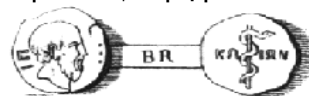




"ωφελέειν, εἰ μὴ βλάπτειν"



'benefit and do not harm'

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΔΙΔΥΜΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (UHPLC-MS/MS) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ (Design of Experiments – DoE)

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΚΟΥΝΤΑΝΑΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ Α.Π.Θ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΜΣ: «ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ -ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΑΘΗΝΑ 2018

*‘Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου
Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.’*

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ

Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ε. ΓΚΙΚΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Ι. ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (Συνεπιβλέπων)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του βιοαναλυτικού τμήματος του κέντρου ΓΑΙΑ/Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Φαρμακευτική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες Καθηγητές μου κ. Ευάγγελο Γκίκα και κ. Ιωάννη Ντότσικα για την ανάθεση του θέματος, καθώς επίσης και για το αμείωτο ενδιαφέρον και την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της δεδομένης προσπάθειας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το 3^ο μέλος τριμελούς επιτροπής Καθηγήτρια Ε. Παντερή για τη συμβολή της στη διόρθωση και βελτίωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	7
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
ΘΕΩΡΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ	10
1.1 Προσδιοριστικά και Στοχαστικά Συστήματα	10
1.2 Πειραματικός Σχεδιασμός- Design of Experiment (DoE)	11
1.3 Βασικές αρχές πειραματικού σχεδιασμού	12
1.4 Στάδια πειραματικού σχεδιασμού	13
1.4.1.Αναγνώριση και καθορισμός του προβλήματος	13
1.4.2. Επιλογή των μεταβλητών απόκρισης.....	14
1.4.3.Επιλογή των παραγόντων, επιπέδων και εύρους	14
1.4.4.Επιλογή τύπου πειραματικού σχεδιασμού.....	15
1.4.5.Εκτέλεση των πειραμάτων	15
1.4.6.Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	16
1.4.7.Συμπεράσματα και προτάσεις.....	16
1.5 Είδη πειραματικού σχεδιασμού	16
1.5.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός	16
1.5.2 Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός	18
1.5.3 Σχεδιασμός Plackett-Burman (PB)	20
1.5.4 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD).....	22
1.5.5 Σχεδιασμός Box-Behnken.....	25
1.5.6 D-optimal σχεδιασμός.....	27
1.6 Γραφική μέθοδος - Μεθοδολογία απόκρισης επιφανειών (Response Surface Methodology)	28
1.7 Εφαρμογές πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανίχνευσης με φασματομετρία μαζών.....	28
1.7.1 Βελτιστοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με την παγίδα ιόντων	29
1.7.2 Βελτιστοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με τη πηγή ιόντων	29
1.7.3 Στρατηγικές βελτιστοποίησης χρωματογραφικών και φασματομετρικών συνθηκών.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	32
ΤΑ ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ.....	32
2.1 Εισαγωγή.....	32
2.2 Χημικοί Τύποι-Φυσικοχημικές ιδιότητες Μακρολίδων.....	32

2.3 Φαρμακολογία	34
2.3.1 Μηχανισμός δράσης	34
2.3.2 Αντιμικροβιακό Φάσμα	35
2.3.3 Ενδείξεις.....	36
2.3.4 Φαρμακοκινητική.....	37
2.3.5 Αντενδείξεις, ανεπιθύμητες ενέργειες, αλληλεπιδράσεις	38
2.4 Διαθέσιμες Αναλυτικές Μέθοδοι για τον προσδιορισμό των μακρολιδικών αντιβιοτικών	40
2.4.1 Χρωματογραφικές Τεχνικές	41
2.4.2 Φασματοφωτομετρικές τεχνικές.....	46
2.4.3 Ηλεκτροχημικές τεχνικές.....	47
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	49
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	49
3.1 Σύστημα UHPLC-MS/MS.....	49
3.2 Λογισμικά.....	50
3.3 Αναλυτικός ζυγός.....	50
3.4 Αναλυτικές πιπέτες.....	50
3.5 Ανακίνηση-Ανάμιξη.....	51
3.6 Διαλύτες-Αναλυτικές Στήλες	51
3.7 Πρότυπες Ουσίες	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	52
ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	52
4.1 Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης.....	52
4.2 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	52
4.3 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών με τη χρήση του IntelliStart	53
4.4 Επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	59
ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ	59
5.1 Εισαγωγή	59
5.2 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός 8 παραγόντων	59
5.3 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός 6 παραγόντων	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	68
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ (CENTRAL COMPOSITE DESIGN, CCD).....	68

6.1 Εφαρμογή CCI σχεδιασμού	68
6.2 Ανάλυση μοντέλου ανά απόκριση	71
6.3 ANOVA	75
6.4 Διαγράμματα Αξιολόγησης	83
6.5 Μεθοδολογία Απόκρισης Επιφάνειας (RSM)	85
6.7 Εύρεση τιμών παραγόντων που βελτιστοποιούν τις αποκρίσεις	87
6.7.1 Βελτιστοποίηση αναλυτικού σήματος ξεχωριστά	87
6.7.2 Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εμβαδών όλων των αναλυτών	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	93
ΣΤΑΔΙΟ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ	93
7.1 Εφαρμογή CCC για τη βελτιστοποίηση των υγροχρωματογραφικών συνθηκών.	93
7.2 Ανάλυση μοντέλου ανά απόκριση	94
7.4 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων μέσω διαγραμμάτων	99
7.5 Εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων που βελτιστοποιούν τις υγροχρωματογραφικές συνθήκες	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	104
ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	104
8.1 Αποτελέσματα πειραμάτων	104
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	111
ABSTRACT	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	114

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ACN	Ακετονιτρίλιο
ANOVA	Analysis of Variance- Ανάλυση Διακύμανσης
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization- Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση
Azi	Azithromycin - Αζιθρομυκίνη
BBD	Box-Behnken Design- Σχεδιασμός Box-Behnken
CCC	Central Composite Circumscribed – Περιγεγραμμένος Κεντρικός Σχεδιασμός
CAD	Collision Gas – Αέριο Σύγκρουσης
CAV	Capillary Voltage – Δυναμικό Τριχοειδούς
CCD	Central Composite Design – Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός
CCI	Central Composite Inscribed- Εγγεγραμμένος Κεντρικός Σχεδιασμός
CE	Capillary Electrophoresis -Ηλεκτροειδής Ηλεκτροφόρηση
CEN	Collision Energy – Ενέργεια Θραυσματοποίησης
CID	Collision Induced Dissociation - Διάσπαση Επαγόμενη από Σύγκρουση
Clar	Clarithromycin - Κλαριθρομυκίνη
CV	Cove Voltage – Δυναμικό Κώνου
DI	Daughter Ion – Θυγατρικό Ιόν
DoE	Design of Experiments – Πειραματικός Σχεδιασμός
DT	Dwell Time -Χρόνος Παραμονής
DGF	Desolvation Gas Flow – Ροή Αερίου Εξάτμισης
DET	Desolvation Temperature – Θερμοκρασία Εξάτμισης
Ery	Erythromycin – Ερυθρομυκίνη
ESI	Electrospray ionization – Ιοντισμός με ηλεκτροψασμό
EV	Extractor Voltage – Δυναμικό Απόσπασης
FCC	Face Central Composite – Εδροκεντρωμένος Σύνθετος
HCOOH	Μυρμηκικό οξύ
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
H ₂ O	Νερό
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass spectrometry – Υγροχρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματομετρία Μαζών
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry – Υγροχρωματογραφίας συνδεδεμένη με δίδυμη Φασματομετρία Μαζών (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)
LIT	Fill time of the ion trap – Χρόνος πλήρωσης της παγίδας ιόντων
MeOH	Μεθανόλη
MS	Mass Spectrometry – Φασματομετρία Μαζών
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography – Υγροχρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης
UV	Ultraviolet – Υπεριώδες
OFAT	One Factor at a time – Μια Παράμετρος τη φορά
PB	Plackett-Burman
Rox	Roxithromycin - Ροξιθρομυκίνη
Rs	Resolution – διαχωριστική ικανότητα

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός και η σύγκριση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών μέσω της βελτιστοποίησης αναλυτικής μεθόδου υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με δίδυμη φασματομετρία μαζών (UHPLC-MS/MS) με τη χρήση της θεωρίας του Πειραματικού Σχεδιασμού και της βελτιστοποίησης που επιτυγχάνεται μέσω του λογισμικού του οργάνου. Τα μοντέλα-αναλύτες που επιλέχθηκαν για αυτήν τη μελέτη είναι 4 μακρολίδια, η ερυθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη, η ροξιθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη.

Το γεγονός ότι τα μακρολίδια αποτελούν την πιο συχνή σε συνταγογράφηση οικογένεια αντιβιοτικών σε ανθρώπους και ζώα και η εμφάνιση αρκετών και σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, καθιστούν ζωτικής σημασίας την ανάπτυξη ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό του. Η επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών ανίχνευσης με φασματομέτρο μαζών, πέραν του προφανούς οφέλους με την επίτευξη χαμηλότερων ορίων ποσοτικοποίησης, έχει σημασία για τη μείωση του χρησιμοποιούμενου όγκου βιολογικού δείγματος που μεταφράζεται σε ελάττωση της πιθανότητας επίδρασης του μητρικού υλικού στο αναλυτικό σήμα, αλλά και προστασίας του οργάνου. Επίσης, είναι προφανές το όφελος για περιπτώσεις που δεν μπορεί να ληφθεί μεγάλη ποσότητα δείγματος, π.χ. νεογνά.

Μέσα από αυτή τη σύγκριση θα γίνει εφικτή η κατανόηση του πειραματικού σχεδιασμού, ο τονισμός της σημαντικότητας της χρήσης του και των προτερημάτων του, καθώς και η εξοικείωση με τον τρόπο εφαρμογής του για το καλύτερο αποτέλεσμα κατά τη διαδρομή προς τον εντοπισμό των βέλτιστων συνθηκών στην ανάπτυξη μιας καινούργιας μεθόδου.

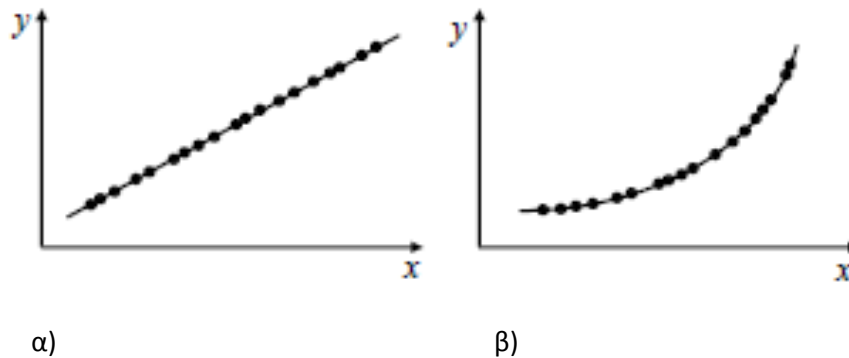
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

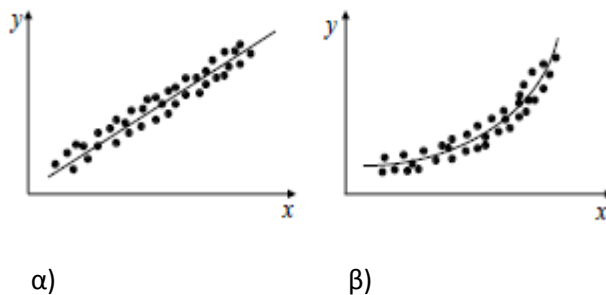
1.1 Προσδιοριστικά και Στοχαστικά Συστήματα^[1]

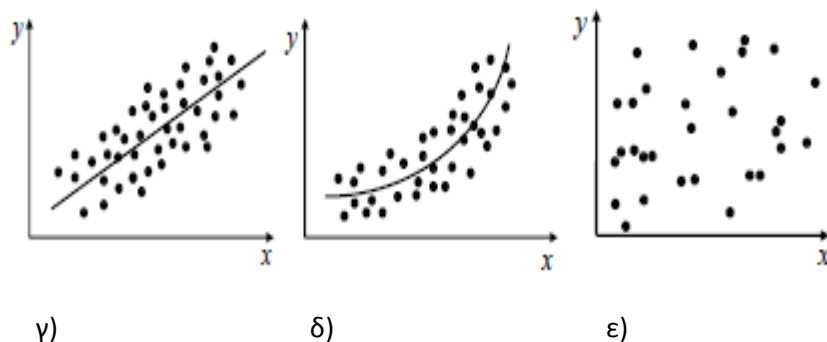
Ένα φυσικό φαινόμενο ή ένα τεχνικό σύστημα, το οποίο μελετάται, μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως προσδιοριστικό ή ως στοχαστικό. Ένα προσδιοριστικό ή αιτιοκρατικό σύστημα μπορεί να περιγραφεί από ένα μαθηματικό προσδιοριστικό μοντέλο (deterministic model) με απόλυτη ακρίβεια. Στην περίπτωση αυτή η συναρτησιακή εξίσωση $y=f(x)$, μέσω της οποίας για μια συγκεκριμένη τιμή της x μεταβλητής, το y θα λαμβάνει πάντα την ίδια τιμή (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: α) Πλήρης γραμμική συσχέτιση β) Πλήρης μη-γραμμική συσχέτιση

Ένα μαθηματικό προσδιοριστικό μοντέλο, όμως, δεν κρίνεται επαρκές, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη του τον παράγοντα της αβεβαιότητας- τυχαιότητας που «συνοδεύει» τα τυχαία ή στοχαστικά φαινόμενα. Η περιγραφή ενός τέτοιου φαινομένου πραγματοποιείται με την χρήση πιθανοκρατικών μοντέλων (probabilistic), ενώ οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών ονομάζονται στοχαστικές (stochastic). Στην περίπτωση αυτή θέτοντας το x στο ίδιο επίπεδο, η y θα λάβει ένα πλήθος διαφορετικών τιμών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέφους σημείων στο διάγραμμα διασποράς, το οποίο πολλές φορές καθορίζει μια ιδεατή γραμμή. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται περιπτώσεις ισχυρής στοχαστικής σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών (Σχήμα 1.2 α, β) και ασθενώς έως και μηδενικής (Σχήμα 1.2 γ, ε), με βάση το αν τα σημεία του διαγράμματος διασποράς βρίσκονται κοντά στην ιδεατή γραμμή.





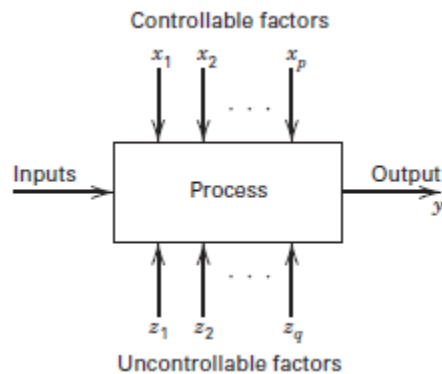
Σχήμα 1.2: α) Ισχυρή γραμμική συσχέτιση β) Ισχυρή μη-γραμμική συσχέτιση γ) Ασθενής γραμμική συσχέτιση δ) Ασθενής μη-γραμμική συσχέτιση ε) Μηδενική συσχέτιση

Σημαντικό εργαλείο για την πιθανοκρατική περιγραφή ενός τυχαίου-στοχαστικού φαινομένου είναι η χρήση στατιστικών μεθόδων (statistical methods), οι οποίες περιλαμβάνουν τη διαδικασία συλλογής των δεδομένων, τη συνοπτική και αποτελεσματική παρουσίαση τους και τη στατιστική ανάλυση τους, με στόχο την ερμηνεία και την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι στατιστικές μέθοδοι ταξινομούνται σε τρεις κλάδους:

1. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments - DoE), με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδων για τη συλλογή δεδομένων μέσω της εκτέλεσης πειραμάτων.
2. Περιγραφική στατιστική (Descriptive Statistics), με στόχο την ανάπτυξη μεθόδων για την παρουσίαση συνοπτικών στοιχείων και γραφημάτων για την αποτελεσματική περιγραφή των δεδομένων
3. Στατιστική συμπερασματολογία (Statistical Interference), η οποία και ασχολείται με την ανάπτυξη μεθόδων για την ανάλυση των δεδομένων και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον πληθυσμό από τον οποίο προέρχονται.

1.2 Πειραματικός Σχεδιασμός- Design of Experiment (DoE)

Ο στόχος ενός πειράματος είναι να μελετήσει την επίδοση μιας διαδικασίας ή ενός συστήματος, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.3. Πρόκειται για ένα συνδυασμό μεθόδων, ανθρώπινου δυναμικού, μηχανημάτων και άλλων πηγών που μετατρέπουν την εισροή (input) (ένα υλικό συνήθως) σε εκροή (output) που χαρακτηρίζεται από μια ή περισσότερες παρατηρήσιμες μεταβλητές απόκρισης (response variables). Κάποιες από τις μεταβλητές της διαδικασίας και τις ιδιότητες του υλικού $x_1, x_2, \dots, x_p$ είναι ελεγχόμενες (controllable), ενώ άλλες μεταβλητές $z_1, z_2, \dots, z_q$ είναι μη ελεγχόμενες (uncontrollable), οι οποίες και αποτελούν συχνά αιτία για μεταβλητότητα στις αποκρίσεις. Οι μεταβλητές μπορεί να είναι αριθμητικές - ποσοτικές (numerical-quantitative) ή κατηγορικές - ποιοτικές (categorical - qualitative). Κατά τη διεξαγωγή ενός πειράματος καθίσταται εφικτή η εύρεση των μεταβλητών που επηρεάζουν περισσότερο την απόκριση y , καθώς και τις βέλτιστες τιμές x , έτσι ώστε η y να προσεγγίζει τη βέλτιστη ονομαστική τιμή (nominal value), η μεταβλητότητα της y να είναι μικρή και να επιτευχθεί ελαχιστοποίηση της επίδρασης των μη ελεγχόμενων μεταβλητών^[2].



Σχήμα 1.3: Γενικό μοντέλο διαδικασίας ή συστήματος

Σε αντίθεση με τα φυσικά φαινόμενα που εξελίσσονται χωρίς την παρέμβαση του παρατηρητή, σε ένα πείραμα ο ερευνητής μπορεί να διαμορφώσει την πειραματική διαδικασία, μεταβάλλοντας τις μεταβλητές, διευκολύνοντας την εξαγωγή των συμπερασμάτων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει τεχνικές που συντελούν στην πραγματοποίηση ενός κατάλληλα επιλεγμένου αριθμού και συνδυασμού πειραμάτων, για τη διεξαγωγή ασφαλών στατιστικών συμπερασμάτων, που απώτερο στόχο έχουν τη βελτιστοποίηση (optimization) της υπό μελέτη διεργασίας^[1]. Με τον όρο βελτιστοποίηση της μεθόδου ορίζεται η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών και επιπέδων των πειραματικών παραγόντων στην απόδοση μιας διαδικασίας (ενός συστήματος ή ενός προϊόντος), με σκοπό να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη απόκριση, ποιότητα και λειτουργία^[3]. Ο όρος πειραματικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται επίσης για να περιγράψει τα εξής στάδια^[4]:

1. Προσδιορισμός των παραγόντων (factors) που μπορεί να επηρεάσουν ένα πείραμα.
2. Σχεδιασμός του πειράματος έτσι ώστε η επίδραση των μη-ελεγχόμενων παραγόντων (uncontrolled factors) να περιορίζεται στο ελάχιστο.
3. Χρήσης της στατιστικής ανάλυσης για να διαχωρίσει και να αξιολογήσει τις επιδράσεις (effects) των διαφόρων παραγόντων

1.3 Βασικές αρχές πειραματικού σχεδιασμού

Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να εφαρμόζονται τρεις βασικές αρχές που διέπουν τον πειραματικό σχεδιασμό^{[2] [3][4]} :

1. Επανάληψη (Replication). Αφορά έναν ανεξάρτητο αριθμό επαναλήψεων πειραμάτων κάθε συνδυασμού μεταβλητών, εξασφαλίζοντας την εγκυρότητα και την ορθότητα των μετρήσεων, αλλά και την εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος.
2. Λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων (Randomization). Πρόκειται για τον προσδιορισμό τόσο της τυχαίας κατανομής του πειραματικού υλικού όσο και την τυχαιότητα στη σειρά των πειραμάτων, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα συστηματικά σφάλματα και να επιτευχθεί η έγκυρη ερμηνεία της απόκρισης
3. Πειράματα σε μπλοκ (Blocking). Αποτελεί μια τεχνική σχεδιασμού με στόχο να βελτιώσει την ακρίβεια των πειραμάτων, δημιουργώντας ομάδες με ομοειδή δεδομένα (blocks). Αυτό συμβαίνει όταν οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν μπορούν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (π.χ. μέρα ή παρτίδα πρώτης

ύλης), έτσι αναπτύσσεται το πλήρες τυχαιοποιημένο σχέδιο σε μπλοκ (randomized block design).

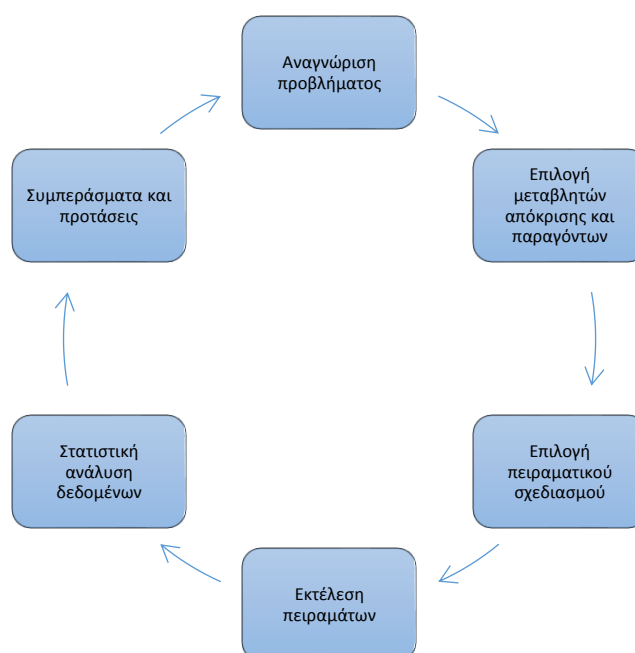
Ο πειραματικός σχεδιασμός και η βελτιστοποίηση βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε διάφορα προβλήματα που προκύπτουν στην ανάπτυξη, στην έρευνα και στην παραγωγή διαφόρων επιστημονικών τομέων^[5].

1.4 Στάδια πειραματικού σχεδιασμού

Τα στάδια που ακολουθούνται, συνήθως, κατά την εφαρμογή ενός πειραματικού σχεδιασμού, όπως απεικονίζονται και στο Σχήμα 1.4 είναι^[2]:

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1. Αναγνώριση και διατύπωση του προβλήματος | } Προ-πειραματικός
σχεδιασμός |
| 2. Επιλογή των μεταβλητών απόκρισης* | |
| 3. Επιλογή των παραγόντων, επιπέδων και εύρους* | |
| 4. Επιλογή τύπου πειραματικού σχεδιασμού | |
| 5. Εκτέλεση των πειραμάτων | |
| 6. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων | |
| 7. Συμπεράσματα και προτάσεις | |

* Στην πράξη πολλές φορές τα βήματα 2 και 3 πραγματοποιούνται ταυτόχρονα ή με αντίστροφη σειρά



Σχήμα 1.4: Στάδια εφαρμογής πειραματικού σχεδιασμού

1.4.1.Αναγνώριση και καθορισμός του προβλήματος

Αν και ίσως θεωρείται πολλές φορές απλό ή ακόμα και ασήμαντο, εντούτοις η αναγνώριση του προβλήματος αλλά και των στόχων του πειράματος, αποτελεί απαραίτητο και κρίσιμο στάδιο, πριν την έναρξη οποιαδήποτε πειραματικού σχεδιασμού. Είναι σημαντικό για την επιτυχή εφαρμογή ενός πειραματικού σχεδιασμού να καθοριστεί με

σαφήνεια το πρόβλημα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η καλύτερη κατανόηση του ως προς μελέτη φαινομένου αλλά και των τελικών λύσεων στο πρόβλημα. Η ανάλυση του προβλήματος μπορεί να γίνει με την εύρεση απαντήσεων στα εξής ερωτήματα: Τι είναι γνωστό; Τι είναι άγνωστο; και τι πρέπει να διερευνηθεί;^[5]

Κάποιοι από τους στόχους του πειράματος μπορεί να είναι:

Α. Εξέταση ή χαρακτηρισμός παραγόντων (factors screening or characterization), κυρίως σε νέα συστήματα ή τεχνολογίες, με στόχο την εύρεση των παραμέτρων με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση ενδιαφέροντος.

Β. Βελτιστοποίηση (Optimization), που αποτελεί συνήθως τη συνέχεια του προηγούμενου στόχου και αποσκοπεί στην εύρεση των επιπέδων ή των ρυθμίσεων των σημαντικών παραμέτρων που θα οδηγήσουν στην επιθυμητή τιμή της απόκρισης.

Γ. Επιβεβαίωση (Confirmation) για το αν το σύστημα «συμπεριφέρεται» με βάση κάποια υπάρχουσα θεωρία ή δεδομένα από παλιά πειράματα.

Δ. Ανακάλυψη (Discovery) νέων υλικών, νέων παραγόντων ή νέου εύρους στους κρίσιμους παράγοντες.

Ε. Ανθεκτικότητα (Robustness), αποσκοπώντας στη διερεύνηση των συνθηκών που οδηγούν σε μειωμένη απόκριση ή σε μη αποδεκτή μεταβλητότητα των παραγόντων απόκρισης.

1.4.2. Επιλογή των μεταβλητών απόκρισης

Η επιλογή μιας ή περισσότερων μεταβλητών απόκρισης θα πρέπει να βασιστεί στο αν προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διαδικασία που πρόκειται να μελετηθεί. Σημαντικοί παράγοντες στο στάδιο αυτό αποτελούν η δυνατότητα μέτρησης της απόκρισης, ο καθορισμός του τρόπου υπολογισμού της κάθε απόκρισης καθώς και θέματα όπως η διακρίβωση (calibration) και η ικανότητα μέτρησης (measurement capability) του συστήματος μέτρησης.

1.4.3.Επιλογή των παραγόντων, επιπέδων και εύρους

Κάθε σύστημα επηρεάζεται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων εκ των οποίων επιλέγεται ένας συγκεκριμένος αριθμός παραγόντων σχεδιασμού (design factors), οι οποίοι και θα μεταβάλλονται στο πείραμα. Η επιλογή τους γίνεται με βάση το μέγεθος της επίδρασης στη μεταβλητή απόκρισης. Να σημειωθεί ότι υπάρχουν μεταβλητές που ενώ ασκούν μεγάλη επίδραση δεν θεωρούνται παράγοντες σχεδιασμού, καθώς δεν ενδιαφέρουν το συγκεκριμένο πείραμα και διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Όσον αφορά το εύρος κάθε παράγοντα, αυτός θα καθοριστεί με βάση την πρακτική εμπειρία και τις θεωρητικές γνώσεις. Τέλος, το διάγραμμα αιτίου και αποτελέσματος (cause and effect diagram, fishbone diagram) μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την οργάνωση των παραγόντων και γενικά πληροφοριών κατά τον προ-πειραματικό σχεδιασμό.

1.4.4.Επιλογή τύπου πειραματικού σχεδιασμού

Για την επιλογή του κατάλληλου τύπου πειραματικού σχεδιασμού πρέπει να ληφθούν υπόψιν παράγοντες όπως: α) ο τύπος του προβλήματος και οι γνωστές πληροφορίες, β) ο αριθμός των παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων που πρέπει να μελετηθούν, γ) η στατιστική εγκυρότητα και αποτελεσματικότητα κάθε σχεδιασμού, δ) χρονικοί, οικονομικοί και υλικοί περιορισμοί και ε) η ευκολία στην κατανόηση και εφαρμογή κάθε τύπου^[6].

Η επιλογή του τύπου πειραματικού σχεδιασμού περιλαμβάνει και την επιλογή ενός εμπειρικού μοντέλου (empirical model) που θα περιγράψει το αποτέλεσμα. Πρόκειται ουσιαστικά για μια ποσοτική σχέση με τη μορφή πολυωνυμικής εξίσωσης, της μορφής $y=f(x)$, που αποδίδει τη σχέση μεταξύ της απόκρισης και των σημαντικών παραγόντων σχεδιασμού. Το πιο απλό πολυωνυμικό μοντέλο είναι το πρώτης-τάξης (first-order model) που περιλαμβάνει τη γραμμική σχέση μεταξύ των παραγόντων σχεδιασμού και της απόκρισης. Ένα μοντέλο πρώτης τάξης με δυο μεταβλητές x_1 και x_2 έχει την εξής μορφή:

$$y = \theta_0 + \theta_1 x_1 + \theta_2 x_2 + \varepsilon$$

όπου y είναι η απόκριση, x_1 και x_2 οι παράγοντες σχεδιασμού, τα θ_0 , θ_1 και θ_2 οι συντελεστές που θα υπολογισθούν από τα δεδομένα του πειράματος και ε το τυχαίο σφάλμα ή υπόλοιπο (residual). Αρκετές φορές τα μοντέλα πρώτης-τάξης ονομάζονται και μοντέλα κυρίων επιδράσεων (main effects models). Το επόμενο επίπεδο πολυωνυμικού μοντέλου ονομάζεται δεύτερης-τάξης (second-order) και περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων. Ένα πολυωνυμικό μοντέλο δεύτερης τάξης με δυο μεταβλητές x_1 και x_2 έχει τη μορφή:

$$y = \theta_0 + \theta_1 x_1 + \theta_2 x_2 + \theta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon$$

όπου ο όρος $x_1 x_2$ εκφράζει την αλληλεπίδραση των δυο παραγόντων σχεδιασμού (two-factor interaction). Τα παραπάνω μοντέλα χρησιμοποιούνται για να διερευνήσουν πειραματικά συστήματα, όπως στην περίπτωση πειραματικών αξιολογήσεων (screening studies), δοκιμασιών ανθεκτικότητας (robustness tests) και πειραμάτων βελτιστοποίησης.

Ένα ακόμα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο είναι με τη συμμετοχή παραγόντων δευτέρου βαθμού, με την εξής μορφή:

$$y = \theta_0 + \theta_1 x_1 + \theta_2 x_2 + \theta_{12} x_1 x_2 + \theta_{11} x_1^2 + \theta_{22} x_2^2 + \varepsilon$$

Η χρήση αυτής της μορφής μοντέλου καθιστά δυνατή την εύρεση βέλτιστου σημείου (optimum), δηλαδή ενός μεγίστου ή ελαχίστου (maximum or minimum), μέσω του προσδιορισμού μη γραμμικών σχέσεων μεταξύ παραγόντων και αποκρίσεων^[5].

1.4.5.Εκτέλεση των πειραμάτων

Στο στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό να τηρηθεί αυστηρά το πρόγραμμα εκτέλεσης των πειραμάτων, κάτι κρίσιμο για τη διασφάλιση της πειραματικής εγκυρότητας. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει, επίσης, να δοθεί στον ορισμό των σωστών επιπέδων των διαφόρων παραμέτρων. Τέλος, συνιστάται να προηγηθεί η διεξαγωγή κάποιων προκαταρκτικών πειραμάτων, τα οποία θα παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη σταθερότητα του

πειραματικού υλικού, το σύστημα μέτρησης και το πειραματικό σφάλμα (experimental error) καθώς και για την επιβεβαίωση της σωστής πειραματικής τεχνικής.

1.4.6. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων και πακέτων λογισμικού (software packages) αποτελεί σημαντική αρωγή στην αξιοπιστία και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Ουσιαστικά επιτρέπουν τον υπολογισμό της πιθανότητας σφάλματος σε ένα αποτέλεσμα ή του επιπέδου εμπιστοσύνης μια δήλωσης, δίνοντας αντικειμενικό χαρακτήρα στη διαδικασία λήψης αποφάσεων. Τεχνικές ανάλυσης όπως οι γραφικές μέθοδοι (graphical methods), εμπειρικά μοντέλα (empirical model), ανάλυση υπολοίπων (residual analysis) και μοντέλα ελέγχου επάρκειας (model adequacy checking) βρίσκουν εφαρμογή στο στάδιο αυτό.

1.4.7. Συμπεράσματα και προτάσεις

Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την εξαγωγή πρακτικών συμπερασμάτων καθώς και τη διατύπωση μιας προτεινόμενης πορείας δράσης. Επιβεβαιωτικά και επαναληπτικά πειράματα συνιστώνται για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων του πειράματος.

1.5 Είδη πειραματικού σχεδιασμού

Η επιλογή ενός πειραματικού σχεδιασμού βασίζεται στους στόχους που επιδιώκονται και τον αριθμό των υπό έλεγχο παραγόντων. Μερικοί από τους κυριότερους πειραματικούς σχεδιασμούς είναι^[3]:

- ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (full factorial design)
- ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (fractional factorial design)
- ο σχεδιασμός Plackett- Burman
- τα Λατινικά και Έλληνο- Λατινικά τετράγωνα (Latin – Latin/Greeksquares)
- οι σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης (response surface design)
 - i. Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (central composite design)
 - ii. Σχεδιασμός Box- Behnken
- Οι ειδικοί σχεδιασμοί
 - I. D- optimal design
 - II. Μικτοί σχεδιασμοί
- οι πλήρως ένθετοι/ιεραρχικοί σχεδιασμοί (fully nested/ hierarchical designs)

1.5.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός

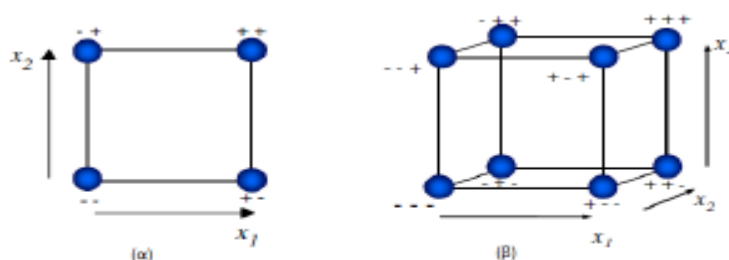
Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός συμβολίζεται με s^k , όπου s ο αριθμός των επιπέδων και k ο αριθμός των παραγόντων, που μελετώνται σε s^k αριθμό πειραμάτων. Με έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό διερευνώνται σε κάθε πλήρη επανάληψη του πειράματος όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των επιπέδων των παραγόντων. Στην περίπτωση που $s = 2$ (2^k παραγοντικός σχεδιασμός), τα δύο επίπεδα αναφέρονται σαν χαμηλό και υψηλό και συμβολίζονται με $-$ ή -1 και $+$ ή $+1$, αντίστοιχα.

Η πιο απλή περίπτωση παραγοντικού σχεδιασμού είναι όταν $s=k=2$, δηλαδή ένας σχεδιασμός 2^2 . Στην περίπτωση αυτού του σχεδιασμού δύο επιπέδων (two-level factorial

design), υπάρχουν 4 πιθανοί συνδυασμοί χαμηλών και υψηλών επιπέδων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 1.1, ενώ η γραφική αναπαράσταση του στο χώρο είναι τετράγωνο (Σχήμα 1.5α). Όμοια, στην περίπτωση μελέτης τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα, προκύπτει ένας 2^3 παραγοντικός σχεδιασμός ($2^3 = 8$ πειράματα) (Πίνακας 1.1) που στο χώρο απεικονίζεται με κύβο (Σχήμα 1.5β), ενώ στην περίπτωση 4 παραγόντων σε δύο επίπεδα διεξάγονται 2^4 πειράματα (Πίνακας 1.1) κ.ο.κ. Η αλλαγή του επιπέδου σε κάθε πείραμα, βασίζεται στις δυνάμεις του 2. Συγκεκριμένα το επίπεδο του πρώτου παράγοντα αλλάζει από σειρά σε σειρά (2^0), του δεύτερου σε κάθε δεύτερη σειρά (2^1), ενώ του τρίτου κάθε τέταρτη σειρά (2^2). Πολλές φορές ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφοδιάζεται με ένα κεντρικό σημείο (zero-level), όπου όλες οι μεταβλητές τίθενται στη μεσαία τους τιμή, παρέχοντας έναν καλό τρόπο προσέγγισης της καμπυλότητας^{[3][7][8]} και εκτίμησης της επαναληψιμότητας και του θορύβου του πειράματος.

Πίνακας 1.1: Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός

Δυο Παράγοντες			Τρεις παράγοντες				Τέσσερις Παράγοντες				
Αριθμός πειράματος	Παράγοντες		Αριθμός πειράματος	Παράγοντες			Αριθμός πειράματος	Παράγοντες			
	x_1	x_2		x_1	x_2	x_3		x_1	x_2	x_3	x_4
1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-	2	+	-	-	-
3	-	+	3	-	+	-	3	-	+	-	-
4	+	+	4	+	+	-	4	+	+	-	-
			5	-	-	+	5	-	-	+	-
			6	+	-	+	6	+	-	+	-
			7	-	+	+	7	-	+	+	-
			8	+	+	+	8	+	+	+	-
							9	-	-	-	+
							10	+	-	-	+
							11	-	+	-	+
							12	+	+	-	+
							13	-	-	+	+
							14	+	-	+	+
							15	-	+	+	+
							16	+	+	+	+



Σχήμα 1.5: Πλήρες παραγοντικό σχέδιο (α) δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα και (β) τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα^[5]

Ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός μπορεί να απεικονιστεί και με τη μορφή ενός πιο εκτεταμένου πίνακα, όπου θα απεικονίζονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κύριων παραγόντων. Το πρόσημο της κάθε αλληλεπίδρασης προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των πρόσημων των κύριων παραγόντων που αλληλοεπιδρούν. Για παράδειγμα: $(+)(+) = +$, $(-)(-) = +$, $(+)(-) = -$, κ.ο.κ. (Πίνακας 1.2 & 1.3)^[9].

Πίνακας 1.2: Πλήρης πίνακας 2^2 παραγοντικού σχεδιασμού

Αριθμός πειράματος	I	X ₁	X ₂	X ₁ X ₂
1	+	-	-	+
2	+	+	-	-
3	+	-	+	-
4	+	+	+	+

Πίνακας 1.3: Πλήρης πίνακας ενός 2^3 παραγοντικού σχεδιασμού

Αριθμός πειράματος	Παράγοντες				Αλληλεπιδράσεις			
	I	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	+	-	-	+
6	+	+	-	+	-	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+

Όσον αφορά τη στήλη I στους παραπάνω πίνακες, η οποία έχει πάντα θετικό πρόσημο (+), αποτελεί τη στήλη ταυτότητας και πολλαπλασιασμός οποιασδήποτε στήλης με τη στήλη I, αφήνει την πολλαπλασιαζόμενη στήλη αμετάβλητη.

1.5.2 Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός

Είναι προφανές ότι όσο μεγαλώνει ο αριθμός των παραγόντων του πειράματος, τόσο αυξάνεται ο αριθμός των πειραμάτων. Αυτό καθιστά αδύνατη πολλές φορές την εφαρμογή

του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού, λόγω έλλειψης χρόνου, περιορισμένων πηγών και απαγορευτικού κόστους. Για παράδειγμα, ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων με 7 παράγοντες απαιτεί 128 πειραματικές διαδικασίες αναλύσεις. Ο σχεδιασμός αυτός θα επιτρέψει την εκτίμηση της μέσης απόκρισης, από 7 κύριες επιδράσεις, 21 αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων, 35 αλληλεπιδράσεων τριών παραγόντων, 35 αλληλεπιδράσεις τεσσάρων παραγόντων, 21 αλληλεπιδράσεων 5 παραγόντων, 7 αλληλεπιδράσεων έξι παραγόντων και 1 αλληλεπίδρασης επτά παραγόντων^[9].

Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι δυνατό να εφαρμοσθεί ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, βασισμένος στην υπόθεση, ότι κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις υψηλής τάξης είναι αμελητέες, χωρίς σημαντικό σφάλμα. Σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τις κύριες επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις χαμηλής τάξης, εκτελώντας μόνο ένα κλάσμα του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού^[10]. Ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δυο-επιπέδων μπορεί να αναγραφεί με τη μορφή 2^{k-p} , όπου k ο αριθμός των παραγόντων και το κλάσμα του 2^k πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού που θα εκτελεστεί είναι ίσο με $(1/2)^p$. Συνήθως χρησιμοποιείται το ένα-δεύτερο κλάσμα ($1/2$, $p=1$) του παραγοντικού σχεδιασμού^[7].

Ο τρόπος κατασκευής ενός κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού βασίζεται στους πίνακες με τις ορθογώνιες στήλες μεταβλητών ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού, όπως αυτές φαίνονται στους Πίνακες 1.2 και 1.3. Συγκεκριμένα, ένας πίνακας ενός 2^2 παραγοντικού σχεδιασμού αποτελείται από τρεις στήλες μεταβλητών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μεταβλητότητα τριών μεταβλητών σε έναν κλασματικό σχεδιασμό με 4 πειραματικές διαδικασίες ανάλυσης. Ο πίνακας ενός 2^3 παραγοντικού σχεδιασμού με 7 στήλες μεταβλητών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της μεταβλητότητας μέχρι και μεταξύ 7 παραγόντων με 8 πειραματικές διαδικασίες ανάλυσης (Πίνακας 1.4). Παρατηρούμε ότι οι μεταβλητές x_4 - x_7 ορίζονται από τις στήλες των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών 1, 2 και 3^[9].

Πίνακας 1.4: Απεικόνιση ενός 2^{7-4} κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού

Αριθμός		x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7
πειράματος	I	1	2	3	12	13	23	123
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	+	-	-	+
6	+	+	-	+	-	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+

Συνοψίζοντας, για τον σχεδιασμό ενός κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού k παραγόντων, χρησιμοποιείται ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός 2^q με αριθμό πειραματικών διαδικασιών, $N > q$. Ο πίνακας του σχεδιασμού θα περιλαμβάνει 2^{q-1} στήλες μεταβλητών, εκ των οποίων οι στήλες αλληλεπιδράσεων των παραγόντων θα χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό των επιπλέον μεταβλητών^[9].

Το κριτήριο της διακριτικής ικανότητας ή ευκρίνειας (R , resolution) είναι από τα βασικότερα κριτήρια για την επιλογή του καταλληλότερου κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού. Ένας σχεδιασμός είναι διακριτικής ικανότητας R , αν καμία επίδραση p παραγόντων δεν είναι ταυτόσημη με άλλη επίδραση που περιέχει λιγότερους από $R-p$ παράγοντες. Για τη διακριτική ικανότητα χρησιμοποιείται σαν υποσημείωση ο συμβολισμός της Ρωμαϊκής αρίθμησης. Οι σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III, IV και V ορίζονται ως εξής^[5]:

- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια επίδραση, αλλά οι κύριες επιδράσεις είναι ταυτόσημες με αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων και οι αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων ενδεχομένως να είναι μεταξύ τους ταυτόσημες.
- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας IV. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια επίδραση, ή με οποιαδήποτε αλληλεπίδραση δυο παραγόντων, αλλά αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων είναι ταυτόσημες με άλλες αλληλεπιδράσεις δυο ή περισσότερων παραγόντων.
- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας V. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση δυο παραγόντων δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια αλληλεπίδραση, αλλά αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων είναι ταυτόσημες με αλληλεπιδράσεις τριών παραγόντων.

Ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται κυρίως σε πειράματα διαλογής-αξιολόγησης ή σάρωσης (screening experiments). Τα πειράματα αυτά εφαρμόζονται όταν υπεισέρχονται πολλοί παράγοντες σε ένα σύστημα, εκ των οποίων κάποιοι έχουν μικρή ή μηδενική επίδραση στην απόκριση. Συνήθως εφαρμόζονται στα αρχικά στάδια μιας έρευνας με στόχο την αναγνώριση (αν υπάρχουν) των παραγόντων με τη μεγαλύτερη επίδραση (σημαντικοί παράγοντες), οι οποίοι και ερευνώνται λεπτομερώς σε επόμενα πειράματα ^{[3][10]}.

1.5.3 Σχεδιασμός Plackett-Burman (PB)

Ο σχεδιασμός Plackett-Burman (PB) βρίσκει εφαρμογή σε πειράματα ανθεκτικότητας στην εύρεση των παραγόντων δηλαδή που η μεταβολή τους επηρεάζει την απόκριση, αλλά και σε πειράματα σάρωσης. Το κύριο χαρακτηριστικό του σχεδιασμού αυτού είναι ότι περιλαμβάνει $4n$ πειράματα, όπου $n=1,2,3,\dots$, ενώ σε κάθε περίπτωση ο αριθμός των παραγόντων που διερευνώνται δεν μπορεί να υπερβαίνει τους $4n-1$. Επομένως σε ένα σχεδιασμό PB με 8 πειράματα δεν μπορεί να διερευνήσει πάνω από 7 παράγοντες, ένας με 12 πάνω από 11, κ.ο.κ. Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτού του σχεδιασμού είναι η εισαγωγή εικονικών παραγόντων (dummy factors), οι οποίοι και επιτρέπουν την εκτίμηση του τυχαίου σφάλματος στις μετρήσεις. Να σημειωθεί ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των εικονικών παραγόντων επιτυγχάνεται καλύτερη εκτίμηση των τυχαίων σφαλμάτων. Ο κάθε παράγοντας στο

σχεδιασμό αυτόν μελετάται σε δυο επίπεδα, ένα υψηλό και ένα χαμηλό, που συμβολίζονται με «+» και «-» αντίστοιχα. Η μεταβολή των επιπέδων των παραγόντων από πείραμα σε πείραμα μεταβάλλεται με κυκλική σειρά και η αλληλουχία των επιπέδων κάθε παράγοντα είναι διαθέσιμη στη βιβλιογραφία και σε πακέτα λογισμικού.

Ένα παράδειγμα σχεδιασμού PB αποτελεί η περίπτωση που πρέπει να διερευνηθούν 4 παράγοντες, θα υλοποιηθούν 8 πειράματα (4x2) και ο σχεδιασμός θα περιλαμβάνει 7 παράγοντες A-G, εκ των οποίων οι 3 θα είναι εικονικοί. Στο πρώτο πείραμα τα επίπεδα των παραγόντων μπορεί να έχουν την εξής διάταξη:

A	B	C	D	E	F	G
+	-	-	+	-	+	+

Τα επίπεδα στο δεύτερο πείραμα, πάλι με τέσσερα + και τρία -, θα προκύψει μετατοπίζοντας το τελευταίο πρόσημο του προηγούμενου πειράματος στην αρχή του δεύτερου πειράματος (κυκλική μετατόπιση). Η διάταξη που θα προκύψει θα είναι η εξής:

A	B	C	D	E	F	G
+	+	-	-	+	-	+

Με την ίδια λογική θα διεξαχθούν τα πρώτα επτά πειράματα, ενώ στο όγδοο πείραμα όλοι οι παράγοντες θα τεθούν στο χαμηλό επίπεδο τους (-). Έτσι θα προκύψει ένα σχεδιασμός με 28 + και 28 - και ο κάθε παράγοντας θα έχει μελετηθεί 4 φορές στο υψηλό επίπεδο και 4 φορές στο χαμηλό. Η επίδραση του κάθε παράγοντα θα καθοριστεί από την εξίσωση:

$$2 [\sum(y+) - \sum(y-)]/N$$

όπου N ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων και (y+), (y-) οι αποκρίσεις όταν ο παράγοντας τίθεται σε υψηλό και χαμηλό επίπεδο αντίστοιχα. Με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) μπορεί να εκτιμηθεί η σημαντικότητα του κάθε παράγοντα. Για κάθε παράγοντα το άθροισμα των τετραγώνων (sum of squares-SS) στον σχεδιασμό δυο παραγόντων δίνεται από την εξίσωση:

$$SS = N \times (\text{εκτιμώμενη επίδραση})^2/4$$

Υπολογίζοντας το άθροισμα τετραγώνων για κάθε παράγοντα (βαθμός ελευθερίας 1) και το μέσο όρο του αθροίσματος τετραγώνων των εικονικών παραγόντων, με βαθμό ελευθερίας ίσο με το άθροισμα των εικονικών παραγόντων μειωμένο κατά 1, εφαρμόζεται δοκιμασία F ενός άκρου (one-tailed) σε επίπεδο εμπιστοσύνης $p=0,05$. Αν η υπολογιζόμενη πειραματική τιμή F ($F_{\text{experimental}}$) είναι μεγαλύτερη της θεωρητικής τιμής F (F_{critical}) τότε ο παράγοντας κρίνεται σημαντικός.

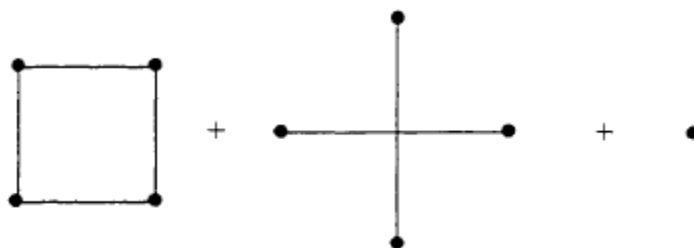
Ο τύπος αυτός πειραματικού σχεδιασμού έχει βρει εφαρμογή σε πολλές χημικές, βιοχημικές, συνθετικές και αναλυτικές μελέτες. Παρά την εφαρμογή αυτής της μορφής

πειραματικού σχεδιασμού σε πλήθος μελετών, θα πρέπει να επισημανθεί μια αδυναμία του. Ο σχεδιασμός PB είναι αποτελεσματικός σε πειράματα διαλογής-αξιολόγησης για την εύρεση σημαντικών για την απόκριση παραμέτρων, που η αλληλεπίδραση τους δεν είναι σημαντική. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων δεν μπορούν να προσδιοριστούν με την εφαρμογή του, που όμως πολλές φορές μπορεί να είναι σημαντικές, δίνοντας ψευδή και παραπλανητικά αποτελέσματα^[11].

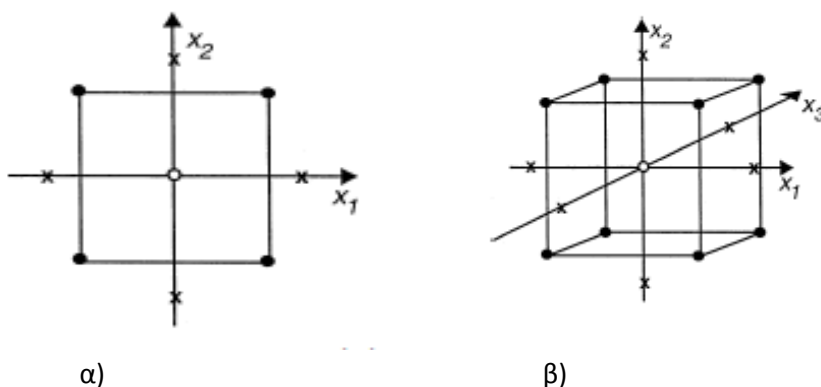
1.5.4 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD)

Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη^{[3][10][12]}:

- Έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό ή έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό αναλυτικής τάξης V , όπου τα επίπεδα των παραγόντων είναι κωδικοποιημένα στις τιμές $-1, +1$. Αυτό λέγεται παραγοντικό τμήμα (factorial portion) του σχεδιασμού.
- Έναν πρόσθετο σχεδιασμό, όπου τα σημεία προκύπτουν από τα πειράματα που βρίσκονται σε απόσταση α από το κέντρο τους (αξονικά σημεία). Αυτό λέγεται αξονικό τμήμα του σχεδιασμού.
- Ένα κεντρικό σημείο (central point) (Σχήματα 1.6 & 1.7).



Σχήμα 1.6: Δυο-επιπέδων κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός. Αποτελείται από ένα 2^2 παραγοντικό σχεδιασμό, ένα αξονικό τμήμα και ένα κεντρικό σημείο.



Σχήμα 1.7: Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός α) για δυο παράγοντες και β) τρεις παράγοντες, όπου τα διαφορετικά σημάδια συμβολίζουν: (•) παραγοντικό σχεδιασμό, (ο) το κεντρικό σημείο και (x) τα αξονικά σημεία^[5].

Ο αριθμός πειραμάτων που απαιτούνται σε ένα CCD δίνεται από τη σχέση:

$$N = 2^k + 2k + C_p,$$

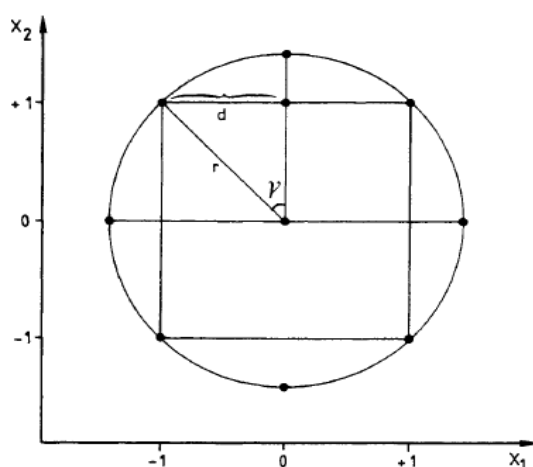
όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_p ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου. Ο κάθε παράγοντας μελετάται σε πέντε επίπεδα ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) ή σπάνια σε τρία (όταν το $\alpha=1$)^{[3][12]}.

1.5.4.1 Είδη CCD

Ο CCD διακρίνεται σε τρία είδη (Σχήμα 1.11)^{[3][12][13]}:

A. Στον περιγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Circumscribed design – CCC)

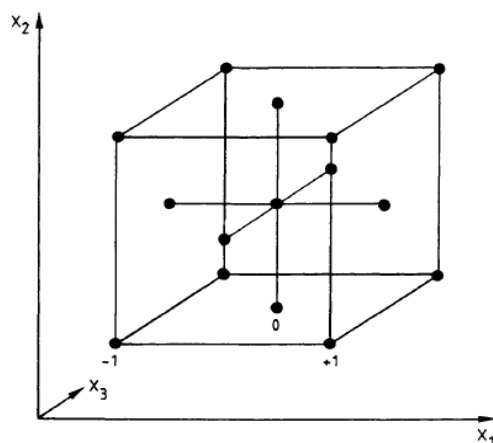
Ο σχεδιασμός αυτός αποτελεί την κλασική μορφή των κεντρικών σύνθετων σχεδιασμών. Συγκεκριμένα στο σχεδιασμό αυτό, τα αξονικά σημεία ανήκουν σε ένα κύκλο περιγεγραμμένο στο τετράγωνο του σχεδιαστικού χώρου. Τα αξονικά σημεία (axial ή star points) ισαπέχουν σε απόσταση $\pm\alpha$ από το κέντρο του σχεδιασμού, με $|\alpha| > 1$, καθιστώντας έτσι τους σχεδιασμούς αυτού του είδους περιστροφικούς. Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 1.8, όλα τα σημεία είναι τοποθετημένα σε ένα κύκλο, με $\alpha=r$ και $d=\pm 1$. Η απόσταση των αξονικών σημείων εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των παραγόντων όσο και τις επιθυμητές ιδιότητες του σχεδιασμού. Κριτήριο για την επιλογή της τιμής του α αποτελεί η περιστροφικότητα (rotatability) ενώ οι τιμές του κυμαίνονται από 1 έως $k^{1/2}$.



Σχήμα 1.8: Περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός. Όλα τα σημεία, εκτός από το κεντρικό, είναι τοποθετημένα σε κύκλο ακτίνας r

B. Στον εδροκεντρωμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Face Centred Central composite design- FCC)

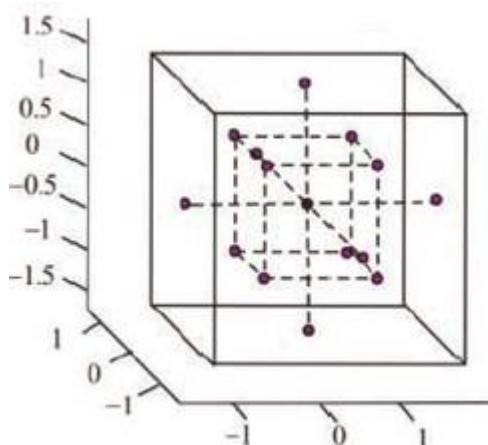
Στην περίπτωση του FCC σχεδιασμού τα αξονικά σημεία είναι στο κέντρο κάθε πλευράς του παραγοντικού χώρου, δηλαδή το $\alpha=\pm 1$. Για τη διεξαγωγή τους απαιτούνται τρία επίπεδα από κάθε παράγοντα (δυο παραγοντικά- ένα υψηλό και ένα χαμηλό- καθώς και ένα αξονικό που συμπίπτει με το κεντρικό). Οι σχεδιασμοί αυτοί δεν είναι περιστροφικοί και η διακριτική τους ικανότητα είναι τύπου V (Σχήμα 1.9).



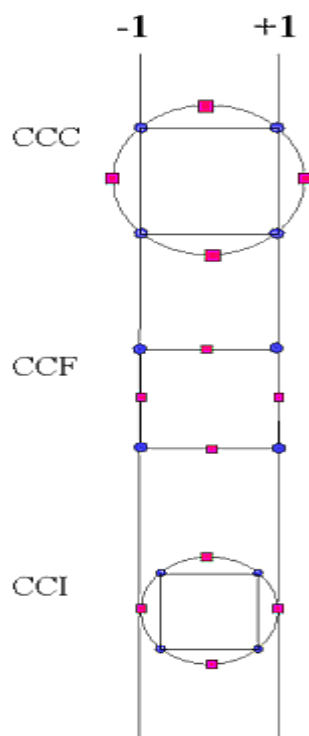
Σχήμα 1.9: Εδρωκεντρωμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός

Γ. Στον εγγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Inscribed – CCI)

Στις περιπτώσεις όπου η υπέρβαση των επιβαλλομένων από τους ερευνητές επιπέδων (± 1) των παραγόντων είναι αδύνατη, εφαρμόζεται ο CCI σχεδιασμός. Σ' αυτές τις περιπτώσεις τα όρια των παραγόντων γίνονται πιο στενά και τα αξονικά σημεία παίρνουν τις τιμές ± 1 (Σχήμα 1.10). Για τη διεξαγωγή τους απαιτούνται 5 επίπεδα από κάθε παράγοντα (2 παραγοντικά - ένα υψηλό και ένα χαμηλό -, δύο αξονικά και ένα κεντρικό. Όπως και στην περίπτωση του CCC σχεδιασμού, ο CCI είναι περιστροφικός σχεδιασμός. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.11 ο σχεδιασμός CCI καλύπτει τον μικρότερο πειραματικό χώρο σε σχέση με τον CCC που καλύπτει το μεγαλύτερο χώρο.



Σχήμα 1.10: Εγγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός



Σχήμα 1.11 : Σύγκριση των τριών ειδών σχεδιασμού κεντρικής σύνθεσης για δύο παράγοντες

1.5.5 Σχεδιασμός Box-Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD) αποτελεί μια αποτελεσματική επιλογή στη μεθοδολογία απόκρισης επιφανειών και μια ιδανική εναλλακτική του CCD. Διερευνά τρία επίπεδα ανά παράγοντα, αλλά αποφεύγει τις γωνίες του χώρου και περιλαμβάνει τους συνδυασμούς κεντρικών και ακραίων επιπέδων. Ο BBD συνδυάζει έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό με μη πλήρεις σχεδιασμούς κατά μπλοκ, με τέτοιον τρόπο ώστε να προκύπτουν σχεδιασμοί περιστρεψίμοι ή σχεδόν περιστρεψίμοι. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας BBD με τρεις παράγοντες, όπου διαμορφώνεται σε 3 μπλοκ, σε καθένα από τον οποίο δύο μεταβλητές συνδυάζονται ακολουθώντας ένα 2^2 παραγοντικό σχεδιασμό και η τρίτη μεταβλητή παραμένει στο επίπεδο μηδέν, ενώ προστίθενται 3 κεντρικά σημεία (Πίνακας 1.5). Γενικά οι BBD με k αριθμό παραγόντων συνίστανται από $k(k-1)/2$ παραγοντικούς σχεδιασμούς 2^2 , παίρνοντας κάθε ζευγάρι παραγόντων στη σειρά και διατηρώντας του υπόλοιπους στο επίπεδο μηδέν.

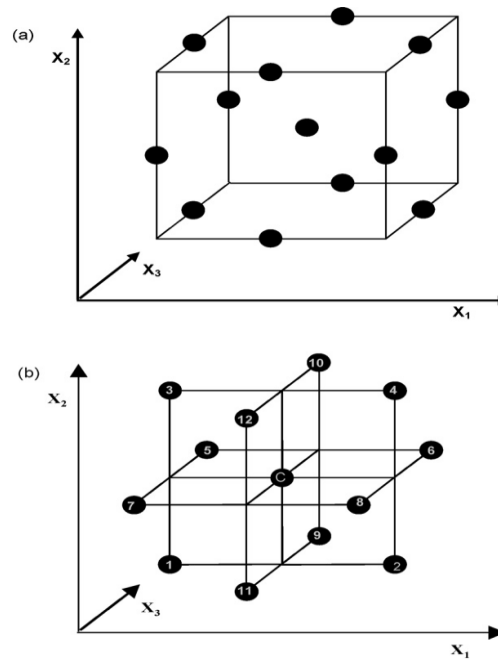
Πίνακας 1.5: BBD με 3 παράγοντες^[2]

Run	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Η γραφική του απεικόνιση μπορεί να γίνει με δύο μορφές:

1. Ένα κύβο που αποτελείται από το κεντρικό σημείο και τα μεσαία σημεία των γωνιών (Σχήμα 1.12α)

2. Ένα σχήμα ενός συμπλεγμένου 2^2 παραγοντικού σχεδιασμού και ένα κεντρικό σημείο (Σχήμα 1.12β)



Σχήμα 1.12: Γραφική απεικόνιση BBD ως κύβο (a) και ως 2^2 παραγοντικός σχεδιασμός (b)

Ο αριθμός πειραμάτων (N) που απαιτεί ένας BBD δίνεται από την εξίσωση:

$$N = 2k(k-1) + C_0$$

Όπου k ο αριθμός των παραγόντων και C_0 ο αριθμός των κεντρικών σημείων

Να σημειωθεί ότι ο σχεδιασμός αυτός χαρακτηρίζεται από σφαιρική συμμετρία, με όλα τα σημεία του να βρίσκονται σε ακτίνα ίση με α , καθώς και ότι δεν υπάρχουν σημεία στις κορυφές του κύβου, που προκύπτουν από τα ανώτερα και ελάχιστα επίπεδα του κάθε παράγοντα. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα καθώς αποφεύγεται η διενέργεια πειραμάτων κάτω από ακραίες συνθήκες, από τα οποία πιθανόν να προκύψουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Αντιθέτως δεν ενδείκνυνται σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η γνώση των αποκρίσεων σε ακραίες τιμές, δηλαδή στις κορυφές του κύβου^{[2] [9][14] [15]}.

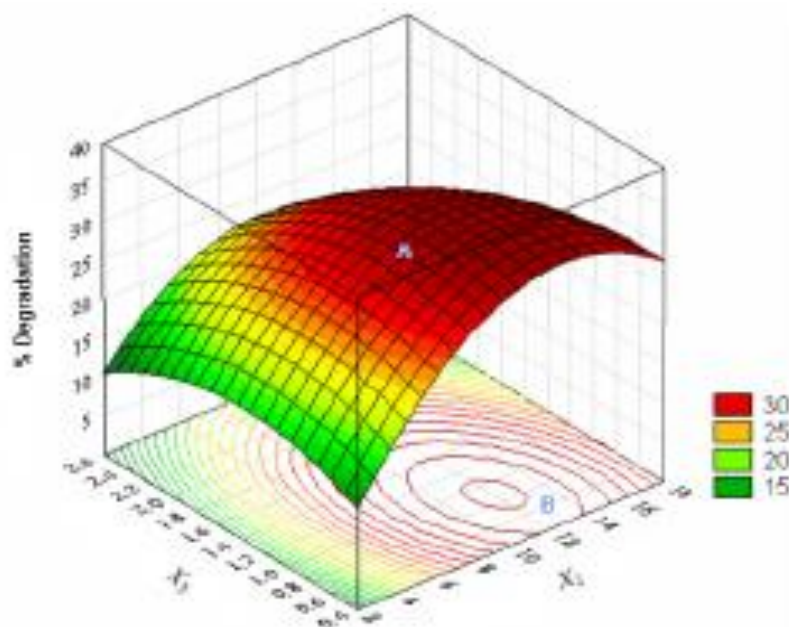
1.5.6 D-optimal σχεδιασμός

Ο σχεδιασμός D-optimal παρέχεται από έναν αλγόριθμο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε περιπτώσεις όπου δεν μπορούν να εφαρμοστούν οι κλασσικοί σχεδιασμοί. Το χαρακτηριστικό αυτού του σχεδιασμού είναι η μη-συμμετρία του και εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου:

1. Πλήρεις ή κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί απαιτούν πολλές διαδικασίες ανάλυσης (runs), τα οποία είναι αδύνατον να διεξαχθούν δεδομένου του περιορισμού σε χρόνο και πηγές.
2. Ο χώρος σχεδιασμού είναι περιορισμένος και κάποιοι από τους συνδυασμούς ακραίων επιπέδων των παραγόντων δεν μπορούν να εφαρμοσθούν. Για παράδειγμα, κατά την εφαρμογή ενός πειραματικού σχεδιασμού για τη μελέτη μια χημικής αντίδρασης, ο συνδυασμός υψηλής συγκέντρωσης αντιδραστήριου και υψηλής θερμοκρασίας οδηγεί σε έκρηξη.

1.6 Γραφική μέθοδος - Μεθοδολογία απόκρισης επιφανειών (Response Surface Methodology)

Η μεθοδολογία απόκρισης επιφανειών (RSM) αποτελείται από μια ομάδα μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη κατάλληλων λειτουργικών σχέσεων μεταξύ της απόκρισης ενδιαφέροντος, y , και του αριθμού των σημαντικών παραγόντων, $x_1, x_2, \dots, x_n$. Μαζί με τον DoE αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την ανάπτυξη, βελτίωση και βελτιστοποίηση διαδικασιών. Η RSM αποτελεί την τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση των αποκρίσεων συναρτήσεων των δυο ανεξάρτητων παραγόντων και μπορεί να περιγραφεί με τη χρήση ισομετρικών διαγραμμάτων. Ως ισομετρικό διάγραμμα (contour plot) ονομάζεται η γεωμετρική απεικόνιση μιας απεικόνισης, που προέρχεται από τη σχεδίαση της μεταβολής δύο μόνο παραγόντων, ενώ το μέγεθος της απόκρισης και οι μεταβολές των υπόλοιπων παραγόντων παραμένουν σταθερές. Τα ισομετρικά διαγράμματα αποτελούν τομές δυο διαστάσεων των αντιστοίχων επιφανειών απόκρισης. Παρακάτω παρουσιάζεται εάν τυπικό διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης και ισομετρικών καμπυλών (Σχήμα 1.13)^{[16][6][3]}.



Σχήμα 1.13: Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικές καμπύλες

1.7 Εφαρμογές πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανίχνευσης με φασματομετρία μαζών

Όπως προαναφέρθηκε ο DoE εφαρμόζεται σε ένα ευρύ εύρος επιστημών, τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και στη βιομηχανία. Όσον αφορά την εφαρμογή του στη φαρμακευτική ανάλυση και συγκεκριμένα στη χρήση της φασματομετρίας μαζών (mass spectrometry-MS), αποτελεί μια διαδικασία με σημαντική συνεισφορά σε αρκετές εφαρμογές. Διάφορες στρατηγικές βελτιστοποίησης με τη χρήση του DoE έχουν εφαρμοσθεί σε αναλύσεις MS. Ο αριθμός και το είδος των παραγόντων και το είδος του πειραματικού σχεδιασμού εξαρτάται από τον εξοπλισμό και τον στόχο της μελέτης. Κάποιοι ερευνητές επιλέγουν τη βελτιστοποίηση της πηγής ιοντισμού, της παγίδας ιόντων ή των παραμέτρων

του τριπλού τετράπολου. Ακόμα ένας αριθμός επιστημονικών άρθρων βελτιστοποιεί ανεξάρτητα τους παράγοντες της υγροχρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών ^{[17][18]}, ενώ σε άλλα πραγματοποιείται μια ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των παραγόντων ^{[19][20][21][22][23][24][25][26][27]}. Κάποια άλλα άρθρα επικεντρώνονται στη βελτιστοποίηση των συνθηκών της φασματομετρίας μαζών, όπως της πηγής ιόντων ^{[28][29][30][31][32][33][34]}, της παγίδας ιόντων ^{[19][35]} και των παραμέτρων του τριπλού τετραπόλου ^[36]. Παρακάτω αναλύονται εκτενέστερα κάποιες από αυτές τις εφαρμογές.

1.7.1 Βελτιστοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με την παγίδα ιόντων

Η θεωρία των DoE και RSM έχει εφαρμοσθεί στη διερεύνηση της τεχνικής collision induced dissociation (CID), ενός κοινού μηχανισμού θραυσματοποίησης στη δίδυμη φασματομετρία μαζών. Το φασματόμετρο μαζών που πραγματοποιήθηκε η έρευνα αποτελούνταν από μια γραμμική παγίδα ιόντων (Q-TRAP) και ήταν εφοδιασμένο με πηγή ηλεκτροψεκασμού (ESI). Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της αλλαγής των ρυθμίσεων σε διάφορες παραμέτρους του οργάνου, οι οποίες μπορούν να ρυθμιστούν από τον χειριστή του οργάνου, να διαπιστωθούν, να οπτικοποιηθούν και να μεταφραστούν σε αρχές που διέπουν τη CID.

Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν αυτοί που επηρεάζουν πιο πολύ την ιοντική θραυσματοποίηση ή την εμφάνιση του σχεδίου θραυσματοποίησης του πρόδρομου ιόντος και που μπορούν να ρυθμιστούν εύκολα από τον χειριστή του οργάνου. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν το αέριο σύγκρουσης αζώτου (Nitrogen collision gas - CAD), η ενέργεια θραυσματοποίησης (Collision energy - CEN), ο χρόνος πλήρωσης της παγίδας ιόντων (fill time of the ion trap - LIT) και η ταχύτητα σάρωσης (scan rate - SR). Η επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού έγινε με βάση το εύρος λήψης τιμών των διαφόρων παραμέτρων. Συγκεκριμένα τα SR και CAD μπορούν να πάρουν 3 διακριτές τιμές, ενώ οι CEN και LIT μπορούν να ρυθμιστούν σε ένα μεγάλο εύρος τιμών. Για το σκοπό αυτό οι παράγοντες SR και CAD αξιολογήθηκαν με έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό 3 παραγόντων και για κάθε συνδυασμό των τιμών σε αυτόν τον σχεδιασμό εφαρμόστηκε ένα CCD για να καθορίσει τις τιμές των CEN και LIT. Ο αριθμός των πειραμάτων ήταν 117, συμπεριλαμβανομένων και 5 στα κεντρικά σημεία για το CCD. Ως μόριο μελέτης επιλέχθηκε το πεπτίδιο μπομπεσίνη το οποίο κατά τη θραυσματοποίηση του εμφανίζει 5 ιοντικά θραύσματα, η φασματική ένταση και το εύρος των φασματικών κορυφών των οποίων αποτέλεσαν τις μεταβλητές απόκρισης. Τα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού κατέδειξαν ποιοι από τους προαναφερθέντες παράγοντες και ποιες αλληλεπιδράσεις αυτών επηρεάζουν αρνητικά, θετικά, αρνητικά ή καθόλου τις μεταβλητές απόκρισης ^[35].

1.7.2 Βελτιστοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με τη πηγή ιόντων

Μια ακόμα εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού ήταν και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων της πηγής ιόντων ενός φασματομέτρου μαζών με τη χρήση ενός μίγματος 8 φαρμακευτικών μορίων. Η συγκεκριμένη πηγή ιόντων επέτρεπε την εφαρμογή δυο τεχνικών ιονισμού, τον ESI και τον χημικό ιοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Η λογική της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η εύρεση αρχικά των σημαντικών παραγόντων με την εφαρμογή ενός 2^{6-2} κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού και στην συνέχεια ενός βέλτιστου σημείου με την εφαρμογή ενός CCD, έτσι ώστε να επιτευχθεί το μέγιστο δυνατό σήμα των αναλυτών. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν

20 πειράματα, εκ των οποίων τα 4 ήταν στα κεντρικά σημεία, μελετώντας τις επιδράσεις και τις μεταξύ των παραγόντων αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με την πηγή ιόντων. Στο επόμενο στάδιο, αυτό του CCD, συμπεριελήφθησαν όλοι οι παραπάνω παράγοντες, με εξαίρεση τον παράγοντα διαλύτη, καθώς φάνηκε ότι δεν είχε κάποια επίδραση στην μεταβλητή απόκρισης. Ο CCD περιλάμβανε 26 πειράματα και αξιολογήθηκε το επιλεγμένο μοντέλο με τη χρήση της ANOVA, ενώ το βέλτιστο σημείο βρέθηκε με τη χρήση διαγραμμάτων τριών διαστάσεων (3D). Να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές για την αποφυγή συστηματικού σφάλματος^[23].

Μια ακόμα χημειομετρική προσέγγιση για την εύρεση και αξιολόγηση των σημαντικών παραγόντων που επιδρούν στην πηγή ιόντων αφορούσε η μελέτη ιοντισμού της αργινίνης. Το όργανο στο οποίο πραγματοποιήθηκαν 52 πειράματα (BBD με 4 κεντρικά σημεία), ήταν ένα τριπλό τετράπολο με προσαρτημένη μια διάταξη πνευματικά υποβοηθούμενου ESI. Οι παράγοντες που διερευνήθηκαν ήταν 6: το ποσοστό μεθανόλης στην κινητή φάση, η συγκέντρωση μυρμηκικού οξέος, το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, το δυναμικό οπής (orifice voltage), η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και ταχύτητα ροής για το περιβάλλον αέριο (sheath gas). Η επιλογή των παραπάνω παραγόντων και των επιπέδων τους στον BBD έγινε με βάση την υπάρχουσα γνώση και κάποιες αρχικές πειραματικές δοκιμασίες. Οι μεταβλητές απόκρισης που επιλέχθηκαν ήταν το σήμα (signal abundance) και ο λόγος σήμα προς θόρυβο (signal-to-noise ratio) του πρωτονιωμένου μορίου και του πρωτονιωμένου διμερούς. Να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές για την αποφυγή συστηματικού σφάλματος. Η εύρεση των σημαντικών παραγόντων καθώς και των βέλτιστων αποκρίσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μοντέλων RSM με χρήση διαγραμμάτων ισοϋψών καμπυλών (contour plots) δυο διαστάσεων και διαγράμματα 3D^[26].

1.7.3 Στρατηγικές βελτιστοποίησης χρωματογραφικών και φασματομετρικών συνθηκών

Σε μια εφαρμογή ακολουθήθηκε η στρατηγική 3 βημάτων με στόχο τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών και την επίτευξη υψηλού λόγου σήματος/θόρυβο. Για το λόγο αυτό διενεργήθηκαν ένας σχεδιασμός σάρωσης, ένας σχεδιασμός για τις συνθήκες υγροχρωματογραφίας και τέλος πειράματα με απευθείας έγχυσης διαλυμάτων των αναλυτών στο όργανο. Θεωρήθηκε ότι το πειραματικό σύστημα αποτελείται από 3 διακριτά μέρη: τη διάταξη υγροχρωματογραφίας, την πηγή ιόντων ηλεκτροψεκασμού και την περιοχή ανάμεσα στην πηγή ιόντων και στον αναλυτή. Οι αναλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η οιστριόλη σε μίγμα οιστρογόνων, η ιβουπροφαίνη σε μίγμα μεταβολιτών ιβουπροφαίνης από δείγμα ούρων και η μορφίνη παρουσία καφεΐνης.

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός σάρωσης με τη χρήση κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 2^{9-5} , με στόχο την εύρεση των σημαντικών παραγόντων που επηρεάζουν το λόγο σήμα/θόρυβο. Στο δεύτερο στάδιο επιχειρήθηκε να ερευνηθούν τα συστατικά της υγροχρωματογραφίας με στόχο τη βελτιστοποίηση της, όσον αφορά το χρόνο κατακράτησης των αναλυτών και της διάρκειας ανάλυσης και την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού μεταξύ των συστατικών του μίγματος. Τέλος πειράματα έγχυσης (extended infusion) διεξήχθησαν με στόχο τη διερεύνηση των παραγόντων που επιδρούν στο λόγο σήμα/θόρυβο. Ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε ήταν ένας 3^{4-2} κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός. Οι χημειομετρικές τεχνικές που αξιοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση στην παρούσα εργασία ήταν η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multiple linear regression), τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (artificial neural networks) και οι γενετικοί αλγόριθμοι (genetic algorithms)^[18].

Μια ακόμα προσπάθεια σταδιακής βελτιστοποίησης με τη χρήση εργαλείων του DoE πραγματοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση του σήματος τριών αντιεπιληπτικών φαρμάκων (βιγκαμπατρίνη, πρεγκαμπαλίνη και γκαμπαπεντίνη) με LC-MS/MS ανάλυση σε τριπλό τετράπολο, εφοδιασμένο με προσαρτημένη διάταξη ESI. Αρχικά πειράματα προηγήθηκαν των πειραματικών σχεδιασμών με στόχο την εύρεση των ισχυρότερων θυγατρικών ιόντων, ικανοποιητικών χρωματογραφικών συνθηκών και της κατάλληλης γεωμετρίας της πηγής, ενώ με τη χρήση του OFAT καθορίστηκαν οι αρχικές συνθήκες του εύρους σάρωσης (scan width) και του χρόνου σάρωσης (scan time). Οι σημαντικοί παράγοντες της πηγής ιόντων εντοπίστηκαν με πειράματα σάρωσης εκτελώντας 2^{5-1} κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό με 3 κεντρικά σημεία με τους εξής παράγοντες: δυναμικό ψεκασμού (spray voltage), θερμοκρασία του εξατμιστή (vaporizer temperature), η θερμοκρασία του τριχοειδούς (capillary temperature), η πίεση του προστατευτικού και βοηθητικού αερίου (sheath gas and auxiliary gas pressure). Οι 3 παράγοντες (sheath gas pressure, auxiliary gas pressure and capillary temperature) που αποδείχθηκαν σημαντικοί βελτιστοποιήθηκαν με την εφαρμογή ενός BBD. Εφαρμόστηκε επίσης σχεδιασμός BBD και στην βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών με 12 πειράματα και ένα σημείο στο κεντρικό σημείο. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν στο στάδιο αυτό ήταν το ποσοστό ακετονιτριλίου και μυρμηκικού οξέους οξέους και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου. Τα στατιστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ANOVA, τα διαγράμματα ημι-κανονικής κατανομής, ισούψων καμπυλών και RSM^[37].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΑ ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ

2.1 Εισαγωγή

Τα μακρολίδια αποτελούν κοινή κατηγορία αντιβιοτικών. Το πρώτο μακρολιδικό αντιβιοτικό ήταν η ερυθρομυκίνη, η οποία απομονώθηκε το 1952 από προϊόντα μεταβολισμού του στελέχους *Streptomyces erythreus*. Ήταν το πρώτο αντιβιοτικό αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη ως εναλλακτική λύση στη θέση της πενικιλίνης σε ασθενείς με αλλεργία στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το 1991 εισήχθησαν στην αγορά δυο ημι-συνθετικά παράγωγα της ερυθρομυκίνης, η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη. Νεότερα μέλη αυτής της οικογένειας είναι η διριθρομυκίνη, η ροξιθρομυκίνη, η μενταμυκίνη, η σπιραμυκίνη και η τελιθρομυκίνη^{[38][39]}.

2.2 Χημικοί Τύποι-Φυσικοχημικές ιδιότητες Μακρολίδων

Η ερυθρομυκίνη παράγεται από το στέλεχος *Streptomyces erythreus* και περιλαμβάνει ένα 14μελή μακροκυκλικό λακτονικό δακτύλιο με προσαρτημένα δυο σάκχαρα (κλαδιινόζη και δεσοσαμίνη) (Σχήμα 2.1). Στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, διασπάται γρήγορα σε 8,9-άνυδρο-6,9-ημικετάλη και στη συνέχεια σε 6,9,9,12-σπιροκετάλη. Είναι ευδιάλυτη σε ακετόνη, χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο και οξικό αιθυλεστέρα, ενώ είναι μέτρια διαλυτή σε αιθέρα, αιθυλενοχλρίδιο και οξικό αμύλιο. Εμφανίζεται σε μορφή κρυστάλλων ή σκόνης χρώματος λευκού ή ελαφρώς κίτρινου. Η ονομασία κατά IUPAC είναι : (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-6-[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(διμεθυλαμινο)-3-υδροξυ-6-μεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-14-αιθυλ-7,12,13-τριυδροξυ-4-[(2*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-ύδροξυ-4-μεθοξυ-4,6-διμεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-3,5,7,9,11,13-εξαμεθυλ-οξακυκλοτετραδεκανο-2,10-διόνη^{[39][40][41]}.

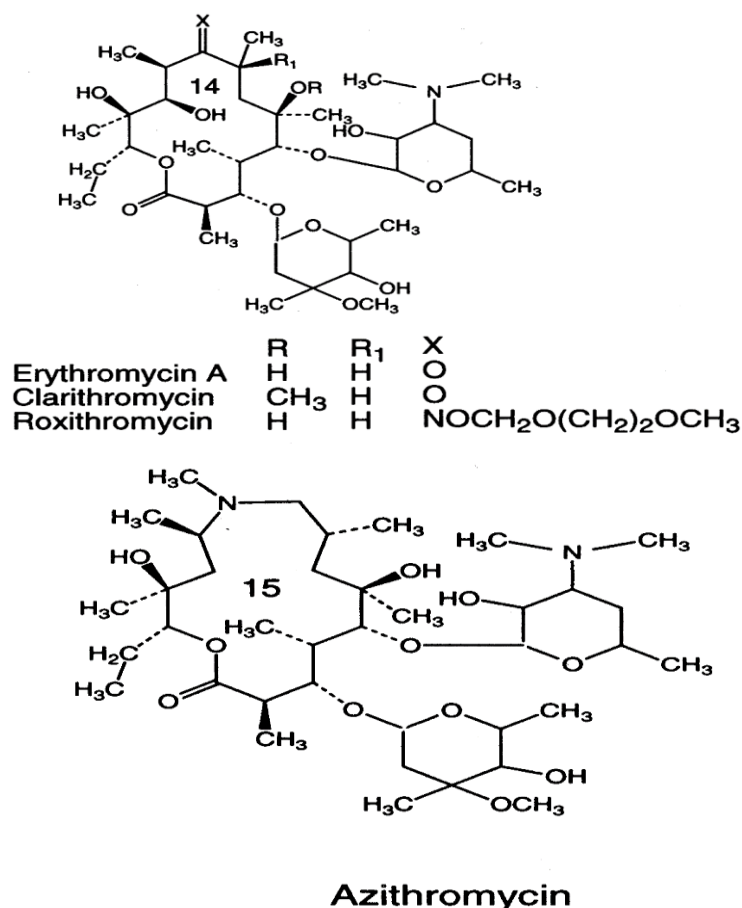
Η κλαριθρομυκίνη (6-Ο-μέθυλ-ερυθρομυκίνη) παράγεται ημισυνθετικά από την ερυθρομυκίνη. Περιέχει και αυτή ένα 14-μελή λακτονικό δακτύλιο και η διαφορά της από την ερυθρομυκίνη είναι ότι στη θέση 6 μια μεθόξυ-ομάδα αντικαθιστά την υδροξυλομάδα (Σχήμα 2.1). Ένας αρχικός μεταβολίτης της κλαριθρομυκίνης είναι το 14-ύδροξυ επιμερές της που διαθέτει αντιμικροβιακή ιδιότητα, ο οποίος και έχει συνεργιστική ή αθροιστική δράση με την πρόδρομη ένωση εναντίον διαφόρων μικροοργανισμών. Η κλαριθρομυκίνη είναι διαλυτή σε ακετόνη και μέτρια διαλυτή σε αιθανόλη και ακετονιτρίλιο. Η ονομασία κατά IUPAC είναι: (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-6-[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(διμεθυλαμινο)-3-υδροξυ-6-μεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-14-αιθυλ-12,13-διυδροξυ-4-[(2*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-υδροξυ-4-μεθοξυ-4,6-διμεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-7-μεθοξυ-3,5,7,9,11,13-εξαμεθυλ-οξακυκλοτετραδεκανο-2,10-διόνη^{[39][40][41]}.

Η αζιθρομυκίνη (9-δεοξο-9α-αζα-9α-ομοερυθρομυκίνη), αποτελείται από έναν 15μελή μακρολιδικό δακτύλιο, που είναι ένα αζαλίδιο το οποίο διαφέρει από την ερυθρομυκίνη στην προσθήκη ενός μεθυλο-υποκατεστημένου ατόμου αζώτου σε λακτονικό δακτύλιο (Σχήμα 2.1). Εμφανίζεται ως άμορφο στερεό. Η ονομασία κατά IUPAC είναι: (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-11-[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(διμεθυλαμινο)-3-υδροξυ-6-

μεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-2-αιθυλ-3,4,10-τριυδροξυ-13-[(2*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-υδροξυ-4-μεθοξυ-4,6-διμεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-3,5,6,8,10,12,14-επταμεθυλ-1-οξα-6-αζακυκλοπενταδεκανο-15-όνη [39][40][41].

Η ροξιθρομυκίνη παραγεται ημισυνθετικά από την ερυθρομυκίνη και περιέχει στο μόριο της ένα 14μελή μακρολιδικό δακτύλιο στον οποίο ο ερυθρονολιδικός Α λακτονικός δακτύλιος έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να εμποδίζει την αδρανοποίηση από το γαστρικό υγρό (Σχημα 2.1). Εμφανίζεται ως λευκή κρυσταλλική σκόνη. Η ονομασία κατά IUPAC είναι: (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,10*E*,11*S*,12*R*,13*S*,14*R*)-6-[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(διμεθυλαμινο)-3-υδροξυ-6-μεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-14-αιθυλ-7,12,13-τριυδροξυ-4-[(2*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-υδροξυ-4-μεθοξυ-4,6-διμεθυλοξαν-2-υλ]οξυ-10-(2-μεθοξυαιθοξυμεθοξυμινο)-3,5,7,9,11,13-εξαμυθυλ-οξακυκλο τετρεδεκαν-2-όνη [39][40][41].

Στο Σχήμα 2.1 απεικονίζονται οι συντακτικοί τύποι και στον Πίνακα 2.1 περιγράφονται κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητες των μακρολιδικών αντιβιοτικών που περιγράφηκαν παραπάνω.



Σχήμα 2.1: Συντακτικοί τύποι αζιθρομυκίνης, κλαριθρομυκίνης, ροξιθρομυκίνης και ερυθρομυκίνης^[42]

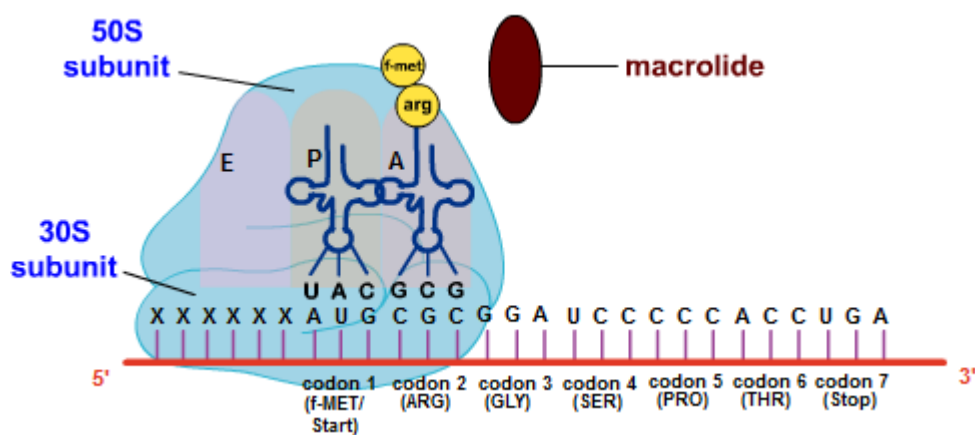
Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες Μακρολιδίων

Ονομασία	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος (g/mol)	Σημείο τήξης (°C)	Διαλυτότητα σε νερό(mg/L)/ 25°C	pKa (25°C)
Ερυθρομυκίνη	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,937	191	1	8,88
Κλαριθρομυκίνη	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747.964	220	0,33	8,99
Αζιθρομυκίνη	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748.996	114	2,37	8,74
Ροξιθρομυκίνη	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837.058	115-120	0,0189	9,08

2.3 Φαρμακολογία

2.3.1 Μηχανισμός δράσης

Τα μακρολίδια ανήκουν στα αντιβιοτικά (χλωραμφενικόλη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη, κ.α.) που δρουν καταστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Η πρωτεϊνοσύνθεση ακολουθεί τη διαδικασία μετάφρασης, κατά την οποία εκφράζεται η γενετική πληροφορία και δημιουργείται η πολυπεπτιδική αλυσίδα με βάση το mRNA. Τα μακρολίδια ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση συνδεδεμένα με τις ριβοσωμιακές υπομονάδες 50S των ευαίσθητων μικροβίων (τα ανθρώπινα ριβοσώματα αποτελούνται από 40S και 60S υποομάδες και δεν φέρουν την 50S υποομάδα) (Σχήμα 2.2). Με αυτόν τον τρόπο καταστέλλεται η ικανότητα του ριβόσωματος να προσθέσει ένα νέο αμινοξύ στην αναπτυσσόμενη πρωτεϊνική αλυσίδα. Η δράση τους είναι κυρίως βακτηριοστατική αλλά μπορεί να είναι και βακτηριοκτόνος ανάλογα με την ευαισθησία του μικροβίου και την συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Τέλος, τα μακρολίδια εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς εμποδίζουν την παραγωγή προ-φλεγμονώδων διαμεσολαβητών και κυτοκινών^{[39][43]}.



Σχήμα 2.2 : Μηχανισμός δράσης Μακρολιδίων ^[44]

2.3.2 Αντιμικροβιακό Φάσμα

Γενικά, τα μακρολίδια είναι δραστικά έναντι των Gram-αρνητικών κόκκων (κυρίως σταφυλόκοκκοι και στρεπτόκοκκοι) και βακίλων, και σε μικρότερο βαθμό έναντι Gram-θετικών κόκκων. Με εξαίρεση τα στελέχη *Bordetella pertussis*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Helicobacter* και *Legionella* οι Gram-αρνητικοί βάκιλοι είναι ανθεκτικοί στα μακρολίδια. Στο αντιμικροβιακό φάσμα των μακρολιδίων περιλαμβάνονται επίσης οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί: *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, σπειροχαίτες και άλλοι. Ο λόγος της αναποτελεσματικής δραστικότητας έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι ότι διαθέτουν μεγάλα υδροφοβικά τμήματα και δεν μπορούν να διεισδύσουν τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μεμβράνη αυτής της κατηγορίας βακτηρίων.

Η ερυθρομυκίνη έχει δραστικότητα έναντι Gram-θετικών κόκκων, όπως στρεπτόκοκκοι (όχι στελέχη *Enterococcus*), σταφυλόκοκκοι (αν και το μεγαλύτερο ποσοστό σταφυλόκοκκων είναι σήμερα ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη), *Bacillus anthracis* κ.α. Όσον αφορά τους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς εμφανίζει μειωμένη δραστικότητα έναντι της *Branhamella catarrhalis* και του *Haemophilus ducreyi*, ενώ η δραστικότητα ποικίλει για τη *N. Gonorrhoeae* και τον *H. Influenza*. Εκ των αναερόβιων μικροβίων είναι δραστική έναντι των Gram-θετικών όπως στελέχη πεπτοστρεπτοκόκκων, ακτινομυκητών κ.α., ενώ δεν είναι ασφαλές φάρμακο για την κάλυψη των Gram-αρνητικών μικροβίων. Στο αντιμικροβιακό φάσμα περιλαμβάνονται επίσης οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί: *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia*, *Legionella pneumoniae*, στελέχη *Campylobacter*, *Borrelia burgdorferi* και *Treponema pallidum*.

Η δραστικότητα της κλαριθρομυκίνης έναντι των Gram-θετικών μικροοργανισμών είναι ανώτερη αυτής της ερυθρομυκίνης και αζιθρομυκίνης, ειδικά έναντι των στελεχών *Streptococcus pyogenes* και *Streptococcus pneumoniae*. Η κάλυψη σε Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς είναι επίσης αυξημένη σε σχέση με την ερυθρομυκίνη. Επίσης μόνο η κλαριθρομυκίνη εμφανίζει δραστικότητα έναντι του στελέχους *H. Influenzae*, λόγω συνεργικού μηχανισμού με ένα μεταβολίτη της, την υδροξυκλαριθρομυκίνη. Τέλος, λόγω της καλής της κατανομής παρουσιάζει δραστικότητα κατά ενδοκυτταρικών παθογόνων όπως στελέχη *Legionella* και *Mycoplasma*.

Η αζιθρομυκίνη διατηρεί την δραστικότητα της ερυθρομυκίνης κατά των Gram-θετικών μικροοργανισμών, αλλά προσφέρει αυξημένη κάλυψη στα Gram-αρνητικά συγκρινόμενη με την ερυθρομυκίνη και την κλαριθρομυκίνη. Η αζιθρομυκίνη είναι πιο δραστική από την κλαριθρομυκίνη έναντι της *H. Influenza*, ενώ έχει μεταβλητή δραστικότητα έναντι της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*. Παρόλα αυτά, τα στελέχη *Salmonella* και *Shigella* εμφανίζουν ευαισθησία, όπως επίσης και άλλα λοιμώδη παθογόνα που προκαλούν διάρροιες όπως το *Yersinia* και *Campylobacter*. Όπως η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη εμφανίζει καλή δραστικότητα έναντι των στελεχών *Legionella* και *Mycoplasma*. Το ξεχωριστό της χαρακτηριστικό, σε σχέση με τα άλλα μακρολίδια, είναι η εξαιρετική της δραστικότητα έναντι σεξουαλικά μεταδιδόμενων παθογόνων, ειδικά αυτά του γένους *Chlamydia trachomatis*.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη, και τα δυο αντιβιοτικά εμφανίζουν διασταυρούμενη-ανθεκτικότητα με την ερυθρομυκίνη.

Η ροξιθρομυκίνη εμφανίζει διευρυμένη ανθεκτικότητα σε σχέση με την ερυθρομυκίνη. Έχει βελτιωμένη δραστικότητα έναντι των *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus species*, *Pasteurella species* και άλλων ατυπικών μυκοβακτηριών^[45].

2.3.3 Ενδείξεις

Η ερυθρομυκίνη ενδείκνυται σε^[45]:

1. Λοιμώξεις αναπνευστικού από *Mycoplasma pneumonia*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumonia*, *Bordetella pertussis* και *Hemophilus influenza*
2. Νόσος των λεγεωναρίων
3. Εντερίτιδες από *Campylobacter jejuni*
4. Λοιμώξεις από Gram-θετικούς κόκκους ή βακτήρια, όταν αντενδείκνυται η χρήση της πενικιλίνης (ιστορικό υπερευαισθησίας, ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στην πενικιλίνη)
5. Διφθερίτιδα και αποστείρωση των φορέων
6. Ερύθρεσμα
7. Σύφιλη
8. Λοιμώξεις από *Ureaplasma urealyticum*
9. Γονοκοκκικές λοιμώξεις (*Neisseria gonorrhoeae*)

Η κλαριθρομυκίνη ενδείκνυται σε^[45]:

1. Λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού
2. Λοιμώξεις του δέρματος
3. Λοιμώξεις μαλακών μορίων
4. Συμπληρωματική θεραπεία σε γενικευμένες ή εντοπισμένες λοιμώξεις οφειλόμενες σε άτυπα μυκοβακτηρίδια (π.χ. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracelulare*, *Mycobacterium fortuitum*)
5. Οδοντογενείς λοιμώξεις, ως φάρμακο δεύτερης επιλογής
6. Εκρίζωση του *Helicobacter pylori* σε συνδυασμό με αναστολείς αντλίας πρωτονίων

Η αζιθρομυκίνη ενδείκνυται σε^[45]:

1. Λοιμώξεις από ευαίσθητα στο αντιβιοτικό βακτήρια του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος
2. Λοιμώξεις του δέρματος
3. Λοιμώξεις μαλακών μορίων (σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, πνευμονιόκοκκοι, ναϊσσέρια, αιμόφιλοι)
4. Μέση ωτίτιδα
5. Μη επιλεγμένες λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος από *Chlamydia trachomatis* ή *Neisseria gonorrhoeae*
6. Μέτρια ή βαριά πνευμονία (μόνο εξωνοσοκομειακή)
7. Εξωνοσοκομειακή πνευμονία από *Chlamydia pneumonia*, *Haemophilus influenza*, *Legionella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* ή *Streptococcus pneumonia*
8. Φλεγμονώδης νόσος της πυέλου από *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Mycoplasma hominis*

Η ροξιθρομυκίνη ενδείκνυται σε^[45]:

1. Λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού από *Streptococcus pyogenes*
2. Οξεία παραρρινοκολπίτιδα από *Streptococcus pneumoniae*
3. Λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού: οξεία βρογχίτιδα από *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* ή *Streptococcus pneumoniae*
4. Πνευμονία από *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*
5. Λοιμώξεις γεννητικού συστήματος, εκτός τις γονοκοκκικές λοιμώξεις
6. Μη επιτελεγμένες λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων από *Streptococcus pyogenes* ή *Staphylococcus aureus*

2.3.4 Φαρμακοκινητική

Παρόλο που η αζιθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη και η ροξιθρομυκίνη εμφανίζουν όμοια χημική δομή με την ερυθρομυκίνη και εμφανίζουν κοινό μηχανισμό δράσης, οι φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες είναι καλύτερες από αυτές τις ερυθρομυκίνης. Σε αντίθεση με τα άλλα μακρολίδια, η κλαριθρομυκίνη έχει έναν ενεργό μεταβολίτη, την 14-υδροξυ-κλαριθρομυκίνη.

Η βιοδιαθεσιμότητα της κλαριθρομυκίνης είναι διπλάσια της ερυθρομυκίνης και η βιοδιαθεσιμότητα της αζιθρομυκίνης είναι 1,5 φορές μεγαλύτερη αυτή της ερυθρομυκίνης. Η βελτιωμένη απορρόφηση οφείλεται στην αυξημένη σταθερότητα σε όξινο περιβάλλον. Η ερυθρομυκίνη εμφανίζει χρόνο ημίσειας ζωής 1-1,5 h και συνήθως απαιτούνται 4 δόσεις ημερησίως. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής της αζιθρομυκίνης και της κλαριθρομυκίνης είναι μεγαλύτεροι από αυτούς την ερυθρομυκίνης, με την αζιθρομυκίνη να παρουσιάζει το μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής. Το βελτιωμένο φαρμακοκινητικό προφίλ των νεότερων μακρολιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς αυτά τα αντιβιοτικά εμφανίζουν χρονικά εξαρτημένη δράση.

Μια ακόμα σημαντική διαφορά εντοπίζεται στις χαμηλότερες μέγιστες συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος για την αζιθρομυκίνη από αυτές της ερυθρομυκίνης και κλαριθρομυκίνης. Ο λόγος είναι η συσώρευση της σε μεγαλύτερο βαθμό σε διάφορα κύτταρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγαλύτερου όγκου κατανομής. Σαν αποτέλεσμα η αζιθρομυκίνη εμφανίζει μικρότερο εμβαδόν υπό την καμπύλη (area under the curve-AUC), αλλά υψηλές συγκεντρώσεις στους ιστούς.

Η κλαριθρομυκίνη είναι σταθερή σε όξινο περιβάλλον και απορροφάται καλά από το γαστρεντερικό σωλήνα, ανεξάρτητα από την παρουσία τροφής. Όντας ένα από τα καλύτερα απορροφήσιμα μακρολίδια, έχει βιοδιαθεσιμότητα 50% και η συγκέντρωση στη σταθεροποιημένη κατάσταση (steady state concentration) επιτυγχάνεται μετά από 5 δόσεις. Η συγκέντρωση της στους ιστούς είναι αρκετά υψηλή, εμφανίζοντας υψηλό λόγο συγκέντρωσης στους ιστούς προς την συγκέντρωση στον ορό σε σχέση με την ερυθρομυκίνη, αλλά χαμηλότερο από την αζιθρομυκίνη. Ο χρόνος ημίσειας ζωής κυμαίνεται από 3 έως 7 h, επιτρέποντας τη χορήγηση δύο δόσεων ημερησίως, από του στόματος ή ενδοφλεβίως, με παρόμοια αποτελεσματικότητα.

Η αζιθρομυκίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα σε όξινο περιβάλλον από την ερυθρομυκίνη. Το φαρμακοκινητικό προφίλ της αζιθρομυκίνης μπορεί να περιγραφεί ως γρήγορη και εκτενής πρόσληψη από την κυκλοφορία σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και στη συνέχεια αργή αποδέσμευση. Έχει φανεί ότι η αζιθρομυκίνη διεισδύει στους ιστούς γρήγορα και εκτενώς. Τα επίπεδα της στα πνευμονικά μακροφάγα, στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, στους αμυγδαλικούς ιστούς, στους ιστούς γεννητικών οργάνων και της πύελου παραμένουν αυξημένα για μεγάλο χρονικό διάστημα, με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής στους ιστούς από 2 έως 4 ημέρες.

Η ροξιθρομυκίνη είναι επίσης περισσότερο σταθερή σε όξινο περιβάλλον από την ερυθρομυκίνη και επιτυγχάνει υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό. Παρουσιάζει καλή από του στόματος διαθεσιμότητα, που είναι ανεξάρτητη της πρόσληψης ή παρουσίας τροφής. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου 12 h^[39].

2.3.5 Αντενδείξεις, ανεπιθύμητες ενέργειες, αλληλεπιδράσεις

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες των μακρολιδικών αντιβιοτικών εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, στο ήπαρ και στην καρδιά. Σημαντικές γαστρεντερικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ναυτία, εμετοί, διάρροιες και κοιλιακή δυσφορία έχουν συσχετισθεί με τα μακρολίδια, ενώ η ερυθρομυκίνη αποτελεί την πιο συχνή αιτία πρόκλησης αυτών. Όσον αφορά τις ηπατικές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι σπάνιες, αλλά σοβαρές. Επίσης, ο κίνδυνος αύξησης του QT διαστήματος και η πρόκληση σοβαρών αρρυθμιών, όπως επίσης κοιλιακής μαρμαρυγής και κοιλιακής ταχυκαρδίας δίκην ριτιδίου (torsades de pointes), αποτελούν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ειδικά σε ασθενείς με καρδιακά προβλήματα που λαμβάνουν αντιαρρυθμικά φάρμακα ή φάρμακα που αλληλεπιδρούν με τα μακρολίδια (όπως η σισαπρίδη). Η αζιθρομυκίνη και η ροξιθρομυκίνη προκαλούν σε μικρότερο βαθμό αρρυθμία σε σχέση με την κλαριθρομυκίνη και την ερυθρομυκίνη. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίζονται σπάνια είναι οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας, ενώ σπανιότερα έχουν αναφερθεί νευροψυχικές διαταραχές ή ωτοτοξικότητα (σε ενδοφλέβια χορήγηση και σε άτομα με νεφρική ανεπάρκεια) και θρομβοφλετίδα σε ενδοφλέβια χορήγηση^{[39][46][45][47][48]}. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι αντενδείξεις στην χορήγηση των μακρολιδίων^[49].

Πίνακας 2.2: Αντενδείξεις Μακρολιδίων

<u>Αζιθρομυκίνη</u>	<u>Κλαριθρομυκίνη</u>
✓ Κύηση ✓ Γαλουχία ✓ Ηλικία κάτω των 16 ετών ✓ Ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια ✓ Ευαισθησία στα μακρολιδικά αντιβιοτικά	✓ Κύηση ✓ Γαλουχία ✓ Διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας ✓ Θεραπεία με θεοφυλλίνη και καρβαμαζεπίνη
<u>Ερυθρομυκίνη</u>	<u>Ροξιθρομυκίνη</u>
✓ Υπερευαισθησία ✓ Ηπατοπάθεια ✓ Κύηση	✓ Υπερευαισθησία ✓ Θεραπεία με παράγωγα της εργοταμίνης

Η κλαριθρομυκίνη μεταβολίζεται από το σύστημα του κυτόχρωματος P450, όπως και η ερυθρομυκίνη, και έχει την τάση να αλληλεπιδρά με άλλα φάρμακα, αναστέλλοντας την οξείδωσή τους. Παρόλα αυτά η κλαριθρομυκίνη είναι αναστολέας του κυτοχρώματος P450 σε μικρότερο βαθμό από την ερυθρομυκίνη. Η αζιθρομυκίνη δεν μεταβολίζεται και έχουν αναφερθεί λίγες αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα. Η ροξιθρομυκίνη, τέλος, δεν μεταβολίζεται εκτενώς. Απεκκρίνεται κυρίως χωρίς να μεταβολιστεί μέσω της χολής ή να μπορεί μεταβολιστεί από άλλους μηχανισμούς. Έτσι έχει μικρή τάση να αλληλεπιδρά με άλλα φάρμακα. Στον Πίνακα 2.3 απεικονίζονται κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις των τεσσάρων αυτών μακρολιδικών αντιβιοτικών^[39].

Πίνακας 2.3: Αλληλεπιδράσεις μακρολιδίων με άλλα φάρμακα

Αζιθρομυκίνη	Κλαριθρομυκίνη	Ερυθρομυκίνη	Ροξιθρομυκίνη
Αντιόξινα ^α	Αστεμιζόλη	Αστεμιζόλη	Κυκλοσπορίνη ^β
Κυκλοσπορίνη ^β	Καρβαμαζεπίνη	Βενζοδιαζεπίνες	Διγοξίνη
Διγιοξίνη	Σιμετιδίνη ^α	Βουσπιρόνη	Θεοφυλλίνη
Λοβαστατίνη ^β	Κυκλοσπορίνη	Καρβαμαζεπίνη	
ΡΙφαμπουτίνη ^α	Διγοξίνη	Σισαπρίδη	
Θεοφυλλίνη ^β	Φλουοξετίνη	Κλοζαπίνη	
Βαρφαρίνη ^β	Ινδιναβίρη ^α	Κυκλοσπορίνη	
	Λοραταδίνη	Διγοξίνη	
	Μιδαζολάμη	Φελοδιπίνη	
	Πιμοζίδη	Φεξοφenaδίνη	
	ΡΙφαμπουτίνη ^α	Αναστολείς HMG- CoA	
	ΡΙτοναβίρη ^α	Μεθυλπρεδνιζολόνη	
	Σακουιναβίρη ^α	Τακρόλιμους	
	Τερφεναδίνη	Θεοφυλλίνη	
	Θεοφυλλίνη	Βινμπλαστίνη	
	Βεραπαμίλη	Βαρφαρίνη	
	Βαρφαρίνη		
	Ζιδοβουδίνη		
α= το φάρμακο έχει επίσης επίδραση στα μακρολίδια, β = μικρής σημασίας αλληλεπιδράσεις, HMG-CoA= υδροξυμεθυλο-γλουταρυλο-συνένζυμο Α			

2.4 Διαθέσιμες Αναλυτικές Μέθοδοι για τον προσδιορισμό των μακρολιδικών αντιβιοτικών

Για τον προσδιορισμό και την ποιοτική ανάλυση των μακρολιδικών αντιβιοτικών σε πρώτες ύλες, δοσολογικές μορφές και βιολογικά δείγματα έχουν εφαρμοσθεί διάφορες αναλυτικές τεχνικές, όπως χρωματογραφικές, φασματοφωτομετρικές και ηλεκτροχημικές.

2.4.1 Χρωματογραφικές Τεχνικές

2.4.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η TLC αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και σημαντική τεχνική για ποιοτικές και ημιποσοτικές αναλύσεις φαρμάκων σε ογκώδεις σκόνες, δοσολογικές μορφές και σωματικά υγρά. Λόγω της απλότητας, της καλής ευαισθησίας, της ταχύτητας, της ευρείας εφαρμογής και του χαμηλού κόστους αυτής της μεθόδου εφαρμόζεται σε μελέτες διαλογής των αντιβιοτικών. Μειονέκτημα αυτής της τεχνικής αποτελεί η αδυναμία ανίχνευσης πλαστών προϊόντων, με λάθος δραστικά ή μη δραστικά συστατικά συστατικά. Έχει αναπτυχθεί μέθοδος TLC διαχωρισμού της ερυθρομυκίνης από τα προϊόντα διάσπασης της^[50] καθώς και διαχωρισμού της ερυθρομυκίνης, τυλοσίνης, ολεανδομυκίνης και σπιραμυκίνης σε ζωικά προϊόντα^[51].

2.4.1.2 Αεριοχρωματογραφία

Η αεριο-υγροχρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική ανάλυση και διαχωρισμό της ερυθρομυκίνης σε μίγματα που περιέχουν ερυθρομυκίνη Α, ερυθρομυκίνη Β, ερυθρομυκίνη C, ερυθρολοσαμίνη και προπιονυλο-ερυθρομυκίνη με τη χρήση ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας^[52]. Παρόμοια, η ερυθρομυκίνη Α και η ερυθρομυκίνη Β έχουν διαχωριστεί και ποσοτικοποιηθεί παρουσία της ερυθρομυκίνης C και της ερυθρολοσαμίνης σε δισκία ερυθρομυκίνης^[53], ενώ έχει αναπτυχθεί μέθοδος προσδιορισμού της ερυθρομυκίνης σε ζωικά προϊόντα με αεριοχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS) με την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (single ion monitoring-SIM) σε m/z 200^[54]. Τέλος έχει δημοσιευθεί μια μέθοδος για την ταυτοποίηση ερυθρομυκίνης σε δισκία αιθυλο-ηλεκτρυλο-ερυθρομυκίνης με αεριοχρωματογραφία πυρόλυσης (Py-GC)^[55].

2.4.1.3 Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η τεχνική της HPLC σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μακρολιδικών αντιβιοτικών. Στους ανιχνευτές αυτούς συγκαταλέγονται ο ανιχνευτής υπεριώδους (UV), ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός και κουλομετρικός) ανιχνευτής και το φασματόμετρο μαζών.

Όσον αφορά τη χρήση ανιχνευτή UV είναι δύσκολο να επιτευχθεί ανάλυση υψηλής ευαισθησίας καθώς η ερυθρομυκίνη στερείται χρωμοφόρου ομάδας^[56]. Ως εκ τούτου έχει αναπτυχθεί μέθοδος προσδιορισμού του εν λόγω αντιβιοτικού με το σχηματισμό ενός μπλέ χρώματος συμπλόκου με ιώδες της γεντιανής σε αλκαλικό μέσο^[57]. Τα μακρολιδικά αντιβιοτικά εμφανίζουν μια ασθενή απορρόφηση σε χαμηλό μήκος κύματος (<220 nm) λόγω έλλειψης ισχυρού χρωμοφόρου. Έτσι, η ανίχνευση UV στα 215 nm έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση όλων των αναλυτών, χωρίς καμία σημαντική παρεμβολή από τη γραμμή βάσης ή το σήμα υποβάθρου. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται πολλές φορές η χρήση μιας προσθήκης εκχύλισης, η οποία θα εξαλείψει την εμφάνιση παρεμβαλλόμενων συστατικών στην διαδικασία της ανάλυσης, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται πολύπλοκα μητρικά υλικά όπως βιολογικά υγρά και ιστοί^[58]. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας με ανίχνευση

UV για ανάλυση αζιθρομυκίνης σε δισκία^[59] και σε πρώτες ύλες^[60]. Όσον αφορά τον προσδιορισμό της αζιθρομυκίνης σε ανθρώπινο πλάσμα έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι προσδιορισμού της με τεχνικές HPLC με ηλεκτροχημική ανίχνευση, καθώς η ανίχνευση με φασματοφωτομετρία UV παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία για τα μακρολίδια σε βιολογικά υγρά. Ο Shepard και οι συνεργάτες τους περιέγραψαν, επίσης, τον προσδιορισμό της αζιθρομυκίνης σε ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς και ορό αίματος με κουλομετρική και αμπερομετρική μέθοδο^[61].

Η τεχνική του φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, για την ανίχνευση της ερυθρομυκίνης, αζιθρομυκίνης, κλαριθρομυκίνης και ροξιθρομυκίνης σε ανθρώπινο ορό κατά τον προσδιορισμό τους με τη μέθοδο HPLC μετά από διαδικασία σχηματισμού παραγώγων με 9-φλουορενυλμεθυλο-οξυκαρβονυλοχλωρίδιο. Η φθορισμομετρική ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος διέγερσης 225 nm και μήκος κύματος εκπομπής 315 nm^[62].

Η εισαγωγή της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας τεχνικής υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένης με LC-MS ή LC-MS/MS στους προσδιορισμούς αυτούς, κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, βελτιώνει σε μεγάλο βαθμό κρίσιμα προβλήματα που προκύπτουν με τη χρήση των προαναφερθέντων τεχνικών, όπως η χαμηλή ευαισθησία και τα χρονοβόρα χρωματογραφικά στάδια που επιφέρουν υψηλούς χρόνους ανάλυσης. Αρκετές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές στη χρήση της τεχνικής αυτής. Μια από αυτές είναι η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού αζιθρομυκίνης από ανθρώπινο πλάσμα. Η εκχύλιση της αζιθρομυκίνης πραγματοποιήθηκε με t-βουτυλοαιθέρα – εξάνιο (50:50, v/v). Η οργανική φάση εξατμίστηκε μέχρι ξηρού στους 40 °C και διαλύθηκε στην κινητή φάση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη C-18. Η αζιθρομυκίνη και το εσωτερικό της πρότυπο, η κλαριθρομυκίνη, μετρήθηκαν με ιοντισμό με θετικό ηλεκτροψεκασμό. Το όριο ποσοτικοποίησης της αζιθρομυκίνης στο πλάσμα ήταν 2 ng/mL με καλή ακρίβεια και πιστότητα. Οι συγγραφείς ανέπτυξαν αυτή τη μέθοδο για μελέτη βιοϊσοδυναμίας της αζιθρομυκίνης σε δυο φαρμακευτικά σκευάσματα^[21].

Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζονται κάποιες από τις εφαρμογές της τεχνικής αυτής στη διεθνή βιβλιογραφία για την ανάλυση των μακρολιδικών αντιβιοτικών σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές και μητρικά υλικά.

2.4.1.4 Υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC)

Η υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (ultra high performance liquid chromatography-UHPLC) αποτελεί σύγχρονη τεχνική, βασισμένη στην HPLC, με κύρια χαρακτηριστικά τη χρήση ως πληρωτικών υλικών των στηλών σωματίδια διαμέτρου <2nm και εφαρμογή υψηλών πιέσεων (μεγαλύτερες των συνήθως 400 bar, μέχρι και 1300 bar). Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται πιο εύκολα ο διαχωρισμός ενώσεων με παραπλήσια δομή και σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Παρόλα αυτά οι αναφορές στη βιβλιογραφία για την εφαρμογή της UHPLC στον προσδιορισμό μακρολιδικών αντιβιοτικών είναι περιορισμένη (Πίνακας 2.4). Μια από αυτές

αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της αζιθρομυκίνης σε ανθρώπινο πλάσμα με UHPLC-MS/MS για την διενέργεια φαρμακοκινητικών μελετών^[63].

Πίνακας 2.4: Περίληψη χρωματογραφικών συνθηκών για την ανάλυση κάποιων μακρολιδικών αντιβιοτικών από πρώτη ύλη, διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές και βιολογικά υγρά, με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών						
Αναλύτης (-ες)	Εσωτερικό πρότυπο	Μητρικό υλικό	Κατεργασία δείγματος	Τύπος Φασματομέτρου/ Ιοντισμός /m/z	Στήλη HPLC/Θερμοκρασία C/ κινητή φάση/ταχύτητα ροής(mL/min)	Αναφορά
Ερυθρομυκίνη και προπιονική βάση της	Ροξιθρομυκίνη	πλάσμα	Υγρό-υγρό εκχύλιση	Q/ESI/790,7 και 837,8	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5μm)/ 30 °C/ακετονιτρίλιο-υδατικό δ/μα φορμικού οξέους 0,1% (50:50)/0,8	[64]
Αζιθρομυκίνη	Ροξιθρομυκίνη	Πλάσμα	Υγρό-υγρό εκχύλιση, διαιθυλαιθέρας:διχλωρομεθάνιο (7:3)	Iontrap /ESI/749,6	C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)/ /20 mM οξικό αμμώνιο (pH 5,2) : ακετονιτρίλιο : μεθανόλη (50:40:10)/0,3	[65]
Ροξιθρομυκίνη	Κλαριθρομυκίνη	Πνεύμονας αρουραίου	Υγρό-υγρό εκχύλιση, n-εξάνιο:διχλωρομεθάνιο:ισοπροπυλική αλκοόλη(20:10:1)	Q/ESI/837,7	C18 (150×4.6 mm, 5 μm)/ περιβάλλοντος/ μεθανόλη: νερό : μυρμηκικό οξύ (80:20:1)/0,5	[66]
Αζιθρομυκίνη	[¹³ C, ² H ₃]-αζιθρομυκίνη	πλάσμα	Υγρό-υγρό εκχύλιση, μέθυλο-t-βουτυλαιθέρα	QqQ/ESI/591,3→157,9	C18 (50 mm × 2,1 mm, 3,5 μm)/30±2/ 0,5M οξικό αμμώνιο:ακετονιτρίλιο (9:1 φάση A), 0,05 M οξικό αμμώνιο :μεθανόλη (1:9, φάση B)/0,2	[67]
Αζιθρομυκίνη	Ροξιθρομυκίνη	Επτεφυκότας κόνικλου	Υγρό-υγρό εκχύλιση, ακετονιτρίλιο	QqQ/ESI/375[M+2H] ²⁺ →591	C18 (3,0×75 mm, 3 μm)/30/10 mM οξικό αμμώνιο (pH 5,2):μεθανόλη (18:82)/0,3	[68]
Αζιθρομυκίνη	Κλαριθρομυκίνη	Πλάσμα	Υγρό-υγρό εκχύλιση	Q/ESI/375[M+2H] ²⁺	C18 (50×2.1 mm, 1,9 μm) και C18 (10×2,1 mm, 3μm) /30/ακετονιτρίλιο:50μM οξικό αμμώνιο (0,05% οξικό οξύ)(85:15)/0,3	[21]

Πίνακας 2.4: Περίληψη χρωματογραφικών συνθηκών για την ανάλυση κάποιων μακρολιδικών αντιβιοτικών από πρώτη ύλη, διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές και βιολογικά υνά, με ανιχνευτή φασματομέτρητο μαζών						
Αναλύτης (-ες)	Εσωτερικό πρότυπο	Μητρικό υλικό	Κατεργασία δείγματος	Τύπος Φασματομέτρου/ Ιοντισμός	Στήλη HPLC/Θερμοκρασία C/ κινήτη φάση/ταχύτητα ροής (mL/min)	Αναφορά
Αζιθρομυκίνη	Ερυθρομυκίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών με μεθανόλη και φυγοκέντρηση	QIT/ESI/749	CN (100x2.1 mm, 3 μm)/30/ νερό (0,1 μυρμηκικό οξύ, 0,1% οξικό αμμώνιο): ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (58:30:12)/0,2	[69]
Κλαριθρομυκίνη	Τελμισαρτάνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και φυγοκέντρηση	QqLIT/ESI/748→158	C18 (150x4,6 mm, 5 μm)/περιβάλλοντος)/νερό(0,1% μυρμηκικό οξύ και 10 mM οξικό αμμώνιο):μεθανόλη (50:50)/1,0	[70]
Αζιθρομυκίνη	Ροξιθρομυκίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών με διαιθυλαιθέρα και φυγοκέντρηση	QqLIT/ESI/749→591	UPLC C18 (50x2,1 mm, 1,7 μm)/40/νερό (50 mM οξικό αμμώνιο) :ακετονιτρίλιο (βαθμιδωσή έκλουση) / 0,35	[63]
Ερυθρομυκίνη A	-	Ούρα (ζώων)	Αραίωση ούρων με 5% ακετονιτρίλιο	TOF/ESI/734,4691	UPLC C18 (50x2,1 mm, 1,7 μm)/ περιβάλλοντος/ Φάση A: νερό/μυρμηκικό οξύ/ ακετονιτρίλιο (947/3/50), Φάση B: νερό/μυρμηκικό οξύ/ακετονιτρίλιο (50/3/947)/0,3	[71]
Ερυθρομυκίνη B				718,4742		
Ερυθρομυκίνη C				720,4564		
Γιοσαμυκίνη				828,4745		
Μιντεκαμυκίνη				814,4589		
Ροξιθρομυκίνη	-	Πλάσμα	Μοριακά μαγνητικά αποτυπωμένα πολυμερή(MMIPs)	QIT/ESI/'' 837,8→158,2	C18 (150x4.6 mm, 5 μm)/30/0,1% οξικό οξύ και 10 mmol οξικό αμμώνιο:μεθανόλη (30:70)/1	[72]

2.4.1.5 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis-CE) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στον διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση φαρμάκων και μιγμάτων αυτών, κατατάσσοντας τη σε μια χρήσιμη και σημαντική αναλυτική διαδικασία. Παρόλο την επιτυχή εφαρμογή στην ανάλυση πάνω από 700 φαρμακευτικών μορίων, εκ των οποίων πολλά σε βιολογικά υγρά^{[73][74]}, δεν έχει εφαρμοστεί ευρέως στην ανάλυση μακρολιδικών αντιβιοτικών^{[58][75]}. Να αναφερθεί η ανάπτυξη μεθόδου τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ανιχνευτή υπεριώδους για το διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό ερυθρομυκίνης, γιοσαμυκίνης και ολεανδομυκίνης^[76].

2.4.2 Φασματοφωτομετρικές τεχνικές

Τα μακρολιδικά αντιβιοτικά δεν διαθέτουν επαρκείς χρωμοφόρες ομάδες, ώστε να επιτρέπουν τον απευθείας προσδιορισμό τους με φασματοφωτόμετρο. Απορροφούν σε μικρότερα μήκη κύματος όπου υπάρχουν πιο πολλές παρεμβολές, καθιστώντας επιτακτική ανάγκη την παραγωγοποίηση ή συμπλοκοποίηση τους. Το φασματοφωτόμετρο αποτελεί έναν σημαντικό ανιχνευτή, που χρησιμοποιείται ευρέως με την HPLC για τον προσδιορισμό των μακρολιδικών αντιβιοτικών^[58].

2.4.2.1 Φασματομετρικές μέθοδοι απορρόφησης

Η ερυθρομυκίνη μπορεί να προσδιοριστεί με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο υπεριώδους ορατού στα 633 nm μέσω αντίδρασης με όξινη βαφή, πυκνό θειικό οξύ και ιόντα σιδήρου ή με ιώδες της γεντιανής για το σχηματισμό συμπλόκου^[58]. Η ερυθρομυκίνη, η διωδρική αζιθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη και η ροξιθρομυκίνη έχουν προσδιοριστεί σε πρώτες ύλες, φαρμακοτεχνικές μορφές και εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα με τον σχηματισμό ενός δυαδικού συμπλόκου κάθε αντιβιοτικού με ηωσίνη Υ, το οποίο και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 542-544 nm^[55].

2.4.2.2 Φασματοφθορισμομετρικές μέθοδοι

Τα μακρολιδικά αντιβιοτικά (ερυθρομυκίνη, εστέρες της ερυθρομυκίνης, διωδρική αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και ροξιθρομυκίνη) μπορούν να προσδιοριστούν μια απλή φασματοφθορισμομετρική μέθοδο βασισμένη στην συμπύκνωση 10% (v/v) μηλονικού οξέως και άνυδρου οξικού οξέος κάτω από την καταλυτική επίδραση των τεταρτοταγών αμινομάδων των υπό εξέταση μακρολιδίων. Η σχετική ένταση φθορισμού του συμπυκνωμένου προϊόντος μετρήθηκε στα 397/452 nm (διέγερση/εκπομπή) για τη διωδρική αζιθρομυκίνη και στα 392/445 nm για την κλαριθρομυκίνη, ερυθρομυκίνη και ροξιθρομυκίνη. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη αντιβιοτικών σε φαρμακοτεχνικές μορφές και σε εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα^[77].

2.4.3 Ηλεκτροχημικές τεχνικές

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές, όπως η αμπερομετρία, η βολταμετρία και η κουλομετρία χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση αναλυτών σε μεθόδους HPLC και CE. Εφόσον αυτές οι τεχνικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό μακρολιδικών αντιβιοτικών^[58].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1 Σύστημα UHPLC-MS/MS

Το δεδομένο αναλυτικό όργανο αποτελείται από δύο διακριτές οργανολογικές μονάδες (Εικόνα 3.1). Η πρώτη μονάδα αντιστοιχεί σε μια διάταξη υγροχρωματογραφίας το οποίο εξυπηρετεί την εισαγωγή του προς ανάλυση δείγματος στη δεύτερη μονάδα του οργάνου που αντιστοιχεί σε ένα φασματομέτρο μαζών.



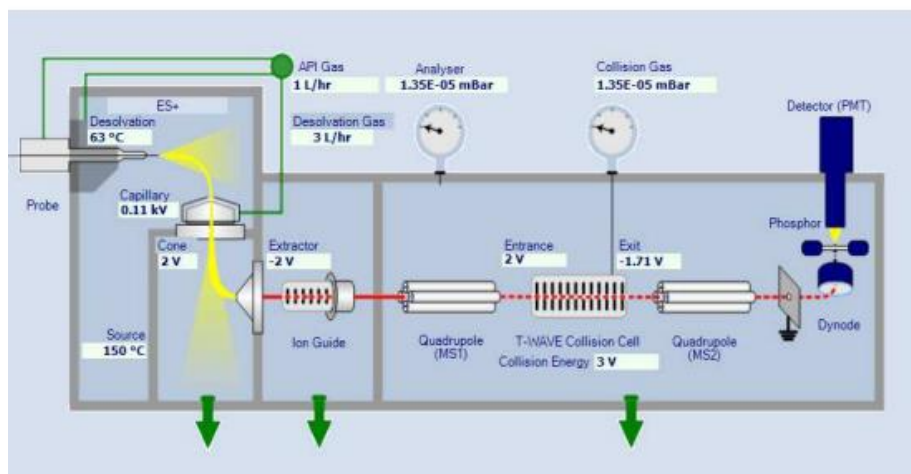
Εικόνα 3.1: ACQUITY UHPLC (αριστερά), Xevo TQD (δεξιά)

Πιο συγκεκριμένα, το υγροχρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια δυαδική αντλία UHPLC (ACQUITY UPLC) της εταιρίας Waters (Milford, MA; USA) που διαθέτει ενσωματωμένο αυτόματο δειγματολήπτη, φούρνο στήλης και απαερωτή κινητής φάσης. Όσον αφορά τη διάταξη του ανιχνευτή φασματομέτρου μαζών Xevo TQD, αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή στην υγρή του μορφή.
2. Πηγή ιόντων: Εδώ τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών. Ο ιοντισμός στην περίπτωση αυτού του οργάνου πραγματοποιείται με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization – ESI)
3. Αναλυτής μαζών: Εδώ γίνεται διαχωρισμός ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z που φέρουν. Είναι η πραγματική καρδιά του συστήματος. Το συγκεκριμένο όργανο περιλαμβάνει ένα τριπλό τετραπολικό. Πρόκειται για ένα συνδυασμό τριών τετραπόλων. Όταν το τριπλό τετράπολο λειτουργεί ως απλός αναλυτής ρυθμίζεται ώστε δυο τετράπολα να συνεισφέρουν μόνο στον εστιασμό της δέσμης των ιόντων και ο διαχωρισμός να γίνεται στο τριπλό τετράπολο. Η ύπαρξη όμως των τριών τετραπόλων δίνει δυνατότητα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών MS-MS.

4. Ανιχνευτής: Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια, γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.
5. Σύστημα κενού. Ολόκληρο το φασματόμετρο (εκτός από το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες.

Στο Σχήμα 3.1 φαίνονται τα τμήματα του φασματόμετρου μαζών Xevo TQD της Waters Waters (Milford, MA; USA), που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της παρούσας διπλωματική εργασία.



Σχήμα 3.1: Φασματόμετρο Μαζών της Waters, Xevo TQD

3.2 Λογισμικά

Η λήψη και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού MassLynx v4.1, ενώ το πρόγραμμα IntelliStart, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο λογισμικό MassLynx, χρησιμοποιήθηκε για την αρχική βελτιστοποίηση των παραμέτρων του οργάνου. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η μοντελοποίηση πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Design Expert 10.0 (trial version) (State-Ease Inc. Minneapolis, USA). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός υπολογιστής Lenovo, με λειτουργικό σύστημα Microsoft Windows 7.

3.3 Αναλυτικός ζυγός

Για τις ζυγίσεις των προτύπων ουσιών χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός Kern 770-12 με ακρίβεια ανάγνωσης τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και ελάχιστο και μέγιστο όριο ζύγισης 1 mg και 120 g, αντίστοιχα.

3.4 Αναλυτικές πιπέτες

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιζόμενες αναλυτικές πιπέτες Finnriperette μεταβλητού όγκου 20 μL - 200 μL και 200 - 1000 μL .

3.5 Ανακίνηση-Ανάμιξη

Για την ανάμιξη των περιεχομένων των φιαλιδίων Eppendorf χρησιμοποιήθηκε συσκευή ανάδευσης Vortex-Genie 2 Shaker της εταιρίας Schientific Industries (Bohemia, N.Y.USA) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Συσκευή ανάδευσης Vortex-Genie 2 Shaker

3.6 Διαλύτες-Αναλυτικές Στήλες

Οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη (MeOH) και ακετονιτρίλιο (ACN) (καθαρότητας HPLC) και το μυρμηκικό οξύ (HCOOH) που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας, των κινητών φάσεων και των διαλυτών εκχύλισης ήταν καθαρότητας HPLC, από την εταιρία Fisher Scientific International, Inc. (Hampton, NH, USA). Επίσης το νερό (H₂O) που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρότητας HPLC και παραγόταν από συσκευή Millipore Direct-Q® 3, (Millipore, Massachusetts, USA).

Η αναλυτική στήλη τύπου C8 (ACQUITY UPLC BEH) που χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση των χρωματογραφικών συνθηκών της μεθόδου είχε διαστάσεις 2,1x100 mm, διάμετρο σωματιδίων 1,7 μm, μέγεθος πόρων 130 Å και ελήφθη από την εταιρία Waters (Milford, MA; USA).

3.7 Πρότυπες Ουσίες

Οι χρησιμοποιούμενες πρότυπες ουσίες αζιθρομυκίνη (azithromycin - Azith), κλαριθρομυκίνη (clarithromycin - Clar), ερυθρομυκίνη (erythromycin - Eryth) και ροξιθρομυκίνη (roxithromycin - Rox) ήταν καθαρότητας μεγαλύτερης από 99% w/w και ελήφθησαν από την εταιρία RAFARM (Αθήνα, Ελλάδα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

4.1 Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) ζυγίστηκε 20 mg από κάθε πρότυπη ουσία με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, οι οποίες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, ξεχωριστά η κάθε μια, και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με διάλυμα MeOH:H₂O (1:1). Με τον τρόπο αυτό, προέκυψαν διαλύματα παρακαταθήκης ροξιθρομυκίνης, ερυθρομυκίνης, κλαριθρομυκίνης και αζιθρομυκίνης συγκέντρωσης 200μg/mL. Μέρος από τα προκύπτοντα διαλύματα παρακαταθήκης μεταφέρθηκε σε φιαλίδια Falcon χωρητικότητας 50 mL και διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C.

4.2 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

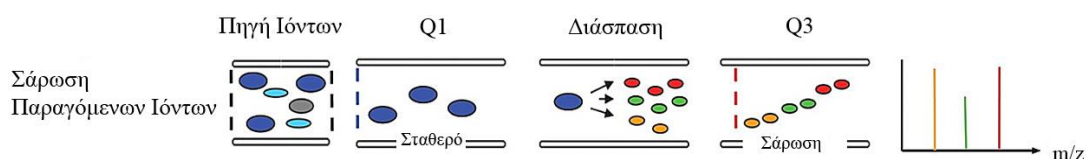
Τα διαλύματα εργασίας (working solutions) παρασκευάστηκαν μέσω κατάλληλων αραιώσεων των διαλυμάτων παρακαταθήκης. Όσον αφορά τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν στα προκαταρκτικά πειράματα 100 μL διαλύματος παρακαταθήκης από τον κάθε αναλύτη αραιώθηκε σε 3900 μL MeOH και ακολούθησε ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης (vortex) για 2 min, παραλαμβάνοντας διάλυμα εργασίας για κάθε αναλύτη συγκέντρωσης 5 μg/mL. Οι παραπάνω αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν εντός φιαλιδίων Falcon χωρητικότητας 15 mL με τη βοήθεια αναλυτικής πιπέτας.

Όσον αφορά τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των πειραματικών σχεδιασμών προετοιμάστηκαν με την προσθήκη 50 μL από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης σε 800 μL MeOH και ακολούθησε ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 2 min. Στην συνέχεια 100 μL από το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκαν σε 900 μL H₂O και ακολούθησε ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης για 2 min. Με τις δύο διαδοχικές αραιώσεις το κάθε διάλυμα εργασίας αραιώθηκε 200 φορές παραλαμβάνοντας διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 1 μg/mL για κάθε αναλύτη. Οι διάφοροι όγκοι τόσο των διαλυμάτων παρακαταθήκης όσο και των διαλυτών μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια αναλυτικής πιπέτας σε φιαλίδια Eppendorf.

4.3 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών με τη χρήση του IntelliStart

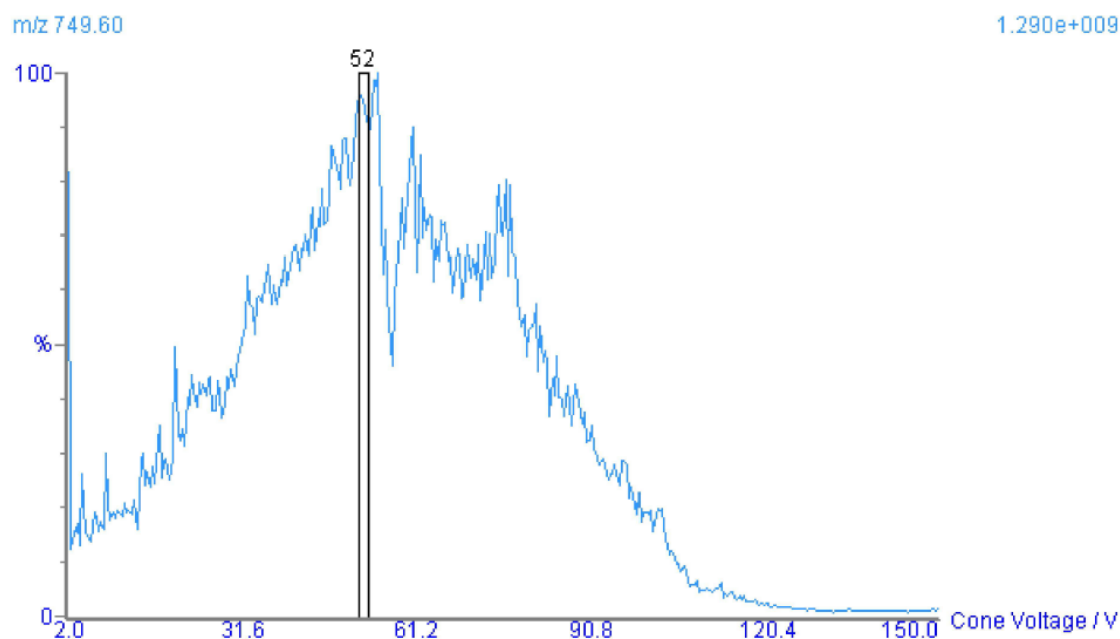
Αρχικά, ακολουθήθηκε η προβλεπόμενη διαδικασία αυτόματης ρύθμισης της ευαισθησίας (autotuning) και βαθμονόμησης της κλίμακας μαζών και της διακριτικής ικανότητας του φασματομέτρου (calibration) βασισμένη στο πρόγραμμα του λογισμικού του οργάνου IntelliStart. Έτσι δείγμα διαλύματος παρακαταθήκης από κάθε αναλύτη εισήχθη μεμονωμένα με έγχυση στο φασματόμετρο μαζών, με στόχο τη λήψη των βέλτιστων συνθηκών και την εύρεση των θυγατρικών ιόντων.

Η διαδικασία σάρωσης που εφαρμόστηκε στην ανάλυση αυτή ήταν η σάρωση παραγόμενων ιόντων, γνωστή και ως «σάρωση θυγατρικού ιόντος» (Daughter Ion Scan). Σε αυτήν ο πρώτος αναλυτής μαζών Q1 χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός πρόδρομου ιόντος (precursor-ion) και το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στο χώρο θραύσματοποίησης Q2 (collision cell). Εκεί, λόγω της παρουσίας υψηλής κινητικής ενέργειας και της παρουσίας αερίου (αργό ή άζωτο), πραγματοποιούνται συγκρούσεις του πρόδρομου ιόντος με τα μόρια του αερίου θραυσματοποίησης (Ar) και θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος σε φορτισμένα θραύσματα (ιόντα) και ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Τα παραγόμενα ιόντα διέρχονται από τον επόμενο αναλυτή μαζών (Q3), οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Η διάδικασία αυτή ονομάζεται «διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση» (Collision-Activated Dissociation, CAD ή CID) (Σχήμα 4.1).

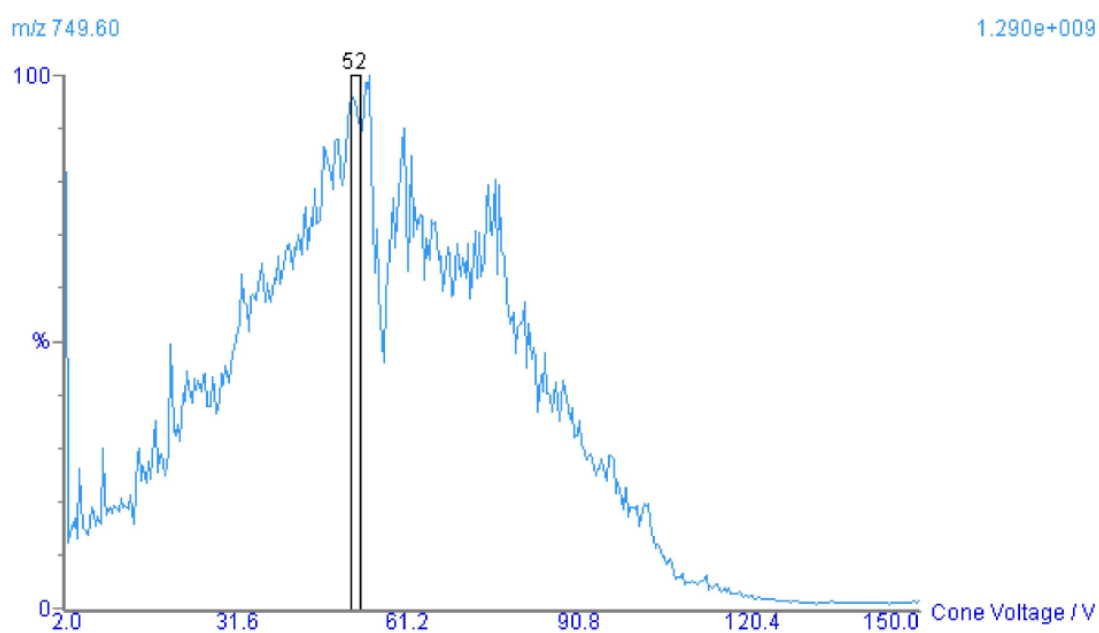


Σχήμα 4.1: Διαδικασία σάρωσης θυγατρικού ιόντος

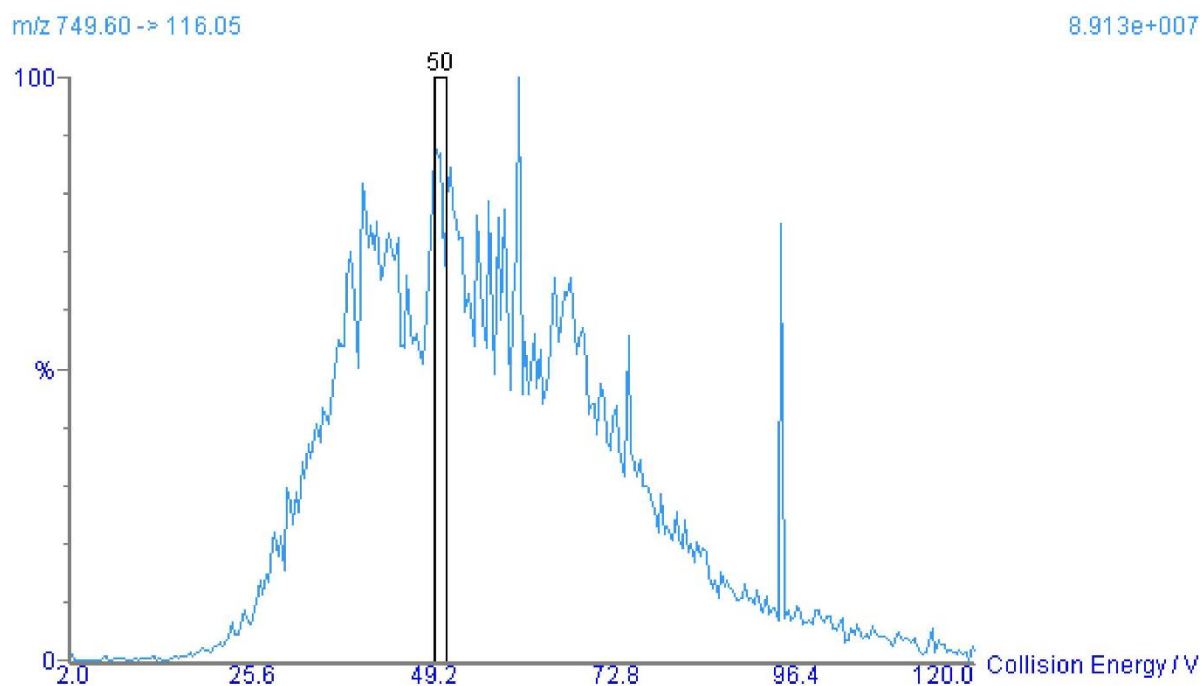
Εφαρμόζοντας τη διαδικασία σάρωσης που αναφέρθηκε προηγουμένως για κάθε αναλύτη χωριστά και μέσω της επεξεργασίας των δεδομένων με το πρόγραμμα IntelliStart ελήφθησαν πληροφορίες για τις βέλτιστες συνθήκες, προκειμένου να επιτευχθεί το μέγιστο σήμα για κάθε αναλύτη. Συγκεκριμένα, από την επεξεργασία των δεδομένων της ανάλυσης πρόέκυψε μια αναφορά για τον κάθε αναλύτη χωριστά, όπου περιγράφονταν οι βέλτιστες τιμές για το δυναμικού κώνου (Cone Voltage-CV), την ενέργεια θραύσης (Collision Energy-CEN), για τα δυο ισχυρότερα θυγατρικά ιόντα κάθε μητρικού ιόντος καθώς και αν ο ιοντισμός που προτείνεται είναι θετικός ή αρνητικός. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται τόσο σε μορφή πίνακα όσο και σε μορφή σχεδιαγραμμάτων για το CEN και CV. Χαρακτηριστικά απεικονίζονται τα σχεδιαγράμματα βελτιστοποίησης για τον αναλύτη αξιθρομυκίνη στα Σχήματα 4.2 -4.5, όπου επισημαίνεται η βέλτιστη τιμή για αυτούς τους δυο παράγοντες, CEN και CV.



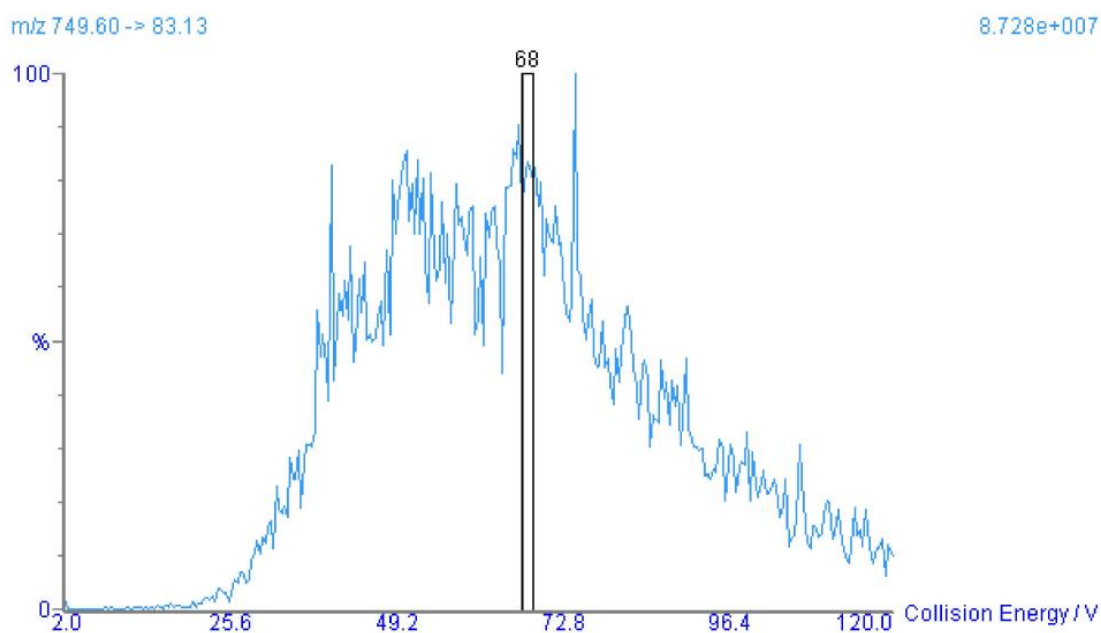
Σχήμα 4.2: Βελτιστοποίηση CV για την μετάπτωση m/z 749,60 $\rightarrow$ 116,05



Σχήμα 4.3: Βελτιστοποίηση CV για τη μετάπτωση m/z 749,60 $\rightarrow$ 83,13



Σχήμα 4.4: Βελτιστοποίηση CEN για τη μετάπτωση m/z 749,60 $\rightarrow$ 116,05



Σχήμα 4.5: Βελτιστοποίηση CEN για τη μετάπτωση m/z 749,60 $\rightarrow$ 83,13

Στον Πίνακα 4.1 περιγράφονται οι τιμές m/z των μητρικών ιόντων και οι βέλτιστες τιμές για CV και CEN για τα δυο ισχυρότερα θυγατρικά ιόντα κάθε μητρικού ιόντος. Να σημειωθεί ότι επιλέχθηκε θετικός ιοντισμός.

Πίνακας 4.1: Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων MS που ελήφθησαν από το πρόγραμμα Intellistart

Αναλύτης	Μοριακός Τύπος	Μητρικό Ιόν m/z	CV	Θυγατρικό Ιόν m/z	CEN (eV)	Ion Mode
Ροξιθρομυκίνη (Rox)	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	873,6	50	158,20	38	ES+
			50	116,11	48	ES+
Ερυθρομυκίνη (Eryth)	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	734,5	36	158,2	38	ES+
			36	83,13	58	ES+
Κλαριθρομυκίνη (Clar)	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	748,5	76	158,20	28	ES+
			76	83,13	58	ES+
Αζιθρομυκίνη (Azith)	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	749,6	52	116,05	50	ES+
			52	83,13	68	ES+

4.4 Επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών

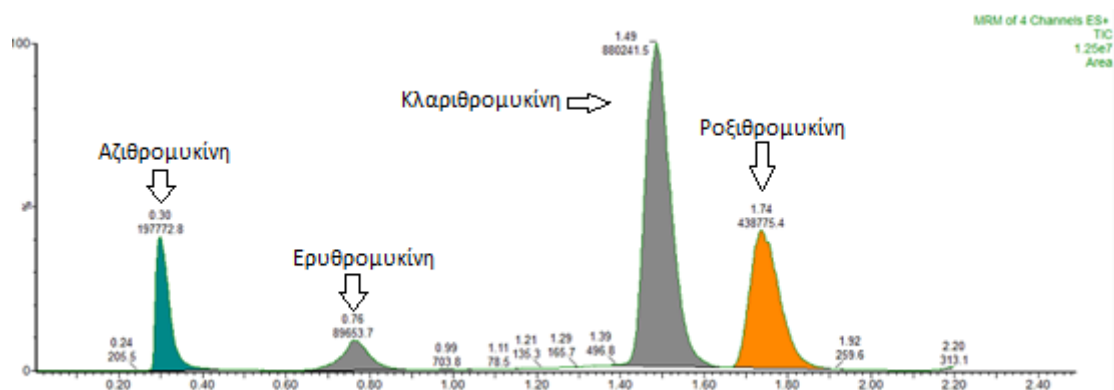
Πριν την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού με στόχο την επιλογή των σημαντικών φασματομετρικών παραμέτρων εκτελέστηκαν κάποιες δοκιμές, με στόχο την εύρεση των ικανοποιητικών χρωματογραφικών συνθηκών. Συγκεκριμένα, οι επιλεγμένες χρωματογραφικές συνθήκες έπρεπε να ελαχιστοποιούν τον χρόνο κατακράτησης (retention time- t_R) των αναλυτών και δευτερευόντως να επιτρέπουν την επίτευξη ικανοποιητικής διαχωριστικής ικανότητας (Resolution- R_s) μεταξύ τους, για να αποφευχθεί μία πιθανή καταστολή σήματος λόγω της συνέκλωσης. Μετά από ορισμένες δοκιμές και τη χρήση πληροφοριών από βιβλιογραφικές πηγές επιλέχθηκαν οι χρωματογραφικές συνθήκες όπως περιγράφονται στον Πίνακα 4.2, ενώ στην Εικόνα 4.1 απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα, όπως ελήφθη με την εφαρμογή αυτών των χρωματογραφικών συνθηκών. Τέλος στον Πίνακα 4.3 απεικονίζονται οι χρόνοι έκλυσης του κάθε αναλύτη, ο χρόνος της ανάλυσης και ο όγκος της ένεσης για την διενέργεια της ανάλυσης.

Πίνακας 4.2: Χρωματογραφικές συνθήκες

Κινητή φάση	MeOH / 0,05% HCOOH (50/50 v/v)
Ροή	0,50 mL/min
Στατική φάση	Αναλυτική στήλη UPLC τύπου C8, διαστάσεων 2,1x100 mm, με σωματίδια διαμέτρου 1,7 μm και μέγεθος πόρων 130 Å
Θερμοκρασία στατικής φάσης	40 °C
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη	10 °C
Όγκος ένεσης	5 μL
Χρόνος ανάλυσης	2,20 min

Πίνακας 4.3: Δεδομένα χρωματογραφικής ανάλυσης

t_R αζιθρομυκίνης	0,3 min
t_R ερυθρομυκίνης	0,76 min
t_R κλαριθρομυκίνης	1,49 min
t_R ροξιθρομυκίνης	1,74 min



Εικόνα 4.1: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που ελήφθη μετά την επιλογή των χρωματογραφικών συνθηκών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ

5.1 Εισαγωγή

Η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών του συστήματος UHPLC-MS/MS με χρήση πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Design Expert 10.0. Αρχικά έλαβε χώρα η διαλογή – αξιολόγηση των σημαντικών παραμέτρων που επηρεάζουν το σήμα MS κάθε αναλύτη. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός σάρωσης και συγκεκριμένα ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, όπως περιγράφεται παρακάτω.

5.2 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός 8 παραγόντων

Ο σχεδιασμός αυτός εφαρμόστηκε για να εντοπιστούν ποιοι από τους 8 παράγοντες που θα μπορούσαν δυνητικά να συμπεριληφθούν στον πειραματικό σχεδιασμό έχουν σημαντική επίπτωση στο σήμα MS για κάθε αναλύτη μεμονωμένα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η μαθηματική βελτιστοποίηση τους. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν σε αυτό το σημείο (Πίνακας 5.1), ήταν όλες οι παράμετροι οι οποίες μπορούν να ρυθμισθούν μέσω του λογισμικού του οργάνου. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 7 αριθμητικοί παράγοντες και ένας κατηγορικός σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό δυο επιπέδων με 38 πειράματα, σύμφωνα με έναν 2^{8-3} κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό με 6 κεντρικά σημεία, όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 5.2. Τα επίπεδα κάθε παράγοντα κρίθηκαν με βάση τα αποτελέσματα του autotunnig, για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν, ενώ για τους υπόλοιπους ορίστηκαν με βάση την προϋπάρχουσα επιστημονική γνώση και τις δυνατότητες του οργάνου. Ως μεταβλητές απόκρισης επιλέχθηκαν τα σήματα MS για κάθε αναλύτη.

Πίνακας 5.1: Παράγοντες και εύρη αυτών για τη διενέργεια του 2^{8-3} κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού

Παράγοντες	Επίπεδα		
	Χαμηλό	Κεντρικό	Υψηλό
	(-1)	(0)	(+1)
(x_1) Δυναμικό Κώνου (CV)(V)	20	40	60
(x_2) Θερμοκρασία Εξάτμισης (DET)(C)	350	450	550
(x_3) Δυναμικό Τριχοειδούς (CAV)(kV)	2,5	3,5	4,5
(x_4) Δυναμικό Απόσπασης (EV)(V)	4	5	6
(x_5) Θυγατρικό Ιόν (DI)(m/z)*	E1	-	E2
(x_6) Ενέργεια Θραυσματοποίησης (CEN)(eV)	10	25	40
(x_7) Χρόνος Παραμονής (DT)(s)	0,01	0,02	0,03
(x_8) Ροή Αερίου Εξάτμισης (DGF)(L/h)	450	600	750

*Πρόκειται για τα δυο επικρατέστερα θυγατρικά ιόντα (E1 και E2) για κάθε αναλύτη, όπως προέκυψαν από την διεξαγωγή των αρχικών πειραμάτων και τη χρήση του IntelliStart

Πίνακας 5.2: Ο σχεδιασμός των πειραμάτων με βάση τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό 2^{8-3}

Πείραμα	Παράγοντες							
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	+1	+1	+1	+1	E2	+1	+1	+1
2	-1	+1	-1	-1	E2	-1	+1	-1
3	+1	-1	-1	+1	E1	-1	-1	+1
4	0	0	0	0	E1	0	0	0
5	-1	-1	+1	-1	E2	+1	-1	+1
6	-1	+1	-1	+1	E1	+1	-1	+1
7	-1	-1	+1	+1	E1	+1	+1	+1
8	0	0	0	0	E1	0	0	0
9	-1	+1	-1	+1	E2	+1	-1	-1
10	-1	+1	-1	-1	E1	+1	+1	-1
11	+1	+1	-1	+1	E2	-1	+1	-1
12	-1	-1	-1	-1	E2	-1	-1	-1
13	+1	+1	+1	+1	E1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	E2	-1	-1	-1
15	+1	+1	-1	-1	E1	-1	-1	-1
16	+1	+1	-1	+1	E1	-1	+1	+1
17	+1	+1	+1	-1	E2	+1	-1	-1
18	+1	+1	+1	-1	E1	+1	-1	+1
19	-1	+1	+1	-1	E1	-1	+1	+1
20	0	0	0	0	E1	0	0	0
21	-1	-1	+1	+1	E2	+1	+1	-1
22	-1	-1	-1	-1	E1	-1	-1	+1
23	+1	-1	+1	-1	E2	-1	+1	+1
24	0	0	0	0	E2	0	0	0
25	-1	-1	-1	+1	E2	-1	+1	+1
26	+1	+1	-1	-1	E2	-1	-1	+1
27	+1	-1	+1	-1	E1	-1	+1	-1
28	+1	-1	-1	+1	E2	+1	-1	+1
29	+1	-1	-1	+1	E1	+1	-1	-1
30	0	0	0	0	E2	0	0	0
31	-1	+1	+1	+1	E2	-1	-1	+1
32	-1	+1	-1	-1	E2	+1	+1	+1
33	+1	-1	-1	-1	E2	+1	+1	-1
34	-1	-1	+1	-1	E1	+1	-1	-1
35	+1	-1	-1	-1	E1	+1	+1	+1
36	-1	-1	-1	+1	E1	-1	+1	-1
37	0	0	0	0	E2	0	0	0
38	-1	+1	+1	+1	E1	-1	-1	-1

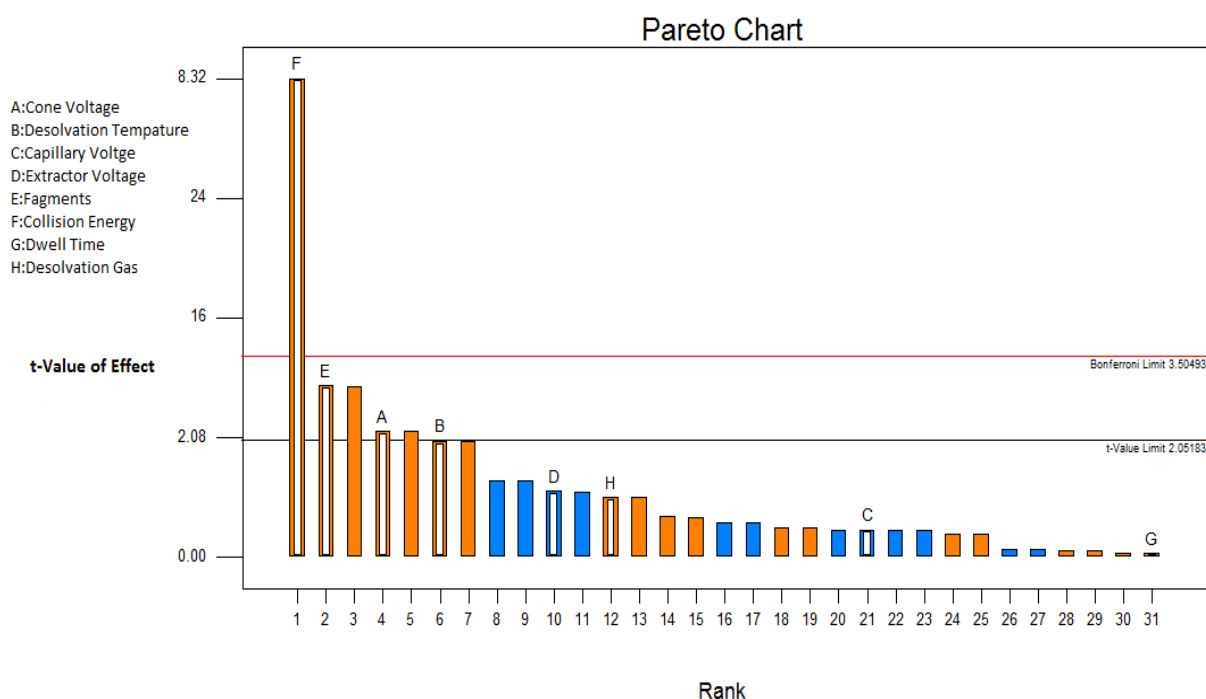
5.2.1 Στατιστική Ανάλυση των Αποτελεσμάτων

Μετά το πέρας των πειραμάτων του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού τα δεδομένα που ελήφθησαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Design Expert. Η ανάλυση μπορεί να διεξαχθεί με την εισαγωγή των δεδομένων απόκρισης, που στον συγκεκριμένο πειραματικό

σχεδιασμό ήταν το σήμα MS για κάθε αναλύτη. Κάθε απόκριση πρέπει να αναλυθεί μεμονωμένα και στόχο αποτελεί η μεγιστοποίηση της. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα Pareto.

Το διάγραμμα Pareto είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενός σχεδιασμού σάρωσης καθώς δείχνει το σχετικό μέγεθος της επίδρασης κάθε παράγοντα. Επιδράσεις που βρίσκονται πάνω από το όριο t είναι σίγουρα σημαντικές σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ενώ όσες βρίσκονται κάτω από αυτό το όριο δεν πρέπει να επιλεγούν ως σημαντικές. Το διάγραμμα Pareto περιλαμβάνει επίσης και όριο Bonferroni, το οποίο αποτελεί όριο σε πιο αυστηρό επίπεδο εμπιστοσύνης, που εξαρτάται κάθε φορά από τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων. Επιδράσεις που βρίσκονται πάνω από το όριο Bonferroni θεωρούνται σχεδόν σίγουρα σημαντικές.

Παρατηρώντας τα διαγράμματα Pareto για κάθε μεταβλητή απόκρισης του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού, παρατηρείται η έντονη επίδραση του συντελεστή CEN καθώς είναι ο μόνος παράγοντας που υπερβαίνει το όριο Bonferroni, ενώ οι υπόλοιποι κρίσιμοι παράγοντες βρίσκονται πάνω από το όριο t . Χαρακτηριστικά, απεικονίζεται στο Σχήμα 5.1 το διάγραμμά Pareto για την απόκριση της αζιθρομυκίνης. Συνεπώς η επίδραση του παράγοντα CEN επισκίασε την επίδραση των υπόλοιπων παραγόντων, κάτι το οποίο και θεωρήθηκε επίφοβο για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή έγκυρων συμπερασμάτων.



Σχήμα 5.1: Διάγραμμα Pareto για τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό για την απόκριση σήμα MS Αζιθρομυκίνης. Η κάθετη μαύρη γραμμή στο διάγραμμα ορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ενώ η κόκκινη σε επίπεδο εμπιστοσύνης 97.5%.

Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαία η διενέργεια ενός δεύτερου κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού αποκλείοντας τον παράγοντα CEN, ο οποίος θεωρείται πως σίγουρα επηρεάζει σημαντικά όλες τις αποκρίσεις. Στον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό

που ακολούθησε αποκλείσθηκε, επίσης ,και ο κατηγορικός παράγοντας DI, καθώς ήταν εμφανές ότι το σήμα του πρώτου θυγατρικού ιόντος ήταν ισχυρότερο.

5.3 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός 6 παραγόντων

Ο σχεδιασμός αυτός εφαρμόστηκε για να εκτιμηθούν οι σημαντικές επιπτώσεις 6 σημαντικών παραγόντων στο σήμα για κάθε αναλύτη μεμονωμένα, δεδομένου ότι ο παράγοντας CEN κρίθηκε σημαντικός και δεν επέτρεψε την σωστή εξαγωγή αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 6 αριθμητικοί παράγοντες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3, σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό δυο επιπέδων με 19 πειράματα, σύμφωνα με έναν 2^{6-2} κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων με 3 κεντρικά σημεία. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων, όπως ελήφθη από το πρόγραμμα Design Expert, καθώς και τα αποτελέσματα για κάθε απόκριση (εμβαδό αναλύτη) απεικονίζονται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.3: Εύρος τιμών αριθμητικών παραγόντων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 2^{6-2}

Παράγοντες	Επίπεδα		
	Χαμηλό	Κεντρικό	Υψηλό
	(-1)	(0)	(+1)
(A) - CV (V)	20	40	60
(B) - DET (°C)	350	450	550
(C) - CAV (kV)	2,5	3,5	4,5
(D) - EV (V)	4	5	6
(E) – DT (s)	0,01	0,02	0,03
(F) - DGF (L/h)	450	600	750

Πίνακας 5.4: Ο σχεδιασμός των πειραμάτων με βάση τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό

Πείραμα	Παράγοντες						Αποκρίσεις			
	A	B	C	D	E	F	Εμβαδό Rox	Εμβαδό Azith	Εμβαδό Clar	Εμβαδό Eryth
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	332.557	36.013,2	698.581	159.925
2	+1	-1	-1	+1	+1	+1	317.346	99.249,5	558.687	102.296
3	+1	+1	-1	+1	-1	-1	407.244	125.464	5.821,97	124.065
4	+1	-1	-1	-1	+1	-1	446.235	125.933	841.215	157.735
5	+1	-1	+1	+1	1	-1	296.752	62.267,8	521.119	88.131,1
6	0	0	0	0	0	0	525.423	86.729,2	1,23166E+006	258.886
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	307.260	57.073,9	716.455	149.510
8	-1	-1	-1	+1	+1	-1	270.984	44.489,9	592.580	138.905
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	249.346	176.860	477.918	73.379,7
10	0	0	0	0	0	0	543.259	99.427,9	1.16648E+006	258.675
11	+1	+1	+1	-1	+1	-1	394.727	122.039	675.466	120.532
12	-1	+1	+1	-1	-1	-1	362.265	54.082,1	748.159	177.610
13	+1	-1	+1	-1	-1	+1	258.969	90.843,7	480.280	88.102,2
14	+1	+1	+1	+1	+1	+1	209.848	140.817	378.917	61.095,7
15	-1	-1	-1	+1	-1	+1	323.631	65.312,7	747.303	170.456
16	-1	+1	-1	+1	+1	-1	470.970	75.166,8	1,07918E+006	243.391
17	0	0	0	0	0	0	521.654	96.400,3	1,22086E+006	262.080
18	-1	+1	-1	-1	+1	+1	351.355	94.018,2	916.573	189.530
19	-1	1	+1	-1	+1	+1	259.744	46.774,5	611.748	144.534

5.3.1 Στατιστική Ανάλυση και Αξιολόγηση των Αποτελεσμάτων

Μετά το πέρας των πειραμάτων με βάση τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό, τα δεδομένα που ελήφθησαν αναλύθηκαν με το λογισμικό Design Expert. Η ανάλυση μπορεί να διεξαχθεί με την εισαγωγή των δεδομένων απόκρισης, που στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό ήταν το σήμα MS για κάθε αναλύτη. Κάθε απόκριση πρέπει να αναλυθεί

μεμονωμένα και στόχος αποτελεί η μεγιστοποίηση του σήματος MS για κάθε αναλύτη. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA), τα διαγράμματα ημικανονικής πιθανότητας (Half normal probability plot) και κανονικής πιθανότητας (Normal probability plot) και τα διαγράμματα Pareto.

Η ANOVA αποτελεί μια σημαντική στατιστική δοκιμασία για την ανάλυση των επιδράσεων των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την απόκριση. Η ολοκλήρωση μια ανάλυσης διακύμανσης καθορίζει:

- Ποιοί παράγοντες έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση ή/ και
- Πόσο μέρος της μεταβλητότητας στην αποκρινόμενη μεταβλητή αποδίδεται σε κάθε παράγοντα.

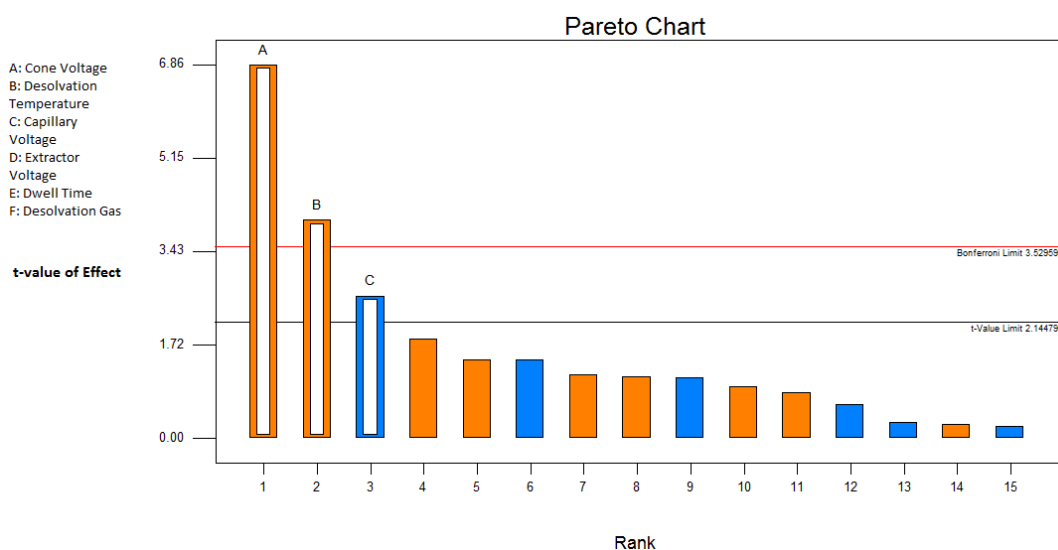
Η περίληψη της ANOVA κατά την διεξαγωγή των δεδομένων της ανάλυσης στον υπολογιστή περιλαμβάνει το άθροισμα των τετραγώνων (Sum of Squares), τους βαθμούς ελευθερίας (Degrees of Freedom, DF), το μέσο τετράγωνο (Mean Square) και τη στατιστική δοκιμασία F0. Στη συνέχεια διερευνώνται διάφοροι διαγνωστικοί δείκτες για να επικυρωθεί στατιστικά το μοντέλο, και αν το μοντέλο είναι ορθό λαμβάνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα για να ερμηνευθούν οι επιδράσεις του κάθε παράγοντα

Στον Πίνακα 5.5 απεικονίζεται η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την μεταβλητή απόκρισης «σήμα MS αζιθρομυκίνης», όπου και απεικονίζονται ποιες «πηγές» έχουν τιμή p (p-value) μικρότερη από 0,05 ($p < 0,05$) και επομένως κρίνονται σημαντικές. Η τιμή F για το μοντέλο 23,32 υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόνο 0,01% πιθανότητα η τιμή F του μοντέλου να οφείλεται σε θόρυβο. Η «έλλειψη προσαρμογής F – τιμή (Lack of Fit F-value)» ίση με 7,63 υπονοεί ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι στατιστικά σημαντική, κάτι το οποίο είναι και επιθυμητό καθώς θέλουμε το μοντέλο να προσαρμόζεται. Επιπλέον παρατηρείται με βάση τις τιμές p ότι οι παράγοντες A, B και C κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί για τη συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης. Η επίδραση των παραγόντων στο σήμα MS της αζιθρομυκίνης επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα Pareto, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.2.

Πίνακας 5.5: ANOVA για την απόκριση Εμβαδό αζιθρομυκίνης

ANOVA						
ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Εμβαδό αζιθρομυκίνης						
Πηγή	Άθροισμα τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
<u>Μοντέλο</u>	2,057E+010	3	6,856E+009	23,32	< 0,0001	<u>σημαντικό</u>
<u>A- CV</u>	1,384E+010	1	1,384E+010	47,07	< 0,0001	
<u>B-DET</u>	4,714E+009	1	4,714E+009	16,03	0,0013	

C-CAV	2,017E+009	1	2,017E+009	6,86	0,0202	σημαντικό
Καμπυλότητα	8,095E+007	1	8,095E+007	0,28	0,6080	όχι σημαντικό
Υπόλοιπο	4,116E+009	14	2,940E+008			
Έλλειψη προσαρμογής	4,028E+009	12	3,357E+008	7,63	0,1216	όχι σημαντικό
Σφάλμα	8,798E+007	2	4,399E+007			
Διορθωμένα Σύνολα	2,477E+010	18				



Σχήμα 5.2: Διάγραμμα Pareto για τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό για την απόκριση σήμα MS Αζιθρομυκίνης. Η κάθετη μαύρη γραμμή στο διάγραμμα ορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ενώ η κόκκινη σε επίπεδο εμπιστοσύνης 97.5%.

Στην Εικόνα 5.3 απεικονίζεται το διάγραμμα κανονικής πιθανότητας για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης. Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζονται οι επιδράσεις πάνω στη γραμμή που θεωρούνται αμελητέες και εκτός αυτής αυτές που είναι σημαντικές. Συγκεκριμένα ο παράγοντας C ασκεί αρνητική επίδραση του στην απόκριση, καθώς βρίσκεται αριστερά της γραμμής, ενώ οι παράγοντες A και B, που βρίσκονται δεξιά της γραμμής, ασκούν θετική επίδραση σε αυτήν. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από το διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5.4. Το τελευταίο διάγραμμα υπδηλώνει τους παράγοντες που ασκούν επίδραση στην απόκριση, χωρίς όμως να προσδιορίζει αν αυτή είναι θετική ή αρνητική.

Design-Expert® Software
Azith

▲ Error from replicates

Shapiro-Wilk test

W-value = 0.945

p-value = 0.567

A: Cone Voltage

B: Desolv. Temp

C: Capillary Volt

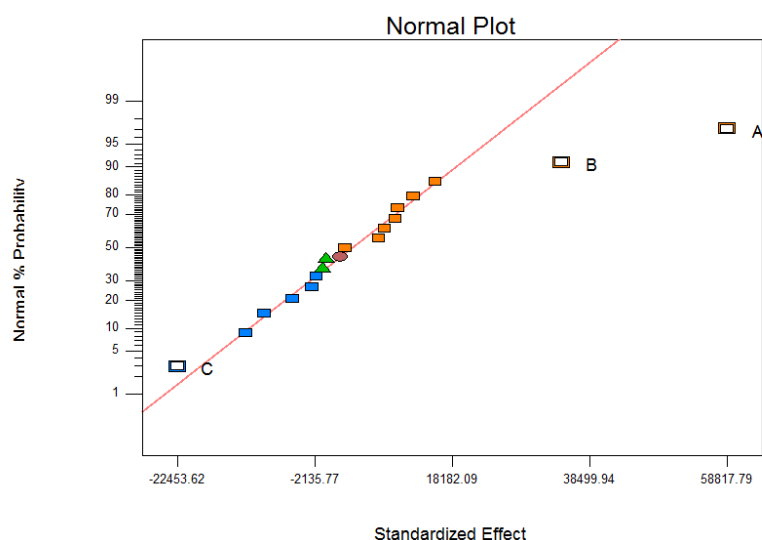
D: Extractor Volt

E: Dwell time

F: Desolv. Gas

■ Positive Effects

■ Negative Effects



Σχήμα 5.3: Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης

Design-Expert® Software
Azith

▲ Error from replicates

Shapiro-Wilk test

W-value = 0.945

p-value = 0.567

A: Cone Voltage

B: Desolv. Temp

C: Capillary Volt

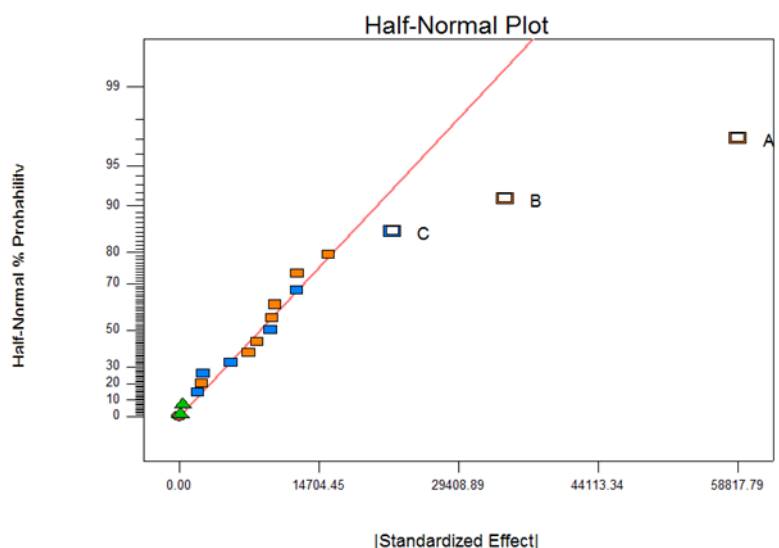
D: Extractor Volt

E: Dwell time

F: Desolv. Gas

■ Positive Effects

■ Negative Effects



Σχήμα 5.4: Διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία για τις υπόλοιπες αποκρίσεις παρατηρήθηκε ότι, οι τιμές p για κάθε μοντέλο μεταβλητής απόκρισης δείχνουν ότι και τα τέσσερα μοντέλα είναι σημαντικά. Επίσης, οι παράγοντες που κρίθηκαν σημαντικοί σε κάθε μεταβλητή απόκρισης απεικονίζονται στον Πίνακα 5.6 για κάθε απόκριση. Συνολικά οι σημαντικοί παράγοντες που κρίθηκαν σημαντικοί είναι οι CV, DET, CAV και DGF.

Πίνακας 5.6: Οι σημαντικοί παράγοντες για κάθε μεταβλητής απόκρισης (σημειώνονται με √)

<i>Παράμετροι</i>	<i>Αποκρίσεις</i>			
	<i>Ροξιθρομυκίνη</i>	<i>Αζιθρομυκίνη</i>	<i>Κλαριθρομυκίνη</i>	<i>Ερυθρομυκίνη</i>
<i>A-CV</i>		√	√	√
<i>B-DET</i>		√		
<i>C-CAV</i>	√	√		√
<i>D-EV</i>				
<i>E-DET</i>				
<i>H-DGF</i>	√			√

Παρατηρώντας τους σημαντικούς παράγοντες για κάθε μεταβλητή απόκρισης (σήμα MS κάθε αναλύτη), όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6 και τα σήματα MS που επιτεύχθηκαν για κάθε αναλύτη στα 19 πειράματα του συγκεκριμένου κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού (Πίνακας 5.4) μπορούν να προκύψουν κάποια εύλογα συμπεράσματα. Ο αναλύτης κλαριθρομυκίνης επηρεάζεται σημαντικά μόνο από τον παράγοντα CV, ενώ εμφάνισε τις υψηλότερες αποκρίσεις. Να αναφερθεί ότι οι παράγοντες CV και CAV κρίθηκαν σημαντικοί για την πλειοψηφία των αναλυτών. Όσον αφορά τις αποκρίσεις της ροξιθρομυκίνης, που και αυτές ήταν ιδιαίτερα υψηλές, επηρεάζονται σημαντικά από δυο παράγοντες, τους CAV και DGF, σε αντίθεση με τις αποκρίσεις της ερυθρομυκίνης και αζιθρομυκίνης, που εμφάνισαν χαμηλές αποκρίσεις και επηρεάζονται σημαντικά από τρεις παράγοντες. Τέλος, ο παράγοντας DET αποδείχθηκε σημαντικός μόνο για τον αναλύτη αζιθρομυκίνη, ο οποίος και εμφάνισε τις χαμηλότερες αποκρίσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ (CENTRAL COMPOSITE DESIGN, CCD)

6.1 Εφαρμογή CCI σχεδιασμού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων κλασματικών παραγοντικών σχεδιασμών, το επόμενο βήμα ήταν να βελτιστοποιηθεί η αναλυτική μέθοδος, μέσω της εύρεσης των βέλτιστων τιμών για τους εναπομείναντες 5 παράγοντες με την χρησιμοποίηση ενός CCD. Ο CCD ανήκει στους πειραματικούς σχεδιασμούς επιφανειών απόκρισης και επιτρέπει τη βελτιστοποίηση μιας ή περισσότερων αποκρίσεων. Οι παράγοντες αυτοί ήταν οι 4 παράγοντες, που κρίθηκαν σημαντικοί με την εφαρμογή του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 6 παραγόντων, και τον παράγοντα CEN, η σημαντική επίδραση του οποίου έγινε ορατή στην πρώτη προσπάθεια σάρωσης των φασματομετρικών παραμέτρων. Τα επίπεδα των παραγόντων αυτών παρέμειναν ίδια, όπως τέθηκαν στην εφαρμογή των πειραματικών σχεδιασμών σάρωσης και περιγράφονται στον Πίνακα 6.1. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε ένας CCI σχεδιασμός, ο οποίος περιείχε συνολικά 45 πειράματα με 3 δοκιμές στα κεντρικά σημεία (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.1: Εύρος τιμών παραμέτρων CCI

Παράμετροι	Επίπεδα			Κεντρικό σημείο ($\alpha = 0,5$)	
	Χαμηλό	Κεντρικό	Υψηλό	- α	+ α
	(-1)	(0)	(+1)		
(x_1) - CV (V)	20	40	60	30	50
(x_2) - DGF (L/h)	300	450	600	375	525
(x_3) - DET (C)	400	500	600	450	550
(x_4) - CAV (kV)	2,5	3,5	4,5	3	4
(x_5) - CEN (V)	20	40	60	30	50

Πίνακας 6.2: Ο σχεδιασμός των πειραμάτων και οι αποκρίσεις με βάση τον CCI σχεδιασμό

Πείραμα	Παράγοντες					Αποκρίσεις			
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	Εμβαδό Rox	Εμβαδό Azith	Εμβαδό Clar	Εμβαδό Eryth
1	0	0	-α	0	0	461.326	49.338	715.330	198.509
2	-1	-1	+1	-1	-1	57.626	1.326	382.079	78.647
3	-1	-1	-1	-1	-1	40.969	1.102	272.485	54.958
4	0	0	0	+α	0	495.613	60.405	758.351	204.323
5	+1	-1	+1	+1	-1	61.941	2.037	291.879	55.529
6	+1	-1	-1	+1	+1	118.439	65.649	94.500	23.323
7	+1	-1	-1	+1	-1	47.408	1.243	243.129	41.470
8	+1	-1	-1	-1	-1	64.587	1.893	332.962	59.197
9	+1	-1	-1	-1	+1	162.659	88.747	130.210	31.818
10	0	0	0	0	-α	350.256	86.051	418.366	113.114
11	0	+α	0	0	0	530.734	70.169	832.442	218.736
12	+1	+1	+1	-1	+1	103.189	153.158	87.121	17.872
13	0	0	0	0	0	546.555	76.671	824.898	217.683
14	-1	+1	+1	-1	-1	49.826	1.980	343.025	63.256
15	0	0	+α	0	0	580.973	82.518	878.369	230.453
16	+1	+1	-1	-1	+1	130.500	116.220	113.057	25.240
17	+1	+1	-1	+1	+1	101.680	72.798	85.433	18.976
18	-1	-1	-1	+1	-1	30.480	817	223.462	44.091
19	0	0	0	0	0	539.870	65.562	833.735	223.217
20	+1	+1	+1	-1	-1	52.061	4.057	223.638	40.351

21	-1	+1	-1	+1	-1	32.696	955	236.195	45.934
22	0	0	0	$-\alpha$	0	587.613	71.377	896.697	241.066
23	$-\alpha$	0	0	0	0	462.044	56.979	708.370	193.975
24	$+\alpha$	0	0	0	0	527.573	64.370	770.089	191.265
25	0	0	0	0	$-\alpha$	389.717	17.613	1.022.803	214.166
26	-1	-1	-1	-1	+1	117.795	36.826	106.244	242.050
27	-1	+1	+1	+1	+1	96.560	44.110	99.304	30.140
28	-1	+1	-1	-1	+1	110.270	49.114	108.696	27.445
29	-1	-1	+1	-1	+1	154.915	48.118	143.570	30.906
30	-1	-1	+1	+1	+1	118.003	37.628	107.412	41.295
31	-1	+1	0	+1	+1	82.957	32.797	82.990	30.982
32	0	0	0	0	0	517.669	52.084	795.250	22.876
33	-1	+1	-1	-1	-1	41.953	1.129	303.304	60.059
34	-1	+1	+1	-1	+1	109.034	61.826	120.030	31.519
35	-1	-1	-1	+1	+1	85.822	20.615	76.448	21.865
36	-1	-1	+1	+1	-1	433.41	853	294.633	58.193
37	+1	-1	+1	+1	+1	145.116	75.528	113.764	27.271
38	+1	-1	+1	-1	+1	185.706	11.534	151.612	36.184
39	+1	+1	+1	+1	+1	85.712	95.233	67.428	14.539
40	+1	-1	+1	-1	-1	84.084	2.672	400.648	72.289
41	+1	+1	-1	+1	-1	45.544	1.872	229.850	37.726
42	0	$-\alpha$	0	0	0	524.390	54.135	785.273	21.2526
43	+1	+1	+1	+1	-1	44.323	2.453	193.788	32.616
44	+1	+1	-1	-1	-1	58.870	2.600	295.377	52.750
45	-1	+1	+1	+1	-1	40.611	1.274	279.914	52.902

6.2 Ανάλυση μοντέλου ανά απόκριση

Στους Πίνακες 6.4 έως 6.7 απεικονίζονται οι υπολογισμοί που πραγματοποίησε το λογισμικό προκειμένου να προσαρμόσει όλα τα πολυωνυμικά μοντέλα στις επιλεγμένες αποκρίσεις. Παρατηρείται ότι το στατιστικά σημαντικό (significant) μοντέλο που εντοπίζεται και προτείνεται είναι το τετραγωνικό – (δευτεροβάθμιο) και για τις τέσσερις αποκρίσεις του σχεδιασμού. Αντίθετα ένα κυβικό μοντέλο δεν μπορεί να υποστηριχθεί από τον κεντρικό σχεδιασμό και σημειώνεται ως «aliased» (αλλοιωμένο).

Πίνακας 6.4 : Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης

	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Εμβαδό αζιθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο εναντι Συνόλου	8,444E+010	1	8,444E+010			
Γραμμικό ένταντι Μέσου	4,850E+010	5	9,701E+009	20.72	<0,0001	
2FI έναντι Γραμμικού	9,407E+009	10	9,407E+008	3,08	0,0086	
Τετραγωνικό έναντι 2FI	<u>6,723E+009</u>	<u>5</u>	<u>1,346E+009</u>	<u>15,25</u>	<u><0,0001</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	1,709E+009	15	1,139E+008	2,50	0,0843	αλλοιωμένο
Υπόλοιπο	4,107E+008	9	4,564E+007			
Σύνολο	1,512E+011	45	3,360E+009			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	1,796E+010	37	4,853E+008	3,20	0,2664	
2FI	8,548E+009	27	3,166E+008	2,09	0,3753	
Τετραγωνικό	<u>1,816E+009</u>	<u>22</u>	<u>8,255E+007</u>	<u>0,54</u>	<u>0,8170</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	1,075E+008	7	1,536E+007	0,10	0,9908	αλλοιωμένο
Σφάλμα	3,032E+008	2	1,516E+008			
Περίληψη στατιστικών μοντέλου						
	Τυπική Απόκλιση	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²	PRESS	
Πηγή						
Γραμμικό	21636,98	0,7265	0,6915	0,6360	2,430E+010	
2FI	17470,71	0,8674	0,7988	0,7519	1,657E+010	
Τετραγωνικό	<u>9397,12</u>	<u>0,9683</u>	<u>0,9418</u>	<u>0,8907</u>	<u>7,295E+009</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	6755,55	0,9938	0,9699	0,8917	7,229E+009	αλλοιωμένο

Πίνακας 6.5 : Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση εμβαδό ροξιθρομυκίνης

	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Εμβαδό ροξιθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο εναντι Συνόλου	1,889E+012	1	1,889E+012			
Γραμμικό έναντι Μέσου	4,920E+010	5	9,839E+009	0,23	0,9471	
2FI έναντι Γραμμικού	4,691E+009	10	4,691E+008	8,181E-003	1,000	
Τετραγωνικό έναντι 2FI	<u>1,646E+012</u>	<u>5</u>	<u>3,293E+011</u>	<u>477,78</u>	<u><0,0001</u>	προτεινόμενο
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	1,495E+010	15	9,965E+008	5,63	0,0064	αλλοιωμένο
Υπόλοιπο	1,594E+009	9	1,771E+008			
Σύνολο	3,606E+012	45	8,012E+010			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	1,667E+012	37	4,506E+010	197,07	0,0051	
2FI	1,663E+012	27	6,158E+010	269,29	0,0037	
Τετραγωνικό	<u>1,608E+010</u>	<u>22</u>	<u>7,311E+008</u>	<u>3,20</u>	<u>0,2654</u>	προτεινόμενο
Κυβικό	1,137E+009	7	1,624E+008	0,71	0,6938	αλλοιωμένο
Σφάλμα	4,573E+008	2	2,287E+008			
Πέριληψη στατιστικών μοντέλου						
	Τυπική Απόκλιση	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²	PRESS	
Πηγή						
Γραμμικό	2,068E+005	0,0287	-0,0959	-0,1412	1,959E+012	
2FI	2,395E+005	0,0314	-0,4696	-0,7729	3,044E+012	
Τετραγωνικός	<u>26253,06</u>	<u>0,9904</u>	<u>0,9823</u>	<u>0,9658</u>	<u>5,875E+010</u>	προτεινόμενο
Κυβικό	13308,59	0,9991	0,9955	0,7379	4,501E+011	αλλοιωμένο

Πίνακας 6.6: Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση εμβαδό κλαριθρομυκίνης

	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Εμβαδό κλαριθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο εναντι Συνόλου	6,013E+012	1	6,031E+012			
Γραμμικό έναντι Μέσου	3,436E+011	5	6,872E+010	0,78	0,5726	
2FI έναντι Γραμμικού	2,256E+010	10	2,256E+009	0,019	1,0000	
<u>Τετραγωνικό έναντι 2FI</u>	<u>3,270E+012</u>	<u>5</u>	<u>6,540E+011</u>	<u>98,58</u>	<u><0,0001</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	1,575E+011	15	1,050E+010	55,65	<0,0001	αλλοιωμένο
Υπόλοιπο	1,698E+009	9	1,887E+008			
Σύνολο	9,826E+012	45	2,184E+011			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	3,415E+012	37	9,327E+010	229,52	0,0043	
2FI	3,428E+012	27	1,270E+011	312,47	0,0032	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>1,584E+011</u>	<u>22</u>	<u>7,201E+009</u>	<u>17,72</u>	<u>0,0547</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	8,857E+008	7	1,265E+008	0,31	0,8976	αλλοιωμένο
Σφάλμα	8,127E+008	2	4,064E+008			
Περίληψη στατιστικών μοντέλου						
Πηγή	Std. Dev.	R ²	Adjusted R-Squared	Pred. R ²	PRESS	
Γραμμικό	2,975E+005	0,0905	-0,0261	-0,0686	4,056E+012	
2FI	3,439E+005	0,0965	-0,3709	-0,6462	6,248E+012	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>81451,46</u>	<u>0,9580</u>	<u>0,9231</u>	<u>0,8433</u>	<u>5,946E+011</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	13737,21	0,9996	0,9978	0,9766	8,870E+010	αλλοιωμένο

Πίνακας 6.7: Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση εμβαδό ερυθρομυκίνης

	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Εμβαδό ερυθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο εναντι Συνόλου	3,526E+011	1	3,526E+011			
Γραμμικό έναντι Μέσου	9,416E+009	5	1,883E+009	0,27	0,9268	
2FI έναντι Γραμμικού	9,205E+008	10	9,205E+007	9,848E-003	1,0000	
<u>Τετραγωνικό έναντι 2FI</u>	<u>2,633E+011</u>	<u>5</u>	<u>5,265E+010</u>	<u>161,92</u>	<u><0,0001</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	7,687E+009	15	5,125E+008	39,29	<0,0001	αλλοιωμένο
Υπόλοιπο	1,174E+008	9	1,304E+007			
Σύνολο	6,340E+011	45	1,409E+010			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	2,720E+011	37	7,350E+009	365,74	0,0027	
2FI	2,710E+011	27	1,004E+010	499,51	0,0020	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>7,764E+009</u>	<u>22</u>	<u>3,529E+008</u>	<u>17,56</u>	<u>0,0552</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	7,720E+007	7	1,103E+007	0,55	0,7694	αλλοιωμένο
Σφάλμα	4,019E+007	2	2,010E+007			
Περίληψη στατιστικών μοντέλου	Τυπική Απόκλιση	R²	Adjusted R²	Pred. R²	PRESS	
Πήγή						
Γραμμικό	83511,37	0.0335	-0,0905	-0,1353	3,195E+011	
2FI	96681,36	0.0367	-0,4615	-0,7599	4,953E+011	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>18032,94</u>	<u>0.9723</u>	<u>0,9492</u>	<u>0,8969</u>	<u>2,901E+010</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	3611,62	0.9996	0,9980	0,9127	2,455E+010	αλλοιωμένο

6.3 ANOVA

Τα αποτελέσματα που λάβαμε με την ANOVA για το δευτεροβάθμιο μοντέλο για κάθε απόκριση και για τις τέσσερις μεταβλητές απόκρισης φαίνονται στους Πίνακες 6.8 έως 6.11. Οι τιμές F του μοντέλου για όλες τις μεταβλητές απόκρισης υποδεικνύουν ότι το μοντέλο

είναι σημαντικό και ότι υπάρχει μόνο μια πιθανότητα 0,01% η μεγάλη τιμή F του μοντέλου να αποδίδεται στην ύπαρξη θορύβου.

Η «Έλλειψη προσαρμογής F τιμή» (Lack of Fit F value) για όλες τις μεταβλητές απόκρισης, όπως φαίνεται στους Πίνακες 6.8 έως 6.11, δεν είναι σημαντική, κάτι το οποίο και είναι επιθυμητό. Στην αντίθετη περίπτωση όπου η τιμή αυτή είναι σημαντική, υποδηλώνει ότι το πολυωνυμικό μοντέλο δεν προσαρμόζεται καλά σε όλα τα σημεία σχεδιασμού.

Πίνακας 6.8: ANOVA για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
ΑΠΟΚΡΙΣΗ : Εμβαδό αζιθρομυκίνης						
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
<u>Μοντέλο</u>	6,464E+010	20	3,232E+009	36,60	< 0,0001	σημαντικό
A-CV	6,646E+009	1	6,646E+009	75,26	< 0,0001	
B-DGF	6,846E+008	1	6,846E+008	7,75	0,0103	
C-DET	8,876E+008	1	8,876E+008	10,05	0,0041	
D-CAV	1,710E+009	1	1,710E+009	19,37	0,0002	
E-CEN	3,858E+010	1	3,858E+010	436,85	< 0,0001	
AB	7,610E+007	1	7,610E+007	0,86	0,3625	
AC	6,535E+007	1	6,535E+007	0,74	0,3982	
AD	3,481E+008	1	3,481E+008	3,94	0,0586	
AE	6,113E+009	1	6,113E+009	69,22	< 0,0001	
BC	1,245E+007	1	1,245E+007	0,14	0,7106	
BD	6,875E+007	1	6,875E+007	0,78	0,3863	
BE	5,478E+008	1	5,478E+008	6,20	0,0201	
CD	2,540E+007	1	2,540E+007	0,29	0,5967	
CE	6,405E+008	1	6,405E+008	7,25	0,0127	
DE	1,509E+009	1	1,509E+009	17,09	0,0004	
A^2	9,950E+006	1	9,950E+006	0,11	0,7400	
B^2	6,710E+005	1	6,710E+005	7,598E-003	0,9313	
C^2	2,651E+007	1	2,651E+007	0,30	0,5888	

D^2	2,591E+007	1	2,591E+007	0,29	0,5930	
E^2	2,935E+008	1	2,935E+008	3,32	0,0808	
Υπόλοιπο	2,119E+009	24	8,831E+007			
Έλλειψη προσαρμογής	<u>1,816E+009</u>	<u>22</u>	<u>8,255E+007</u>	<u>0,54</u>	<u>0,8170</u>	<u>όχι σημαντικό</u>
Σφάλμα	3,032E+008	2	1,516E+008			
Διορθωμένα Σύνολα	6,676E+010	44				

Πίνακας 6.9: ANOVA για την απόκριση εμβαδό ροζιθρομυκίνης

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
	ΑΠΟΚΡΙΣΗ : Εμβαδό ροζιθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
<u>Μοντέλο</u>	<u>1,700E+012</u>	<u>20</u>	<u>8,502E+010</u>	<u>123,36</u>	<u>< 0,0001</u>	<u>σημαντικό</u>
A-CV	2,990E+009	1	2,990E+009	4,34	0,0481	
B-DGF	3,349E+009	1	3,349E+009	4,86	0,0373	
C-DET	1,479E+009	1	1,479E+009	2,15	0,1559	
D-CAV	4,666E+009	1	4,666E+009	6,77	0,0156	
E-CEN	3,671E+010	1	3,671E+010	53,27	< 0,0001	
AB	8,305E+008	1	8,305E+008	1,20	0,2832	
AC	2,792E+008	1	2,792E+008	0,41	0,5305	
AD	4,894E+007	1	4,894E+007	0,071	0,7921	
AE	4,124E+007	1	4,124E+007	0,060	0,8088	
BC	1,323E+009	1	1,323E+009	1,92	0,1787	
BD	2,655E+008	1	2,655E+008	0,39	0,5407	
BE	1,301E+009	1	1,301E+009	1,89	0,1822	
CD	1,477E+007	1	1,477E+007	0,021	0,8848	

CE	8,827E+006	1	8,827E+006	0,013	0,9108	
DE	5,793E+008	1	5,793E+008	0,84	0,3684	
A^2	7,998E+008	1	7,998E+008	1,16	0,2921	
B^2	5,517E+008	1	5,517E+008	0,80	0,3798	
C^2	1,783E+008	1	1,783E+008	0,26	0,6156	
D^2	2,088E+009	1	2,088E+009	3,03	0,0946	
E^2	5,088E+010	1	5,088E+010	73,82	< 0,0001	
Υπόλοιπο	1,654E+010	24	6,892E+008			
Έλλειψη προσαρμογής	<u>1,608E+010</u>	<u>22</u>	<u>7,311E+008</u>	<u>3,20</u>	<u>0,2654</u>	<u>όχι σημαντικό</u>
Σφάλμα	4,573E+008	2	2,287E+008			
Διορθωμένα Σύνολα	1,717E+012	44				

Πίνακας 6.10: ANOVA για την απόκριση εμβαδό κλαριθρομυκίνης

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
	RESPONSE : Εμβαδό κλαριθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μοντέλο	<u>3,636E+012</u>	<u>20</u>	<u>1,818E+011</u>	<u>27,40</u>	<u>< 0,0001</u>	<u>σημαντικό</u>
A-CV	2,750E+008	1	2,750E+008	0,041	0,8404	
B-DGF	6,864E+009	1	6,864E+009	1,03	0,3192	
C-DET	6,149E+009	1	6,149E+009	0,93	0,3453	
D-CAV	2,292E+010	1	2,292E+010	3,45	0,0754	
E-CEN	3,074E+011	1	3,074E+011	46,33	< 0,0001	
AB	5,782E+009	1	5,782E+009	0,87	0,3598	
AC	3,933E+009	1	3,933E+009	0,59	0,4488	
AD	4,000E+007	1	4,000E+007	6,030E-003	0,9387	

AE	4,671E+008	1	4,671E+008	0,070	0,7930	
BC	6,239E+009	1	6,239E+009	0,94	0,3419	
BD	7,531E+008	1	7,531E+008	0,11	0,7391	
BE	9,733E+008	1	9,733E+008	0,15	0,7051	
CD	5,505E+006	1	5,505E+006	8,298E-004	0,9773	
CE	1,014E+009	1	1,014E+009	0,15	0,6992	
DE	3,350E+009	1	3,350E+009	0,50	0,4842	
A^2	1,232E+010	1	1,232E+010	1,86	0,1857	
B^2	8,596E+005	1	8,596E+005	1,296E-004	0,9910	
C^2	3,963E+008	1	3,963E+008	0,060	0,8090	
D^2	8,166E+008	1	8,166E+008	0,12	0,7288	
E^2	1,973E+010	1	1,973E+010	2,97	0,0975	
Υπόλοιπο	1,592E+011	24	6,634E+009			
<u>Έλλειψη προσαρμογής</u>	<u>1,584E+011</u>	<u>22</u>	<u>7,201E+009</u>	<u>17,72</u>	<u>0,0547</u>	<u>όχι σημαντικό</u>
Σφάλμα	8,127E+008	2	4,064E+008			
Διορθωμένα Σύνολα	3,795E+012	44				

Πίνακας 6.11: ANOVA για την απόκριση εμβαδό ερυθρομυκίνης

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
	ΑΠΟΚΡΙΣΗ : Εμβαδό ερυθρομυκίνης					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
<u>Μοντέλο</u>	<u>2,736E+011</u>	<u>20</u>	<u>1,368E+010</u>	<u>42,07</u>	<u>< 0,0001</u>	<u>σημαντικό</u>
A-CV	3,674E+008	1	3,674E+008	1,13	0,2984	
B-DGF	5,135E+008	1	5,135E+008	1,58	0,2210	
C-DET	2,808E+008	1	2,808E+008	0,86	0,3620	
D-CAV	1,100E+009	1	1,100E+009	3,38	0,0782	
E-CEN	7,154E+009	1	7,154E+009	22,00	< 0,0001	
AB	2,088E+008	1	2,088E+008	0,64	0,4308	
AC	1,414E+008	1	1,414E+008	0,43	0,5160	
AD	1,569E+005	1	1,569E+005	4,826E-004	0,9827	
AE	1,846E+007	1	1,846E+007	0,057	0,8137	
BC	3,611E+008	1	3,611E+008	1,11	0,3025	
BD	3,375E+007	1	3,375E+007	0,10	0,7501	
BE	1,996E+007	1	1,996E+007	0,061	0,8064	
CD	1,475E+006	1	1,475E+006	4,537E-003	0,9469	
CE	3,968E+007	1	3,968E+007	0,12	0,7299	
DE	9,573E+007	1	9,573E+007	0,29	0,5924	
A^2	1,071E+009	1	1,071E+009	3,29	0,0821	
B^2	1,328E+007	1	1,328E+007	0,041	0,8416	
C^2	3,328E+006	1	3,328E+006	0,010	0,9203	
D^2	2,192E+008	1	2,192E+008	0,67	0,4197	
E^2	3,192E+009	1	3,192E+009	9,82	0,0045	
Υπόλοιπο	7,804E+009	24	3,252E+008			
<u>Έλλειψη προσαρμογής</u>	<u>7,764E+009</u>	<u>22</u>	<u>3,529E+008</u>	<u>17,56</u>	<u>0,0552</u>	<u>όχι σημαντικό</u>

Σφάλμα	4,019E+007	2	2,010E+007
Διορθωμένα Σύνολα	2,814E+011	44	

Όσον αφορά τους όρους του μοντέλου μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί ανάλογα με τις τιμές p . Συγκεκριμένα, όταν η τιμή αυτή είναι μικρότερη από 0,05, τότε αυτός ο παράγοντας θεωρείται σημαντικός. Στο Πίνακα 6.12 απεικονίζονται οι σημαντικοί παράμετροι για κάθε απόκριση, όπως προέκυψαν από τους Πίνακες 6.8-6.11. Σε συμφωνία με τον πρώτο κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό σάρωσης ο παράγοντας CEN κρίθηκε σημαντικός για όλες τις αποκρίσεις σημειώνοντας τιμές p κάτω από 0,0001, ενώ στην περίπτωση της κλαριθρομυκίνης και ροξιθρομυκίνης σημαντικός είναι και ο E^2 . Όλοι οι παράγοντες καθώς και αρκετές δευτεροβάθμιες αλληλεπιδράσεις αυτών κρίθηκαν σημαντικές για την αζιθρομυκίνη, η οποία και εμφανίζει τις χαμηλότερες τιμές απόκρισης. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η ερυθρομυκίνη επηρεάζεται μόνο από τον παράγοντα CEN, παρά τις σχετικά χαμηλές αποκρίσεις.

Πίνακας 6.12: Σημαντικοί όροι για κάθε απόκριση, όπως εξήχθησαν από τα αντίστοιχα μοντέλα

	Παράμετροι																		
Αποκρίσεις	A-CV	B-DGF	C-DET	D-CAV	E-CEN	AB	AC	AE	BC	BD	BE	CD	CE	DE	A ²	B ²	C ²	D ²	E ²
Rox	✓	✓		✓	✓														✓
Azith	✓	✓	✓	✓	✓			✓			✓		✓	✓					
Clar					✓														
Eryth					✓														✓

Όσον αφορά τους στατιστικούς συντελεστές προσδιορισμού R^2 , που αναφέρονται στον Πίνακα 6.13, παρουσιάζονται 3 διαφορετικοί συντελεστές. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 μετράει το κλάσμα της συνολικής μεταβλητότητας που εξηγείται από το μοντέλο, από το οποίο φαίνεται η καταλληλότητα προσαρμογής του μοντέλου. Ένα σημαντικό πρόβλημα με αυτό το δείκτη είναι ότι αυξάνεται όσο προστίθενται παράγοντες στο μοντέλο, ακόμα και αν αυτοί δεν είναι στατιστικά σημαντικοί. Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό οι τιμές του R^2 είναι πολύ ικανοποιητικές. Ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού R^2_{adj} είναι ένας στατιστικός δείκτης προσαρμοσμένος στο «μέγεθος» τους μοντέλου, δηλαδή στον αριθμό των παραγόντων. Στη πραγματικότητα ο R^2_{adj} μπορεί να μειωθεί αν μη σημαντικοί παράγοντες προστεθούν στο μοντέλο. Τέλος, ο συντελεστής προσδιορισμού πρόβλεψης (Prediction R^2) και για τις δύο αποκρίσεις υποδηλώνει ότι το μοντέλο έχει αυξημένη ικανότητα πρόβλεψης. Συγκεκριμένα ο Pred R^2 πρέπει να είναι εντός του 0,20 του R^2_{adj} , το οποίο και ισχύει στο συγκεκριμένο μοντέλο. Τέλος, η επάρκεια πιστότητας (Adeq Precision) βασίζεται στον υπολογισμό του λόγου σήμα προς θόρυβο και λόγος πάνω από 4 είναι επιθυμητός. Στην περίπτωση αυτού του πειραματικού σχεδιασμού παρατηρείται επαρκές σήμα για όλες τις μεταβλητές απόκρισης, δείχνοντας ότι τα μοντέλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να πλοηγηθούν στο χώρο του σχεδιασμού.

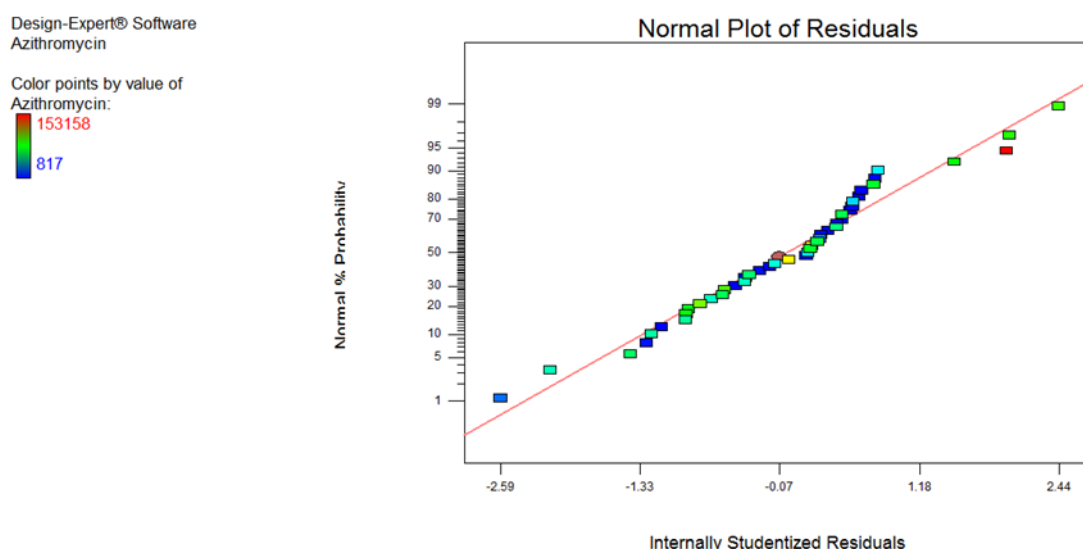
Πίνακας 6.13: Παράμετροι αξιολόγησης

	Αποκρίσεις			
	Εμβαδό Αζιθρομυκίνης	Εμβαδό Ροξιθρομυκίνης	Εμβαδό Κλαριθρομυκίνης	Εμβαδό Ερυθρομυκίνης
Τυπική απόκλιση.	9.397,12	26253,06	81451,46	18032,94
Μέσος Όρος	43.317,24	2,049E+005	3,661E+005	88521,76
Συντελεστής Διακύμανσης %	21,69	12,81	22,25	20,37
PRESS	7,295E+009	5,875E+010	5,946E+011	2,901E+010
R-Squared	0,97	0,99	0,96	0,97
Adj R-Squared	0,94	0,99	0,92	0,95
Pred R-Squared	0,89	0,97	0,84	0,90
Επάρκεια Πιστότητας	22,34	29,97	14,44	17,56

6.4 Διαγράμματα Αξιολόγησης

Τα διαγράμματα όπως προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων μέσω του προγράμματος, δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τα διάγραμμα όπως ελήφθησαν για όλες τις αποκρίσεις του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού, εμφάνισαν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Χαρακτηριστικά θα γίνει αναφορά σε κάποια διαγράμματα για την απόκριση Εμβαδό αζιθρομυκίνης, όπως περιγράφονται παρακάτω:

- **Διάγραμμα κανονικής κατανομής υπολοίπων (Normal plot of residuals):** Ένα μοντέλο δεν είναι πάντα κατάλληλο για την ικανοποιητική περιγραφή των δεδομένων. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών δείχνουν ικανοποιητική συμφωνία με τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές, χρησιμοποιούνται τα υπόλοιπα (πειραματική- θεωρητική τιμή). Όταν τα υπόλοιπα ακολουθούν κανονική κατανομή και δεν υπάρχουν έκτροπες τιμές >95%, τότε το μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1 για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης, τα υπόλοιπα των εξαρτημένων μεταβλητών από τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές παρουσιάζουν κανονική κατανομή, όπως φαίνεται από την τοποθέτησή τους σε ευθεία γραμμή.

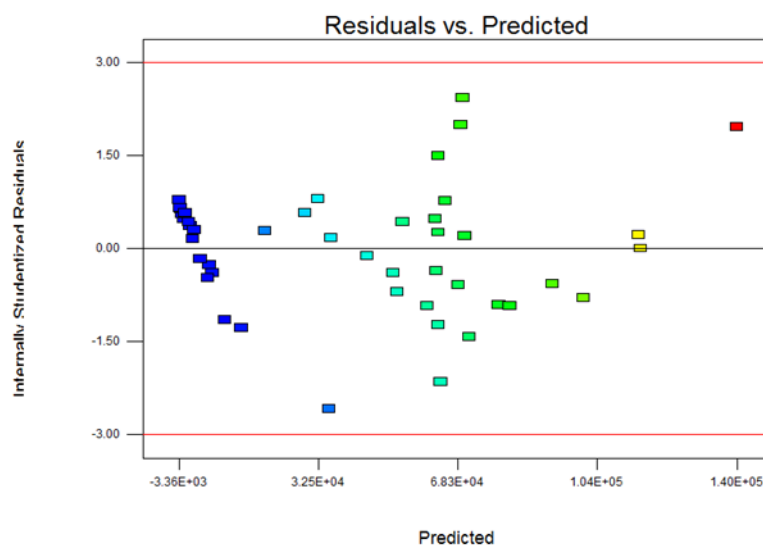


Σχήμα 6.1: Διάγραμμα κανονικής κατανομής των υπολοίπων των πειραματικών μετρήσεων που προέκυψαν από τον CCI σχεδιασμό για το εμβαδό αζιθρομυκίνης

- **Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (Residuals vs Predicted):** Παρουσιάζει την ομοιογένεια στην διακύμανση των τιμών σε όλο το εύρος των τιμών. Αν με αύξηση της απόκρισης παρατηρείται συστηματική μεταβολή (αύξηση ή μείωση) των σφαλμάτων τότε υπάρχει πρόβλημα ετεροσκεδαστικότητας των υπολοίπων. Σε αντίθετη περίπτωση παρατηρείται ομοσκεδαστικότητα, όπως και στην περίπτωση του του συγκεκριμένου σχεδιασμού CCI για την απόκριση εμβαδό αζιθρομυκίνης (Σχήμα 6.2)

Design-Expert® Software
Azithromycin

Color points by value of
Azithromycin:

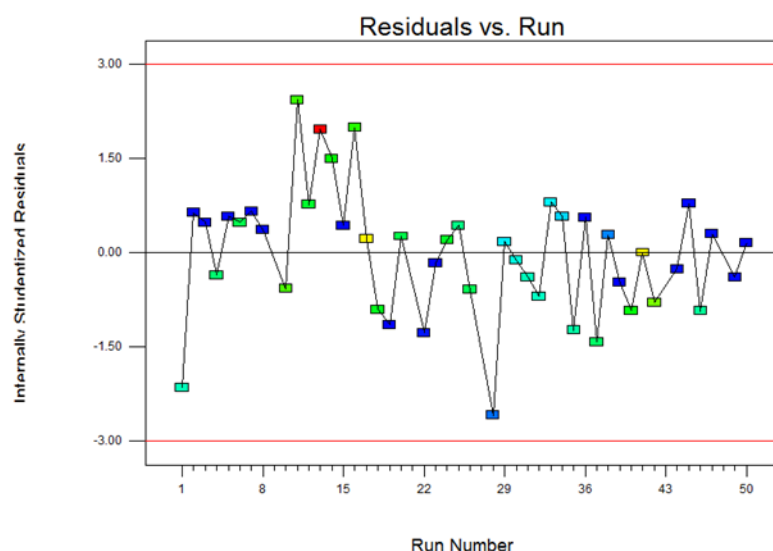


Σχήμα 6.2: Αναπαράσταση των υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων τιμών για τις πειραματικές μετρήσεις του CCI σχεδιασμού για το εμβασό αζιθρομυκίνης

- Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων (Residuals vs Run): Παρουσιάζει τη συμπεριφορά των υπολοίπων σε σχέση με τη σειρά των πειραμάτων. Η παρουσία ενός μοτίβου κρίνεται προβληματική, ενώ επιθυμητή είναι η τυχαιότητα. Από το διάγραμμα για την απόκριση εμβασό αζιθρομυκίνης στο Σχήμα 6.3 συμπεραίνεται ότι η σειρά διεξαγωγής των πειραμάτων δεν επηρέασε την υπό μελέτη απόκριση και τα υπόλοιπα παρουσιάζουν τυχαιότητα.

Design-Expert® Software
Azithromycin

Color points by value of
Azithromycin:

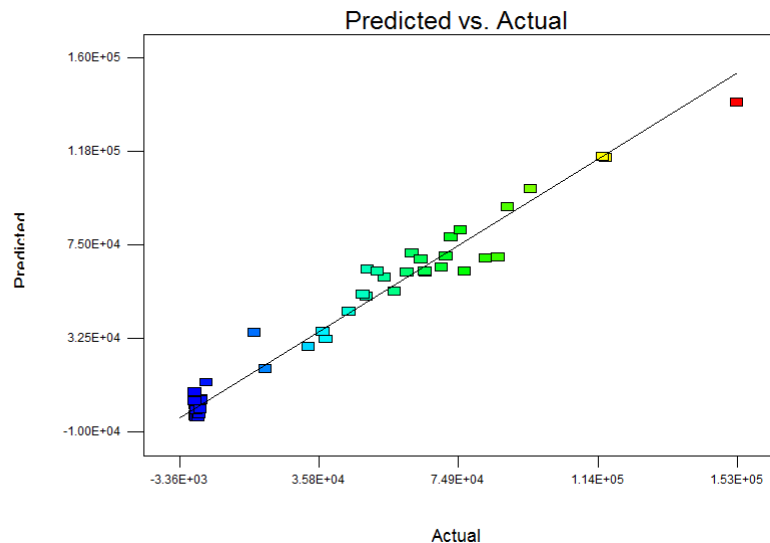


Σχήμα 6.3: Διάγραμμα των υπολοίπων πραγματικών - προβλεπόμενων τιμών ως προς τη σειρά των πειραματικών μετρήσεων του CCI σχεδιασμού για το εμβασό αζιθρομυκίνης

- Διάγραμμα των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών (Predicted vs Actual): Το διάγραμμα αυτό δείχνει κατά πόσο οι προβλεπόμενες τιμές που προκύπτουν από το μοντέλο που χρησιμοποιείται ταυτίζονται με τις πραγματικές. Τα σημεία του διαγράμματος στο Σχήμα 6.4, για την απόκριση εμβασό αζιθρομυκίνης, βρίσκονται σε μια ευθεία γραμμή αποδεικνύοντας πως υπάρχει καλή συσχέτιση των πραγματικών τιμών και των προβλέψεων του μοντέλου για όλη την έκταση των αποκρίσεων. Το διάγραμμα αυτό υποδεικνύει την αυξημένη ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

Design-Expert® Software
Azithromycin

Color points by value of
Azithromycin:



Σχήμα 6.4: Αναπαράσταση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών του για τις πειραματικές μετρήσεις του σχεδιασμού ICC για το εμβασό αζιθρομυκίνη

6.5 Μεθοδολογία Απόκρισης Επιφάνειας (RSM)

Η RSM αποτελεί απαραίτητη μεθοδολογία στον πειραματικό σχεδιασμό. Στόχος της μεθοδολογίας αυτής είναι η καλύτερη περιγραφή της απόκρισης και η εύρεση της βέλτιστης τιμής της. Είναι αδύνατη η ταυτόχρονη απεικόνιση άνω των δυο παραγόντων, καθώς στον τρισδιάστατο χώρο και με δεσμευμένο τον έναν άξονα για την παράσταση της απόκρισης, το πλήθος των διαθέσιμων για αναπαράσταση μεταβλητών είναι δύο. Στην περίπτωση αυτή που οι μεταβλητές είναι πάνω από 2, όπως στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού, η γραφική αναπαράσταση γίνεται για δυο από αυτές, διατηρώντας τις υπόλοιπες σε σταθερές τιμές. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά οι επιφάνειες απόκρισης για την απόκριση εμβασό αζιθρομυκίνη (Εικόνες 6.1 -6.4).

Design-Expert® Software

Azithromycin



X1 = A: Cone Voltage

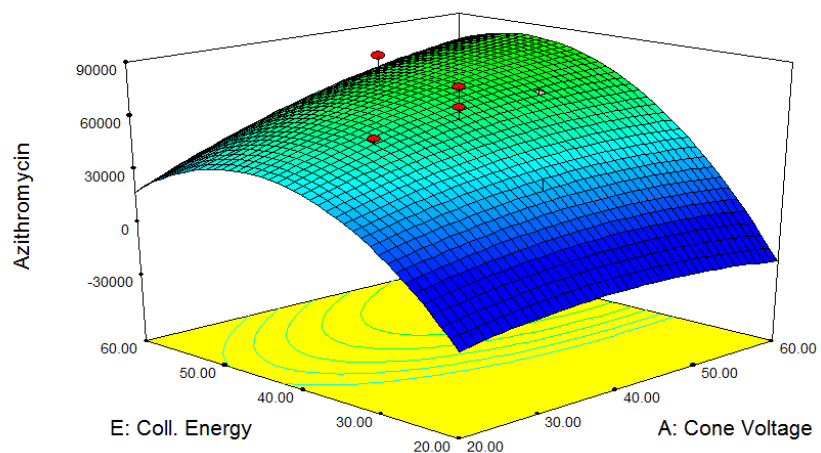
X2 = E: Coll. Energy

Actual Factors

B: Desolvation gas = 450.00

C: Desolvation Temp = 500.00

D: Capillary Voltage = 3.50



Εικόνα 6.1: Επιφάνεια απόκρισης όπου αναπαρίσταται η επίδραση του CEN και CV στο εμβασό της Αζιθρομυκίνη, διατηρώντας τα επίπεδα των άλλων παραγόντων στην κεντρική τους τιμή

Design-Expert® Software

Azithromycin



X1 = B: Desolvation gas

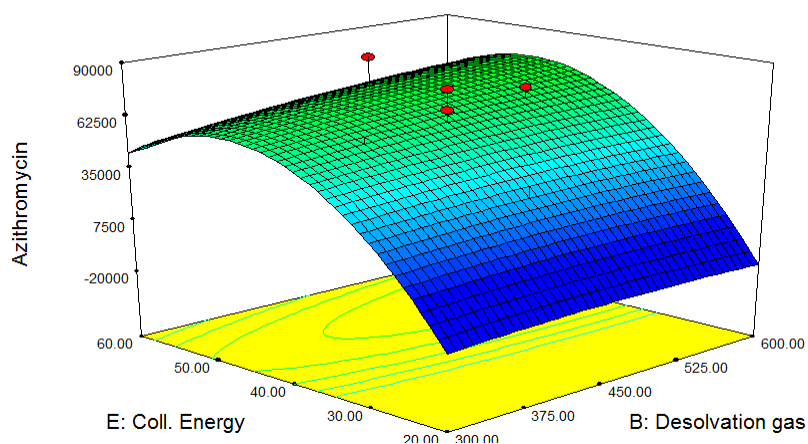
X2 = E: Coll. Energy

Actual Factors

A: Cone Voltage = 40.00

C: Desolvation Temp = 500.00

D: Capillary Voltage = 3.50



Εικόνα 6.2: Επιφάνεια απόκρισης όπου αναπαρίσταται η επίδραση του CEN και DGF στο εμβασό της Αζιθρομυκίνης, διατηρώντας τα επίπεδα των άλλων παραγόντων στην κεντρική τους τιμή

Design-Expert® Software

Azithromycin



X1 = C: Desolvation Temp

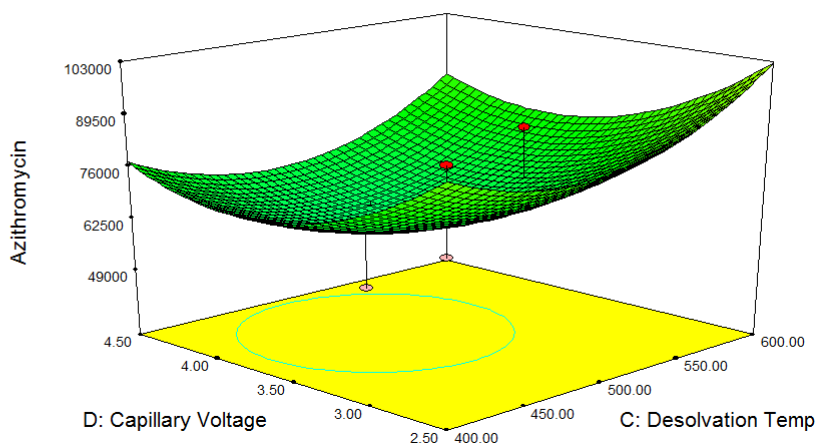
X2 = D: Capillary Voltage

Actual Factors

A: Cone Voltage = 40.00

B: Desolvation gas = 450.00

E: Coll. Energy = 40.00



Εικόνα 6.3: Επιφάνεια απόκρισης όπου αναπαρίσταται η επίδραση του CAV και DET στο εμβασό της Αζιθρομυκίνης, διατηρώντας τα επίπεδα των άλλων παραγόντων στην κεντρική τους τιμή

Azithromycin

153158

817

X1 = B: Desolvation gas

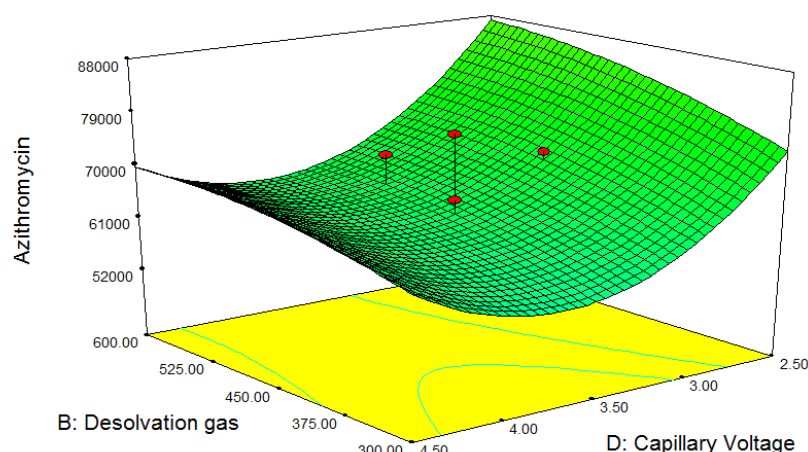
X2 = D: Capillary Voltage

Actual Factors

A: Cone Voltage = 40.00

C: Desolvation Temp = 500.00

E: Coll. Energy = 40.00



Εικόνα 6.4: Επιφάνεια απόκρισης όπου αναπαρίσταται η επίδραση του DGF και CAV στο εμβαδό της Αζιθρομυκίνης, διατηρώντας τα επίπεδα των άλλων παραγόντων στην κεντρική τους τιμή

6.7 Εύρεση τιμών παραγόντων που βελτιστοποιούν τις αποκρίσεις

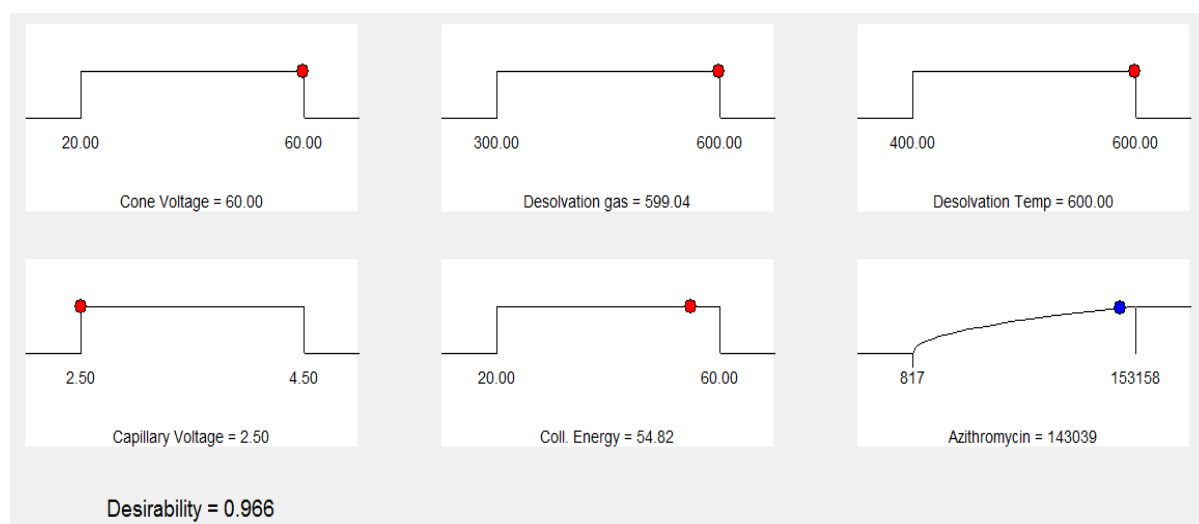
Βασικός σκοπός του παρόντος σχεδιασμού είναι η βελτιστοποίηση της απόκρισης κάθε αναλύτη, εκφραζομένης μέσω του εμβαδού του. Θα επιχειρηθεί βελτιστοποίηση με δύο τρόπους: α) βελτιστοποίηση της απόκρισης για κάθε αναλύτη χωριστά και β) βελτιστοποίηση των αποκρίσεων όλων των αναλυτών ταυτόχρονα. Στην τελευταία περίπτωση επιδιώκεται η ανάπτυξη μιας κοινής μεθόδου UHPLC-MS/MS για ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των αναλυτών, ενώ στην πρώτη η ανάπτυξη 4 διαφορετικών μεθόδων για την ποσοτικοποίηση κάθε αναλύτη χωριστά.

6.7.1 Βελτιστοποίηση αναλυτικού σήματος ξεχωριστά

Στο στάδιο αυτό επιχειρήθηκε η ξεχωριστή βελτιστοποίηση του εμβαδού κάθε αναλύτη. Στον Πίνακα 6.14 απεικονίζονται οι στόχοι, τα βάρη και οι σημαντικότητες των παραμέτρων και των αποκρίσεων ώστε να επιτευχθεί η αριθμητική βελτιστοποίηση για το σήμα MS αζιθρομυκίνης. Στοχεύοντας σε τιμή επιθυμητότητας που να αγγίζει το 1 και μεγιστοποίηση του εμβαδού της αζιθρομυκίνης τίθενται στο λογισμικό του προγράμματος όλες οι παράγοντες σε εύρος και ως στόχος αποκλειστικά η μεγιστοποίηση του εμβαδού της αζιθρομυκίνης και όχι των άλλων αναλυτών. Έτσι προέκυψαν οι συνδυασμοί των τιμών των παραμέτρων με τη μέγιστη επιθυμητότητα. Από αυτές επιλέχθηκε η πρώτη λύση με την οποία επιτυγχάνεται μέγιστη επιθυμητότητα και σήμα του αναλύτη της αζιθρομυκίνης, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6.5.

Πίνακας 6.14: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβασό αζιθρομυκίνης

Όνομα		Κατώτερο ριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο β άρος	Ανώτερο β ρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι σε εύρος	300	600	1	1	3	
DET	Είναι σε εύρος	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε εύρος	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Azith	Μεγιστοποίηση	817	153.158	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Azith	Επιθυμητότητα
<u>1</u>	<u>60</u>	<u>599,54</u>	<u>600</u>	<u>2,50</u>	<u>54,82</u>	<u>143.039</u>	<u>0,966</u>
2	59,99	598,92	599,95	2,50	55,13	142.995	0,966
3	59,60	599,99	599,91	2,50	54,27	142.680	0,965
4	60,00	598,41	598,62	2,50	52,48	141.972	0,963
5	59,99	598,92	599,95	2,50	55,13	142.995	0,966
6	60,00	599,74	600,00	2,50	58,22	141.736	0,962



Εικόνα 6.5: Ράμπες που παρουσιάζουν τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για τη μεγιστοποίηση της απόκρισης εμβασό αζιθρομυκίνης

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις άλλες τρεις μεταβλητές απόκρισης, όπως απεικονίζονται στους Πίνακες 6.15 έως 6.17, όπου απεικονίζονται οι ρυθμίσεις που τέθηκαν στο πρόγραμμα και οι συνδυασμοί των παραμέτρων για την βελτιστοποίηση της κάθε μεταβλητής. Όπως και στην περίπτωση της αζιθρομυκίνης έτσι και κατά τη βελτιστοποίηση των άλλων αποκρίσεων εντοπίστηκαν πολλές λύσεις με επιθυμητότητα που ήταν ίση ή προσέγγιζε κατά πολύ την τιμή 1. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε η λύση, με την οποία επιτυγχάνεται το μέγιστο σήμα. Να σημειωθεί ότι οι λύσεις που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση έχουν υπογραμμισθεί.

Πίνακας 6.15: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό ερυθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο ριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι σε εύρος	300	600	1	1	3	
DET	Είναι σε εύρος	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε εύρος	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Erythr	Μεγιστοποίηση	14.539	242.050	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Eryth	Επιθυμητότητα
1	39,42	349,45	522,36	2,53	36,48	262.909	1,000
2	41,41	430,10	436,16	2,53	41,14	254.498	1,000
3	37,77	496,34	431,54	2,55	35,91	251.036	1,000
4	41,41	430,10	436,16	2,53	41,14	254.498	1,000
5	44,30	333,23	573,81	2,56	44,75	252.125	1,000
6	38,68	530,80	514,40	2,51	35,02	252.451	1,000

Πίνακας 6.16: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό ροξιθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι σε εύρος	300	600	1	1	3	
DET	Είναι σε εύρος	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε εύρος	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Rox	Μεγιστοποίηση	30.480	587.613	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Rox	Επιθυμητότητα
1	42,16	340,96	592,38	4,36	40,42	670.890	1,000
2	49,98	317,20	414,70	4,46	39,77	668.018	1,000
3	35,03	307,66	415,93	4,46	43,72	664.353	1,000
4	32,30	355,64	556,67	2,56	39,32	661.644	1,000
5	39,71	550,48	418,33	4,42	39,64	646.050	1,000
6	56,48	314,00	425,14	4,47	41,64	643.180	1,000

Πίνακας 6.17: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό κλαριθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο		Χαμηλότερο	Ανώτερο	Σημαντικότητα	
		ριο	Ανώτερο	όριο	άρος		βάρος
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι σε εύρος	300	600	1	1	3	
DET	Είναι σε εύρος	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε εύρος	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Clar	Μεγιστοποίηση	67428	1,0228E+006	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Clar	Επιθυμητότητα
<u>1</u>	<u>40,31</u>	<u>300,02</u>	<u>528,62</u>	<u>2,51</u>	<u>36,97</u>	<u>939.255</u>	<u>0,955</u>
2	41,02	300,01	542,18	2,50	36,57	939.221	0,955
3	40,36	300,01	524,44	2,51	36,44	939.209	0,955
4	40,76	300,01	542,19	2,50	37,39	939.144	0,955
5	39,68	300,00	499,65	2,50	37,96	934.876	0,953
6	40,32	351,26	520,70	2,50	37,07	933.597	0,952

5.7.2 Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εμβαδών όλων των αναλυτών

Στην συνέχεια τέθηκε ως στόχος η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εμβαδών όλων των αναλυτών, δηλαδή η εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων που θα επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση των συγκεκριμένων αναλυτών σε ένα δείγμα, στο βέλτιστο βαθμό. Το λογισμικό του οργάνου δεν επιτρέπει τον καθορισμό όλων των παραμέτρων ξεχωριστά για κάθε αναλύτη, σε μια ενδεχόμενη ταυτόχρονη ανάλυση τους. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι DGF, DET και CAV ρυθμίζονται από κοινού σε αντίθεση με τις παραμέτρους CV και CEN που μπορούν να πάρουν τιμές ξεχωριστές για κάθε λόγο m/z .

Επομένως, έπρεπε αρχικά να καθοριστούν κοινές τιμές για τους τρεις παράγοντες DGF, DET και CAV. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν με βάση τις βέλτιστες τιμές που εντοπίστηκαν στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης. Παρατηρώντας τα εμβαδά που επιτυγχάνονται με τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για κάθε αναλύτη στους Πίνακες 6.14 έως 6.17, παρατηρείται πως για την αζιθρομυκίνη επιτυγχάνονται αρκετά χαμηλότερες τιμές εμβαδού σε σχέση με τους άλλους αναλύτες. Προκειμένου να ενισχυθεί η συγκεκριμένη αυτή μεταβλητή επιλέχθηκαν οι παρακάτω τιμές που δίνουν το βέλτιστο αναλυτικό σήμα (εμβαδό) για την αζιθρομυκίνη: DGF=600, DET=600 και CAV=2.50.

Ακολουθώντας τη λογική του πρώτου σταδίου βρέθηκαν οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων καθώς και τα μέγιστα εμβαδά που επιτυγχάνονται για κάθε αναλύτη, όπως απεικονίζονται στους Πίνακες 6.18 έως 6.21. Όπως φαίνεται και στους πίνακες μόνο οι παράμετροι που καθορίζονται μεμονωμένα για κάθε αναλύτη τέθηκαν σε εύρος και οι υπόλοιποι πήραν τις τιμές που ορίστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 6.18: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό αζιθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι ίση με 600	300	600	1	1	3	
DET	Είναι ίση με 600	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι ίση με 2,50	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Azith	Μεγιστοποίηση	817	153.158	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Azith	Επιθυμητότητα
<u>1</u>	<u>60,00</u>	<u>600</u>	<u>600</u>	<u>2,50</u>	<u>54,45</u>	<u>136.851</u>	<u>0,945</u>
2	60,00	600	600,00	2,50	54,63	136.847	0,945
3	60,00	600,00	600,00	2,50	55,76	136.668	0,944

Πίνακας 6.19: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό ερυθρομυκίνης

Όνομα		Κατώτεροόριο	Ανώτεροόριο	Χαμηλότεροβάρος	Ανώτεροβάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι ίση με 600	300	600	1	1	3	
DET	Είναι ίση με 600	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι ίση με 2,50	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Eryth	Μεγιστοποίηση	14.539	242.050	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Eryth	Επιθυμητότητα
<u>1</u>	<u>37,08</u>	<u>600</u>	<u>600</u>	<u>2,50</u>	<u>39,73</u>	<u>260.250</u>	<u>1,000</u>
2	39,02	600	600	2,50	41,06	259.579	1,000
3	41.41	600	600	2,50	40,01	259.725	1,000

Πίνακας 6.20: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το εμβαδό ροξιθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι ίση με 600	300	600	1	1	3	
DET	Είναι ίση με 600	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε με 2,55	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Rox	Μεγιστοποίηση	30.480	587.613	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Rox	Επιθυμητότητα
<u>1</u>	<u>40,21</u>	<u>600</u>	<u>600</u>	<u>2,50</u>	<u>41,24</u>	<u>700.773</u>	<u>1,000</u>
2	42,90	600	600	2,50	38,08	691.543	1,000
3	35,26	600	600	2,50	40,20	696.399	1,000

Πίνακας 6.21: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για το σήμα MS κλαριθρομυκίνης

Όνομα	Στόχος	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	Χαμηλότερο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
CV	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
DGF	Είναι ίση με 600	300	600	1	1	3	
DET	Είναι ίση με 600	400	600	1	1	3	
CAV	Είναι σε με 2,50	2,5	4,5	1	1	3	
CEN	Είναι σε εύρος	20	60	1	1	3	
Clar	Μεγιστοποίηση	67.428	1,0228E+006	0,5	1	5	
Λύση	CV	DGF	DET	CAV	CEN	Clar	Επιθυμητότητα
1	39,09	600	600	2,50	37,00	850.866	0,906

Παρατηρώντας τις επιθυμητότητες που επιτεύχθηκαν κατά τη βελτιστοποίηση των εμβαδών των αναλυτών είναι σαφές ότι έχουν επιτευχθεί ιδιαίτερα υψηλές τιμές, που προσεγγίζουν την τιμή 1. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι κάθε φορά τέθηκε ένας στόχος και όχι παραπάνω στόχοι, οι οποίοι μπορεί να είναι και αντικρουόμενοι. Η ύπαρξη περισσότερων από μια λύσεις με υψηλή επιθυμητότητα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μια περιοχή λύσεων (design space), που εξυπηρετούν τα κριτήρια που έχουν τεθεί. Χαρακτηριστικά απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα) η γραφική παράσταση, όπως προέκυψε από τη βελτιστοποίηση του εμβαδού της ερυθρομυκίνης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται η περιοχή των τιμών για τους παράγοντες DGF και CV, που επιτυγχάνεται υψηλή επιθυμητότητα.

Design-Expert® Software

Desirability



X1 = A: Cone Voltage

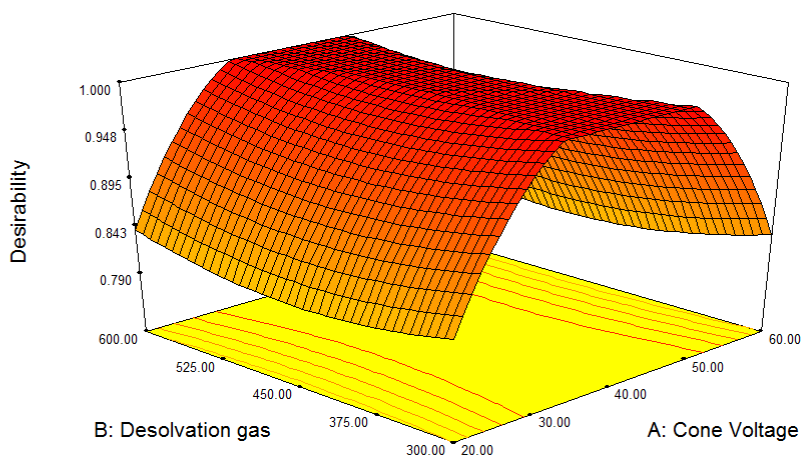
X2 = B: Desolvation gas

Actual Factors

C: Desolvation Temp = 450.12

D: Capillary Voltage = 4.49

E: Coll. Energy = 39.77



Εικόνα 6.5 : Γραφική απεικόνιση της βελτιστοποίησης εμβαδού ερυθρομυκίνης για τους παράγοντες DGF και CV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΤΑΔΙΟ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

7.1 Εφαρμογή CCC για τη βελτιστοποίηση των υγροχρωματογραφικών συνθηκών.

Ένας τελευταίος πείραμα πειραματικού σχεδιασμού εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών του οργάνου UHPLC με στόχο τη μείωση του χρόνου κατακράτησης (retention time- t_R) των αναλυτών και επίτευξη ικανοποίησης διαχωριστικής ικανότητας (Resolution- R_s) μεταξύ των αναλυτών. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν καθώς και τα επίπεδα τους περιγράφονται στον Πίνακα 7.1. Η επιλογή τους έγινε με βάση τις υπάρχουσες επιστημονικές γνώσεις και την εμπειρία. Η χρωματογραφική ανάλυση βελτιστοποιήθηκε με την χρήση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού. Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος αυτής της εργασίας ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται σε ένα κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό δίνεται από τη σχέση $N = 2^k + 2k + C_p$, όπου k ο αριθμός των παραγόντων ($k=3$) και C_p ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου. Συνολικά 18 πειράματα υλοποιήθηκαν διεξήχθησαν σε αυτόν τον σχεδιασμό στα οποία περιέχονταν 4 πειράματα με επανάληψη των κεντρικών τιμών.

Εκτελώντας αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό ήταν φανερό ότι οι μεταβλητές απόκρισης που έπρεπε να επιλεγούν για τη βελτιστοποίηση ήταν ο t_R της ροξιθρομυκίνης (t_{R-rox}) και η R_s μεταξύ ροξιθρομυκίνης και κλαριθρομυκίνης ($R_{s \text{ rox-clar}}$). Οι συγκεκριμένες αποκρίσεις επελέγησαν γιατί η ροξιθρομυκίνη εκλούεται τελευταία σε σχέση με τους υπόλοιπους αναλύτες και ότι οι δύο αναλύτες (Roxith και Clarith) εκλούνται σχετικά σε ίδιους χρόνους και είναι πιθανή μια μερική αλληλεπικάλυψη των χρωματογραφικών κορυφών τους.

Πίνακας 7.1: Εύρος τιμών παραμέτρων και πειράματα που διενεργήθηκαν με τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCC) για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών

Παράγοντες	Επίπεδα			Κεντρικό σημείο ($\alpha=1,68$)	
	Χαμηλό	Κεντρικό	Υψηλό	- α	+ α
	(-1)	(0)	(+1)		
(x_1) Ροή κινητής φάσης (ml/min)	0,45	0,50	0,55	0,42	0,58
(x_2) Ποσοστό μυρμηκικού οξέος (%)	0,040	0,050	0,060	0,0332	0,0668
(x_3) Ποσοστό μεθανόλης (%)	45	50	55	41,59	58,41
Πείραμα	x_1	x_2	x_3	t_{R-rox}	$R_{s \text{ rox-clar}}$
1	0	0	- α	6,59	3,07

2	-α	0	0	2,12	1,76
3	0	0	0	1,79	1,30
4	-1	+1	-1	4,56	2,94
5	0	0	+α	0,66	0,82
6	+1	-1	-1	3,38	2,34
7	+1	+1	-1	3,66	2,47
8	+1	-1	+1	0,78	0,79
9	0	0	0	1,64	1,33
10	0	-α	0	1,61	1,35
11	0	+α	0	1,80	1,46
12	+α	0	0	1,48	1,48
13	-1	-1	-1	4,20	2,52
14	0	0	0	1,64	1,28
15	0	0	0	1,60	1,10
16	+1	+1	+1	0,87	0,77
17	-1	+1	+1	1,01	0,77
18	-1	-1	+1	0,94	0,67

7.2 Ανάλυση μοντέλου ανά απόκριση

Στους Πίνακες 7.2 και 7.3 απεικονίζονται οι υπολογισμοί που πραγματοποίησε το λογισμικό προκειμένου να προσαρμόσει όλα τα πολυωνμικά μοντέλα στις επιλεγμένες αποκρίσεις. Παρατηρείται ότι το στατιστικά σημαντικό (significant) μοντέλο που εντοπίζεται και προτείνεται είναι το τετραγωνικό – (δευτεροβάθμιο) και για τις 2 αποκρίσεις του σχεδιασμού. Αντίθετα ένα κυβικό μοντέλο δεν μπορεί να υποστηριχθεί από τον κεντρικό σχεδιασμό και σημειώνεται ως «aliased» (αλλοιωμένο).

Πίνακας 7.2 : Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση t_{R-rox}

	Απόκριση: t_{R-rox}					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο έναντι Συνόλου	90,36	1	90,36			
Γραμμικό έναντι Μέσου	36,79	3	12,26	24,92	< 0,0001	
2FI έναντι Γραμμικού	0,28	3	0,094	0,16	0,9236	
<u>Τετραγωνικό έναντι 2FI</u>	<u>6,38</u>	<u>3</u>	<u>2,13</u>	<u>74,23</u>	<u>< 0,0001</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	0,21	4	0,052	9,83	0,0240	αλλοιωμένο
Υπόλοιπο	0,021	4	5,291E-003			
Σύνολο	134,05	18	7,45			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	6,87	11	0,62	88,91	0,0017	
2FI	6,59	8	0,82	117,24	0,0012	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>0,21</u>	<u>5</u>	<u>0,042</u>	<u>5,93</u>	<u>0,0870</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	9,014E-005	1	9,014E-005	0,013	0,9170	αλλοιωμένο
Σφάλμα	0,021	3	7,025E-003			
Πείληψη στατιστικών μοντέλου						
	Τυπ. Απόκλιση.	R²	Adjusted R²	Predicted R²	PRESS	
Πηγή						
Γραμμικό	0,70	0,8422	0,8084	0,7308	11,76	
2FI	0,78	0,8487	0,7662	0,6916	13,47	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>0,17</u>	<u>0,9948</u>	<u>0,9888</u>	<u>0,9629</u>	<u>1,62</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	0,073	0,9995	0,9979	0,9987	0,057	αλλοιωμένο

Πίνακας 7.3 : Ανάλυση μοντέλου για την απόκριση $R_{s \text{ rox-clar}}$

	Απόκριση: $R_{s \text{ rox-clar}}$					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μέσο έναντι Συνόλου	44,25	1	44,25			
Γραμμικό έναντι Μέσου	9,05	3	3,02	36,42	< 0,0001	
2FI έναντι Γραμμικού	0,12	3	0,040	0,42	0,7403	
<u>Τετραγωνικό έναντι 2FI</u>	<u>0,80</u>	<u>3</u>	<u>0,27</u>	<u>9,09</u>	<u>0,0059</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό έναντι Τετραγωνικού	0,20	4	0,050	5,84	0,0579	αλοιωμένο
Υπόλοιπο	0,034	4	8,621E-003			
Σύνολο	54,46	18	3,03			
Έλεγχος έλλειψης προσαρμογής						
Γραμμικό	1,13	11	0,10	9,52	0,0446	
2FI	1,01	8	0,13	11,70	0,0340	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>0,20</u>	<u>5</u>	<u>0,041</u>	<u>3,78</u>	<u>0,1513</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	2,188E-003	1	2,188E-003	0,20	0,6827	αλοιωμένο
Σφάλμα	0,032	3	0,011			
Περίληψη στατιστικών μοντέλου						
	Τυπ. Απόκλιση	R²	Adjus R²	Predicted R²	PRESS	
Πηγή						
Γραμμικό	0,29	0,8864	0,8621	0,8197	1,84	
2FI	0,31	0,8982	0,8426	0,7500	2,55	
<u>Τετραγωνικό</u>	<u>0,17</u>	<u>0,9769</u>	<u>0,9509</u>	<u>0,8423</u>	<u>1,61</u>	<u>προτεινόμενο</u>
Κυβικό	0,093	0,9966	0,9856	0,9471	0,54	αλοιωμένο

7.3 : Ανάλυση Μοντέλου

Μετά το πέρας των πειραμάτων με βάση το σχεδιασμό CCI, τα δεδομένα που ελήφθησαν αναλύθηκαν με το λογισμικό Design Expert. Στους Πίνακες 7.4 και 7.5 παριστάνονται τα αποτελέσματα της ANOVA για το τετραγωνικό μοντέλο για τις απόκρισεις t_{R-rox} και $R_{s \text{ rox-clar}}$ αντίστοιχα. Τιμές p μικρότερες του 0,05 υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες είναι

σημαντικοί. Στην περίπτωση της απόκρισης t_{R-rox} οι παράγοντες A,B και οι αλληλεπιδράσεις AB και A^2 ενώ για την απόκριση $R_{s_{rox-clar}}$ ο παράγοντας A και οι αλληλεπιδράσεις A^2 και B^2 κρίνονται σημαντικοί.

Όσον αφορά την προσαρμογή των δεδομένων στο επιλεγμένο μοντέλο (lack of fit) οι τιμές p είναι μεγαλύτερες από 0,05 και για τις δυο αποκρίσεις. Επομένως, κρίνονται στατιστικά όχι σημαντικές κάτι που είναι επιθυμητό για τα επιλεγμένα μοντέλα.

Πίνακας 7.4: ANOVA για την απόκριση t_{R-rox}

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: t_{R-rox}					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μοντέλο	43.46	9	4.83	168.52	< 0.0001	σημαντικό
A-% MeOH	36.00	1	36.00	1256.42	< 0.0001	
B-Ροή	0.70	1	0.70	24.50	0.0011	
C-% Μυρμ. οξύ	0.092	1	0.092	3.20	0.1113	
AB	0.25	1	0.25	8.80	0.0180	
AC	0.029	1	0.029	1.01	0.3454	
BC	4.500E-004	1	4.500E-004	0.016	0.9034	
A^2	6.08	1	6.08	212.16	< 0.0001	
B^2	0.029	1	0.029	1.02	0.3428	
C^2	43.46	9	4.83	168.52	< 0.0001	σημαντικό
Υπόλοιπο	36.00	1	36.00	1256.42	< 0.0001	
Έλλειψης Προσαρμογής	0.70	1	0.70	24.50	0.0011	
Σφάλμα	0.092	1	0.092	3.20	0.1113	
Διορθωμένα Σύνολα	0.25	1	0.25	8.80	0.0180	

Πίνακας 7.5 : ANOVA για την απόκριση $R_{S \text{ rox-clar}}$

ANOVA για την Απόκριση Επιφανειών Τετραγωνικού Μοντέλου						
Πηγή	ΑΠΟΚΡΙΣΗ: $R_{S \text{ rox-clar}}$					
	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε	Μέσο Τετραγώνων	Τιμή F	Τιμή p Prob > F	
Μοντέλο	9,98	9	1,11	37,59	< 0,0001	<u>σημαντικό</u>
A-% MeOH	8,93	1	8,93	302,81	< 0,0001	
B-Ροή	0,076	1	0,076	2,57	0,1478	
C-% Μυρμηκ. Οξύ.	0,047	1	0,047	1,61	0,2408	
AB	0,073	1	0,073	2,47	0,1549	
AC	0,027	1	0,027	0,91	0,3672	
BC	0,020	1	0,020	0,69	0,4308	
A ²	0,73	1	0,73	24,70	0,0011	
B ²	0,20	1	0,20	6,66	0,0326	
C ²	0,031	1	0,031	1,05	0,3350	
Υπόλοιπο	0,24	8	0,029			
Έλλειψης Προσαρμογής	0,20	5	0,041	3,78	0,1513	<u>όχι σημαντικό</u>
Σφάλμα	0.032	3	0.011			
Διορθωμένα Σύνολα	10.21	17				

Στον Πίνακα 7.6 παρουσιάζονται οι παράμετροι αξιολόγησης για τις δυο αποκρίσεις. Όσον αφορά την τιμή του Συντελεστή Διακύμανσης (Coefficient Variation, CV %), η οποία μετράει την τυπική απόκλιση εκφραζόμενη ως ποσοστό της μέσης τιμή, είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Η τιμή PRESS (Prediction Error Sum of Squares) είναι ένα μέτρο του πόσο ορθά το μοντέλο θα προβλέπει τα νέα δεδομένα και υπολογίζεται από τα σφάλματα πρόβλεψης που λαμβάνονται με την πρόβλεψη της ν-οστής τιμής, με ένα μοντέλο που περιλαμβάνει όλες τις παρατηρήσεις εκτός της ν-οστής. Μοντέλα όπως αυτά των δυο αποκρίσεων του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού, με χαμηλές τιμές PRESS υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι πιθανό να προβλέπει σωστά.

Όσον αφορά τους στατιστικούς συντελεστές προσδιορισμού R^2 στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται 3 διαφορετικοί συντελεστές, οι οποίοι και ερμηνεύτηκαν προηγουμένως. Στην περίπτωση της απόκρισης t_{R-rox} οι τιμές $R^2=0,9934$ και $R^2_{adj}=0,9907$ υποδεικνύουν ότι μόνο 0,66% και 0,93% της μεταβλητότητας, αντίστοιχα, δεν εξηγείται από το μοντέλο. Παρόμοια, οι τιμές των συντελεστών για την απόκριση $R_{S \text{ rox-clar}}$ υποδεικνύουν ότι ένα πολύ χαμηλό ποσοστό της μεταβλητότητας δεν εξηγείται από το μοντέλο. Τέλος, ο συντελεστής προσδιορισμού πρόβλεψης (Prediction R^2) και για τις δύο αποκρίσεις υποδηλώνει ότι το

μοντέλο έχει αυξημένη ικανότητα πρόβλεψης. Συγκεκριμένα ο $Pred R^2$ πρέπει να είναι εντός του 0,20 του R^2_{adj} , το οποίο και ισχύει στο συγκεκριμένο μοντέλο.

Πίνακας 7.6 : Παράμετροι αξιολόγησης

	t_{R-rox}	$R_{s\ rox-clar}$
Τυπική Απόκλιση.	0,17	0,17
Μέσος Όρος	2,24	1,57
Συντελεστής διακύμανσης %	7,55	10,95
PRESS	1,62	1,61
R-Squared	0,9948	0,9769
Adj R-Squared	0,9988	0,9509
Pred R-Squared	0,9629	0,8423
Adeq Precision	44,567	21,250

7.4 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων μέσω διαγραμμάτων

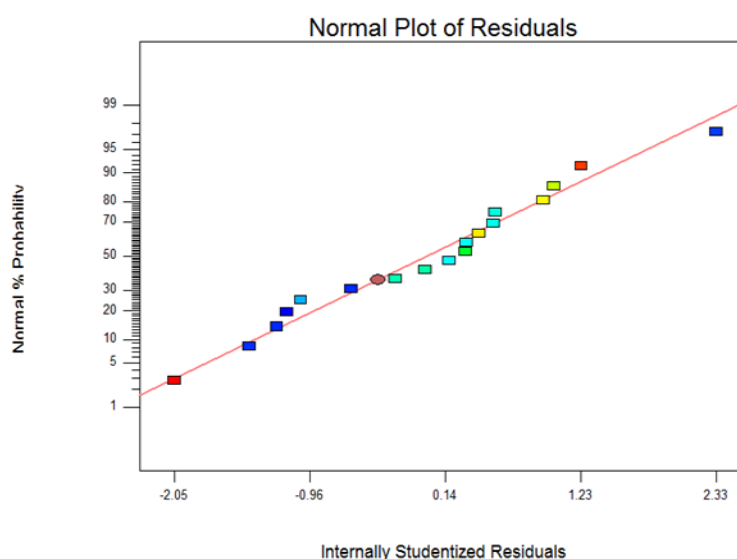
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα παρακάτω διαγράμματα:

- Διαγράμματα κανονικής κατανομής υπολοίπων (Normal plot of residuals)

Ένα μοντέλο δεν είναι πάντα κατάλληλο για την ικανοποιητική περιγραφή των δεδομένων. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών δείχνουν ικανοποιητική συμφωνία με τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές, χρησιμοποιούνται τα υπόλοιπα (πειραματική-θεωρητική τιμή). Όταν τα υπόλοιπα ακολουθούν κανονική κατανομή και δεν υπάρχουν έκτροπες τιμές >95%, τότε το μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Στην Εικόνα 7.1 απεικονίζονται τα διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολοίπων των πειραματικών μετρήσεων για τις αποκρίσεις $R_{s\ rox-clar}$ και t_{R-rox} , τα οποία και παρουσιάζουν κανονική κατανομή, καθώς κατανέμονται πάνω σε ευθεία γραμμή

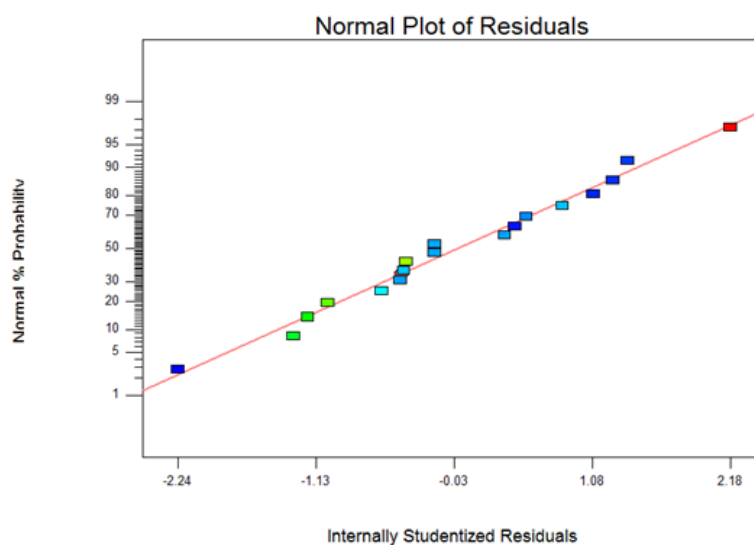
Design-Expert® Software
R Rox-Clar

Color points by value of
R Rox-Clar:



Design-Expert® Software
tR Roxithromycin

Color points by value of
tR Roxithromycin:



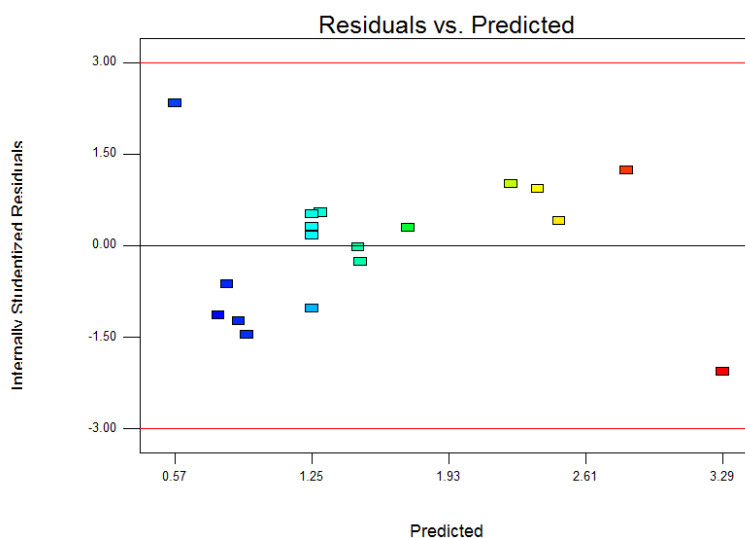
Εικόνα 7.1: Διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολοίπων των πειραματικών μετρήσεων για τις αποκρίσεις $R_{s \text{ rox-clar}}$ (πάνω) και $t_{R-\text{rox}}$ (κάτω)

- Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (Residuals vs Predicted)

Παρουσιάζει την ομοιογένεια στην διακύμανση των τιμών σε όλο το εύρος των τιμών. Αν με αύξηση της απόκρισης παρατηρείται συστηματική μεταβολή (αύξηση ή μείωση) των σφαλμάτων τότε υπάρχει πρόβλημα ετεροσκεδαστικότητας των υπολοίπων. Σε αντίθετη περίπτωση παρατηρείται ομοσκεδαστικότητα.

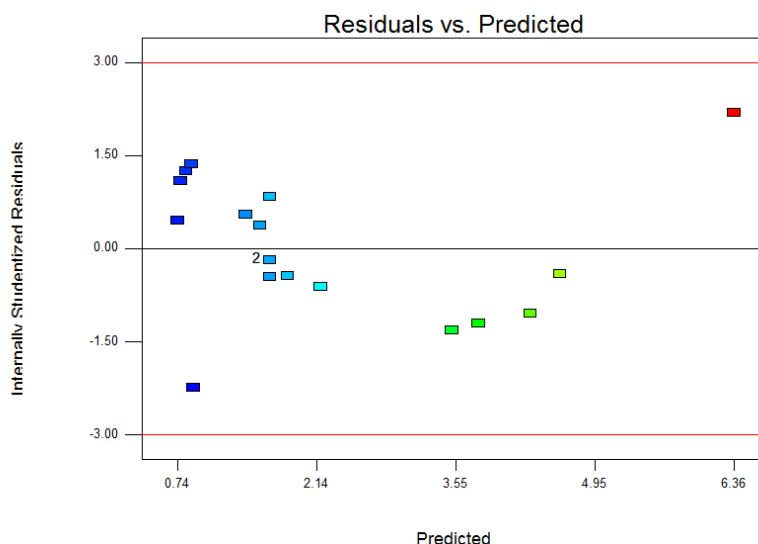
Design-Expert® Software
R Rox-Clar

Color points by value of
R Rox-Clar:



Design-Expert® Software
tR Roxithromycin

Color points by value of
tR Roxithromycin:

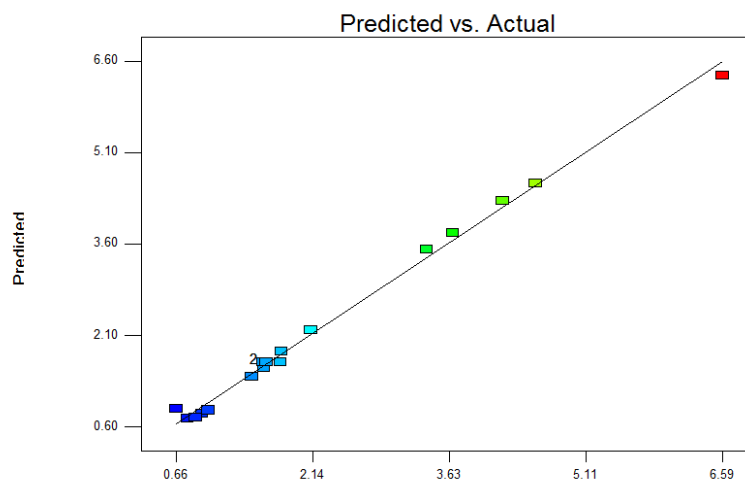


- Διάγραμμα των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών (Predicted vs Actual) για τις αποκρίσεις $R_{s \text{ rox-clar}}$ (πάνω) και $t_{R-\text{rox}}$ (κάτω)

Το διάγραμμα αυτό δείχνει κατά πόσο οι προβλεπόμενες τιμές που προκύπτουν από το μοντέλο που χρησιμοποιείται ταυτίζονται με τις πραγματικές. Στην Εικόνα 7.3 αναπαριστώνται οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές έναντι των πραγματικών τιμών της κάθε μια απόκρισης, όπου και παρατηρείται. Σε όλη την έκταση των αποκρίσεων υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση των δύο τιμών, καθώς όλα τα σημεία βρίσκονται σε ευθεία γραμμή. Το διάγραμμα αυτό υποδεικνύει την αυξημένη ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

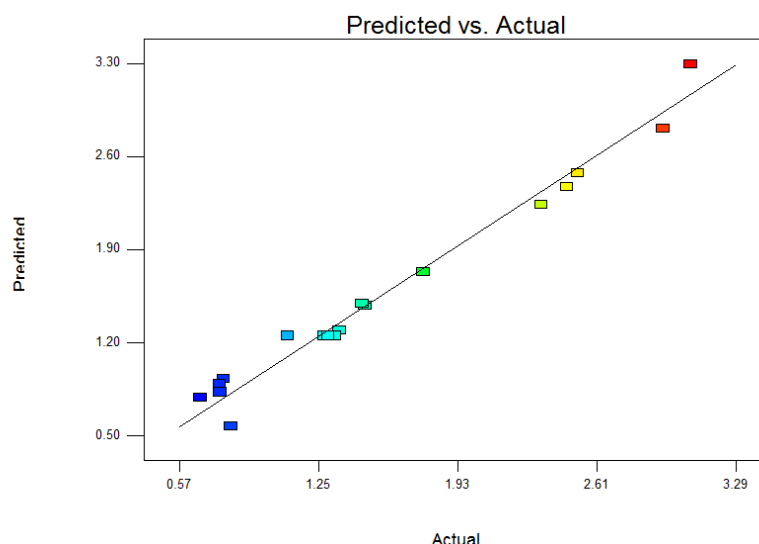
Design-Expert® Software
tR Roxithromycin

Color points by value of
tR Roxithromycin:



Design-Expert® Software
R Rox-Clar

Color points by value of
R Rox-Clar:
3.07115
0.674252



Σχήμα 7.3: Διάγραμμα των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών για τις αποκρίσεις $R_{s \text{ rox-clar}}$ (πάνω) και t_{R-rox} (κάτω)

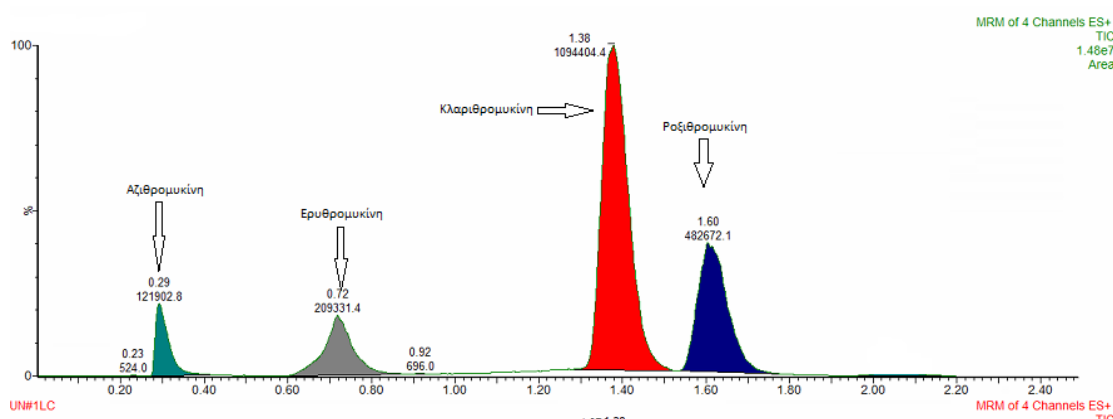
7.5 Εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων που βελτιστοποιούν τις υγροχρωματογραφικές συνθήκες

Τελευταίο στάδιο σε αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό ήταν η εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων που τέθηκαν ως σημαντικοί κατά τη διενέργεια του. Οι στόχοι που τέθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, ήταν η ελαχιστοποίηση της τιμής της απόκρισης t_{R-rox} και ταυτόχρονα η επίτευξη μιας ικανοποιητικής τιμής στη μεταβλητή απόκριση $R_{s \text{ rox-clar}}$. Όσον αφορά τον τελευταίο στόχο, ικανοποιητική τιμή $R_{s \text{ rox-clar}}$ θεωρείται πάνω από 1,5. Στον Πίνακα 7.5 απεικονίζονται οι στόχοι, τα βάρη και οι σημαντικότητες των παραμέτρων και των αποκρίσεων που τέθηκαν στο πρόγραμμα ώστε να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών. Συγκεκριμένα τέθηκαν όλοι οι παράμετροι σε εύρος, η μεταβλητή απόκριση t_{R-rox} τέθηκε ως στόχος η ελαχιστοποίηση της ενώ για τη μεταβλητή απόκριση $R_{s \text{ rox-clar}}$ τέθηκε ως κατώτατο όριο το 1,2 και ως μέγιστο, το μέγιστο που επιτεύχθηκε κατά τη διενέργεια των δοκιμών. Επίσης, τέθηκε μεγαλύτερη σημαντικότητα στην απόκριση $R_{s \text{ rox-clar}}$ καθώς θεωρήθηκε πιο σημαντική η αποφυγή μιας ενδεχόμενης αλληλεπικάλυψης των δυο χρωματογραφικών κορυφών από την μείωση του χρόνου ανάλυσης. Έτσι προέκυψαν οι συνδυασμοί των τιμών των παραμέτρων με τη μέγιστη επιθυμητότητα, όπως απεικονίζονται στον Πίνακα 5.14, από τις οποίες και επιλέχθηκε η πρώτη καθώς εμφάνιζε τόσο τη μέγιστη επιθυμότητα όσο και το μέγιστο εμβαδό, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.9.

Πίνακας 7.7: Περιορισμοί και οι λύσεις της υψηλότερης επιθυμητότητας για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών

		Χαμηλότερο					
Όνομα	Στόχος	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	ρο βάρος	Ανώτερο βάρος	Σημαντικότητα	
% MeOH	Είναι σε εύρος	45	55	1	1	3	
Ροή	Είναι σε εύρος	0.45	0.55	1	1	3	
% Μυρμηκ. Οξύ.	Είναι σε εύρος	0.04	0.06	1	1	3	
t _{R-rox}	Ελαχιστοποίηση	0.66	3.3	1	0.1	4	
R _{S rox-clar}	Στόχος=1,5	1.2	3.07115	0.1	5	5	
Λύση	% MeOH	Ροή Κινητής Φάσης	%Φορμικού Οξέος	t _{R-rox}	R _{S rox-clar}	Επιθυμητότητα	
<u>1</u>	<u>48,82</u>	<u>0,55</u>	<u>0,0418</u>	<u>1,80446</u>	<u>1,5</u>	<u>0,975</u>	<u>Επιλέχθηκε</u>
2	48,77	0,55	0,0434	1,83256	1,5	0,974	
3	50,59	0,45	0,0600	1,83458	1,49999	0,974	
4	48,76	0,55	0,0438	184011	1,5	0,974	
5	50,54	0,45	0,0594	184795	1,5	0,974	
6	48,74	0,55	0,0450	1.85666	1,49999	0,974	

Με την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού με στόχο τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών, επετεύχθη τόσο η μείωση του t_{R-rox} όσο και αποφυγή αλληλεπικάλυψης των χρωματογραφικών κορυφών, με εξασφάλιση μιας ικανοποιητικής τιμής $R_{s \text{ rox-clar}}$. Το χρωματογράφημα που λήφθηκε με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών της πρώτης λύσης που επιλέχθηκε, απεικονίζεται στην Εικόνα 7.1. Η τιμή του t_{R-rox} είναι 1,60 min ενώ η τιμή του $R_{s \text{ rox-clar}}$ είναι ίση με 1,6. Και οι δυο αυτές τιμές βρίσκονται εντός ορίων σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, σύμφωνα με την πρόβλεψη του λογισμικού.



Εικόνα 7.1: Χρωμάτογραφο που ελήφθη με την εφαρμογή των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

8.1 Αποτελέσματα πειραμάτων

Μετά το πέρας της εφαρμογής του πειραματικού σχεδιασμού και της διεξαγωγής των δυο διαφορετικών βελτιστοποιήσεων, έπρεπε να διαπιστωθεί πόσο αποτελεσματική κρίνεται η εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού. Για τον σκοπό αυτόν διεξήχθησαν στο όργανο κάποια τελικά πειράματα, τα οποία και περιγράφονται στους Πίνακες 8.3 έως 8.4. Οι χρωματογραφικές συνθήκες ήταν κοινές σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν παρακάτω. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι προτινόμενες τιμές για τις παραμέτρους που διερευνήθηκαν κατά τη διενέργεια του πειραματικού σχεδιασμού (ταχύτητα ροής κινητής φάσης, ποσοστό μυρμηκικού οξέος και ποσοστό μεθανολής). Οι χρωματογραφικές συνθήκες και τα δεδομένα της χρωματογραφικής ανάλυσης παρουσιάζονται στους Πίνακα 8.1 και 8.2 αντίστοιχα.

Πίνακας 8.1: Χρωματογραφικές συνθήκες

Κινητή φάση	MeOH / 0,04% HCOOH (49/51, v/v)
Ροή	0,55 mL/min
Στατική φάση	Αναλυτική στήλη UPLC τύπου C8, διαστάσεων 2,1x100 mm, με σωματίδια διαμέτρου 1.7 μm και μέγεθος πόρων 130 Å
Θερμοκρασία στατικής φάσης	40 °C
Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη	10 °C

Πίνακας 8.2: Δεδομένα χρωματογραφικής ανάλυσης

Όγκος ένεσης	5 μL
t _R αζιθρομυκίνης	0,29 min
t _R ερυθρομυκίνης	0,72 min
t _R κλαριθρομυκίνης	1,38 min
t _R ροξιθρομυκίνης	1,60 min

Χρόνος ανάλυσης	2,20 min
-----------------	----------

Όσον αφορά τις συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών πραγματοποιήθηκαν αρχικά τρεις μετρήσεις του διαλύματος εργασίας με τις βέλτιστες συνθήκες, όπως προέκυψαν από το λογισμικό του προγράμματος Intellistart (Πίνακας 4.1). Να σημειωθεί ότι το πρόγραμμα παρείχε πληροφορίες για τις βέλτιστες τιμές των παραγόντων CEN και CV, ενώ για τους παράγοντες CAV, DET και DGF ορίστηκαν με βάση την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των αναλυτών. Τέλος, οι τιμές για τους παράγοντες DET και EV ορίστηκαν τυχαία, καθώς αποδείχθηκε ότι είναι παράμετροι ελάσσονος σημασίας. Στην τελευταία στήλη περιγράφεται ο μέσος όρος του εμβადού για κάθε αναλύτη, υπό τη μορφή του εμβადού του, όπως προέκυψε από τις 3 επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες. Να σημειωθεί ότι οι τιμές που προέκυψαν ως βέλτιστες, για τη διενέργεια όλων των πειραμάτων, στρογγυλοποιήθηκαν πολλές φορές κατά την ρύθμιση τους στο λογισμικό Masslynx, καθώς δεν επιτρέπει την ρύθμιση τιμών με δεκαδικά ψηφία.

Πίνακας 8.3: Συνθήκες διεξαγωγής δοκιμών με τις βέλτιστες συνθήκες του IntelliStart

Αναλύτης (n=3)	Parent ion	Daughter ion	CV	CEN	CAV	DET	DGF	DT	EV	Εμβαδό
<i>Eryth</i>	734,56	158,2	36	38	2,50	600	600	0,01	4	87818,11
<i>Clar</i>	748,57	158,2	76	28	2,50	600	600	0,01	4	109107,7
<i>Azith</i>	749,60	116,05	52	50	2,50	600	600	0,01	4	183946
<i>Rox</i>	837,62	158,2	50	38	2,50	600	600	0,01	4	422840,3

Στην συνέχεια διεξήχθησαν τρεις δοκιμές του διαλύματος εργασίας με τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των σημάτων MS όλων των αναλυτών. Επομένως, οι τιμές των παραμέτρων CE και CV είναι μοναδικές για κάθε αναλύτη, ενώ οι υπόλοιπες έχουν μια κοινή τιμή, όπως απεικονίζεται και στον Πίνακα 8.4. Στην τελευταία στήλη περιγράφεται ο μέσος όρος του σήματος MS για κάθε αναλύτη, υπό τη μορφή του εμβადού του, όπως προέκυψε από τις 3 επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες.

Πίνακας 8.4: Συνθήκες διεξαγωγής δοκιμών με τις συνθήκες από την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εμβαδών όλων των αναλυτών

<i>Αναλύτης (n=3)</i>	<i>Parent ion</i>	<i>Daughter ion</i>	<i>CV</i>	<i>CEN</i>	<i>CAV</i>	<i>DET</i>	<i>DGF</i>	<i>DT</i>	<i>EV</i>	<i>Εμβαδό</i>
<i>Eryth</i>	734,5	158,2	37	40	2,50	600	600	0,01	4	87184,34
<i>Clar</i>	748,5	158,2	39	37	2,50	600	600	0,01	4	881824,9
<i>Azith</i>	749,6	116,05	60	54	2,50	600	600	0,01	4	199556,1
<i>Rox</i>	837,6	158,2	41	41	2,50	600	600	0,01	4	455578,6

Τέλος πραγματοποιήθηκαν 12 δοκιμές με τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για κάθε αναλύτη χωριστά (Πίνακας 8.5). Συγκεκριμένα έγιναν 3 δοκιμές με τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του κάθε αναλύτη κάθε μια φορά, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η βελτιστοποίηση των υπολοίπων. Επομένως τέθηκαν σε κάθε τριάδα δοκιμών οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων για έναν μόνο αναλύτη, όπως υπολογίστηκαν με την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού, του οποίου και αναφέρεται ο μέσος όρος του σήματος MS στον παρακάτω πίνακα. Για τους υπόλοιπους αναλύτες τέθηκαν τυχαία οι συνθήκες των παραμέτρων CEN και CV.

Πίνακας 8.5: Δοκιμές με τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για κάθε αναλύτη

<i>Αναλύτης</i>	<i>Δοκιμές</i>	<i>Μητρικό Ιόν</i>	<i>Θυγατρικό Ιόν</i>	<i>CV</i>	<i>CEN</i>	<i>CAV</i>	<i>DET</i>	<i>DGF</i>	<i>DT</i>	<i>EV</i>	<i>Εμβαδό</i>
<i>Eryth</i>	3	734,5	158,2	39	36	2.50	522	350	0,01	4	119614,7
<i>Clar</i>	3	748,5	158,2	40	37	2,50	529	300	0,01	4	925059
<i>Azith</i>	3	749,6	116,05	60	55	2,50	600	600	0,01	4	203010,6
<i>Rox</i>	3	837,6	158,2	42	40	4.50	592	341	0,01	4	443124,4

Μετά το πέρας το δοκιμών υπολογίστηκε η μεταβολή που παρουσιάστηκε μεταξύ του μέσου όρου των εμβαδών για κάθε αναλύτη με τις συνθήκες βελτιστοποίησης μέσω του Intellistart εφαρμόζοντας τις διαφορετικές συνθήκες ανάλυσης. Τα αποτελέσματα περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 8.6.

Πίνακας 8.6: Η μεταβολή του σήματος για κάθε αναλύτη κάτω από διαφορετικές φασματομετρικές συνθήκες

Συνθήκες διεξαγωγής δοκιμών (n=3)	Εμβαδά			
	Εμβαδό Ροξιθρομυκίνη	Εμβαδό Αζιθρομυκίνη	Εμβαδό Κλαριθρομυκίνη	Εμβαδό Ερυθρομυκίνη
Intellistart	422.840,3	183.946	109.107,7	87.818,11
Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση αναλυτών	455.578,6	199.556,1	881.824,9	87.184,34
Μεταβολή (%) μεταξύ συνθηκών Intellistart και ταυτόχρονης βελτιστοποίησης αναλυτών	7,74	8,48	708.22	-0.721
Βελτιστοποίηση κάθε αναλύτη ξεχωριστά	443.124,4	203.010,6	925.059	119.614,7
Μεταβολή (%) μεταξύ συνθηκών Intellistart και συνθηκών βελτιστοποίησης κάθε αναλύτη χωριστά	4,79	10.36	747.84	36.20

8.2 Αξιολόγηση - Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό τεσσάρων μακρολιδίων. Η μέθοδος βασίστηκε στην εφαρμογή της υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (UHPLC-MS/MS). Επίσης, έγινε σύγκριση της βελτιστοποίησης που επιτυγχάνεται μέσω του λογισμικού του οργάνου (Intellistart) και τη χρήση της θεωρίας του DoE, με τη διενέργεια πειραματικού σχεδιασμού σάρωσης και βελτιστοποίησης με τη βοήθεια του προγράμματος Design Expert. Η σύγκριση έγινε με τον υπολογισμό της μεταβολής στο εμβαδό του κάθε αναλύτη, όπως προέκυψε από τα τελικά πειράματα που διεξήχθησαν και περιγράφηκαν προηγουμένως.

Πριν την αναφορά των συμπερασμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα προηγηθεί μια αξιολόγηση του λογισμικού του οργάνου (IntelliStart). Το συγκεκριμένο λογισμικό, όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο 4.3 παρέχει χρήσιμες πληροφορίες, όσον αφορά τους παράγοντες CEN και CV, τα επικρατέστερα θυγατρικά ιόντα και τον τύπου ιοντισμού (θετικός ή αρνητικός) που συνιστάται. Ο παράγοντας CEN αποδείχθηκε σημαντικός τόσο στο πείραμα σάρωσης όσο και στο πείραμα βελτιστοποίησης, επηρεάζοντας την απόκριση όλων των αναλυτών. Όμοια και ο παράγοντας CV κρίθηκε σημαντικός για την μεταβλητή απόκρισης όλων των αναλυτών, εξαιρουμένης της ροξιθρομυκίνης, κατά τη διάρκεια του πειράματος σάρωσης και των αναλυτών ροξιθρομυκίνης και ερυθρομυκίνης

κατά το στάδιο βελτιστοποίησης. Επομένως, η επιλογή των δυο συγκεκριμένων παραγόντων κρίνεται ως εύστοχη από την πλευρά του κατασκευαστή του λογισμικού.

Παρόλα αυτά, το λογισμικό του οργάνου (Masslynx) επιτρέπει τη ρύθμιση και άλλων παραγόντων, όπως ο DET, DGF και CAV, οι οποίοι και κρίθηκαν σημαντικοί σύμφωνα με τα πειράματα σάρωσης, ενώ το λογισμικό IntelliStart δεν παρείχε καμία πληροφορία για αυτούς. Παρατηρώντας επίσης την ANOVA για κάθε μεταβλητή απόκρισης (Υποκεφάλαιο 6.3) υπάρχουν πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, πληροφορίες οι οποίες βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση του μοντέλου ανάλυσης. Οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες από το λογισμικό του οργάνου, καθώς η βελτιστοποίηση γίνεται με την αρχή OFAT, η οποία δεν παρέχει πληροφορίες για τους σημαντικούς παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών.

Ο περιορισμένος αριθμός πληροφοριών που προκύπτουν από τη βελτιστοποίηση του ποσοτικού προσδιορισμού με την χρήση του λογισμικού του οργάνου, δεν είναι επαρκής για τον χαρακτηρισμό του IntelliStart ως «ανεπαρκούς», σε σχέση με την εφαρμογή της θεωρίας του DoE. Για να προκύψει μια ολοκληρωμένη και έγκυρη αξιολόγηση πρέπει να διευκρινιστεί αν σημειώνεται κάποια μεταβολή στις μεταβλητές απόκρισης όλων των αναλυτών μεταξύ των δυο τρόπων βελτιστοποίησης. Η μεταβολή αυτή μπορεί να μεταφραστεί και ως επίτευξη ή όχι χαμηλής ευαισθησίας στον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ή περισσότερων ταυτόχρονα αναλυτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τα τελικά πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.6, όπου και υπολογίσθηκαν οι μεταβολές της απόκρισης. Η πρώτη μεταβολή που υπολογίσθηκε ήταν αυτή με τις συνθήκες του IntelliStart και της ταυτόχρονης βελτιστοποίησης των αποκρίσεων και η δεύτερη της απόκριση με τις συνθήκες του IntelliStart και της βελτιστοποίησης κάθε αναλύτη χωριστά. Παρατηρώντας τις μεταβολές, όπως υπολογίσθηκαν με το πέρας των πειραμάτων, παρατηρείται μια σημαντική βελτίωση στις μεταβλητές απόκρισης όλων των αναλυτών.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις μεταβλητές απόκρισης της ερυθρομυκίνης, αζιθρομυκίνης και ροξιθρομυκίνης έχει επιτευχθεί μια σημαντική βελτίωση της απόκρισης μέσω της εφαρμογής της θεωρίας του DoE. Η μεταβολή αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένες αποκρίσεις αποδείχθηκε ότι επηρεάζονται και από άλλους παράγοντες, εκτός του CV και CEN, για τους οποίους και έγινε βελτιστοποίηση. Εξαίρεση αποτελεί το εμβάδο της ερυθρομυκίνης που εμφάνισε αμελητέα μείωση, κατά τη διενέργεια της δοκιμής με τις συνθήκες της ταυτόχρονης βελτιστοποίησης όλων των αναλυτών. Όσον αφορά τις τιμές CV και CEN, που προέκυψαν με τους τρεις τρόπους βελτιστοποίησης (IntelliStart, ταυτόχρονη βελτιστοποίηση και βελτιστοποίηση κάθε μεταβλητής απόκρισης χωριστά) παρατηρούνται μικρές αποκλίσεις, όπως απεικονίζονται στον Πίνακα 9.1. Για παράδειγμα η μεταβλητή απόκρισης της ερυθρομυκίνης με σχεδόν ταυτόσημες τιμές CV και CEN εμφάνισε μεταβολή 36,20 % κατά τη βελτιστοποίηση της μεμονωμένα από τους άλλους αναλύτες, αποδεικνύοντας τη σημασία των υπόλοιπων σημαντικών παραγόντων. Όμοια, για την απόκριση της αζιθρομυκίνης, η οποία και εμφάνισε χαμηλό εμβάδο έναντι των άλλων αναλυτών, φάνηκε να επιδρούν σημαντικά σε αυτήν πλήθος παραγόντων καθώς και αλληλεπιδράσεων αυτών, και τελικά επετεύχθη μια αύξηση του εμβადού της τάξης του 10%. Η αυξητική τάση αυτή στην μεταβολή των αποκρίσεων αποδεικνύει τη σημασία εύρεσης και βελτιστοποίησης των σημαντικών παραγόντων, με τη βοήθεια της θεωρίας του DoE και του λογισμικού Design Expert.

Πίνακας 9.1: Βέλτιστες τιμές CV και CEN όπως υπολογίσθηκαν από το IntelliStart και τους δυο τρόπους βελτιστοποίησης με την εφαρμογή του DoE

	CV			CEN		
Μεταβλητή απόκρισης (Σήμα MS αναλύτη)	IntelliStart	Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση	Βελτιστοποίηση χωριστά	IntelliStart	Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση	Βελτιστοποίηση χωριστά
Ερυθρομυκίνη	36	37	39	38	40	36
Κλαριθρομυκίνη	76	39	40	28	37	37
Αζιθρομυκίνη	52	60	60	50	54	55
Ροξιθρομυκίνη	50	41	42	38	41	40

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, όμως, η μεγάλη αύξηση στην απόκριση της κλαριθρομυκίνης, η οποία και επηρεάζεται σημαντικά από τους δυο παράγοντες CEN και CV (και ο CEN^2 είναι σημαντικός), όπως προέκυψε από το πείραμα σάρωσης και βελτιστοποίησης. Ενώ θα ανέμενε κανείς αμελητέα μεταβολή στην απόκριση, καθώς δεν εμπλέκονται άλλοι σημαντικοί παράγοντες και το λογισμικό του οργάνου παρέχει πληροφορίες για τις βέλτιστες τιμές των παραγόντων αυτών, σημειώνεται αύξηση του σήματος MS μεγαλύτερη από 700 % και στις δυο περιπτώσεις. Παρατηρώντας τον Πίνακα 9.1 παρατηρείται μια σημαντική απόκλιση στις βέλτιστες τιμές των CV και CEN, με εντονότερη τη διακύμανση στην τιμή του CV, για το εμβάδο της κλαριθρομυκίνης. Η σημαντική απόκλιση αυτή δικαιολογεί την αξιοσημείωτη αύξηση της απόκρισης, θέτοντας ερωτηματικά για την αποτελεσματική διενέργεια βελτιστοποίησης από το λογισμικό του οργάνου, ακόμα και στην περίπτωση που δεν εμπλέκονται άλλοι σημαντικοί παράγοντες. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι κατά τη διενέργεια των τελικών πειραμάτων με τις συνθήκες του IntelliStart οι τιμές που τέθηκαν στους παράγοντες DGF, DET και CAV, επελέγησαν μετά τη διενέργεια των πειραματικών σχεδιασμών και με στόχο την ενίσχυση του σήματος της αζιθρομυκίνης. Δεδομένου της απουσίας βιβλιογραφικών πηγών και εμπειρίας ποσοτικού προσδιορισμού μακρολιδίων με LC-MS/MS, πολύ πιθανόν να επιλεγόντουσαν τιμές οι οποίες δεν θα ήταν βέλτιστες και θα οδηγούσαν στη λήψη χαμηλότερων αποκρίσεων και κατά προέκταση σε υψηλότερη μεταβολή μετά την εφαρμογή του DoE.

Άξιο αναφοράς είναι και η διαφορετική συμπεριφορά της αζιθρομυκίνης σε σχέση με τους άλλους αναλύτες στο περιβάλλον του φασματομέτρου μαζών. Ο πειραματικός σχεδιασμός έδειξε η απόκριση της να επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων και αλληλεπιδράσεων αυτών, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει χαμηλές τιμές εμβαδού. Αυτό οφείλεται πιθανόν στη διαφορετική χημική δομή του μορίου της αζιθρομυκίνης, η οποία διαφέρει από τα υπόλοιπα

μόρια στην προσθήκη ενός μεθυλο-υποκατεστημένου ατόμου αζώτου σε λακτονικό δακτύλιο (Εικόνα 2.1).

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποδείχθηκε ένα χρήσιμο εργαλείο στην περίπτωση του προσδιορισμού και της βελτιστοποίησης του προσδιορισμού των τεσσάρων μακρολιδίων και αποδείχθηκε αποτελεσματικότερος του λογισμικού του οργάνου. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη μιας βιοαναλυτικής μεθόδου, όπου επιδιώκονται όρια ανίχνευσης ιδιαίτερα χαμηλά (της τάξης των ng/mL). Ακόμα, η στρατηγική ανάπτυξης μπορεί να εφαρμοσθεί σε παρόμοιες αναλύσεις με άλλα μόρια - μοντέλα. Σε εφαρμογή της στρατηγικής αυτής σε περίπτωση ταυτόχρονης παρουσίας και ανάλυσης περισσότερων από έναν αναλύτες σε ένα βιολογικό δείγμα, μπορεί να επιλεγούν ως βέλτιστες τιμές στους παράγοντες που ρυθμίζονται από κοινού στο λογισμικό του οργάνου, οι βέλτιστες τιμές του αναλύτη που επιδιώκεται να αυξηθεί η απόκριση ή που τίθεται μεγαλύτερη βαρύτητα. Η επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών ανίχνευσης με φασματομέτρο μαζών, πέραν του προφανούς οφέλους με την επίτευξη χαμηλότερων ορίων ποσοτικοποίησης, έχει σημασία για τη μείωση του χρησιμοποιούμενου όγκου βιολογικού δείγματος που μεταφράζεται σε ελάττωση της πιθανότητας επίδρασης του μητρικού υλικού στο αναλυτικό σήμα, αλλά και προστασίας του οργάνου. Επίσης, είναι προφανές το όφελος για περιπτώσεις που δεν μπορεί να ληφθεί μεγάλη ποσότητα δείγματος, π.χ. νεογνά.

Τέλος, η παρούσα εργασία ολοκληρώθηκε δημιουργώντας θέματα για περαιτέρω μελέτη. Συγκεκριμένα αποτελεί μια πρόκληση η μελέτη της επίδρασης του κάθε παράγοντα που εμπλέκεται στην τεχνική της φασματομετρίας μαζών και ο τρόπος που μεταβάλλονται ανάλογα με τη χημική δομή του αναλύτη. Πρόκληση αποτελεί ακόμα η ανάπτυξη πρωτόκολλων και στρατηγικών πειραματικού σχεδιασμού για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού φαρμακομορίων σε βιολογικά υγρά με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναλυτική τεχνική της υγροχρωματογραφίας συνδεδεμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί τα τελευταία χρόνια μέθοδο εκλογής για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου εύρους ενώσεων ποικίλου ενδιαφέροντος. Παρ' όλα αυτά η ευαισθησία και η απόκριση (response) κάθε αναλύτη σε μια αναλυτική μέθοδο επηρεάζεται τόσο από χαρακτηριστικά του αναλύτη (επίδραση μήτρας δείγματος, υδροφοβικότητα, κ.α.) όσο και από οργανολογικές παραμέτρους. Παρά τις προσπάθειες, δεν έχει ακόμα καταστεί εφικτή η εύρεση ενός περιεκτικού μοντέλου που να περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις αυτών των παραγόντων, την ποσοτική επίδραση τους σε πειραματικές αποκρίσεις καθώς και τους υπεύθυνους μηχανισμούς. Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη βιοαναλυτικών μεθόδων απαιτεί αυξημένη ευαισθησία, η βελτιστοποίηση της οποίας πολλές φορές καθίσταται πολύπλοκη δεδομένης της επίδρασης μήτρας δείγματος και των μικρών όγκων βιολογικών δειγμάτων.

Ένα πολύ σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση είναι και ο εντοπισμός των σημαντικών παραμέτρων που επιδρούν στο σήμα του αναλύτη καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Τα λογισμικά πολλών οργάνων δίνουν την δυνατότητα βελτιστοποίησης σήματος, η οποία όμως χαρακτηρίζεται ανεπαρκής. Αυτό οφείλεται στο ότι βελτιστοποιούν μια παράμετρο τη φορά (one-factor-at-a-time, OFAT), χωρίς να παρέχονται πληροφορίες για τις πιο σημαντικές παραμέτρους καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Αντίθετα με την εφαρμογή της θεωρίας του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments- DoE) μπορεί να επιτευχθεί μια περισσότερο ακριβής και αποτελεσματική βελτιστοποίηση. Ο DoE αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο της στατιστικής το οποίο εφαρμόζεται ευρέως σε ένα μεγάλο εύρος επιστημονικών πεδίων και πειραματικών εργασιών, καθώς μπορεί να επιλύσει προβλήματα και να βελτιώσει ή να βελτιστοποιήσει διεργασίες. Σύμφωνα με τον στόχο και τις ανάγκες της κάθε μελέτης, τον αριθμό και το είδος (ποιοτικές ή ποσοτικές) των πειραματικών μεταβλητών και των αποκρίσεων που πρόκειται να μετρηθούν επιλέγεται ο κατάλληλος τύπος DoE. Πολύ συχνά ο DoE και η Μεθοδολογία Απόκρισης Επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM) αποτελούν διαδοχικά βήματα μιας μελέτης και βασικά στοιχεία μιας μεθόδου βελτιστοποίησης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός και η σύγκριση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών μέσω της βελτιστοποίησης αναλυτικής μεθόδου υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με δίδυμη φασματομετρία μαζών (UHPLC-MS/MS) και της βελτιστοποίησης που επιτυγχάνεται μέσω του λογισμικού του οργάνου. Τα μοντέλα-αναλύτες που επιλέχθηκαν για αυτή τη μελέτη είναι 4 μακρολίδια, η ερυθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη, η ροξιθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που προτείνονται με διαδικασία βελτιστοποίησης ενός παράγοντα τη φορά σύμφωνα με το λογισμικό του οργάνου. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε πειραματικός σχεδιασμός σάρωσης, με στόχο την εύρεση των σημαντικών παραμέτρων της ανίχνευσης με MS/MS. Στο επόμενο στάδιο εφαρμόστηκε ένας Εγγεγραμμένος Κεντρικός Σχεδιασμός (Central Composite Inscribed- CCI) με στόχο τη βελτιστοποίηση των σημαντικών παραμέτρων έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί το αναλυτικό σήμα των αναλυτών. Ένας δεύτερος CCI σχεδιασμός εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση των υγροχρωματογραφικών συνθηκών.

Τέλος, ακολούθησε μια σύγκριση μεταξύ των βελτιστοποιημένων σημάτων MS σημάτων από το λογισμικό του οργάνου και τον DoE και έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθούν οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν. Το αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας ήταν μια σημαντική αύξηση του σήματος, δίνοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας ευαίσθητης βιοαναλυτικής μεθόδου για την ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων αντιβιοτικών στο μέλλον.

ABSTRACT

Liquid chromatography (LC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) with electrospray ionization tend to be the method of choice for qualitative and quantitative determination of a wide range of compounds. However, the sensitivity and the response of each analyte in each analytical method is under the influence of both compound-dependent factors (chargeability, relative hydrophobicity, matrix characteristics etc.) and instrumental parameters. Despite the efforts there is no comprehensive model available to describe the interactions, the grade of interaction, as well as the mechanisms between the mentioned factors. Additionally, the demand of sensitive methods is very often mandatory, concerning the minimal volumes of biological samples and the effort to avoid or reduce matrix effects, that consist a major concern in bioanalytical methods.

A crucial step to this procedure is to distinguish the most important factors, that affect the MS signal, and the interactions between these factors. Instrument's software perform usually an optimization but it is insufficient, considering that they study the influence of one factor at a time (OFAT) and they don't distinguish the most important factors and the interactions between them. On the contrary, applying the theory of Design of Experiments (DOE) a more precise and efficient optimization can be achieved. DOE consists a tool of statistical science that is being applied in a wide range of scientific fields and in many areas of experimental work, as they solve problems and improve or optimize processes. According to the aim of the study, the number and the kind (numerical or categorical) of the experimental variables and the responses that are going to be measured the proper type of DOE can be chosen from a great variety of DOE types. Very often DOE and RSM (Response Surface Methodology) consist consecutively steps of a study, since they are basic components of a method optimization.

The aim of this work was to determine and compare the optimal experimental conditions through a stepwise optimization method of an UPLC-MS/MS method and the optimization being conducted from the instrument's software. The model analytes chosen for this study are four macrolide molecules, erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin.

As a first step in the current study was to find the optimal experimental conditions according to instrument's software. After an experimental design was applied to define the UHPLC optimal conditions and a screening design was carried out aiming to distinguish the most important factors of the MS/MS analysis. The next step a CCI (Central Composite Inscribed) design was applied in order to optimize the important factors so as to maximize the MS signals of our analytes. A second ICC design was performed so as to optimize the liquid-chromatography conditions. Finally, a comparison was conducted between the optimized MS signals achieved from both the instrument's software and DOE and an attempt to investigate these differences was made. The outcome of this current paper was a significant increase in MS signals, enabling the development of sensitive bioanalytical method for the quantification of these antibiotics in the future.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ντζιαντζιάς Ιωάννης, “ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΙΝΩΔΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ-ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ,” Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πολυτεχνική Σχολή, 2014.
- [2] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Eighth. Arizona: John Wiley & Sons, 2013.
- [3] Ν. Πετρίδης, “Ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης και μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων σε υδατικά δείγματα,” Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2016.
- [4] J. M. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth. Essex: Pearson Education Limited, 2010.
- [5] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, T. Bernt, A. Nyströ, J. Pettersen, and R. Bergman, “Experimental design and optimization,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 42, no. 1–2, pp. 3–40, 1998.
- [6] L. Vera Candioti, M. M. De Zan, M. S. Cámara, and H. C. Goicoechea, “Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development,” *Talanta*, vol. 124, pp. 123–138, 2014.
- [7] T. Ryan, *Modern Experimental Design*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2008.
- [8] M. J. Anderson and P. J. Whitcomb, *DOE Simplified Practical Tools for Effective Experimentation*, Second. New York: Productivity Press, 2005.
- [9] F. Pitard, *Comprehensive Chemometrics*. Broomfield, CO, USA: Elsevier, 2009.
- [10] Π. Υψηλάντης, “Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών-Σχεδιασμοί Υποσυνόλου,” Ε.Μ.Π, 2012.
- [11] A. N. 55 Analytical Methods Committee, “Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs,” *Anal. Methods*, vol. 5, no. 8, p. 1901, 2013.
- [12] D. L. Massart, B. G. . Vandeginste, L. M. . Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam, 1997.
- [13] “Central Composite Designs (CCD),” *U.S. Department of Commerce*, 2013. [Online]. Available: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>.

- [14] G. Hanrahan, J. Zhu, S. Gibani, and D. . Patil, "Experimental Design," *Chemom. Stat. Exp. Des.*, pp. 8–13, 2005.
- [15] S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandão, E. G. P. da Silva, L. A. Portugal, P. S. dos Reis, A. S. Souza, and W. N. L. dos Santos, "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods," *Anal. Chim. Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179–186, 2007.
- [16] A. I. Khuri and S. Mukhopadhyay, "Response surface methodology," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, no. 2, pp. 128–149, 2010.
- [17] G. A. Zachariadis and E. Rosenberg, "Use of modified Doehlert-type experimental design in optimization of a hybrid electrospray ionization ion trap time-of- flight mass spectrometry technique for glutathione determination," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, no. April 2012, pp. 489–499, 2013.
- [18] M. Moberg, J. Bergquist, and D. Bylund, "A generic stepwise optimization strategy for liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods," *J. MASS Spectrom.*, no. October, pp. 1334–1345, 2006.
- [19] L. S. Riter, O. Vitek, K. M. Gooding, B. D. Hodge, and R. K. Julian, "Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry," *J. MASS Spectrom.*, vol. 40, pp. 565–579, 2005.
- [20] G. Székelya, B. Henriquesa, M. Gila, and A. N. and letters correspond to the affiliation list. C. to expose these in author workspace. A. links open Ramos, "Design of experiments as a tool for LC–MS/MS method development for the trace analysis of the potentially genotoxic 4-dimethylaminopyridine impurity in glucocorticoids," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 70, pp. 251–258, 2012.
- [21] B. M. Chen, Y. Z. Liang, X. Chen, S. G. Liu, F. L. Deng, and P. Zhou, "Quantitative determination of azithromycin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in a bioequivalence study," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 42, no. 4, pp. 480–487, 2006.
- [22] Y. Zhou, J. Song, F. Choi, H. Wu, C. Qiao, L. Ding, S. Gesang, and H. Xu, "An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsi* species," *J. Chromatogr.*, vol. 1216, no. 42, pp. 7013–23, 2009.
- [23] N. D. Sousa, C. J. Ellert, M. Gillbert, and A. D. Wright, "Use of chemometrics to optimize the operation of an ion source," *Anal Chem.*, vol. 80, p. 873, 2008.
- [24] N. Maragou, E. Rosenberg, N. Thomaidis, and M. Koupparis, "Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, alpha- and beta-zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1202, pp. 47–57, 2008.

- [25] V. Tak, P. K. Kanaujia, D. Pardasani, R. Kumar, R. K. Srivastava, A. K. Gupta, and D. K. Dubey, "Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1161, no. 1–2, pp. 198–206, 2007.
- [26] L. Charles, S. Caloprisco, S. Mohamed, and M. Sergent, "Chemometric approach to evaluate the parameters affecting electrospray: application of a statistical design of experiments for the study of arginine ionization," *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 11, pp. 361–370, 2005.
- [27] M. Moberg, D. Bylund, R. Danielsson, and K. E. Markides, "Optimization strategy for liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry methods," *Analyst*, vol. 125, pp. 1970–1976, 2000.
- [28] N. Maragou, N. Thomaidis, and M. Koupparis, "Optimization and comparison of ESI and APCI LC-MS/MS methods: a case study of Irgarol 1051, Diuron, and their degradation products in environmental samples," *J Am Soc Mass Spectrom.*, vol. 22, pp. 1826–38, 2011.
- [29] L. Dillon, V. Stone, L. Croasdell, P. Fielden, N. Goddard, and C. Thomas, "Optimisation of secondary electrospray ionisation (SESI) for the trace determination of gas-phase volatile organic compounds," *Analyst*, vol. 135, pp. 306–14, 2010.
- [30] T. Gruending, M. Guilhaus, and C. Barner-Kowollik, "Design of Experiment (DoE) as a Tool for the Optimization of Source Conditions in SEC-ESI-MS of Functional Synthetic Polymers Synthesized via ATRP," *Macromol Rapid Commun.*
- [31] M. A. Raji and K. A. Schug, "Chemometric study of the influence of instrumental parameters on ESI-MS analyte response using full factorial design," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 279, pp. 100–106, 2009.
- [32] O. Padro, V. Yusa, N. Leon, and A. Pastor, "Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish," *J. Chromatogr. A*, vol. 1154, pp. 287–294, 2007.
- [33] G. M. Titato, R. C. Bicudo, and F. M. Lancas, "Optimization of the ESI and APCI experimental variables for the LC/MS determination of s-triazines, methylcarbamates, organophosphorous, benzimidazoles, carboxamide and phenylurea compounds in orange samples," *J. mass Spectrom.*, vol. 42, pp. 1348–1357, 2007.
- [34] I. Mazsaroff, W. Yu, B. D. Kelley, and J. E. Vath, "Quantitative Comparison of Global Carbohydrate Structures of Glycoproteins Using LC–MS and In-Source Fragmentation," *Anal Chem.*, vol. 69, pp. 2517–2524, 1997.
- [35] M. Moberg, K. E. Markides, and D. Bylund, "Multi-parameter investigation of tandem

- mass spectrometry in a linear ion trap using response surface modelling," *J. MASS Spectrom.*, vol. 40, no. January, pp. 317–324, 2005.
- [36] J. Jiao, A. J. Carella, G. S. Steeno, and R. T. Darrington, "Optimization of triple quadrupole mass spectrometer for quantitation of trace degradants of pharmaceutical compounds," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 216, no. 2, pp. 209–218, 2002.
- [37] N. Kostic, Y. Dotsikas, A. Malenovic, and B. Stojanovic, "Stepwise optimization approach for improving LC-MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design," *J. MASS Spectrom.*, vol. 48, pp. 875–884, 2013.
- [38] "Γαληνός - Εθνικό συνταγολόγιο - Μακρολίδια." .
- [39] "Compare Macrolide Antibiotics: Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin," 2017. [Online]. Available: <http://www.emedexpert.com/compare/macrolides.shtml>.
- [40] "Roxithromycin - DrugBank," 2011. [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00778>.
- [41] "azithromycin | C38H72N2O12 - PubChem," *National Center for Biotechnology Information*. [Online]. Available: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043#section=Formulations-Preparations>.
- [42] J. Hoyt and R. Robbins, "Macrolide antibiotics and pulmonary inflammation," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 205, no. 1, pp. 1–7, 2001.
- [43] H. Lüllmann, K. Mohr, A. Ziegler, and D. Bieger, *Color Atlas of Pharmacology*, Second. Stuttgart-New York: Thieme, 2007.
- [44] "Mechanism of Action of Macrolides," *Animations _ PharmaXChange*, 2011. [Online]. Available: <http://pharmaxchange.info/press/2011/06/mechanism-of-action-of-macrolides/>.
- [45] *Εθνικό Συνταγολόγιο*. Αθήνα: Εκδόσεις ΕΟΦ, 2007.
- [46] J. Gallagher and C. MacDougall, *Antibiotics Simplified*, Third Edit. Burlington, MA: Jorres & Barlett Learning, 2011.
- [47] P. Milberg, L. Eckardt, H. Urogen, J. Biertz, S. Ramtin, N. Reinsch, D. Fleischer, P. Kirchhof, L. Fabritz, G. Unter, and W. Haverkamp, "Divergent Proarrhythmic Potential of Macrolide Antibiotics Despite Similar QT Prolongation : Fast Phase 3 Repolarization Prevents Early Afterdepolarizations and Torsade de Pointes," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 303, no. 1, pp. 218–225, 2002.

- [48] H. Ohtani, C. Taninaka, E. Hanada, H. Kotaki, H. Sato, Y. Sawada, and T. Iga, "Comparative pharmacodynamic analysis of Q-T interval prolongation induced by the macrolides clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in rats," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 10, pp. 2630–2637, 2000.
- [49] Κ. Λιτσας, *Ιατροφαρμακευτικός Οδηγός*, Εκδόσεις Λ. Αθήνα, 2011.
- [50] A. Banaszek, K. Krowicki, and A. Zmojski, "Thin-layer and column chromatography of erythromycins and some degradation products," *J. Chromatogr. A*, vol. 32, pp. 581–583, 1968.
- [51] M. Petz, R. Solly, M. Lymburn, and M. H. Clear, "Thin-layer chromatographic determination of erythromycin and other macrolide antibiotics in livestock products," *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, vol. 70, no. 4, pp. 691–697, 1987.
- [52] K. Tsuji and J. H. Robertson, "Determination of erythromycin and its derivatives by gas-liquid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 43(7), no. 4, pp. 818–821, 1971.
- [53] K. Tsuji and J. H. Robertson, "GLC Determination of Erythromycin in Enteric-Coated Tablets," *J. Pharm. Sci.*, vol. 61, no. 10, pp. 1633–1635, 1972.
- [54] A. Roger, "Gas Chromatographic-Mass Spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring," *J. Chromatogr.*, vol. 352, pp. 439–443, 1986.
- [55] N. D. Danielson, J. a. Holeman, D. C. Bristol, and D. H. Kirzner, "Simple methods for the qualitative identification and quantitative determination of macrolide antibiotics," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 11, no. 2, pp. 121–130, 1993.
- [56] A. Deubel and U. Holzgrabe, "Development of an enhanced separation of erythromycin and its related substances by liquid chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 2, pp. 493–498, 2007.
- [57] A. S. Amin and Y. M. Issa, "Selective spectrophotometric method for the determination of erythromycin and its esters in pharmaceutical formulations using gentiana violet," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 14, no. 11, pp. 1625–1629, 1996.
- [58] L. K. Bekele and G. G. Gebeyehu, "Application of Different Analytical Techniques and Microbiological Assays for the Analysis of Macrolide Antibiotics from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Matrices," *ISRANAL. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–17, 2012.
- [59] L. Miguel and C. Barbas, "LC determination of impurities in azithromycin tablets," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 33, no. 2, pp. 211–217, 2003.
- [60] P. Zubata, R. Ceresole, M. A. Rosasco, and M. T. Pizzorno, "A new HPLC method for azithromycin quantitation," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 27, no. 5, pp. 833–836,

2002.

- [61] R. M. Shepard, G. S. Duthu, R. A. Ferraina, and M. A. Mullins, "High-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection for azithromycin in serum and tissues," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 565, no. 1–2, pp. 321–337, 1991.
- [62] J. Sastre Toraño and H. J. Guchelaar, "Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fl," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 720, no. 1–2, pp. 89–97, 1998.
- [63] L. Chen, F. Qin, Y. Ma, and F. Li, "Quantitative determination of azithromycin in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 855, no. 2 SPEC. ISS., pp. 255–261, 2007.
- [64] W. Xiao, B. Chen, S. Yao, and Z. Cheng, "Simultaneous determination of erythromycin propionate and base in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 817, no. 2, pp. 153–158, 2005.
- [65] A. Choemunng and K. Na-Bangchang, "an Alternative Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Method for the Determination of Azithromycin in Human Plasma and Its Application To Pharmacokinetic Study," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 33, no. 16, pp. 1516–1528, 2010.
- [66] P. Wang, M. Qi, and X. Jin, "Determination of roxithromycin in rat lung tissue by liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 39, no. 3–4, pp. 618–623, 2005.
- [67] M. Filist, K. Buś-Kwaśnik, H. Ksycińska, and P. J. Rudzki, "Simplified LC-MS/MS method enabling the determination of azithromycin in human plasma after a low 100mg dose administration," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 100, pp. 184–189, 2014.
- [68] Y. Shen, C. Yin, M. Su, and J. Tu, "Rapid, sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantification of topically applied azithromycin in rabbit conjunctiva tissues," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 52, no. 1, pp. 99–104, 2010.
- [69] F. Liu, Y. Xu, J. Huang, S. Gao, and Q. Guo, "Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry assay for the quantification of azithromycin in human plasma," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 21, no. 2, pp. 1272–1278, 2007.
- [70] Y. Jiang, J. Wang, H. Li, Y. Wang, and J. Gu, "Determination of clarithromycin in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass

- spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 4, pp. 1460–1464, 2007.
- [71] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, and M. Widmer, "Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine," *Anal. Chim. Acta*, vol. 586, no. 1–2 SPEC. ISS., pp. 13–21, 2007.
 - [72] J. Ding, F. Zhang, X. Zhang, L. Wang, C. Wang, Q. Zhao, Y. Xu, L. Ding, and N. Ren, "Determination of roxithromycin from human plasma samples based on magnetic surface molecularly imprinted polymers followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometer," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1021, pp. 221–228, 2016.
 - [73] A.-C. Servais, P. Chiap, P. Hubert, J. Crommen, and M. Fillet, "Determination of salbutamol enantiomers in human urine using heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)-beta-cyclodextrin in nonaqueous capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 25, pp. 1632–1640, 2004.
 - [74] M. C. Breadmore, R. Theurillat, and W. Thormann, "Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 10–11, pp. 1615–1622, 2004.
 - [75] N. A. Epshtein, "Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control," *Pharm. Chem. J.*, vol. 38, no. 4, pp. 212–228, 2011.
 - [76] A. K. Lalloo and I. Kanfer, "Determination of erythromycin and related substances by capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 704, no. 1–2, pp. 343–350, 1997.
 - [77] El-Rabbat, N. Askal, H. Khashaba, P. Attia, and N. Noha, "A Validated Spectrofluorometric Assay for the Determination of Ce," *J. AOAC Int.*, vol. 89, pp. 1276–1287, 2006.