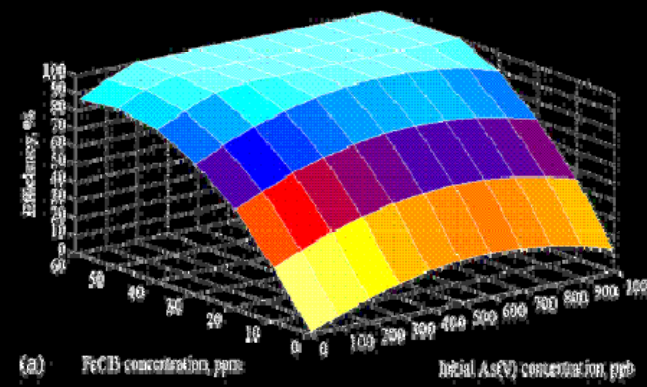
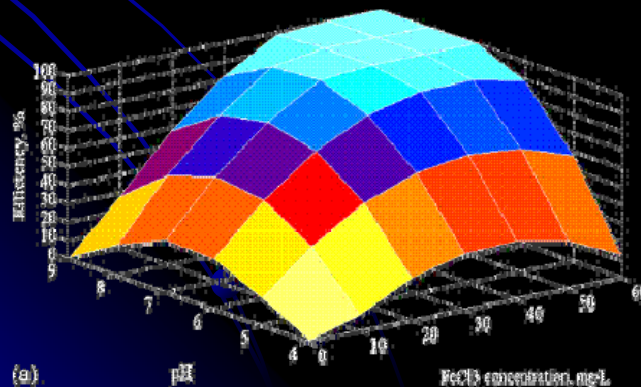


Primena dizajniranja eksperimenata u razvoju metoda

Optimizacija analitičkih metoda
korišćenjem metoda odzivnih površina
(RSM - Response Surface Methodology)

Zašto RSM?

- Implementacija ispravnog eksperimentalnog dizajna pruža informacije o:
 - svim interakcijama koje postoje između analiziranih promenljivih/uslova,
 - promenljivim/uslovima koje imaju najveći uticaj na rezultat,
 - uslovima eksperimenta koji obezbeđuju najbolji rezultat
- Jasna vizuelna prezentacija ovih informacija pomaže da se bolje razume sistem eksperimenta



Zašto RSM?

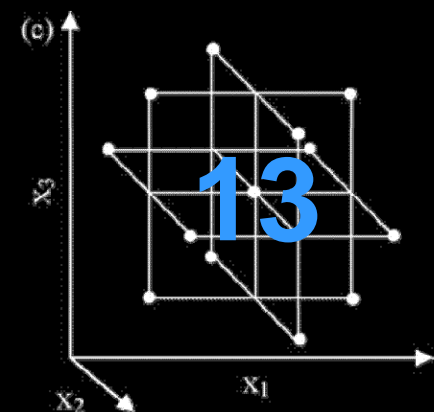
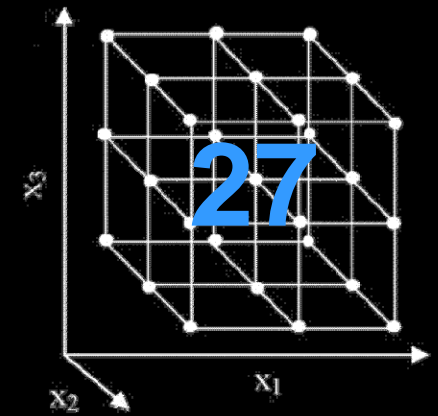
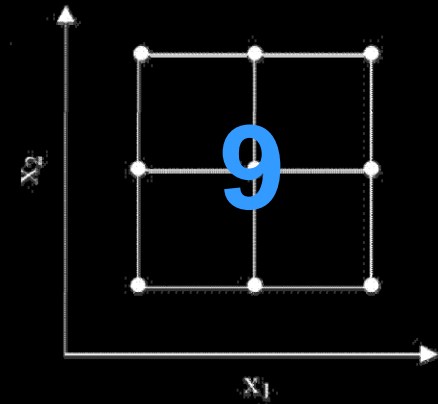
- RSM je vrlo efikasan - za ispitivanje velikog broja promenljivih dovoljan je mali broj testiranja
- Uključuje metodologiju za kvantifikaciju greške i za minimizovanje uticaja slučajnih grešaka
- Pruža dobru statističku podlogu za validaciju metoda
- RSM je jednostavan za korišćenje
 - softver generiše kombinacije promenljivih za koje treba sprovesti eksperiment i obezbeđuje potrebne statističke analize

Šta je RSM?

- Skup matematičkih i statističkih tehnika
 - koji se koristi za konstrukciju empirijskih modela na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem linearnih ili polinomijalnih funkcija
 - koji se može koristiti za bilo koju vrstu optimizacije - u tehnološkom procesu, npr. uklanjanje arsena iz vode za piće, ili u analitičkom metodu
- Primena RSM uključuje
 - definisanje prostora eksperimenta - izbor nezavisnih promenljivih + kodiranje njihovih limita
 - izbor dizajna i generisanje matrice eksperimenta
 - modelovanje - statistička analiza dobijenih eksperimentalnih podataka
 - ocena adekvatnosti modela
 - određivanje optimalne vrednosti za svaku od posmatranih promenljivih

Definisanje eksperimenta i izbor dizajna

- Dizajn koji će se koristiti zavisi od:
 - broja promenljivih koje treba da ispitujete
 - izabranog broja nivoa
 - broja testova koje hoćete da radite.
- Neki od standardnih dizajnova su:
 - full factorial dizajn, 2 promenljive
 - full factorial dizajn, 3 promenljive
 - Box-Behnken dizajn, 3 promenljive



Optimizacija GC/MS metode

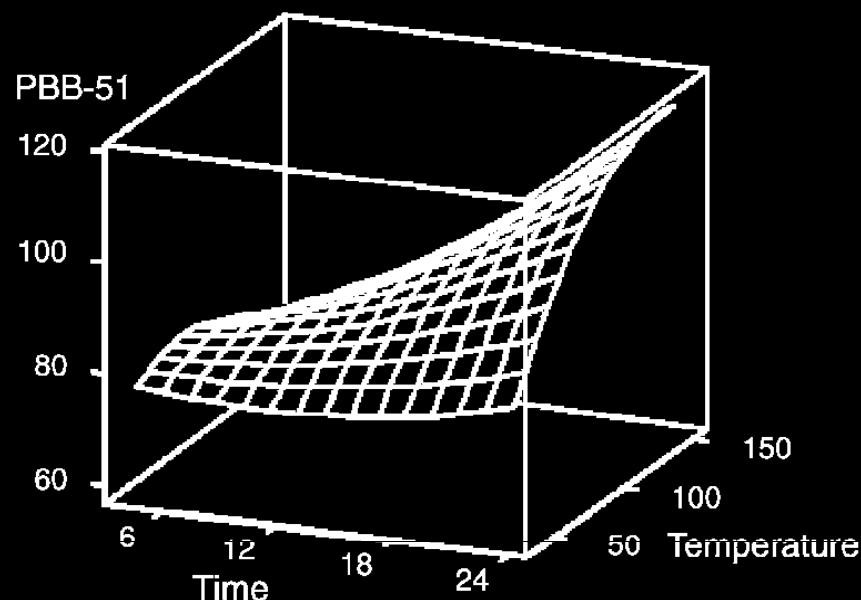
- Determinacija polibromovani bifenili, i polihlorovani naftaleni u uzorcima sedimenta:
- 5 potencijalno značajnih parametara za GC/MS .
- izabrana su 3 nivoa za svaki od parametara, npr.

EV:	0.1	1.05	2.0	V
ET:	4	19	34	ms
IST:	150	200	250	°C

- Izabran je dizajn sa 12 kombinacija minimalnih i maksimalnih nivoa, plus 3 ponavljanja centralne tačke.

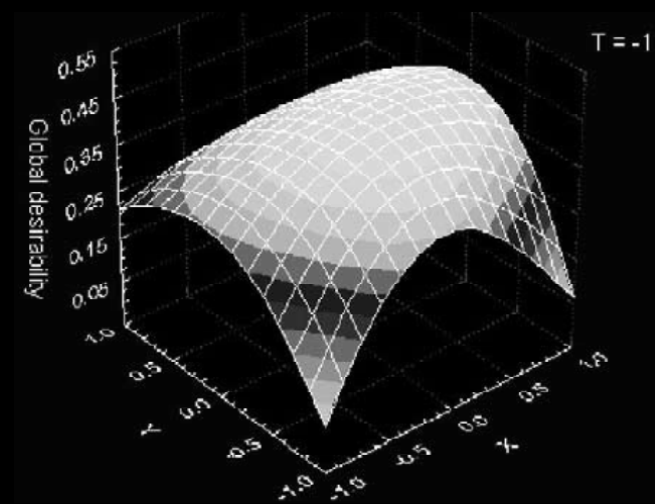
Optimizacija GC/MS metode

- Za optimizaciju koraka mikrotalasne ekstrakcije u pripremi uzorka, korišćen je drugačiji dizajn
- Centralni kompozitni dizajn.
 - 3 promenljive, 3 nivoa
 - Dodatne centralne tačke
- Promenljive:
 - vreme digestije
 - temperatura digestije
 - zapremina uzorka
- Na niskoj temperaturi, vreme ekstrakcije praktično nema uticaj na odziv
- Na visokoj temperaturi, vreme ekstrakcije ima značajan uticaj



Purge-and-trap-GC/MS determinacija metil terc-butil etar, terc-butil alkohol i BTEX u površinskoj vodi

- Optimizacija se izvodi simultano po više kriterijuma
- Korišćenjem faktorskog dizajna sa dva nivoa:
 - temperature,
 - trajanja ekstrakcije i
 - količine natrijum hlorida koje se dodaje u uzorke vode
- Neki aniliti su imali kvadratni, a ne linearne jednačine
- Dodali su centralni kompozitni dizajn, i kombinovali ga sa faktorskim dizajnom.
- Optimalni uslovi (koji odgovaraju najvećim "recoveries"): 60°C, u trajanju od 30 min, bez dodate soli.



Razvoj metoda

- Identifikacija zahteva metoda i ispitivanje različitih opcija:
 - koja vrsta matrice uzoraka će biti analizirana?
 - koji su ciljni aniliti vaše analize?
 - koje su granice detekcije?
- Izbor odgovarajućeg metoda na osnovu:
 - zahtevane osetljivosti
 - potrebnog vremena
 - isplativosti
 - mogućnosti vaše laboratorije
- Optimizacija metoda
- Validacija metoda
 - pokazati da metod zadovoljava željene kriterijume
 - određivanje granica detekcije, procedure kontrole kvaliteta.

Optimizacija metoda

- Korišćenjem RSM moguće je optimizovati metode za pojedinačan cilj.
- Takođe je moguće definisati funkciju želje kako bi se metod optimizovao za više ciljeva odjednom, što je naročito korisno za višestruke analite.
- Može se koristiti bilo koji kriterijum koji se može kvantifikovati, npr:
 - Povećati osetljivost metoda za anilit X ili Y
 - Učiniti metod robusnijim
 - Smanjiti vreme potrebno za analizu
 - Smanjiti količinu opasnih ili skupih reagenasa koji se koriste u analizi

Validacija metoda

- Proces korišćenja RSM optimizacije obezbeđuje informacije i statistike vezane za:
 - interakcije promenljivih
 - promenljive koje su od najvećeg značaja za rezultat analize
 - nivo greške u analizi

Što je bolje vaše znanje o tome koje promenljive imaju najveći uticaj na vaše analize, lakše će biti napraviti logičnu kontrolu kvaliteta.

Hvala na pažnji.

RSM in the literature

Review: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry

Analytes	Samples	Analytical technique	Objective of the study
Organochlorines and pyrethroids	Tea	GC	Optimizing a method based on matrix solid-phase dispersion and gas chromatography for the determination of multi-residue pesticides
R-Timolol and other impurities	S-Timolol maleate	HPLC	Finding the optimal chromatographic condition for the simultaneous determination of analytes
Anthraquinones and bianthrone	Herbal medicine	Micellar electrokinetic chromatography	Developing a chromatography method for the analysis of anthraquinones and bianthrone in rhubarb crude drugs
Organomercury compounds and Hg(II)	Seawater	GC-MIP OES	Developing a method for determination of these species
Methyl <i>tert</i> -butyl ether, <i>tert</i> -butyl alcohol, benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers	Groundwater	GC-MS	Developing a method for the simultaneous determination of these substances

M.A. Bezerra *et al.*, *Talanta* 76 (2008) 965–977