |   |
|---|---|
| A | puffer mennyisége a mintaelőkészítés első lépésénél, ml |
| B | a puffer pH-ja  |
| C | a tejhez adott acetónitril mennyisége, ml               |
| D | az ultrahangozás ideje, perc                            |
| E | a centrifugálás ideje, perc                             |
| F | a centrifuga fordulatszáma, 1/perc                      |
| G | a minta hűtése (igen/nem)                               |
| H | a másodszor hozzáadott puffer mennyisége, ml            |
| I | az oszlop minősége (új, közepes, régi)                  |
| J | az injektálás előtt hozzáadott puffer mennyisége, ml    |
| K | a mobil fázis pH-ja                                     |

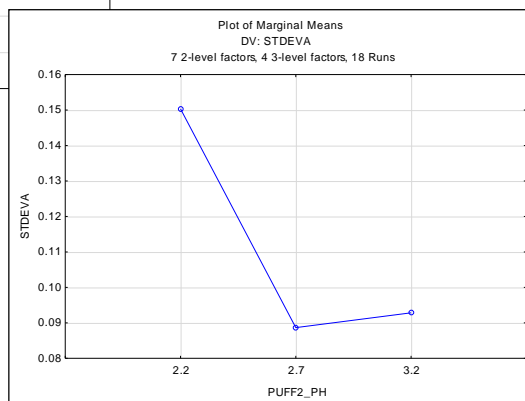
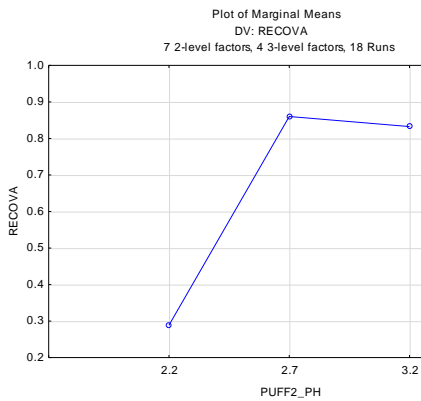
## zaj-faktorok

|   |   |
|---|---|
| a | a tej származási helye                              |
| b | a tejhez adott acetónitril beszállítója             |
| c | a tejhez adott acetónitril mennyiségének hibája, ml |
| d | a centrifuga hőmérséklete                           |
| e | a mintaelőkészítés késése (óra)                     |
| f | az eluensként használt acetónitril beszállítója     |
| g | az acetónitril mennyiségének hibája, ml             |

18\*8=144 kísérlet

Robusztusság

21



Robusztusság

22