



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ –
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ
ΣΧΕΔΙΑΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΥΔΡΟΧΛΩΡΟΘΕΙΑΖΙΔΙΟΥ, ΑΜΛΟΔΙΠΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΑΛΣΑΡΤΑΝΗΣ**

ΚΑΡΑΜΑΝΗ ΜΑΡΙΑΝΘΗ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΘΗΝΑ
2018**

ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύγκριση Διαφορετικών Ειδών Πειραματικών Σχεδιασμών για την Ανάπτυξη
Ισοκρατικών Μεθόδων HPLC για τον Ταυτόχρονο Προσδιορισμό
Υδροχλωροθειαζιδίου, Αμλοδιπίνης και Βαλσαρτάνης

Ονοματεπώνυμο: Καραμάνη Μαριάνθη

A.M:140606

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. ΛΟΥΚΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ε. ΓΚΙΚΑΣ

Επικουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Ι.ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ

Επικουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (Συνεπιβλέπων)

*«Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου
Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».*

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Φαρμακευτική Ανάλυση- Έλεγχος Ποιότητας».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα του Επιβλέποντες Καθηγητές μου κ. Γκίκα Ευάγγελο και κ. Ντότσικα Ιωάννη για την αμέριστη κατανόηση, εμπύχωση και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος. Η εμπειρία μου αποδείχτηκε ιδιαίτερα εποικοδομητική, καθώς όλη η γνώση και τα εφόδια που αποκόμισα θα με βοηθήσουν στη μετέπειτα πορεία μου, όπως και ευχάριστη μετά την άπογη συνεργασία μας. Ευχαριστώ, επίσης, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λουκά Ιωάννη για τη συμβολή του στην αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους φίλους και συναδέλφους, που με παρότρυναν να υλοποιήσω άλλον ένα προσωπικό μου στόχο και μου συμπαραστάθηκαν μέχρι το τέλος. Η παρούσα εργασία αφιερώνεται σε αυτούς.

Στην οικογένεια μου,

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για τον προσδιορισμό τριών δραστικών ουσιών, της αμλοδιπίνης, της βαλσαρτάνης και του υδροχλωροθειαζιδίου με χρήση ισοκρατικών συνθηκών σε RP-HPLC/UV, η παρουσίαση γενικότερα της έννοιας του πειραματικού σχεδιασμού κατά τη βελτιστοποίηση, αλλά και η σύγκριση τριών διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών μεταξύ τους που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο. Μέσα από αυτή τη σύγκριση θα γίνει εφικτή η κατανόηση του πειραματικού σχεδιασμού, θα τονισθεί η σημασία της χρήσης των προτερημάτων του 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.

Κάθε πειραματικός σχεδιασμός διαφέρει όχι μόνο στον αριθμό των πειραμάτων του, των μεταβλητών και των αποκρίσεων του, αλλά και στις πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε ύστερα από την εφαρμογή του. Σκοπός είναι μέσα από την αρχιτεκτονική του καθενός να αποκαλυφθούν διαφορετικές ιδιότητες των ίδιων ουσιών, διαφορετικοί χρόνοι ανάλυσης, αλλαγή στη σειρά έκλουσης και να δοθούν ιδέες για την ανάπτυξη μεθόδων, ανάλογα με το στόχο, τον διαθέσιμο χρόνο για την εξακρίβωση των βέλτιστων συνθηκών, ακόμα και την ευχέρεια στην κατανάλωση διαλυτών.

Στόχος, λοιπόν, είναι η διερεύνηση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των διαδικασιών του πειραματικού σχεδιασμού και η εύρεση της πιο βολικής και αποτελεσματικής λύσης, με σκοπό να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες μιας νέας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αμλοδιπίνης, της βαλσαρτάνης και του υδροχλωροθειαζιδίου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	18
ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	18
1.1 Εισαγωγή.....	18
1.2 Φυσιολογικός έλεγχος της αρτηριακής πίεσης	18
1.3 Αρτηριακή Υπέρταση-Ορισμός	19
1.4 Μηχανισμός δράσης αντιϋπερτασικών φαρμάκων	19
1.5 Αμλοδιπίνη (AML): ένας αναστολέας των διαύλων ασβεστίου	21
1.6 Βαλσαρτάνη (VAL): ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II.....	22
1.7 Υδροχλωροθειαζίδιο (HCTZ): ένα θειαζιδικό διουρητικό	23
1.8 Μέθοδοι ανάλυσης.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	26
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	26
2.1 Εισαγωγικά	26
2.2 Ιστορική Αναδρομή	26
2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός-Ορισμός	27
2.4 Πλεονεκτήματα της εφαρμογής του Πειραματικού Σχεδιασμού	27
2.5 Βασικές έννοιες-Ορολογία	28
2.6 Εμπειρικά μοντέλα.....	33
2.7 Βήματα για τον σχεδιασμό ενός πειράματος.....	34
2.8 Είδη Πειραματικών Σχεδιασμών ανάλογα με την χρήση τους.....	35
2.8.1 Στάδιο προκαταρκτικών πειραμάτων.....	36
2.8.2 Στάδιο βελτιστοποίησης.....	38
2.8.3 Στάδιο ανθεκτικότητας.....	40
2.8.4 Μεικτός σχεδιασμός.....	41
2.9 Μέτρηση σφάλματος-Βαθμοί ελευθερίας.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	47

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ	47
3.1 Εισαγωγή–Ορισμός Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης	47
3.1.1 Οπτικοποίηση της Απόκρισης	48
3.1.2 Συνάρτηση επιθυμητότητας (Desirability function)	50
3.1.3 Παράδειγμα της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης	52
3.2 Σχεδιασμοί Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης (RSM)	53
3.2.1 Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)	53
3.2.1.1 <i>Είδη του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού ανάλογα με την επιλογή της τιμής α</i>	54
3.2.1.2 <i>Αριθμός επαναλήψεων στο κεντρικό σημείο</i>	56
3.2.2 Σχεδιασμός Box-Behnken	56
3.2.3 Σχεδιασμός D-optimal	58
3.2.3.1 <i>Αλγόριθμος του D-optimal</i>	59
3.2.3.2 <i>Πλεονεκτήματα του D-optimal</i>	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	62
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	62
4.1 Χρωματογραφικό Σύστημα	62
4.2 Ηλεκτρονικός Υπολογιστής-Λογισμικό	62
4.3 Σύστημα Διήθησης-Απαέρωσης	63
4.4 Αναλυτικός Ζυγός	63
4.5 Πιπέττες	63
4.6 Πεχάμετρο	63
4.7 Διαλύτες-Αντιδραστήρια	63
4.8 Πρότυπες Ουσίες	64
4.9 Ογκομετρικές φιάλες	64
5.0 Αναλυτικές στήλες	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	65
ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	65
5.1 Εισαγωγή	65

5.2 Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου.....	65
5.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης	65
5.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας.....	65
5.3 Επιλογή μήκους κύματος	66
5.4 Προκαταρκτικά πειράματα	66
5.4.1 Δοκιμές διαφορετικών κινητών φάσεων στη στήλη C18.....	69
5.4.2 Δοκιμές διαφορετικών τιμών pH στη στήλη C18.....	71
5.4.3 Δοκιμές διαφορετικών συγκεντρώσεων ρυθμιστικού άλατος της υδατικής φάσης στη στήλη C18	72
5.4.4 Δοκιμές διαφορετικών κινητών φάσεων στη στήλη C8	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	75
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ C8 ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ BOX-BEHNKEN	75
6.1 Εισαγωγή.....	75
6.2 Εύρεση και αξιολόγηση μοντέλου	76
6.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	78
6.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}	78
6.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την διαχωριστικότητα $R_{AML/VAL}$	79
6.3.3 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας βαλσαρτάνης k_{VAL}	80
6.4 Διαγνωστικά διαγράμματα.....	81
6.4.1 Διαγράμματα κανονικής κατανομής υπολοίπων (Normal plot of residuals)...	81
6.4.2 Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (Residuals vs Predicted).....	83
6.4.3 Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων (Predicted vs Run).....	84
6.4.4 Διάγραμμα των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών (Predicted vs Actual).....	85
6.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για τον σχεδιασμό Box Behnken.....	86
6.6 Εναλλακτική βέλτιστη λύση.....	89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	91
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ C18 ΜΕ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ	91
7.1 Εισαγωγή.....	91
7.2 Αξιολόγηση μοντέλου	92
7.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	93
7.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}	93
7.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την εκλεκτικότητα α	95
7.4 Διαγνωστικά διαγράμματα.....	96
7.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για το σχεδιασμό CCD.....	96
7.5.1 Συνάρτηση επιθυμητότητας για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=1,30$	96
7.5.2 Συνάρτηση επιθυμητότητας για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=0,77$	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	101
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΥΟ ΣΤΗΛΕΣ ΜΕ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ D-OPTIMAL	101
8.1 Εισαγωγή.....	101
8.2 Αξιολόγηση μοντέλου	102
8.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	103
8.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}	103
8.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την εκλεκτικότητα α	105
8.4 Διαγνωστικά διαγράμματα.....	106
8.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για το σχεδιασμό D-Optimal	107
8.5.1 Συνάρτηση επιθυμητότηταςγια τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=1,30$	107
8.5.2 Desirability για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=0,77$	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	112
ΣΥΓΚΡΙΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	112
9.1 Δομικά χαρακτηριστικά των πειραματικών σχεδιασμών	112

9.2 Διαφορές ως προς τη βέλτιστη λύση.....	113
9.2.1 Από τον σχεδιασμό Box-Behnken προέκυψαν τα παρακάτω:	113
9.2.2 Από τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό προέκυψαν τα παρακάτω:	113
9.2.3 Από τον σχεδιασμό D-Optimal προέκυψαν τα παρακάτω:	114
9.3 Διαφορές και ομοιότητες στην ικανότητα πρόβλεψης	114
9.3.1 Για τον Box-Behnken:.....	114
9.3.2. Για τον CCD:.....	115
9.3.3 Για τον D-Optimal:.....	115
9.4 Συμπερασματικά	115
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
ABSTRACT	118
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 :Χημική δομή αμλοδιπίνης	21
Εικόνα 2: Χημική δομή βαλσαρτάνης	22
Εικόνα 3: Χημική δομή υδροχλωροθειαζιδίου	23
Εικόνα 4: Συσχέτιση της απόδοσης μιας αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση και το pH [27].....	28
Εικόνα 5: Ποσοτικοί παράγοντες και ο χώρος διαστάσεων των παραγόντων [27]....	29
Εικόνα 6: Ποιοτικοί παράγοντες και ο χώρος διαστάσεων των παραγόντων [27].....	30
Εικόνα 7: α) Οι τιμές της απόκρισης υποδεικνύουν αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβλητών X_1X_2 . β) Οι τιμές της απόκρισης υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβλητών X_1X_2 [30].....	32
Εικόνα 8: Συσχετισμός μεταβλητών και αποκρίσεων [18].....	35
Εικόνα 9: Πλήρεις Παραγοντικοί Σχεδιασμοί (α) Δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα (β) Δύο παραγόντων σε τρία επίπεδα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων ενός πειράματος (run) [25].....	37
Εικόνα 10: Σύγκριση α) Πλήρη Παραγοντικού Σχεδιασμού-Full Factorial Design β) Κλασματικού Παραγοντικού Σχεδιασμού-Fractional Factorial Design. Παρατηρείται η μείωση του αριθμού των πειραμάτων από τον α) με 8 πειράματα στον β) με 4 πειράματα [27].....	38
Εικόνα 11: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός με δύο παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25].....	39
Εικόνα 12: Box Behnken σχεδιασμός με τρεις παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25].....	39
Εικόνα 13: Doehlert design με δύο παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25]	40
Εικόνα 14: Παράδειγμα D-optimal σχεδιασμού με δύο παράγοντες και εννιά πειράματα, όπου το κατώτερο δεξιά τρίγωνο του σχεδιασμού έχει αφαιρεθεί, καθώς ανήκει σε πειράματα με συνδυασμούς τιμών παραγόντων που δεν μπορούν να εκτελεστούν [25].....	40
Εικόνα 15: α) Μεικτός σχεδιασμός για τρία συστατικά των οποίων οι τιμές αθροίζονται στο 100% και β) το εύρος των παραγόντων σε τριών διαστάσεων σχεδιάγραμμα [25].....	42
Εικόνα 16: Γράφημα του ύψους κορυφής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, στη φασματοσκοπία απορρόφησης [27]	43
Εικόνα 17: Πείραμα με μεγάλο πειραματικό σφάλμα [27]	44
Εικόνα 18: Πείραμα με μικρό πειραματικό σφάλμα [27]	45
Εικόνα 19: Σχεδιάγραμμα βαθμών ελευθερίας.	45
Εικόνα 20: Αποκριτική επιφάνεια με έναν παράγοντα ανταποκρινόμενη σε δευτεροβάθμια συνάρτηση [45]	48
Εικόνα 21: Αποκριτική επιφάνεια με δύο παράγοντες ανταποκρινόμενη σε δευτεροβάθμια συνάρτηση (3D γράφημα) [45]	49
Εικόνα 22: Διαγράμματα αποκριτικών επιφανειών με δύο παράγοντες α) με μέγιστη απόκριση β) με σταθερή κορυφογραμμή γ) με ανερχόμενη κορυφογραμμή δ) με σχήμα σέλας [45]	49

Εικόνα 23: Διαδοχικά βήματα της RSM για την εύρεση της βέλτιστης απόδοσης μιας διαδικασίας.....	50
Εικόνα 24: Τριών διαστάσεων επιφάνειες απόκρισης σε συνάρτηση με δύο παράγοντες α) έχοντας μέγιστη απόκριση, β) χωρίς μέγιστη απόκριση στο εύρος τιμών των παραγόντων και γ) με πλατώ [25]	50
Εικόνα 25: Γραφική παράσταση της συνάρτησης επιθυμητότητας για διαφορετικά κριτήρια βελτιστοποίησης	52
Εικόνα 26: Συσχέτιση της απόδοσης μιας χημικής αντίδρασης με δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, το χρόνο (ξ_1) και τη θερμοκρασία (ξ_2) α) σε ένα τριδιάστατο διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης β) σε ένα περίγραμμα καμπύλης [66].....	53
Εικόνα 27: Βήματα κατασκευής ενός Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού (CCD) [20] ..	54
Εικόνα 28: Ένας Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός σε τρεις διαστάσεις με τα σημεία του κύβου (τελείς), τα αστρικά σημεία (X) και το κεντρικό σημείο (κύκλος) [68]	54
Εικόνα 29: α) Περιγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCC) για δύο παράγοντες β) Εγγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός για δύο παράγοντες (CCI).[69].....	55
Εικόνα 30: Εδροκεντρωμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCF) α) για δύο παράγοντες.[43] και β) για τρεις παράγοντες [54,69].....	56
Εικόνα 31: Κυβοειδής περιοχή ενδιαφέροντος για Εδροκεντρωμένο Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό [54]	56
Εικόνα 32: α) Ο κύβος για τον BBD και β) σχέδιο τριών αλληλοσυνδεόμενων 2^2 παραγοντικών σχεδιασμών με ένα κεντρικό σημείο [44].....	57
Εικόνα 33: Πειραματική μήτρα σε σύγχρονα πακέτα υπολογιστών και υπολογιστικά φύλλα	59
Εικόνα 34: Μια περιορισμένη πειραματική περιοχή για δύο μεταβλητές	60
Εικόνα 35: α) Αντλία HPLC GBC LC 1150 και β) Rheodyne 7725i S/Steel Manual Analytical Sample Injector Switch	62
Εικόνα 36: Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού UV/Vis GBC LC 1210.....	62
Εικόνα 37: Χρωματογραφήματα των τριών δραστικών ουσιών με κινητή φάση 40/5/55 v/v, στήλη C18, pH=3,00, NaH_2PO_4 40,0 mM, $\lambda=232$ nm και ροή 1 mL/min α) αμλοδιπίνης β) υδροχλωροθειαζιδίου και γ) βαλσαρτάνης	71
Εικόνα 38: Χρωματογραφήματα των τριών δραστικών ουσιών με κινητή φάση 35/65 (ACN/ H_2O) v/v, στήλη C8, pH=3,00, buffer 40,0 mM, $\lambda=232$ nm, ταχύτητα ροής 1 mL/min α) αμλοδιπίνης (AML) β) υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ) και γ) βαλσαρτάνης (VAL).....	74
Εικόνα 39: Διάγραμμα κανονικής κατανομής υπολοίπων για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{\text{AML/VAL}}$ γ) k_{VAL} σχεδιασμού BBD	82
Εικόνα 40: Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων τιμών για τις πειραματικές μετρήσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{\text{AML/VAL}}$ γ) k_{VAL} του σχεδιασμού BBD	84
Εικόνα 41: Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης πειραμάτων για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{\text{AML/VAL}}$ γ) k_{VAL} του σχεδιασμού BBD	85
Εικόνα 42: Αναπαράσταση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών των αποκρίσεων α) k_{HCTZ} β) $R_{\text{AML/VAL}}$ και γ) k_{VAL} για τον σχεδιασμό BBD	86

Εικόνα 43: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ και γ) k_{VAL} του σχεδιασμού BBD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας	87
Εικόνα 44: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων και των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , $R_{AML/VAL}$, k_{VAL} και επιθυμητότητας (desirability)	88
Εικόνα 45: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH	88
Εικόνα 46: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζίδης (HCTZ), αμλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες	89
Εικόνα 47: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων και των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , $R_{AML/VAL}$, k_{VAL} και επιθυμητότητας.....	90
Εικόνα 48: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και συγκέντρωση άλατος.	90
Εικόνα 49: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού CCD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας ...	96
Εικόνα 50: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)	97
Εικόνα 51: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH	97
Εικόνα 52: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες	98
Εικόνα 53: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού CCD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας ...	98
Εικόνα 54: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)	99
Εικόνα 55: 3D γράφημα επιθυμητότητας α) ποσοστού ACN και pH β) ποσοστού ACN και ποσοστού MeOH.....	100
Εικόνα 56: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες	100
Εικόνα 57: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού D-Optimal για τη συνάρτηση επιθυμητότητας	107
Εικόνα 58: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability) ...	108
Εικόνα 59: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH	108
Εικόνα 60: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες για τον σχεδιασμό D-Optimal και με $\alpha=1,3$	109
Εικόνα 61: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού D-Optimal για τη συνάρτηση επιθυμητότητας	109
Εικόνα 62: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability) ...	110
Εικόνα 63: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH.....	110

Εικόνα 64: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), βαλσαρτάνης (VAL) και αμλοδιπίνης (AML) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες για τον σχεδιασμό D-Optimal και με $\alpha=0,77$ 111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην υπέρταση [3]	20
Πίνακας 2: Σχεδιασμός πειραμάτων για τρεις παράγοντες σε δύο επίπεδα [28].....	31
Πίνακας 3: Κλασσικός σχεδιασμός πειραμάτων-ένας παράγοντας τη φορά (OFAT) με τρεις παράγοντες A,B και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (-) και το υψηλό (+) [30].....	32
Πίνακας 4: Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός με τρεις παράγοντες A,B και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (-) και το υψηλό (+) [30].....	36
Πίνακας 5: Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός με τρεις παράγοντες A,B και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (-) και το υψηλό (+) [30].....	37
Πίνακας 6: Επίπεδα 7 παραγόντων ενός Plackett-Burman σχεδιασμού με 8 πειράματα. Το (+) αντιπροσωπεύει το ένα επίπεδο και το (-) το δεύτερο [25].....	41
Πίνακας 7: Τρεις πειραματικοί σχεδιασμοί με ίδια τιμή P [27].....	46
Πίνακας 8: Βασικές ιδιότητες των τριών δραστικών ουσιών αμλοδιπίνης, υδροχλωροθειαζιδίου και βαλσαρτάνης [74].	68
Πίνακας 9: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18 και pH=3,00, NaH ₂ PO ₄ 40 mM για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης με ACN, με MeOH ή με συνδυασμό και των δύο διαλυτών.....	70
Πίνακας 10: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18 και pH=4-5, για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης, με ACN και MeOH	72
Πίνακας 11: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18, pH=3,00, για κινητή φάση 45/55 (ACN/H ₂ O) v/v και διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος.....	72
Πίνακας 12: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C8, pH=3,00-4,50, για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης (ACN, MeOH ή συνδυασμό και των δύο διαλυτών) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος	73
Πίνακας 13: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό Box-Behnken	75
Πίνακας 14: Τα πειράματα για τον σχεδιασμό Box-Behnken, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 10 trial version, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων.....	76
Πίνακας 15: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού Box-Behnken	77
Πίνακας 16: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας k _{HCTZ}	79
Πίνακας 17: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την διαχωριστικότητα μεταξύ αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης R _{AML/VAL}	80
Πίνακας 18: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας k _{VAL}	81
Πίνακας 19: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό CCD.....	91

Πίνακας 20: Τα πειράματα για τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων	92
Πίνακας 21: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού CCD	93
Πίνακας 22: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας k_{HCTZ}	94
Πίνακας 23: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την εκλεκτικότητα α	95
Πίνακας 24: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό D-Optimal	101
Πίνακας 25: Τα πειράματα για τον Σχεδιασμό D-Optimal, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 7.0.0, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων	102
Πίνακας 26: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού D-Optimal	103
Πίνακας 27 :Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας k_{HCTZ}	104
Πίνακας 28: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την εκλεκτικότητα α	105
Πίνακας 29: Δομικά χαρακτηριστικά των τριών πειραματικών σχεδιασμών που διεξάχθηκαν για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης	112

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

1.1 Εισαγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η υπέρταση και η στηθάγχη, αποτελούν μάλιστα της σύγχρονης κοινωνίας, με αποτέλεσμα η ευρεία κατανάλωση των αντίστοιχων φαρμάκων να κρίνεται επιτακτική ανάγκη με στόχο τη μείωση της θνησιμότητας και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου. Προς διευκόλυνση των ασθενών έχουν παραχθεί φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν ταυτόχρονα πάνω από μία δραστικές ουσίες. Οι τρεις δραστικές ουσίες υδροχλωροθειαζίδιο, αμλοδιπίνη και βαλσαρτάνη περιέχονται σε δισκία του εμπορικού σκευάσματος Coralia HCT, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης. Το φαρμακευτικό σκεύασμα εγκρίθηκε από τον FDA και τον EMA το 2009 και η τριπλή του δράση βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματική στη μείωση της πίεσης και γενικότερα στη ρύθμιση της ανεξάρτητα από την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα και τη σοβαρότητα της ασθένειας [1].

1.2 Φυσιολογικός έλεγχος της αρτηριακής πίεσης

Αρτηριακή ονομάζεται η πίεση που ασκείται στα τοιχώματα των αρτηριών κατά τη συστολή και διαστολή της καρδιάς (συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση). Η πρώτη (συστολική πίεση) μετράται μετά την σύσπαση της καρδιάς και είναι υψηλή, ενώ η δεύτερη (διαστολική πίεση) μετράται πριν τη σύσπαση της καρδιάς και είναι χαμηλή. Διαφέρει ανάλογα με τη δύναμη του καρδιακού παλμού, την ελαστικότητα των αρτηριακών τοιχωμάτων, τον όγκο και το ιξώδες του αίματος, την ηλικία και φυσική κατάσταση ενός ατόμου. Η αρτηριακή πίεση αίματος (BP) είναι άμεσα ανάλογη με την καρδιακή παροχή (CO) και την περιφερική αγγειακή αντίσταση (PVR).

Τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα υπερτασικά άτομα, η αρτηριακή πίεση διατηρείται με ρύθμιση της καρδιακής παραγωγής και της περιφερικής αγγειακής αντίστασης, που ασκείται σε τρεις ανατομικές θέσεις, τα αρτηρίδια, τα τριχοειδή φλεβίδια και την καρδιά. Μία τέταρτη ανατομική περιοχή ελέγχου είναι ο νεφρός ο οποίος συμβάλλει στη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης ρυθμίζοντας τον όγκο του ενδοαγγειακού υγρού [2,3].

Σε γενικές γραμμές η αρτηριακή πίεση ελέγχεται φυσιολογικά από:

- ❖ Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα που νευρώνει την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία.

❖ Από άλλους συντελεστές.

- Την χωρητικότητα των φλεβών
- Την περιφερική αντίσταση
- Τους τασεο-υποδοχείς και χημειο-υποδοχείς
- Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης

1.3 Αρτηριακή Υπέρταση-Ορισμός

Η υπέρταση ή υψηλή αρτηριακή πίεση, η οποία ονομάζεται αρτηριακή υπέρταση, είναι μια χρόνια ιατρική κατάσταση στην οποία η αρτηριακή πίεση στις αρτηρίες είναι αυξημένη. Αυτό απαιτεί από την καρδιά να εργάζεται εντονότερα από το κανονικό για να κυκλοφορεί το αίμα μέσω των αιμοφόρων αγγείων. Η πίεση του αίματος εκτιμάται με δύο μετρήσεις, συστολική και διαστολική, οι οποίες εξαρτώνται από το εάν ο καρδιακός μυς συστέλλεται (συστολικός) ή χαλαρώνει μεταξύ των χτύπων (διαστολής). Η φυσιολογική πίεση αίματος σε κατάσταση ηρεμίας κυμαίνεται μεταξύ 100-140 mmHg συστολικής και 60-90 mmHg διαστολικής. Η υψηλή αρτηριακή πίεση διαγιγνώσκεται ως το πρώτο στάδιο, εάν η αρτηριακή πίεση είναι σταθερά πάνω από 140/90 mmHg ή ως δεύτερο στάδιο αν είναι σταθερά πάνω από 160/100 mmHg.

Η υπέρταση ταξινομείται σε δύο κατηγορίες την πρωτοπαθή υπέρταση και την δευτεροπαθή υπέρταση. Περίπου το 90-95% των περιπτώσεων ανήκουν στην πρωτοπαθή υπέρταση που σημαίνει υψηλή πίεση του αίματος χωρίς προφανή υποκείμενη ιατρική αιτία. Το υπόλοιπο 5-10% των περιπτώσεων (δευτεροπαθούς υπέρτασης) προκαλείται από άλλες παθήσεις που επηρεάζουν τους νεφρούς, τις αρτηρίες, την καρδιά ή το ενδοκρινικό σύστημα [2].

1.4 Μηχανισμός δράσης αντιυπερτασικών φαρμάκων

Όλοι οι αντιυπερτασικοί παράγοντες ενεργούν σε μία ή περισσότερες από τις τέσσερις θέσεις ανατομικού ελέγχου (αρτηρίες και αρτηρίδια, τριχοειδή φλεβίδια, καρδιά, νεφρός) και δρουν με παρεμβολή σε φυσιολογικούς μηχανισμούς ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης. Η ταξινόμηση αυτών των παραγόντων γίνεται σύμφωνα με τον κύριο ρυθμιστικό τρόπο ή τον μηχανισμό με τον οποίο ενεργούν. Μερικά από αυτά τα αντιυπερτασικά χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, όπως για παράδειγμα το υδροχλωροθειαζίδιο, η φουροσεμίδα, η σπειρονολακτόνη, η μετοπρολόλη, η καπτοπρίλη και η λοσαρτάνη [4,5]. Οι κατηγορίες των αντιυπερτασικών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην υπέρταση [3]

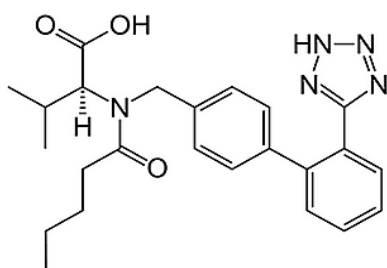
Κατηγορία	Υποκατηγορία	Παραδείγματα	Μηχανισμός δράσης
Διουρητικά	Θειαζίδες	Υδροχλωριθειαζίδιο	Αναστολή της επαναρρόφησης ιόντων NaCl
	Διουρητικά της αγκύλης του Henle	Φουροσεμίδη	Αναστολείς του συμμεταφορικού συστήματος $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$
	Ανταγωνιστές Αλδοστερόνης	Σπιρονολακτόνη, Επλερερόνη	Αναστολή του υποδοχέων αλδοστερόνης
Συμπαθητικολυτικά	Κεντρικά δρώντα	Κλονιδίνη Μεθυλντόπα	Διέγερση α_2 -υποδοχέων
	Ανταγωνιστές α αδρενεργικών υποδοχέων	Πραζοσίνη	Επιλεκτική αναστολή α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων
	Ανταγωνιστές β -αδρενεργικών υποδοχέων	Μετοπρολόλη	Αναστολή β -υποδοχέων
Αγγειοδιασταλτικά		Αμλοδιπίνη	Αναστολή μεταφοράς ιόντων Ca^{2+}
		Υδραλαζίνη	Απελευθέρωση NO
Αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης		Καπτοπρίλη Λισινοπρίλη	Αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης
Ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτασίνης		Λοσαρτάνη Βαλσαρτάνη	Αναστολή υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT1
Αναστολέας ρενίνης		Αλισκιρένη	Αναστολή της δράσης του ενζύμου της ρενίνης

Γαστρεντερικό Σύστημα ➡️ Άνορεξία, δυσφαγία, διάρροια, παγκρεατίτιδα, έμετος, Δυσκοιλιότητα
Αναπνευστικό Σύστημα ➡️ Δύσπνοια, επίσταξη
Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα ➡️ Ξηρό στόμα, αύξηση ιδρώτα
Μεταβολικό Σύστημα ➡️ Υπογλυκαιμία, δίψα
Δερματολογικές Α.Ε. ➡️ Αγγειοοίδημα, εξανθήματα
Ψυχιατρικές Α.Ε. ➡️ Αϋπνία, κατάθλιψη, κρίσης άγχους, νευρικότητα
Μυοσκελετικό Σύστημα ➡️ Αρθραλγία, μυαλγία, μυϊκές κράμπες
Οφθαλμολογικές Α.Ε. ➡️ Διπλωπία, πόνος στα μάτια, επιπεφυκίτιδα, προβλήματα στην όραση [7].

1.6 Βαλσαρτάνη (VAL): ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II

Η βαλσαρτάνη (VAL) είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II, το οποίο σημαίνει ότι μπλοκάρει τους υποδοχείς AT1 αναστέλλοντας τη δράση της ορμόνης «αγγειοτασίνη II». Η «αγγειοτασίνη II» είναι ισχυρό αγγειοσυσταλτικό (ουσία που προκαλεί τη συστολή των αιμοφόρων αγγείων) και έτσι αποκλείοντας τους υποδοχείς στους οποίους δεσμεύεται φυσιολογικά και δρα, η βαλσαρτάνη έμμεσα προκαλεί τη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης μπλοκάρει την έκκριση της αλδοστερόνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της κατακράτησης νερού, άλατος και της πίεσης του αίματος. Η χρήση τους απαγορεύεται από εγκύους, καθώς προκαλεί εβρουτοξικότητα [1,6].

Χημική δομή:



Εικόνα 2: Χημική δομή βαλσαρτάνης

Ενδείξεις: Η βαλσαρτάνη χρησιμοποιείται στον έλεγχο της υπέρτασης, σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Ανεπιθύμητες ενέργειες:

Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα ➡ Ζάλη, λιποθυμία

Γαστρεντερικό Σύστημα ➡ Διάρροια, ναυτία, πόνος στομάχου, έμετος

Αναπνευστικό Σύστημα ➡ Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού, βήχας, ρινική καταρροή, πονόλαιμος, φτέρνισμα

Μεταβολικό Σύστημα ➡ Πτώση βάρους

Δερματολογικές Α.Ε. ➡ Κνησμός, εξανθήματα, πρησμένα χείλη

Μυοσκελετικό Σύστημα ➡ Πόνος πλάτης, στήθους και αρθρώσεων

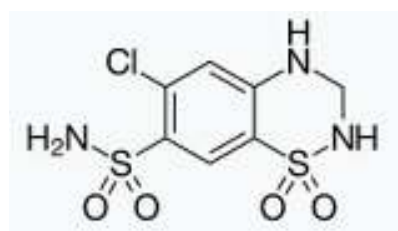
Οφθαλμολογικές Α.Ε. ➡ Θολή όραση

Διάφορες Α.Ε. ➡ Πονοκέφαλος, κόπωση, συμπτώματα γρίπης, αίσθηση δίψας, υπόταση [7]

1.7 Υδροχλωροθειαζίδιο (HCTZ): ένα θειαζιδικό διουρητικό

Το Υδροχλωροθειαζίδιο ανήκει στην κατηγορία των διουρητικών. Τα διουρητικά αποτελούν θεραπεία πρώτης γραμμής για την υπέρταση. Σε χαμηλές δόσεις είναι ασφαλή, φθηνά και αποτελεσματικά στην πρόληψη εγκεφαλικού επεισοδίου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα διουρητικά είναι ανώτερα από τους β-αποκλειστές για τη θεραπεία της υπέρτασης σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, τα θειαζιδικά διουρητικά μειώνουν την πίεση του αίματος προκαλώντας αύξηση της αποβολής νατρίου και νερού, μειώνοντας τον εξωκυτταρικό όγκο, με αποτέλεσμα τη μείωση της καρδιακής παροχής και της νεφρικής αιματικής ροής και συνεπώς, την αρτηριακή πίεση. Με μακροχρόνια θεραπεία, ο όγκος του πλάσματος προσεγγίζει τα φυσιολογικά επίπεδα και, ως εκ τούτου, είναι χρήσιμες σε θεραπεία συνδυασμού με μια ποικιλία άλλων αντιυπερτασικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των β-αποκλειστών, των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ACE), των αναστολέων του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II και των καλιοσυντηρητικών διουρητικών [1,6].

Χημική δομή:



Εικόνα 3: Χημική δομή υδροχλωροθειαζιδίου

Ενδείξεις: Το υδροχλωροθειαζίδιο χρησιμοποιείται σε υπερτασικούς ασθενείς για την μείωση της αρτηριακής πίεσης, στην πρόληψη εμφράγματος και σε περιπτώσεις νεφρικής δυσλειτουργίας (κατακράτησης υγρών).

Ανεπιθύμητες ενέργειες:

Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα ➡ Ζαλάδα, λιποθυμία

Γαστρεντερικό Σύστημα ➡ Ναυτία, ανορεξία, διάρροια, έμετος, δυσκοιλιότητα, ερεθισμό από γαστρικό οξύ

Αναπνευστικό Σύστημα ➡ Αναπνευστικά προβλήματα

Δερματολογικές Α.Ε. ➡ Κνησμός, εξανθήματα, πρήξιμο στο πρόσωπο

Οφθαλμολογικές Α.Ε. ➡ Μείωση όρασης, πόνος στα μάτια

Διάφορες Α.Ε. ➡ Αφυδάτωση, ξηροστομία, μυϊκή αδυναμία

Καρδιαγγειακό Σύστημα ➡ Υπόταση, ορθοστατική υπόταση [7]

1.8 Μέθοδοι ανάλυσης

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες τεχνικές ανάλυσης και μέθοδοι με τις οποίες έχουν προσδιοριστεί οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες. Μία από αυτές είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της αμλοδιπίνης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βαλσαρτάνης, με χρήση HPLC-DAD, κάτω από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης και στήλη Zorbax SB-C8 (4,6x250 mm, 5 μm). Η κινητή φάση αποτελείται από αναλογία ακετονιτρίλιου και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος, με συγκέντρωση 0,025 M. Το μήκος κύματος του ανιχνευτή είναι ρυθμισμένο στα 238 nm, για τη μέτρηση της αμλοδιπίνης και στα 225 nm για τη βαλσαρτάνη και το υδροχλωροθειαζίο, ενώ η ροή βρίσκεται στο 1 mL/min. Οι χρόνοι έκλουσης των ουσιών είναι 4,9 , 6,4 και 8,3 min για το υδροχλωροθειαζίδιο, την αμλοδιπίνη και τη βαλσαρτάνη αντίστοιχα [1].

Ο προσδιορισμός των ίδιων δραστικών ουσιών αναφέρεται και με χρήση RP-HPLC χρησιμοποιώντας στήλη Rp-C₁₈, κινητή φάση που αποτελείται από ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM σε αναλογία 20:50:30%, pH 3, ροή 1 mL/min και μήκος κύματος στα 239 nm. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 10 min με την αμλοδιπίνη να εκλύεται στα 5,83 min, την βαλσαρτάνη στα 8,86 min και το υδροχλωροθειαζίδιο στα 3,34 min [7]. Για τις ίδιες ουσίες υπάρχουν παρόμοιες αναφορές με χρήση HPLC-UV [8,9].

Αναφέρεται επίσης, ο προσδιορισμός αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης σε δισκία με χρήση HPLC-PAD, στήλη C₁₈ (ODS 2, 10 μm, 200x4.6 mm), κινητή φάση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 3,6 , 0,01 mol/L): ακετονιτρίλιο: μεθανόλη σε

αναλογία 46:44:10 v/v/v και ρύθμιση ροής 1 mL/min. Ο ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος στα 240nm και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης έφτασε τα 9 min με την αμλοδιπίνη να εκκλύεται στα 7,1 min και την βαλσαρτάνη στα 3,4 λεπτά **[10]**. Επίσης, για τις ίδιες ουσίες υπάρχει αναφορά με HPLC-UV, στήλη xTerra C₁₈ (250x4,6 mm) κινητή φάση μεθανόλη/ακετονιτρίλιο/νερό/τριαιθυλαμίνη σε αναλογία 40:20:30:10, pH=3, ροή 1.2mL/min και μήκος κύματος του ανιχνευτή 237nm. Η αμλοδιπίνη εκκλύεται στα 4,3 λεπτά, ενώ η βαλσαρτάνη στα 7,6 min **[11]**.

Τέλος, υπάρχει πληθώρα αναφορών για τον προσδιορισμό αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης με φασματοφωτομετρία **[12]**, RP-HPLC/DAD **[13]**, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, καθώς και HPLC με UV ανιχνευτή **[14]** ενώ, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός βαλσαρτάνης και υδροχλωροθειαζιδίου περιγράφεται επίσης με διάφορες τεχνικές, όπως φασματοφωτομετρία **[15]**, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση **[16]** και HPTLC **[17]**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

2.1 Εισαγωγικά

Οι περισσότεροι άνθρωποι σκέφτονται τη στατιστική μόνο όταν έρχονται αντιμέτωποι με μεγάλο όγκο πληροφοριών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η αλήθεια είναι πως κάθε ερευνητής που χρησιμοποιεί στατιστικές μεθόδους έχει τη δύναμη να διαχειριστεί τεράστιο όγκο πληροφοριών και να εξάγει πολύτιμα συμπεράσματα. Σε ένα πείραμα, η πιο σημαντική στατιστική δραστηριότητα δεν είναι η ανάλυση των δεδομένων, αλλά ο πειραματικός σχεδιασμός που θα μας οδηγήσει στην πληροφορία. Αν αυτός δεν σχεδιασθεί σωστά το πείραμα θα δώσει ασυνάρτητες και ασήμαντες πληροφορίες. Το μυστικό ενός καλού σχεδιασμού, λοιπόν, είναι να στηθεί μια σειρά πειραμάτων που θα αποδώσουν με ακρίβεια το είδος των πληροφοριών που επιδιώκουμε να αποκτήσουμε. Για άλλη μια φορά, αυτό μπορεί να φαίνεται προφανές, αλλά στην πραγματικότητα όχι μόνο δεν είναι, αλλά αποτελεί και το πιο δύσκολο κομμάτι ενός πειραματικού σχεδιασμού [18].

2.2 Ιστορική Αναδρομή

Η ανάπτυξη των στατιστικών πειραματικών σχεδιασμών έχει τις ρίζες της στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ο πρώτος που ανέπτυξε τις αρχές γύρω από αυτή τη πρωτοποριακή θεωρία ήταν ο Ronald A. Fisher, το 1935. Ο Fisher εισήγαγε τη στατιστική σκέψη και τις στατιστικές αρχές στην έρευνα των πειραματικών σχεδιασμών, με προφανή επιρροή στον αγροτικό τομέα, καθώς κατάφερε μέσα από τα πειράματα που σχεδίασε να εντοπίσει τις βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας της γης για τη μέγιστη απόδοση στην παραγωγή αγροτικών προϊόντων [19].

Το 1951, μετά την εκτεταμένη εργασία των Box και Wilson πάνω στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology), ξεκινάει η πρώτη περίοδος της ιστορίας του πειραματικού σχεδιασμού και προάγεται περαιτέρω η χρήση του στη βιομηχανία και στον τομέα της χημείας. Στα τέλη του 1970, αρχίζει η δεύτερη περίοδος της ιστορίας, ή αλλιώς «επανάσταση της ποιότητας» όπως αναφέρει ο Montgomery, κατά την οποία πυροδοτήθηκε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τη βελτίωση ποιότητας. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε αυτό έπαιξε η εισαγωγή της έννοιας του ανθεκτικού παραμετρικού σχεδιασμού (robust parameter design) από τον Genichi Taguchi το 1987, ο οποίος έδωσε

περισσότερη έμφαση στη θεωρία του πειραματικού σχεδιασμού αντί του μαθηματικού σχεδιασμού του. Μετά το 1990, στο προσκήνιο βρίσκεται η μοντέρνα περίοδος, κατά την οποία η παγκοσμιοποίηση και ο συνεχής ανταγωνισμός έχουν καταστήσει τον πειραματικό σχεδιασμό βασικό στατιστικό εργαλείο και έχει εισαχθεί νέος τρόπος παρουσίασης της έννοιας της «συνεχούς βελτίωσης ποιότητας» (Continuous Quality Improvement-CQI) και της ανατροφοδότησης (feedback) [20,21].

2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός-Ορισμός

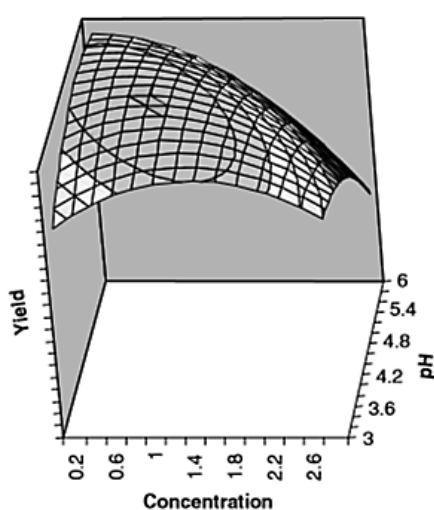
Ο *πειραματικός σχεδιασμός* μπορεί να οριστεί ως η στρατηγική ή η σχεδιασμένη προσέγγιση για τη διεξαγωγή πειραμάτων, ώστε οι πληροφορίες που θα διεξαχθούν να είναι όσο γίνεται πιο ακριβείς, αποτελεσματικές και να προσδιορίζουν τη σχέση κόστος-όφελος [22,23]. Με άλλα λόγια, ο πειραματικός σχεδιασμός είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη συστηματική εξέταση διαφόρων τύπων προβλημάτων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της έρευνας, της ανάπτυξης και της παραγωγής, σε διάφορα πεδία και επιστήμες. Είναι προφανές ότι εάν τα πειράματα εκτελούνται τυχαία, το αποτέλεσμα που θα προκύψει θα είναι επίσης τυχαίο. Για το λόγο αυτό είναι επιτακτική ανάγκη τα πειράματα να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι πληροφορίες που αντλούνται να είναι χρήσιμες. Ουσιαστικά ο πειραματικός σχεδιασμός είναι στατιστική τεχνική για τον σχεδιασμό, τη διεξαγωγή, την ανάλυση και την ερμηνεία δεδομένων από πειράματα [24-26].

2.4 Πλεονεκτήματα της εφαρμογής του Πειραματικού Σχεδιασμού

Υπάρχουν αρκετοί βασικοί λόγοι για τους οποίους ένας ερευνητής, έχοντας μόνο βασικές γνώσεις, μπορεί να γίνει πιο παραγωγικός χρησιμοποιώντας τον πειραματικό σχεδιασμό, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

- Προκαταρκτική εξέταση (screening). Αυτοί οι τύποι των πειραμάτων περιλαμβάνουν την παρατήρηση παραγόντων που είναι σημαντικοί για την επιτυχία μιας διαδικασίας. Ένα παράδειγμα είναι η μελέτη μιας χημικής αντίδρασης, που εξαρτάται από την αναλογία του διαλύτη, τη συγκέντρωση του καταλύτη, τη θερμοκρασία, το pH, το ρυθμό ανάδευσης, κλπ. Αρχικά, μπορεί να διαπιστωθούν 10 ή περισσότεροι παράγοντες που μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν επίδραση επί της μετρούμενης μεταβλητής, στην πορεία όμως πρέπει να αποκλεισθούν οι μη σημαντικοί και να παραμείνουν αυτοί που θα μελετηθούν με λεπτομέρεια.
- Βελτιστοποίηση (optimization). Αυτή είναι μία από τις συχνότερες εφαρμογές στη χημεία. Πώς μπορεί να βελτιωθεί η απόδοση μιας αντίδρασης (Εικόνα 4) ή ο χρωματογραφικός διαχωρισμός διαφόρων ουσιών;

- Εξοικονόμηση χρόνου. Ένας επίσης πολύ καλός λόγος για τη χρήση του πειραματικού σχεδιασμού ιδιαίτερα στον τομέα της βιομηχανίας, καθώς με τον σωστό προγραμματισμό πειραμάτων και την οργανωμένη μελέτη παραγόντων μπορεί να γίνει σημαντική εξοικονόμηση χρόνου.
- Ποσοτικοποίηση με χρήση μοντέλων (quantitative modelling). Σχεδόν για όλα τα πειράματα, είτε για τα απλά στην αναλυτική χημεία που χαρακτηρίζονται από μία γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, είτε για τα πιο περίπλοκα που αφορούν φυσικές διαδικασίες και απαιτούν μια σειρά παρατηρήσεων για να περιγραφούν με ένα μαθηματικό μοντέλο, ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελεί πολύ χρήσιμο εργαλείο [27].



Εικόνα 4: Συσχέτιση της απόδοσης μιας αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση και το pH [27]

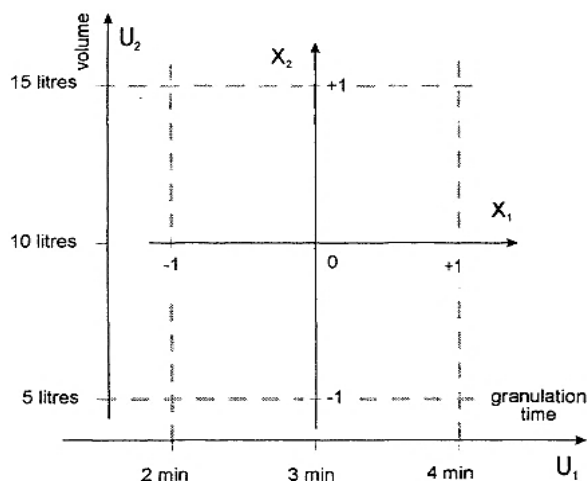
2.5 Βασικές έννοιες-Ορολογία

1. **Παράγοντας (factor)**: μια ανεξάρτητη μεταβλητή.
2. **Επίπεδα ενός παράγοντα (levels)**: είναι οι διακριτές τιμές στις οποίες κυμαίνεται ένας παράγοντας.
3. **Αποκρίσεις (responses)**: Οι αποκρίσεις είναι οι ιδιότητες μιας διαδικασίας που μπορούν να μετρηθούν, όπως για παράδειγμα ο ρυθμός διάλυσης, η πυκνότητα, ο χρόνος έκλουσης ή η απόδοση μιας αντίδρασης.
4. **Ποσοτικοί παράγοντες**. Οι ποσοτικοί παράγοντες είναι εκείνοι οι οποίοι μπορούν να πάρουν αριθμητικές τιμές, για παράδειγμα ο χρόνος ή το ύψος. Συνήθως είναι συνεχείς, δηλαδή μπορούν να πάρουν οποιαδήποτε τιμή εντός προκαθορισμένων ορίων, ωστόσο μερικές φορές λόγω πρακτικών περιορισμών επιτρέπονται μόνο διακριτά επίπεδα π.χ. το μέγεθος ενός κόσκινου που είναι

διαθέσιμο σε συγκεκριμένες διαστάσεις. Το επίπεδο του ποσοτικού παράγοντα i εκφρασμένο σε μονάδες στις οποίες ορίζεται, γράφεται U_i , όπως στην Εικόνα 5.

5. **Κωδικοποιημένες μεταβλητές (coded values).** Κάποιες φορές, με κάθε φυσική μεταβλητή συνδέεται μια κωδικοποιημένη μεταβλητή X . Αυτή η κωδικοποίηση, ονομάζεται κανονικοποίηση (normalization) και προκύπτει με μετασχηματισμό της φυσικής μεταβλητής, ώστε το επίπεδο της κεντρικής τιμής του πειραματικού εύρους τιμών να είναι το μηδέν. Τα όρια αυτού του εύρους των κωδικοποιημένων μεταβλητών είναι συνήθως ίδια για όλες τις μεταβλητές. Οι ακραίες τιμές συνήθως είναι ακέραιοι αριθμοί ± 1 .

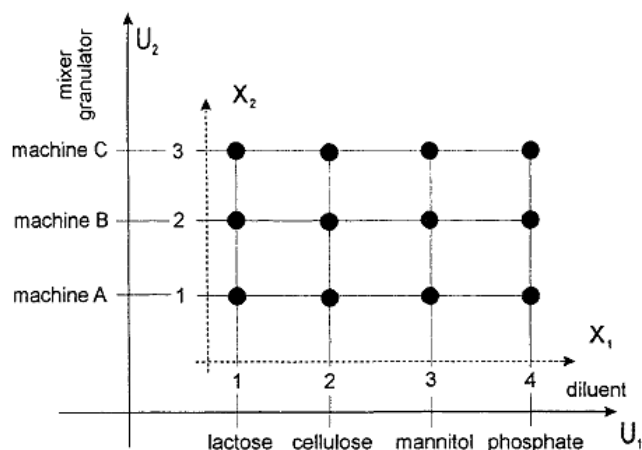
6. **Χώρος διαστάσεων των παραγόντων (factor space).** Ο k -διαστατος χώρος που ορίζεται από τις k κωδικοποιημένες μεταβλητές X_i , για τους συνεχείς ποσοτικούς παράγοντες που ερευνώνται. Για παράδειγμα, μπορεί να αναπαρασταθεί ως επίπεδο δύο διαστάσεων αν εξετάζονται μόνο δύο παράγοντες, να έχει τρεις διαστάσεις για τρεις παράγοντες κ.ο.κ. Συνήθως, το ενδιαφέρον της έρευνας αφορά ένα μικρό μέρος αυτών των διαστάσεων που ονομάζεται πειραματική περιοχή (**experimental domain**) ή περιοχή ενδιαφέροντος (**region of interest**) και εμπεριέχει το διάστημα μεταξύ της ανώτερης και της κατώτερης τιμής των κωδικοποιημένων μεταβλητών. Ο πειραματικός χώρος (**design space**) είναι ο χώρος των παραγόντων που οριοθετείται από τις κωδικοποιημένες μεταβλητές [22,27].



Εικόνα 5: Ποσοτικοί παράγοντες και ο χώρος διαστάσεων των παραγόντων [27]

7. **Ποιοτικοί παράγοντες.** Οι παράγοντες που παίρνουν μόνο διακριτές τιμές. Για παράδειγμα στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων ένας ποιοτικός παράγοντας θα μπορούσε να είναι ο τύπος μιας μηχανής όταν συγκρίνονται διαφορετικά μοντέλα, ή η διαφοροποίηση ενός συστατικού για την παραγωγή ενός φαρμάκου π.χ. λακτουλόζη, κελουλόζη, μαννιτόλη και φωσφορικά. Ο χώρος διαστάσεων των ποιοτικών παραγόντων αποτελείται μόνο από διακριτά σημεία,

ανάλογα με τα επίπεδα και τον αριθμό των παραγόντων όπως φαίνεται στην Εικόνα 6 για αυτούς τους δύο παράγοντες.



Εικόνα 6: Ποιοτικοί παράγοντες και ο χώρος διαστάσεων των παραγόντων [27]

8. **Ομαδοποίηση (blocking).** Όταν ένας αριθμός πειραμάτων μπορεί να διεξαχθεί κάτω από τις ίδιες συνθήκες τότε αυτά χωρίζονται σε ομάδες.

9. **Πείραμα (experimental run).** Κάθε πείραμα αποτελείται από μια σειρά χειρισμών που διεξάγονται κάτω από ορισμένες συνθήκες με συγκεκριμένα επίπεδα των παραγόντων (εκείνων που διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού και εκείνων που παραμένουν σταθεροί) καταλήγοντας σε μια μόνο πληροφορία για κάθε απόκριση που μετράται. Ο συνδυασμός των επιπέδων του παράγοντα που μελετώνται σε ένα πείραμα αντιπροσωπεύεται από ένα σημείο στο χώρο του σχεδιασμού. Σε ένα πειραματικό σχεδιασμό, κάθε ένα πείραμα από τη σειρά πειραμάτων μπορεί να διεξάγεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διακριτά σημεία στο χώρο του σχεδιασμού) και ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα της σειράς του.

10. **Αποδοτικότητα R.** Η αποδοτικότητα R είναι ο τρόπος περιγραφής του οφέλους που απορρέει από την αποτελεσματικότητα ενός πειραματικού σχεδιασμού και ορίζεται ως ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου (p) προς τον αριθμό των πειραμάτων (N). Μπορεί να εκφραστεί και σε ποσοστό.

$$Ref = p/N \leq 1$$

11. **Τυχαιότητα (Randomisation).** Η τυχαία σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων ώστε να διασφαλίσει ότι οι παράγοντες, που δεν μπορούν να ελεγχθούν, δεν επηρεάζουν την επαναληψιμότητα.

12. **Επανάληψη (Replication).** Είναι η διαδικασία κατά την οποία διεξάγονται περισσότερες από μία δοκιμές ενός πειράματος. Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των επαναλήψεων ενός πειράματος και των πολλαπλών μετρήσεων ενός παράγοντα. Η επανάληψη παρέχει μια εκτίμηση της τυπικής απόκλισης του πειραματικού σφάλματος και για αυτόν τον λόγο πρέπει να επαναληφθεί ολόκληρο το

πείραμα με επαναχρησιμοποίηση του οργάνου από την αρχή. Δεν είναι βάσιμο απλά να ληφθούν περισσότερες μετρήσεις για κάθε παράγοντα. Έτσι προκύπτει ένα πραγματικό αντίγραφο πειράματος.

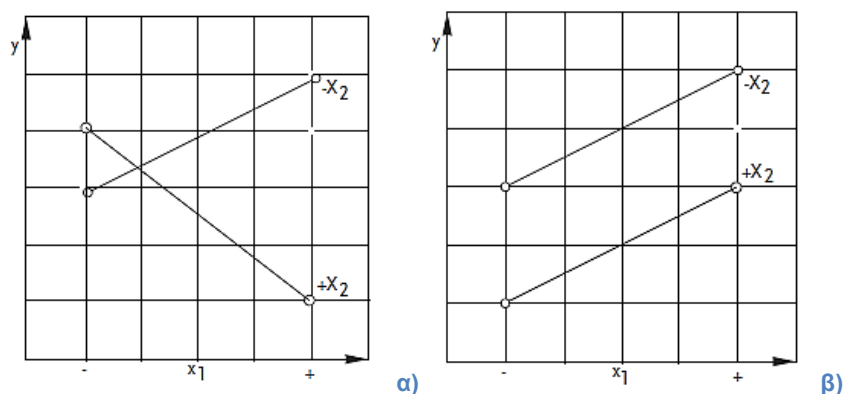
13. **Περιστροφή (Rotatability).** Ένα σχέδιο είναι περιστρεφόμενο όταν το μοντέλο που χρησιμοποιείται προσδιορίζει την απόκριση με την ίδια ακρίβεια, σε όλα τα σημεία του εύρους των παραγόντων που απέχουν την ίδια απόσταση από το κέντρο του σχεδίου.

14. **Ορθογωνιότητα (Orthogonality).** Είναι μια ιδιότητα ενός πειραματικού σχεδιασμού που ελέγχεται πολύ εύκολα με τον εξής τρόπο. Μετά την αντικατάσταση του επιπέδου (+) με (+1) και του επιπέδου (-) με (-1) στον Πίνακα 2, το άθροισμα σε κάθε στήλη των παραγόντων Α,Β,Γ για τα 4 πειράματα είναι μηδέν.[28]

Πίνακας 2: Σχεδιασμός πειραμάτων για τρεις παράγοντες σε δύο επίπεδα [28]

Πείραμα	Παράγοντας Α	Παράγοντας Β	Παράγοντας Γ
1	+	+	-
2	+	-	+
3	-	+	+
4	-	-	-

15. **Στρατηγικές βελτιστοποίησης.** Είναι διαδικασίες, οι οποίες ακολουθούνται όταν γίνεται προσπάθεια για σχεδιασμό ενός προϊόντος, για εύρεση μιας διαδικασίας ή μιας αναλυτικής μεθόδου, όπως για παράδειγμα διαχωρισμού ουσιών ενός δείγματος με τη βοήθεια της χρωματογραφίας. Κατά τη διαδικασία αυτή, ο ερευνητής προσπαθεί να ανακαλύψει τις βέλτιστες συνθήκες για έναν αριθμό παραγόντων ή παραμέτρων, όπως το pH, η συγκέντρωση, ο χρόνος αντίδρασης κ.α. που επηρεάζουν τις τιμές των αποκρίσεων. Τα επίπεδα τους κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μέσα στο οποίο υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες για το συνολικά καλύτερο αποτέλεσμα. Οι παράγοντες αυτοί είναι επίσης πιθανό να αλληλεπιδρούν και αυτό αποδεικνύεται όταν η τιμή του ενός παράγοντα διαφοροποιείται σε περίπτωση που γίνεται αλλαγή της τιμής του δεύτερου παράγοντα, Εικόνα 7 [29]. Όταν υπάρχει η ανάγκη βελτιστοποίησης πολλών παραγόντων, οι πιθανές στρατηγικές μπορούν να διαχωριστούν σε *μονοπαραγοντικές* και *πολυπαραγοντικές* [30,31].



Εικόνα 7: α) Οι τιμές της απόκρισης υποδεικνύουν αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβλητών X_1X_2 . β) Οι τιμές της απόκρισης υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβλητών X_1X_2 [30]

16. Μονοπαραγοντική στρατηγική (one-factor-at-a-time, OFAT). Όταν εξετάζεται μόνος ένας παράγοντας κάθε φορά, ενώ οι υπόλοιπες ανεξάρτητες μεταβλητές-παράγοντες διατηρούνται σταθεροί, η διαδικασία που ακολουθείται είναι πολύ απλή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα, όπως ότι οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων δεν υπολογίζονται, ο αριθμός των πειραμάτων αυξάνεται σημαντικά όταν είναι μεγάλος ο αριθμός των παραγόντων και οι βέλτιστες συνθήκες που θα προκύψουν μπορεί να εξαρτώνται από τις αρχικές πειραματικές συνθήκες. Ο αριθμός των πειραμάτων προκύπτει από την εξίσωση:

$$N=k(p-1)+1$$

Όπου, k είναι ο αριθμός παραγόντων και p ο αριθμός των επιπέδων στα οποία οι παράγοντες εξετάζονται.

Πίνακας 3: Κλασσικός σχεδιασμός πειραμάτων-ένας παράγοντας τη φορά (OFAT) με τρεις παράγοντες A, B και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (-) και το υψηλό (+) [30]

Αριθμός πειράματος	Συνδυασμοί των επιπέδων των παραγόντων A,B και Γ			Απόκριση y
	Παράγοντας A	Παράγοντας B	Παράγοντας Γ	
1	-	-	-	Y1
2	+	-	-	Y2
3	-	+	-	Y3
4	-	-	+	Y4

17. Πολυπαραγοντική στρατηγική. Είναι μια διαφορετική προσέγγιση κατά την οποία εξετάζονται συγχρόνως διάφοροι παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η εξέταση μπορεί να γίνει είτε διαδοχικά είτε ταυτόχρονα. Στη διαδοχική εξέταση των μεταβλητών (*sequential approach*), τα αποτελέσματα κάποιων αρχικών πειραμάτων είναι καθοριστικά για τα επόμενα στη συνέχεια. Συνήθως επιλέγεται όταν το εύρος των τιμών των μεταβλητών είναι άγνωστο και οι απαιτήσεις της βελτιστοποίησης περιορίζονται σε μόνο μία απόκριση. Αντιθέτως, στην ταυτόχρονη εξέταση πολλών

παραγόντων (*simultaneously approach*), διεξάγεται ένας προκαθορισμένος αριθμός πειραμάτων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και με την καθοδήγηση ενός καλά οργανωμένου πειραματικού σχεδιασμού [29].

18. Έλλειψη προσαρμογής (*Lack of fit*). Όταν τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν με την ολοκλήρωση ενός πειραματικού σχεδιασμού δεν ταιριάζουν στο μοντέλο που έχει χρησιμοποιηθεί τότε είναι ξεκάθαρο, είτε πως υπάρχει *καθαρό σφάλμα* (*pure error*) ή αλλιώς *τυχαίο σφάλμα* (*random error*), ή ότι το μοντέλο είναι απροσδιόριστο και δεν περιγράφει επαρκώς τη μέση δομή. Αυτό ονομάζεται έλλειψη προσαρμογής. Όταν η έλλειψη προσαρμογής είναι μεγάλη σε σχέση με το καθαρό σφάλμα, συνήθως σε μοντέλα πρώτου βαθμού, σημαίνει πως αυτά πρέπει να αντικατασταθούν με μοντέλα δευτέρου βαθμού ή να περιοριστεί η περιοχή μοντελοποίησης [32].

2.6 Εμπειρικά μοντέλα

Βασικό πρωταρχικό στάδιο για τον κάθε ερευνητή είναι αρχικά να εκτελέσει κάποια προκαταρκτικά πειράματα, ώστε να είναι σε θέση να απαντήσει σε κάποια ερωτήματα, όπως το ποιες πληροφορίες είναι δεδομένες και ποιες άγνωστες, ποιος είναι ακριβώς ο στόχος διερεύνησης, ποιες είναι οι αποκρίσεις που μπορούν να μετρηθούν και ποιες οι μεταβλητές που επηρεάζουν αυτές τις αποκρίσεις. Όταν οι αποκρίσεις και οι πειραματικές μεταβλητές οριστούν, τότε τα πειράματα μπορούν να προγραμματιστούν με ένα λογικό τρόπο, ώστε ο μέγιστος όγκος πληροφορίας να αποκτηθεί με τον ελάχιστο αριθμό πειραμάτων [33].

Το αποτέλεσμα ενός πειράματος εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες και για αυτό το λόγο μπορεί να περιγραφεί ως μια συνάρτηση. Ο όρος μοντέλο απευθύνεται στη συγκεκριμένη συνάρτηση που συνδέει τις πειραματικές μεταβλητές με τις αποκρίσεις, οι οποίες κυμαίνονται μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών. Η αντίστοιχη συνάρτηση έχει την εξής μορφή:

$$y=f(x)$$

Υπάρχουν τρεις τύποι πολυωνυμικών μοντέλων που μπορούν να περιγραφούν με δύο μεταβλητές x_1 και x_2 . Το απλούστερο πολυωνυμικό μοντέλο περιγράφει μόνο τη γραμμική σχέση μεταξύ των πειραματικών μεταβλητών και των αποκρίσεων. Σε αυτό το μοντέλο πρώτου βαθμού με δύο μεταβλητές, ισχύει ότι:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\varepsilon$$

όπου, y η απόκριση, x_i οι παράγοντες του πειραματικού σχεδιασμού, b_i οι άγνωστοι παράγοντες που θα προκύψουν από τα δεδομένα των πειραμάτων και ε το τυχαίο πειραματικό λάθος.

Στο επόμενο μοντέλο, υπάρχουν επιπρόσθετοι όροι που περιγράφουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων πειραματικών μεταβλητών και περιγράφεται ως εξής:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+\varepsilon$$

όπου x_{12} η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.

Τα δύο παραπάνω μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως για τη διερεύνηση μιας σειράς μελετών σάρωσης (screening studies) και σε μελέτη ανθεκτικότητας (robustness) ή άλλα παρόμοια [34,35]. Για να είναι όμως εφικτό να προβλεφθεί ένα βέλτιστο αποτέλεσμα πρέπει να προστεθούν επιπλέον τετραγωνικοί (quadratic) όροι στο μοντέλο. Με την εισαγωγή αυτών των όρων είναι δυνατό να προσδιορισθούν μη γραμμικές σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών και των αποκρίσεων. Οι σχεδιασμοί δευτέρου βαθμού χρησιμοποιούνται πρακτικά σε περιπτώσεις που το γραμμικό μοντέλο είναι ανεπαρκές για τη μαθηματική περιγραφή του αντικειμένου της έρευνας με επαρκή ακρίβεια. Η αντίστοιχη δευτεροβάθμια συνάρτηση που χαρακτηρίζει ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού για δύο παράγοντες είναι η παρακάτω:

$y=$	(απόκριση)
b_0+	(τομή στον $y'y$)
$b_1x_1+b_2x_2+$	(γραμμικοί όροι που εξαρτώνται από τον κάθε παράγοντα)
$b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+$	(τετραγωνικοί όροι που εξαρτώνται από τον κάθε παράγοντα)
$b_{12}x_1x_2+\varepsilon$	(αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων)

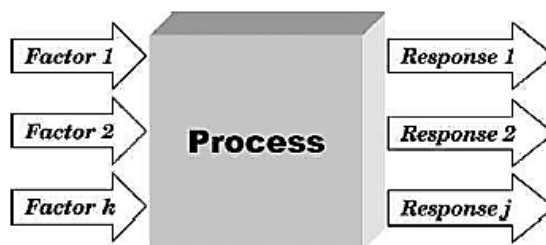
Όλες αυτές οι πολυωνυμικές συναρτήσεις περιλαμβάνουν διάφορους άγνωστους παράγοντες (b_0, b_1, b_2 κτλ) οι οποίοι πρέπει να υπολογιστούν. Για κάθε πειραματικό μοντέλο απαιτούνται διαφορετικά είδη πειραματικών σχεδιασμών [24,36,37].

2.7 Βήματα για τον σχεδιασμό ενός πειράματος

Ο σχεδιασμός ενός πειράματος περιλαμβάνει διάφορες αλληλοσυνδεόμενες δραστηριότητες. Ο ερευνητής αφού ξεκαθαρίσει το στόχο του και το αντικείμενο του πειράματός του, πρέπει να ορίσει τις αποκρίσεις και να επιλέξει τις πιθανές μεταβλητές που θα μελετήσει, ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα [24]:

- * Επανεξέταση της όλης διαδικασίας, του εξοπλισμού, των πρώτων υλών και των κρίσιμων σημείων. Βασικός, επίσης, είναι ο ρεαλιστικός οικονομικός προϋπολογισμός και συνεπώς η δυνατότητα ανταπόκρισης στην εκτέλεση και ολοκλήρωση πειραμάτων.

- ✱ Ορισμός των αποκρίσεων (output variables). Ποιες μπορούν να μετρηθούν, ποιες μπορεί να αλλάξουν κατά τη διάρκεια του χρόνου και ποιες είναι οι πηγές σφαλμάτων.
- ✱ Ορισμός των παραγόντων που διερευνούνται (input variables). Ποιες είναι οι σημαντικές μεταβλητές, οι μη σημαντικές και ποιο είναι το εύρος στο οποίο θα κυμανθούν. Ποιες αλληλεπιδράσεις αναμένονται ή αποκλείεται να αλληλεπιδράσουν.
- ✱ Αναγνώριση των πιθανών εξωτερικών παραγόντων που θα επηρεάσουν την πειραματική διαδικασία.
- ✱ Επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού, δηλαδή του μοντέλου που θα αντιστοιχίσει ικανοποιητικά τους παράγοντες με τις αποκρίσεις [38].
- ✱ Διεξαγωγή των πειραμάτων.
- ✱ Ανάλυση δεδομένων.
- ✱ Συμπεράσματα και προτάσεις.



Εικόνα 8: Συσχετισμός μεταβλητών και αποκρίσεων [18]

Οι μεταβλητές που τελικά θεωρούνται μη σημαντικές πρέπει να κρατηθούν σε ένα σταθερό επίπεδο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Είναι πάντα πιο οικονομικό να προστίθεται κάποια επιπλέον μεταβλητή στα πρώτα προκαταρκτικά πειράματα παρά μετά το πέρας αυτών. Ο χρόνος που δαπανάται στην αρχή για να δημιουργηθεί αυτή η λίστα με τις πιθανές μεταβλητές, αποκρίσεις και αλληλεπιδράσεις, αποδεικνύεται πάντα χρήσιμος και κερδοφόρος στο τέλος των πειραμάτων [24].

2.8 Είδη Πειραματικών Σχεδιασμών ανάλογα με την χρήση τους

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους ένας ερευνητής μπορεί να καταφύγει στον πειραματικό σχεδιασμό ανάλογα με το στόχο που θέλει να υλοποιήσει. Τα είδη των πειραματικών σχεδιασμών είναι πολλά και διάφορα και μπορούν να διακριθούν με βάση το μοντέλο πάνω στο οποίο βασίζονται δηλαδή γραμμικό, τετραγωνικό, με ή χωρίς αλληλεπίδραση των παραγόντων, με βάση τους περιορισμούς στα επίπεδα των παραγόντων ή με το σκοπό της μελέτης. Στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης, συνήθως το είδος του πειραματικού σχεδιασμού επιλέγεται ανάλογα με το σκοπό της μελέτης. Παρακάτω αναλύονται τα στάδια και τα είδη των πειραματικών σχεδιασμών που αντιστοιχούν σε αυτά [25].

2.8.1 Στάδιο προκαταρκτικών πειραμάτων

Τα προκαταρκτικά πειράματα μπορούν να διεξαχθούν με βάση κάποιον πειραματικό σχεδιασμό, ώστε να επιλεγθούν οι μεταβλητές που είναι πιο σημαντικές ή χρήζουν περαιτέρω μελέτης, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχουν σημαντική επιρροή σε μία ή περισσότερες αποκρίσεις. Οι πλέον κατάλληλοι είναι οι εξής [39,40]:

× **Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός** (Full Factorial Design). Σε ένα πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό τα πειράματα προκύπτουν από τον συνδυασμό των επιπέδων κάθε παράγοντα σε σχέση με τα επίπεδα όλων των άλλων παραγόντων. Αν ο κάθε παράγοντας n έχει π.χ. δύο επίπεδα, που συχνά υποδηλώνονται ως κωδικοποιημένες τιμές, δηλαδή (+) για το ένα επίπεδο και (–) για το άλλο, τότε ο αριθμός των πειραμάτων που προκύπτουν είναι 2^n . Όταν κάθε παράγοντας έχει τον ίδιο αριθμό επιπέδων, τότε ο πειραματικός σχεδιασμός ονομάζεται:

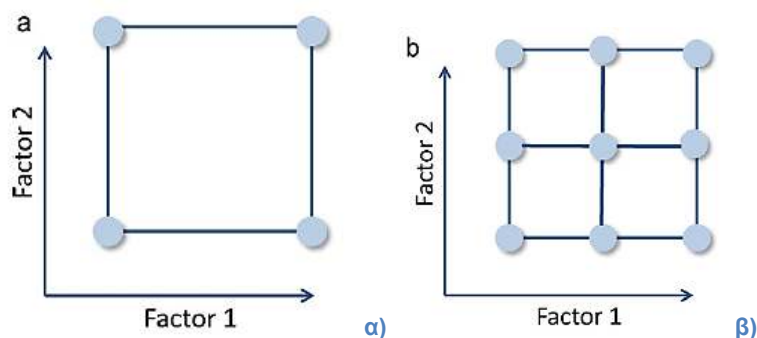
$$k^n$$

όπου, k είναι ο αριθμός των επιπέδων

Αν ο παράγοντας Α έχει τρία επίπεδα, ο Β έχει δύο επίπεδα και ο Γ έχει τρία επίπεδα, τότε ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός αποτελείται από $3 \times 2 \times 3 = 18$ πειράματα. Στον παρακάτω Πίνακα 4 αποτυπώνονται οι πειραματικές δοκιμές για τρεις παράγοντες σε τρία επίπεδα, όπου κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα πείραμα και κάθε στήλη εμπεριέχει το επίπεδο του κάθε παράγοντα [41,43].

Πίνακας 4: Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός με τρεις παράγοντες Α, Β και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (–) και το υψηλό (+) [30]

Αριθμός πειράματος	Συνδυασμοί των επιπέδων των παραγόντων Α, Β και Γ			Απόκριση y
	Παράγοντας Α	Παράγοντας Β	Παράγοντας Γ	
1	–	–	–	Y_1
2	+	–	–	Y_2
3	–	+	–	Y_3
4	+	+	–	Y_4
5	–	–	+	Y_5
6	+	–	+	Y_6
7	–	+	+	Y_7
8	+	+	+	Y_8



Εικόνα 9: Πλήρεις Παραγοντικοί Σχεδιασμοί (α) Δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα (β) Δύο παραγόντων σε τρία επίπεδα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων ενός πειράματος (run) [25]

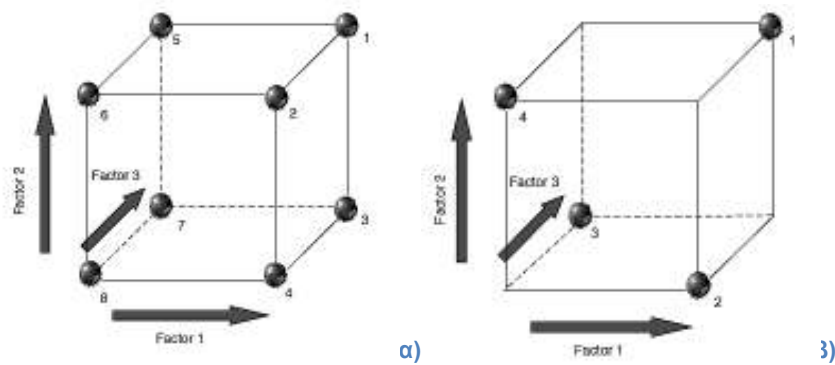
× **Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός** (Fractional Factorial Design). Αποτελεί ένα υποσύνολο των πειραμάτων του ολοκληρωμένου πειραματικού σχεδιασμού. Συχνά ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός έχει μεγάλο οικονομικό κόστος, με αποτέλεσμα να απαιτείται πειραματικός σχεδιασμός με λιγότερα πειράματα. Ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός προκύπτει όταν σε έναν παραγοντικό σχεδιασμό 2^n μειωθούν τα πειράματά του κατά $1/2$, $1/4$ ή $1/2^p$. Ο νέος σχεδιασμός που προκύπτει ονομάζεται:

2^{n-p} , Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός.

Για παράδειγμα, οι πειραματικές δοκιμές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 μειώνονται από $2^3 = 8$ σε $2^{3-1} = 4$ όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 [41,43].

Πίνακας 5: Κλασματικός Παραγοντικός Σχεδιασμός με τρεις παράγοντες A, B και Γ, με δύο επίπεδα για τον καθένα, το χαμηλό (-) και το υψηλό (+) [30]

Αριθμός πειράματος	Συνδυασμοί των επιπέδων των παραγόντων A,B και Γ			Απόκριση y
	Παράγοντας A	Παράγοντας B	Παράγοντας Γ	
1	-	-	+	Y_1
2	+	+	+	Y_2
3	-	+	-	Y_3
4	+	-	-	Y_4



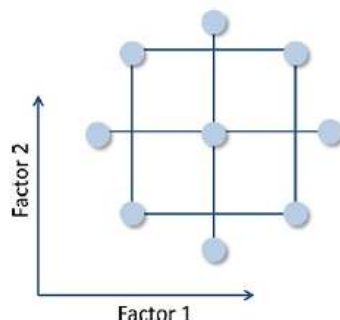
Εικόνα 10: Σύγκριση α) Πλήρη Παραγοντικού Σχεδιασμού-Full Factorial Design β) Κλασματικού Παραγοντικού Σχεδιασμού-Fractional Factorial Design. Παρατηρείται η μείωση του αριθμού των πειραμάτων από τον α) με 8 πειράματα στον β) με 4 πειράματα [27]

2.8.2 Στάδιο βελτιστοποίησης

Δύο βασικοί πειραματικοί σχεδιασμοί που χρησιμοποιούνται στο στάδιο της βελτιστοποίησης είναι η μέθοδος Simplex και η Μέθοδος Αποκριτικών Επιφανειών (Response Surface Method). Η RSM προσδιορίζει ένα βέλτιστο σημείο, ενώ η Simplex ορίζει μια μικρή περιοχή μέσα στην οποία εμπεριέχεται το βέλτιστο σημείο. Ακολουθούν παραδείγματα πειραματικών σχεδιασμών που ανήκουν στη Μέθοδο Αποκριτικών Επιφανειών [24].

* Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design)

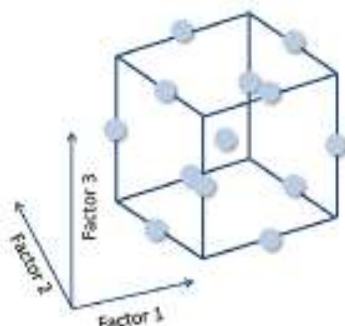
Οι αποκρίσεις που αφορούν σχεδιασμούς δύο επιπέδων, ανταποκρίνονται μόνο σε γραμμικά μοντέλα χωρίς να μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τις μη γραμμικές σχέσεις. Ένα βασικό μειονέκτημα των ολοκληρωμένων παραγοντικών σχεδιασμών σε πάνω από δύο επίπεδα είναι ο μεγάλος αριθμός πειραμάτων. Οι σχεδιασμοί που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό επιπέδων, χωρίς όμως να χρειάζεται να εκτελεστεί πείραμα για κάθε ένα συνδυασμό των επιπέδων των παραγόντων, καλύπτουν το εύρος τιμών κοντά στο κέντρο με περισσότερα σημεία από ότι στη περιφέρεια. Ένας τέτοιος σχεδιασμός είναι ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός, ο οποίος ονομάστηκε έτσι διότι συνδυάζει έναν παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων με επιπλέον κεντρικά σημεία και σημεία σε σχήμα άστρου, όπως στη Εικόνα 11 [25].



Εικόνα 11: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός με δύο παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25]

× Σχεδιασμός Box Behnken

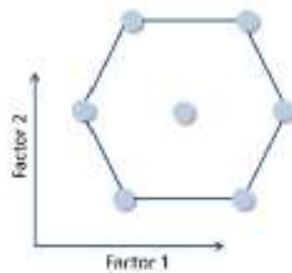
Ο σχεδιασμός Box-Behnken μπορεί να έχει τρεις παράγοντες ή παραπάνω, με τρία επίπεδα ή παραπάνω, χωρίς την ύπαρξη ακραίων σημείων. Το σύνολο των σημείων του είναι μικρότερο από αυτό του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού και για τρεις παράγοντες είναι ίδιο με του Doehlert. Η χρήση του ενδείκνυται για περισσότερους από δύο παράγοντες, όπου το βέλτιστο σημείο είναι γνωστό ότι βρίσκεται περίπου στο μέσο του εύρους των παραγόντων [25,44].



Εικόνα 12: Box Behnken σχεδιασμός με τρεις παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25]

× Σχεδιασμός Doehlert

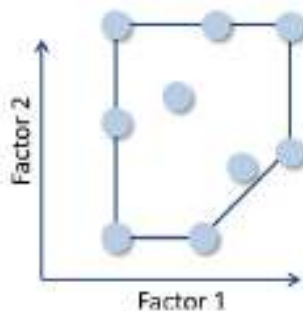
Ο Σχεδιασμός Doehlert σε αντίθεση με τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό και τον Box-Behnken, δεν μπορεί να περιστρέφεται. Ωστόσο είναι πολύ αποτελεσματικός, διότι περιλαμβάνει διαφορετικό αριθμό επιπέδων για κάθε παράγοντα ανάλογα με τη βαρύτητά τους. Έτσι, παράγοντες που θεωρούνται σημαντικοί μπορούν να μετρηθούν σε περισσότερα επίπεδα με στόχο να καλυφθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το εύρος τιμών του συγκεκριμένου παράγοντα [25].



Εικόνα 13: Doehlert design με δύο παράγοντες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις τιμές των παραγόντων για ένα πείραμα [25]

× Σχεδιασμός *D-optimal*

Ο σχεδιασμός D-optimal προσφέρεται ως μια εναλλακτική λύση στους Παραγοντικούς Σχεδιασμούς, όταν υπάρχουν κατηγορικοί παράγοντες, με κίνδυνο όμως να οδηγήσουν σε μεγάλο αριθμό πειραμάτων. Παρόλα αυτά, με τα κριτήρια του συγκεκριμένου σχεδιασμού ο αριθμός των πειραμάτων μπορεί να περιοριστεί σε ένα υποσύνολο όλων των πιθανών συνδυασμών των κατηγορικών παραγόντων, ανάλογα με το μοντέλο που θα επιλεγεί [25].



Εικόνα 14: Παράδειγμα D-optimal σχεδιασμού με δύο παράγοντες και εννιά πειράματα, όπου το κατώτερο δεξιά τρίγωνο του σχεδιασμού έχει αφαιρεθεί, καθώς ανήκει σε πειράματα με συνδυασμούς τιμών παραγόντων που δεν μπορούν να εκτελεστούν [25]

2.8.3 Στάδιο ανθεκτικότητας

Κατά τη μελέτη επικύρωσης μιας μεθόδου, οι πειραματικοί σχεδιασμοί που χρησιμοποιούνται για τη βελτιστοποίηση μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν και στον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας, [44] δηλαδή στην ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να αναπαράγει τα ίδια αποτελέσματα ακόμα και όταν η διαδικασία επαναλαμβάνεται με μικρές αλλαγές στις ονομαστικές τιμές των πειραματικών παραγόντων που έχουν καθοριστεί στο στάδιο της βελτιστοποίησης. Στο στάδιο της ανθεκτικότητας επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενος είναι ο Plackett-Burman [38].

* Σχεδιασμός Plackett-Burman

Ο σχεδιασμός Plackett-Burman αποτελείται από $4n$ πειράματα με στόχο να ερευνηθούν $4n-1$ παράγοντες σε δύο επίπεδα. Για παράδειγμα, υπάρχουν 8 πειράματα για 7 παράγοντες στον Πίνακα 6. Με δύο επίπεδα (+) και (-). Όταν ορίζονται τα επίπεδα, αν το (-) θεωρηθεί το βασικό επίπεδο ενός παράγοντα τότε το (+) είναι το βασικό επίπεδο συν μια μικρή αλλαγή που μελετάται ως μέρος της μελέτης ανθεκτικότητας. Η αλλαγή αυτή μπορεί να είναι είτε μείωση, είτε αύξηση. Με βάση το αποτέλεσμα μπορεί να εκτιμηθεί η αλλαγή στην απόκριση καθώς ο παράγοντας περνάει από την τιμή του επιπέδου (-) στην τιμή του επιπέδου (+) [25].

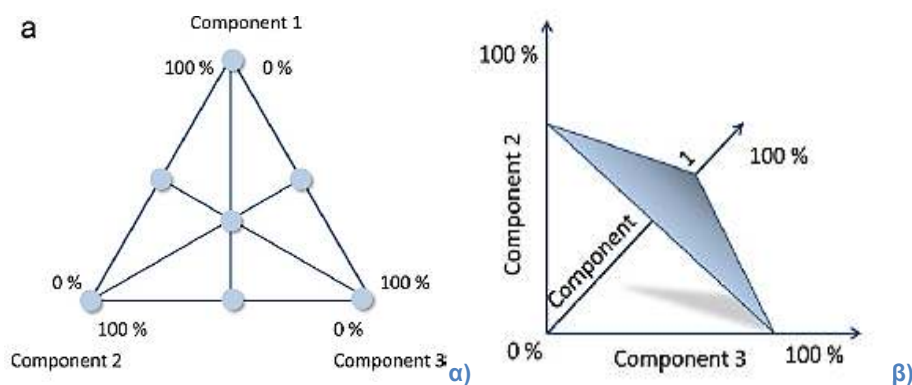
Πίνακας 6: Επίπεδα 7 παραγόντων ενός Plackett-Burman σχεδιασμού με 8 πειράματα. Το (+) αντιπροσωπεύει το ένα επίπεδο και το (-) το δεύτερο [25]

Factor	A	B	C	D	E	F	G
Expt.							
1	+	+	+	—	—	+	—
2	—	+	+	+	—	—	+
3	+	—	+	+	+	—	—
4	—	+	—	+	+	+	—
5	—	—	+	—	+	+	+
6	+	—	—	+	—	+	+
7	+	+	—	—	+	—	+
8	—	—	—	—	—	—	—

2.8.4 Μεικτός σχεδιασμός

Ένας ειδικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται όταν οι παράγοντες που έχουν οριστεί έχουν πάντα ως άθροισμα μια συγκεκριμένη τιμή. Ο μεικτός σχεδιασμός είναι κατάλληλο σε περιπτώσεις που η απόκριση δεν επηρεάζεται ακριβώς από την τιμή του παράγοντα, αλλά από το ποσοστό στο οποίο βρίσκεται ο πάθε παράγοντας, καθώς αυτοί αποτελούν συστατικά ενός μίγματος. Το εύρος των τιμών των παραγόντων είναι περιορισμένο. Για παράδειγμα, στη χρωματογραφία, όταν η κινητή φάση αποτελείται από τρία συστατικά αυτά έχουν πάντα άθροισμα στο 100% [25]. Το εύρος στο οποίο κυμαίνονται οι τιμές των παραγόντων απεικονίζεται ως ένα τρίγωνο, όπως στην Εικόνα 15, και αν $x_1, x_2, \dots, x_p$ είναι οι αναλογίες p συστατικών τότε ισχύει ότι:

$$0 \leq x_i \leq 1 \text{ και} \\ x_1 + x_2 + \dots + x_p = 1, [45]$$



Εικόνα 15: α) Μεικτός σχεδιασμός για τρία συστατικά των οποίων οι τιμές αθροίζονται στο 100% και β) το εύρος των παραγόντων σε τριών διαστάσεων σχεδιάγραμμα [25]

2.9 Μέτρηση σφάλματος-Βαθμοί ελευθερίας

Θεμελιώδους σημασίας για την κατανόηση των πειραματικών σχεδιασμών είναι και η κατανόηση των βαθμών ελευθερίας. Βασική προϋπόθεση για την αξιολόγηση των πειραμάτων είναι η μέτρηση των σφαλμάτων. Για παράδειγμα, είμαστε πραγματικά βέβαιοι ότι μπορούμε να εκτιμήσουμε τη δράση μιας άγνωστης ένωσης από τη μοριακή περιγραφή του, ή είμαστε ευχαριστημένοι με την ακρίβεια με την οποία μια συγκέντρωση μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση φασματοσκοπίας; Επιπλέον, ποιος είναι ο αδύναμος κρίκος σε μια σειρά πειραμάτων; Είναι η απόδοση ενός φασματόμετρου ή η ποιότητα μιας ογκομετρικής φιάλης ικανοποιητική; Κάθε πείραμα περιλαμβάνει τη διεξαγωγή μιας σειράς από παρατηρήσεις, οι οποίες μας επιτρέπουν να απαντήσουμε σε κάποιες από αυτές τις ερωτήσεις, και να υπολογίσουμε τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας που σχετίζονται με την ποσότητα των πληροφοριών που είναι διαθέσιμες για κάθε απάντηση. Φυσικά, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας, τόσο πιο σίγουροι μπορούμε να είμαστε για τις απαντήσεις μας, αλλά απαιτούνται περισσότερη προσπάθεια και εργασία. Αν έχουμε περιορισμένο διαθέσιμο χρόνο, είναι σημαντικό να δοθούν κάποιες πληροφορίες για να μπορέσουμε να απαντήσουμε σε όλες τις ερωτήσεις.

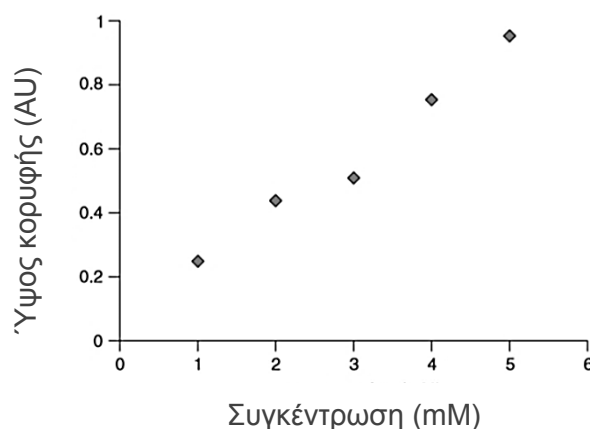
Τα περισσότερα πειράματα περιγράφονται με ένα μοντέλο, δηλαδή με μια μαθηματική σχέση μεταξύ των παραγόντων και της απόκρισης. Σύμφωνα με το παράδειγμα στο οποίο η απόδοση μιας αντίδρασης συνιστά την απόκριση, ενώ το pH, η θερμοκρασία και ένας καταλύτης αποτελούν τους υπό εξέταση παράγοντες, ο ερευνητής θέλει να διεξαγάγει μια αντίδραση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και επιθυμεί να προβλέψει την απόδοση. Το ερώτημα που προκύπτει είναι πόσα πειράματα και σε ποιους συνδυασμούς των παραγόντων πρέπει να διεξαχθούν για την βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης; Προφανώς όσα περισσότερα πειράματα τόσο πιο έγκυρες οι προβλέψεις, αλλά επίσης τόσο αυξάνονται και τα έξοδα, ο χρόνος και

η εργασία. Ο πειραματικός σχεδιασμός βοηθάει τον ερευνητή να βρει μια ισορροπημένη λύση για τον αριθμό των πειραμάτων και τις συνθήκες εκτέλεσής τους.

Σε ένα πείραμα με γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης, όπου για παράδειγμα μετράται η απορρόφηση (AU) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση (mM), ο ερευνητής μπορεί να θελήσει να εφαρμόσει ένα γραμμικό μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού (Εικόνα 16), δηλαδή

$$y=b_0+b_1x_1$$

όπου y: η απόκριση, x: η τιμή του παράγοντα, b_0 και b_1 οι συντελεστές του μοντέλου.



Εικόνα 16: Γράφημα του ύψους κορυφής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, στη φασματοσκοπία απορρόφησης [27]

Υπάρχουν λοιπόν δύο συντελεστές και έχουν εκτελεστεί πέντε πειράματα τα οποία είναι αρκετά όχι μόνο για να δώσουν την εξίσωση μιας ευθείας γραμμής, αλλά και να βοηθήσουν στην εξακρίβωση της πραγματικά επαναλήψιμης και γραμμικής σχέσης. Είναι πιθανόν να υπάρχουν άγνωστες παρεμποδίσεις, το όργανο ίσως δεν δίνει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, ή μπορεί οι μεγάλες συγκεντρώσεις να μην ακολουθούν γραμμική σχέση. Κατ' επέκταση, δεν πρέπει τα πειράματα να χρησιμοποιούνται μόνο για τον προσδιορισμό της εξίσωσης, αλλά και για τον ακριβή προσδιορισμό της γραμμικής σχέσης.

Η ικανότητα να αποσαφηνιστεί πόσο καλά τα δεδομένα υπακούουν σε ένα γραμμικό μοντέλο εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας:

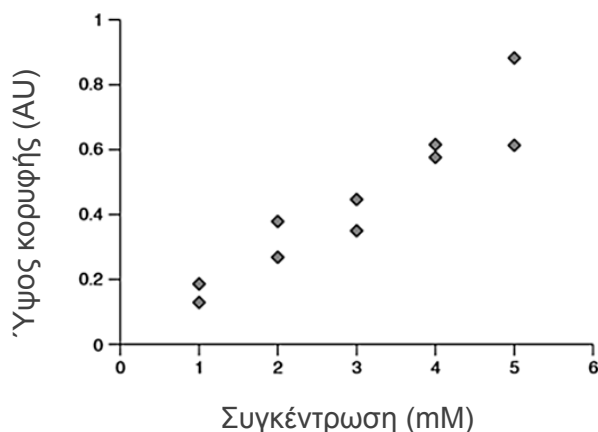
$$D=N-P$$

Όπου N ο αριθμός των πειραμάτων και P ο αριθμός των συντελεστών της συνάρτησης του μοντέλου. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα ισχύει ότι:

$$N=5 \text{ και } P=2$$

Άρα, $D=3$, οι βαθμοί ελευθερίας που μας βοηθούν να αποφασίσουμε πόσο καλά μπορούμε να προβλέψουμε το μοντέλο (*lack-of-fit*).

Οι βαθμοί ελευθερίας μας δίνουν μια συσχέτιση της ανταπόκρισης των πειραμάτων στο γραμμικό μοντέλο που αναφέρεται επίσης ως σφάλμα ή διακύμανση. Ωστόσο, το σφάλμα αυτό είναι ένας απλός αριθμός, ο οποίος στο παράδειγμα που αναφέρθηκε εκφράζεται σε απορρόφηση (AU). Η φυσική ερμηνεία του δεν είναι κάτι τόσο εύκολο, γιατί αν το σφάλμα εκφραστεί ως 100 mAU φαίνεται να είναι μεγάλο, ενώ αν εκφραστεί σε AU τότε γίνεται 0,1 και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να είναι μικρό. Η απόλυτη τιμή του σφάλματος πρέπει να συγκριθεί με κάτι, γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό το πείραμα να επαναληφθεί μερικές φορές κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ώστε να αξιολογηθεί η αναπαραγωγιμότητα των πειραμάτων, το οποίο ονομάζεται αναλυτικό ή πειραματικό σφάλμα. Όσο μεγαλύτερο είναι το σφάλμα, τόσο πιο δύσκολο είναι να γίνουν σωστές προβλέψεις. Στην Εικόνα 17, φαίνεται μια γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης με μεγάλο σφάλμα, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, για παράδειγμα στην απόδοση του οργάνου, στην ποιότητα των ογκομετρικών φιαλών, στην ακρίβεια των ζυγίσεων κ.τ.λ. Είναι δύσκολο να αντιληφθούμε οπτικά αν τα αποτελέσματα μπορούν να περιγραφούν επαρκώς με μια γραμμική εξίσωση ή όχι. Επίσης, κάποιες ακραίες τιμές (*outliers*) πιθανώς να πρέπει να απορριφθούν, διότι οδηγούν σε λανθασμένα αποτελέσματα.

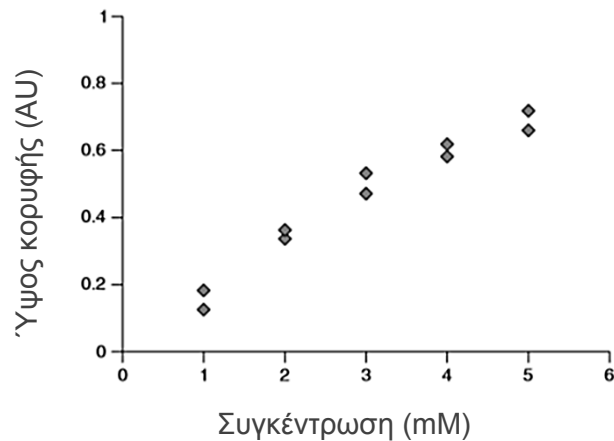


Εικόνα 17: Πείραμα με μεγάλο πειραματικό σφάλμα [27]

Σε ένα παρόμοιο πείραμα με μικρότερο πειραματικό σφάλμα (Εικόνα 18), πιθανόν να φαίνεται ότι ένα γραμμικό μοντέλο είναι ακατάλληλο, αλλά αυτό συμβαίνει μόνο επειδή το πειραματικό σφάλμα είναι μικρό σε σύγκριση με την απόκλιση από τη γραμμικότητα. Στις Εικόνα 17 και Εικόνα 18, έχουν προστεθεί άλλοι πέντε βαθμοί ελευθερίας, δηλαδή άλλες πέντε επαναλήψεις για να αντληθούν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με το πειραματικό σφάλμα. Οι βαθμοί ελευθερίας για να ελεγχθεί η έλλειψη προσαρμογής (*lack of fit*) δίνονται τώρα από τη σχέση:

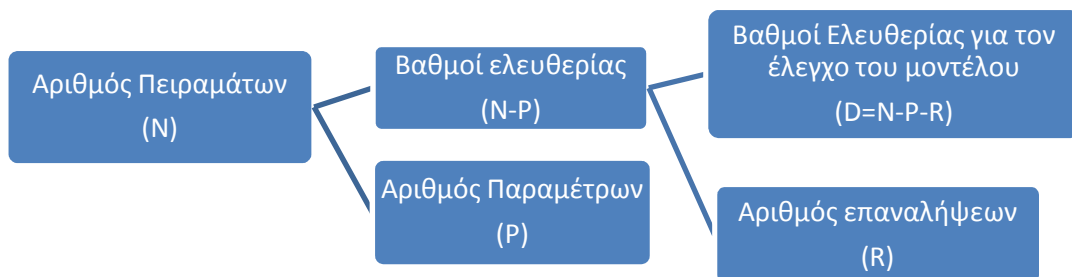
$$D = N - P - K$$

Όπου το K ισούται με τον αριθμό των επαναλήψεων και έτσι $D = 10 - 2 - 5 = 3$.



Εικόνα 18: Πείραμα με μικρό πειραματικό σφάλμα [27]

Παρόλο, που το D παραμένει ίδιο όπως στην Εικόνα 16, έχουν προστεθεί πέντε επιπλέον πειράματα που έχουν δώσει περαιτέρω πληροφορίες για το πειραματικό σφάλμα. Σε πολλούς σχεδιασμούς είναι σημαντικό να υπάρχει ισορροπία μεταξύ του αριθμού των μοναδικών πειραμάτων και του αριθμού των επαναλήψεων. Κάθε επανάληψη παρέχει ένα βαθμό ελευθερίας για την μέτρηση του πειραματικού σφάλματος. Ένα απλουστευμένο σχεδιάγραμμα που αφορά τους βαθμούς ελευθερίας απεικονίζεται στην Εικόνα 19. Ένας καλός εμπειρικός κανόνας είναι ότι ο αριθμός των επαναλήψεων (R) πρέπει να είναι παρόμοιος με τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας.



Εικόνα 19: Σχεδιάγραμμα βαθμών ελευθερίας.

Παρακάτω στον Πίνακα 7 δίνονται τρεις πειραματικοί σχεδιασμοί. Ο στόχος είναι να σχεδιαστεί ένα γραμμικό μοντέλο της μορφής:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$$

όπου η απόκριση y μπορεί να αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε ένα φάσμα και τα x_1, x_2 τις συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων. Η τιμή P είναι ίδια σε όλες τις περιπτώσεις.

➤ **Σχεδιασμός 1.** Αυτός έχει μια τιμή R ίση με 0 και $D = 6$. Δεν υπάρχει καμία πληροφορία σχετικά με το πειραματικό σφάλμα και η προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στον καθορισμό του μοντέλου. Εάν είναι γνωστό με βεβαιότητα, εκ των προτέρων, ότι η απόκριση είναι γραμμική (ή η πληροφορία αυτή δεν έχει ενδιαφέρον) το πείραμα

αυτό μπορεί να έχει καλό αποτέλεσμα, αλλά δεν έχει γίνει προσπάθεια για μέτρηση επαναλήψεων. Αν και αυτό το σχέδιο μπορεί να φαίνεται πως παρέχει ομοιόμορφη κατανομή η έλλειψη πληροφόρησης από επαναλήψεις θα μπορούσε, σε ορισμένες περιπτώσεις, να χάσει κρίσιμες πληροφορίες.

➤ **Σχεδιασμός 2.** Αυτός έχει μια τιμή του R ίση με 3 και $D=2$. Υπάρχει μια λογική ισορροπία μεταξύ των επαναλήψεων και εξέτασης του μοντέλου. Αν και δεν είναι πολλές οι πληροφορίες για τον σχεδιασμό φαίνεται να είναι καλός, λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη για οικονομία στα πειράματα.

➤ **Σχεδιασμός 3.** Αυτός έχει μια τιμή του R ίση με 4 και $D=1$. Ο αριθμός των επαναλήψεων είναι αρκετά μεγάλος σε σχέση με τον αριθμό των μοναδικών πειραμάτων. Ωστόσο, εάν ο κύριος στόχος είναι απλά να διερευνηθεί πειραματικά η αναπαραγωγικότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι χρήσιμη [27].

Πίνακας 7: Τρεις πειραματικοί σχεδιασμοί με ίδια τιμή P [27]

Αριθμός Πειραμάτων	Σχεδιασμός 1		Σχεδιασμός 2		Σχεδιασμός 3	
	A	B	A	B	A	B
1	1	1	1	2	1	3
2	2	1	2	1	1	1
3	3	1	2	2	3	3
4	1	2	2	3	3	1
5	2	2	3	2	1	3
6	3	2	2	2	1	1
7	1	3	2	2	3	3
8	2	3	2	2	3	1
9	3	3				

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

3.1 Εισαγωγή–Ορισμός Μεθοδολογίας Επιφανείας Απόκρισης

Πολλά πειράματα έχουν ως στόχο την αποτύπωση της διαφοροποίησης των τιμών της απόκρισης, σε σχέση με το εύρος συνεχόμενων τιμών ορισμένων ποσοτικών παραγόντων με σκοπό, ως συνήθως την εύρεση της βέλτιστης, της μέγιστης ή της ελάχιστης τιμής. Η Μεθοδολογία Απόκρισης Επιφανείας (RSM) αποτελεί μια συλλογή και μελέτη στατιστικών και μαθηματικών τεχνικών, η οποία οδηγεί στην οπτικοποίηση της απόκρισης που εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάπτυξη, τη βελτίωση και τη βελτιστοποίηση διαφόρων διαδικασιών [22,59,60]. Η σχέση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως:

$$Y = f(x_1, x_2) + E$$

Που σημαίνει ότι η απόκριση y είναι συνάρτηση των μεταβλητών x_1, x_2 και του πειραματικού λάθους.

Ο σχεδιασμός πειραμάτων με τη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης είναι σημαντικός για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

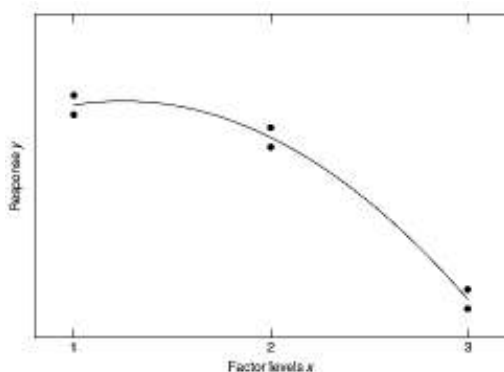
- Ο προσδιορισμός της απόκρισης γίνεται με βάση τα κριτήρια του ερευνητή,
- Μπορούν να προκύψουν στατιστικά συμπεράσματα για την ευαισθησία της απόκρισης σε σχέση με τους παράγοντες,
- Μπορούν να προσδιοριστούν τα επίπεδα των παραγόντων για τα οποία η απόκριση είναι βέλτιστη π.χ. μέγιστη ή ελάχιστη, και
- Μπορούν να προσδιοριστούν τα επίπεδα των παραγόντων, ενώ ταυτόχρονα βελτιστοποιούνται πολλαπλές αποκρίσεις [23].

Οι πιο εκτεταμένες εφαρμογές της RSM εντοπίζονται στον βιομηχανικό κόσμο και αφορούν το σχεδιασμό, την ανάπτυξη, και τη διαμόρφωση νέων προϊόντων, καθώς και τη βελτίωση των υπάρχοντων σχεδίων, ιδιαίτερα σε καταστάσεις όπου πολλές «ανεξάρτητες μεταβλητές» (inputs) δυνητικά επηρεάζουν τα μέτρα απόδοσης ή ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός προϊόντος ή μιας διαδικασίας. Αυτά τα μέτρα απόδοσης ή ποιοτικά χαρακτηριστικά, τα οποία συνήθως είναι πάνω από ένα σε αριθμό, ονομάζονται «αποκρίσεις» (responses) και μετρώνται σε συνεχή κλίμακα. Οι μεταβλητές που εισάγονται, υπόκεινται στον έλεγχο του ερευνητή για το σκοπό του πειράματος [54,55].

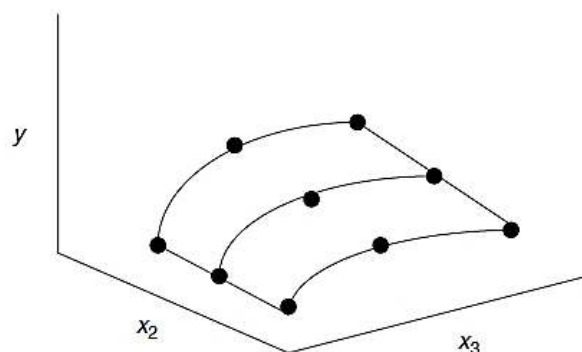
3.1.1 Οπτικοποίηση της Απόκρισης

Ο συνηθέστερος στόχος δουλεύοντας με RSM είναι η εύρεση των τιμών των μεταβλητών που βελτιστοποιούν την απόκριση. Τι συμβαίνει όμως όταν οι αποκρίσεις είναι περισσότερες από μια; Τότε η κατάσταση δυσχεραίνει και πρέπει να βρεθεί ένα σημείο, που θα βελτιώνει αρκετά όλες τις αποκρίσεις αλλά δεν θα βελτιστοποιεί την κάθε μία ξεχωριστά. Εναλλακτικά, μπορούν να τεθούν περιορισμοί στις μεταβλητές θέτοντας ως στόχο την βελτιστοποίηση συγκεκριμένης μεταβλητής [57,62,68,69].

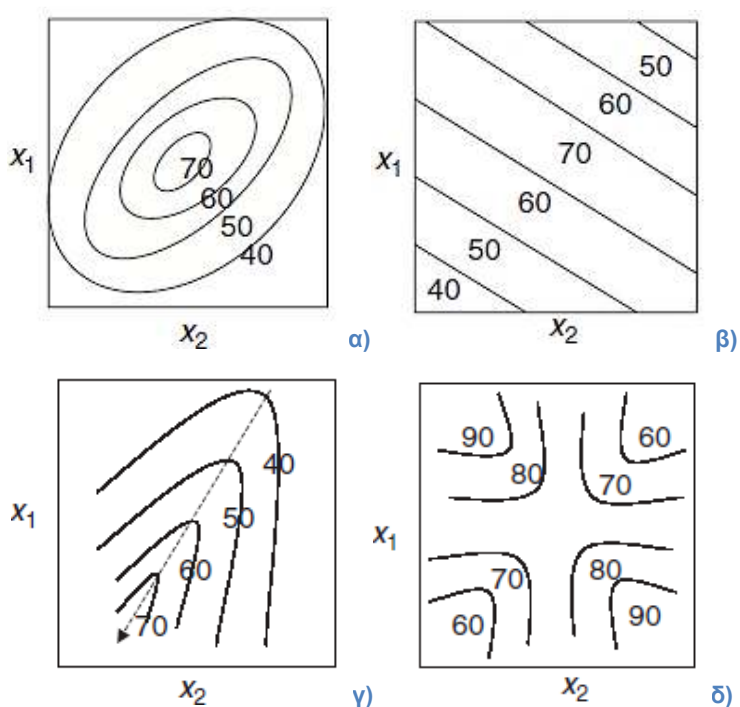
Μια επιφάνεια απόκρισης μπορεί να έχει διαφορετικά σχήματα ανάλογα με τη συνάρτηση από την οποία χαρακτηρίζεται. Αν η απόκριση έχει γραμμική σχέση με τις ανεξάρτητες μεταβλητές, τότε ένα μοντέλο πρώτου βαθμού είναι κατάλληλο για την περιγραφή της. Αν η κατάλληλη συνάρτηση είναι δευτεροβάθμια τότε, για ένα παράγοντα, το σχήμα της μπορεί να είναι μια απλή καμπύλη, Εικόνα 20. Τα σημεία του διαγράμματος αντιστοιχούν σε παρατηρούμενες αποκρίσεις (y) για κάθε μία τιμή του ποσοτικού παράγοντα (x) και η μέγιστη απόκριση είναι εμφανής. Όταν η απόκριση είναι συνάρτηση δύο παραγόντων μπορεί και πάλι να αποτυπωθεί γραφικά, όπως στην Εικόνα 21 ή εναλλακτικά με γραφήματα που μοιάζουν με τοπογραφικούς χάρτες θυμίζοντας βουνά ή κοιλάδες, Εικόνα 22. Έτσι υλοποιείται και ένας δεύτερος στόχος που αφορά την RSM, δηλαδή πώς θα αλλάξει η τιμή μιας απόκρισης αν αλλάζαν οι τιμές των μεταβλητών προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Τα γραφήματα και οι τεχνικές οπτικοποίησης είναι τα καλύτερα μέσα για την κατανόηση των αποκριτικών επιφανειών. Δυστυχώς όμως δεν μπορούν να αποδοθούν γραφήματα για τρεις μεταβλητές και πάνω [54,55,59].



Εικόνα 20: Αποκριτική επιφάνεια με έναν παράγοντα ανταποκρινόμενη σε δευτεροβάθμια συνάρτηση [45]

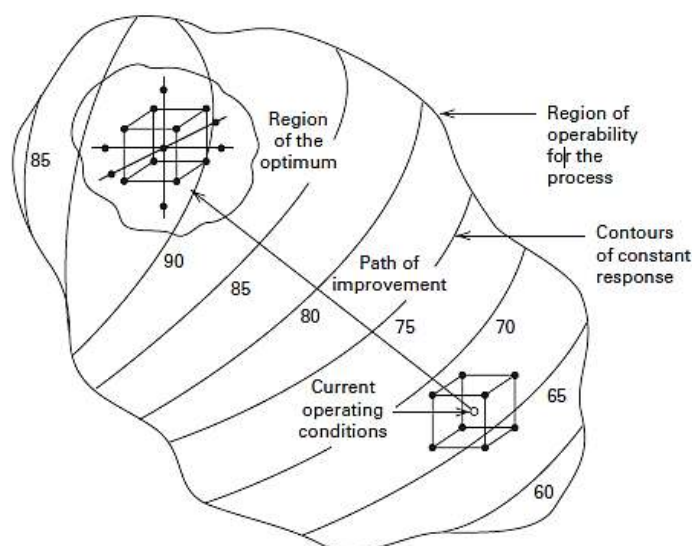


Εικόνα 21: Αποκριτική επιφάνεια με δύο παράγοντες ανταποκρινόμενη σε δευτεροβάθμια συνάρτηση (3D γράφημα) [45]

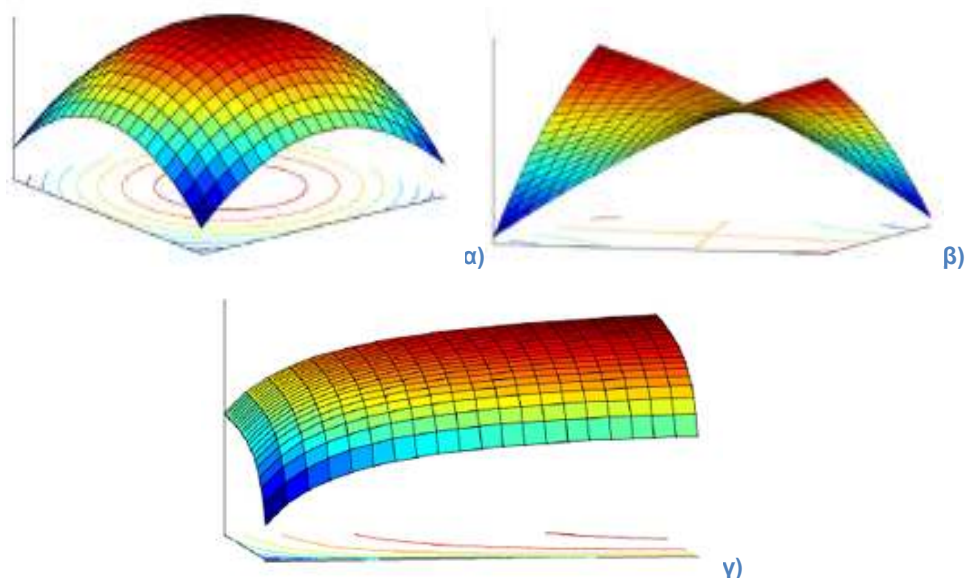


Εικόνα 22: Διαγράμματα αποκριτικών επιφανειών με δύο παράγοντες α) με μέγιστη απόκριση β) με σταθερή κορυφογραμμή γ) με ανερχόμενη κορυφογραμμή δ) με σχήμα σέλας [45]

Συνήθως, ένα από τα δύο μοντέλα, πρώτου ή δευτέρου βαθμού, είναι ικανοποιητικό χωρίς να σημαίνει όμως ότι η ίδια συνάρτηση είναι κατάλληλη για όλο το εύρος των ανεξάρτητων μεταβλητών, αλλά μόνο για ένα περιορισμένο που μας ενδιαφέρει. Η RSM είναι μια διαδοχική διαδικασία. Όταν ένα σημείο της αποκριτικής επιφάνειας είναι απομονωμένο από το βέλτιστο και υπάρχει μικρή καμπυλότητα, τότε ένα μοντέλου πρώτου βαθμού είναι κατάλληλο. Αν όμως το εύρος της βέλτιστης περιοχής έχει προσδιοριστεί, τότε εφαρμόζεται ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού για να εντοπιστεί με περισσότερη ακρίβεια το βέλτιστο σημείο [35,55,56].



Εικόνα 23: Διαδοχικά βήματα της RSM για την εύρεση της βέλτιστης απόδοσης μιας διαδικασίας



Εικόνα 24: Τριών διαστάσεων επιφάνειες απόκρισης σε συνάρτηση με δύο παράγοντες α) έχοντας μέγιστη απόκριση, β) χωρίς μέγιστη απόκριση στο εύρος τιμών των παραγόντων και γ) με πλατώ [25]

3.1.2 Συνάρτηση επιθυμητότητας (Desirability function)

Η συνάρτηση επιθυμητότητας αναπτύχθηκε για τη βελτιστοποίηση ταυτόχρονα πολλαπλών αποκρίσεων από τον Harrington [57] και τροποποιήθηκε αργότερα από τους Derringer και Suich [58]. Πολλές φορές, το στάδιο της βελτιστοποίησης περιλαμβάνει περισσότερες από μία αποκρίσεις δεν είναι όμως εφικτό να βελτιστοποιηθεί η κάθε μια ξεχωριστά, διότι τότε ο αριθμός των λύσεων θα είναι ίσος με τον αριθμό των μεταβλητών [59]. Αυτό καθιστά απαραίτητη την εύρεση μιας συνολικής βέλτιστης λύσης, η οποία θα συμμορφώνεται σε συγκεκριμένα κριτήρια για

την κάθε απόκριση ξεχωριστά και θα περιλαμβάνει μια βέλτιστη περιοχή τιμών των αποκρίσεων. Η επιθυμητότητα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 έως 1, και αντιπροσωπεύει την εγγύτητα μιας απόκρισης στην ιδανική της αξία. Εάν μια απόκριση πλησιάζει στο ανεπιθύμητο εύρος τιμών, τότε η επιθυμητότητα πλησιάζει προς το 0, ενώ αν κυμαίνεται στο ιδανικό εύρος πλησιάζει το 1 [60,61].

Η συνάρτηση επιθυμητότητας, κατά τους Derringer και Suich, βασίζεται στην ιδέα ότι η ποιότητα ενός προϊόντος ή μιας διαδικασίας, η οποία απαρτίζεται από πολλά χαρακτηριστικά, απορρίπτεται σε περίπτωση που έστω ένα από αυτά είναι εκτός των επιθυμητών ορίων. Ο σκοπός της, λοιπόν, είναι η εύρεση λειτουργικών συνθηκών, οι οποίες θα εξασφαλίζουν συμμόρφωση με τα κριτήρια για όλες τις αποκρίσεις και την ίδια στιγμή, θα παράσχουν την καλύτερη τιμή «συμβιβασμού» στην επιθυμητή τομή των αποκρίσεων [58]. Αυτό επιτυγχάνεται μετατρέποντας τις πολλαπλές αποκρίσεις σε μία, συνδυάζοντας τις μεμονωμένες αποκρίσεις σε μια σύνθετη συνάρτηση και στη συνέχεια βελτιστοποιώντας αυτή.

Η συνάρτηση επιθυμητότητας επιτρέπει στον αναλυτή να βρει τις πειραματικές συνθήκες (επίπεδα των παραγόντων) που θα του επιτρέπουν να φτάσει ταυτόχρονα στη βέλτιστη τιμή για όλες τις αποκρίσεις, περιλαμβάνοντας επιπλέον τις προτεραιότητες που θέτει ο ίδιος για την κάθε μια. Αρχικά, κατασκευάζεται μια συνάρτηση $d_i(\hat{y}_i)$ για κάθε απόκριση $\hat{y}_i$, καθιερώνοντας τα κριτήρια βελτιστοποίησης. Μόλις οι n μεταβλητές (παράγοντες και αποκρίσεις) μετατραπούν όλες σε συναρτήσεις επιθυμητότητας, συνδυάζονται σε μια μοναδική συνάρτηση, την «Συνολική επιθυμητότητα» (Global Desirability) για να βρεθεί η «χρυσή τομή» για όλες τις αποκρίσεις [62].

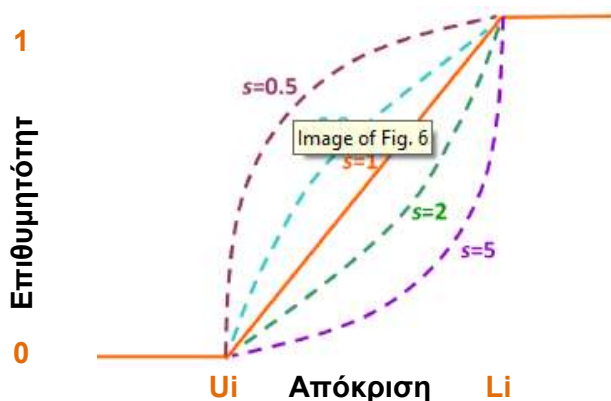
Ανάλογα με τα κριτήρια βελτιστοποίησης που θα ορίσει ο αναλυτής προκύπτουν διαφορετικές συναρτήσεις επιθυμητότητας μέσα στα αποδεκτά όρια των τιμών των αποκρίσεων ($U_i - L_i$), όπου U_i το ανώτερο αποδεκτό όριο και L_i το κατώτατο. Έτσι αν, για παράδειγμα, η απόκριση πρέπει να μεγιστοποιηθεί, η συνάρτηση $d_i(\hat{y}_i)$ περιγράφεται ως εξής:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{bmatrix} 0 & \text{if } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{if } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{if } \hat{y}_i(x) > U_i \end{bmatrix}$$

Όπου s είναι μια τιμή που ονομάζεται «βάρος» (weight) και ορίζεται από τον αναλυτή για να προσδιοριστεί πόσο σημαντικό είναι για το $\hat{y}_i$ να αποκτά τιμές κοντά στο μέγιστο του.

Ακολουθεί στην Εικόνα 25, μια γραφική παράσταση της συνάρτησης επιθυμητότητας, για διαφορετικά κριτήρια βελτιστοποίησης, και πώς αυτή

διαφοροποιείται ανάλογα με τις τιμές του s . Να σημειωθεί ότι η μικρότερη τιμή του s υποδεικνύει πως η απόκριση δεν χρειάζεται απαραίτητα να πάρει τη μέγιστη τιμή που έχει οριστεί ως στόχος (target value), αλλά είναι δυνατό να προκύψει η ίδια επιθυμητότητα μέσα από ένα εύρος τιμών της απόκρισης κοντά στη μέγιστη τιμή της.



Εικόνα 25: Γραφική παράσταση της συνάρτησης επιθυμητότητας για διαφορετικά κριτήρια βελτιστοποίησης

Από τη στιγμή που οι n μεταβλητές (παράγοντες και αποκρίσεις) θα μετασχηματιστούν σε συναρτήσεις επιθυμητότητας τότε συνδυάζονται στη Συνολική Συνάρτηση (global desirability) D για να βρεθεί ο καλύτερος συνδυασμός αποκρίσεων ακολουθώντας την παρακάτω εξίσωση:

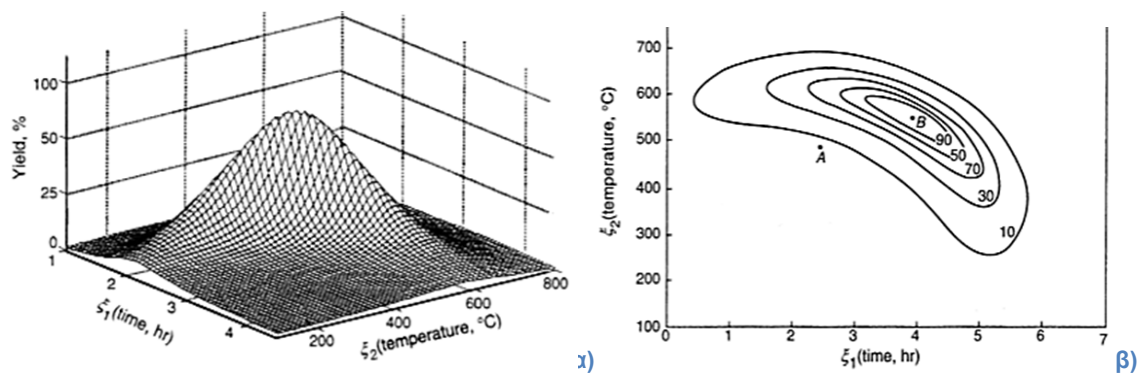
$$D = (d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times \dots \times d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}}$$

Όπου r_i είναι η σημαντικότητα της κάθε μεταβλητής σε σχέση με τις άλλες [63,64].

3.1.3 Παράδειγμα της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης

Στο παράδειγμα που ακολουθεί στην Εικόνα 26α, φαίνεται γραφικά η συσχέτιση της απόδοσης μιας χημικής αντίδρασης (απόκριση) με το χρόνο αντίδρασης και τη θερμοκρασία (ανεξάρτητες μεταβλητές). Για κάθε τιμή των δύο μεταβλητών υπάρχει μία αντίστοιχη τιμή της απόδοσης, που οπτικά χαρακτηρίζεται ως μια επιφάνεια που καλύπτει το επίπεδο χρόνου-θερμοκρασίας. Αυτός είναι και ο λόγος που στη συγκεκριμένη μέθοδο δόθηκε ο όρος «μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης».

Στην Εικόνα 26β, απεικονίζεται η επιφάνεια απόκρισης σε ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων, όπου είναι ενωμένα σε καμπύλες γραμμές όλα τα σημεία χρόνου-θερμοκρασίας που αντιστοιχούν στην ίδια απόκριση σχηματίζοντας ένα περίγραμμα καμπύλης (contour plot) [65].



Εικόνα 26: Συσχέτιση της απόδοσης μιας χημικής αντίδρασης με δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, το χρόνο (ξ_1) και τη θερμοκρασία (ξ_2) α) σε ένα τριδιάστατο διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης β) σε ένα περίγραμμα καμπύλης [66]

3.2 Σχεδιασμοί Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης (RSM)

3.2.1 Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD)

Ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design) είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους σχεδιασμούς της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης, καθώς ο ερευνητής μπορεί να ξεκινήσει χρησιμοποιώντας έναν 2^k παραγοντικό σχεδιασμό πρώτου βαθμού και στη συνέχεια να τον ενισχύσει με αξονικά σημεία και πιθανώς περισσότερα κεντρικά, ώστε να τον εξελίξει σε σχεδιασμό δευτέρου βαθμού, Εικόνα 26. Το βασικό πλαίσιο σχεδίασής του αποτελείται από τα εξής βήματα:

- *Κατασκευή ενός 2^k πλήρη παραγοντικού ή κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού*, ανάλογα με την δυνατότητα να αγνοηθούν οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων. Όπου k είναι, ο αριθμός των παραγόντων.

- *Προσθήκη $2k$ αξονικών σημείων σε σχήμα αστεριού*. Κάθε ζευγάρι αξονικών σημείων σημειώνεται με κωδικοποιημένες τιμές ως εξής:

$$(\pm \alpha, 0, 0, \dots, 0),$$

$$(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0),$$

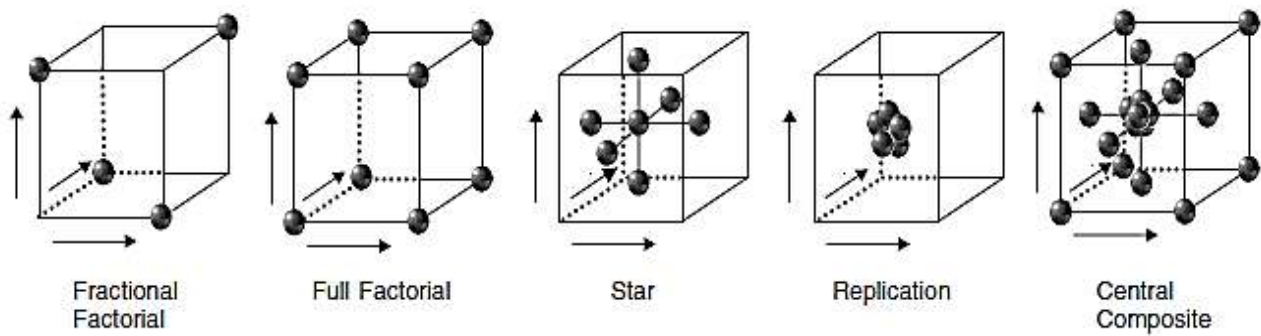
...

$$(0, 0, 0, \dots, \pm \alpha),$$

Όπου α είναι μια τιμή που μπορεί να προσδώσει περιστρεψιμότητα ή κάποια άλλη επιθυμητή ιδιότητα στον σχεδιασμό.

- *Προσθήκη m κεντρικών σημείων*, δηλαδή επαναλαμβανόμενων πειραμάτων [66-67].

$$(0, 0, 0, \dots, 0)$$

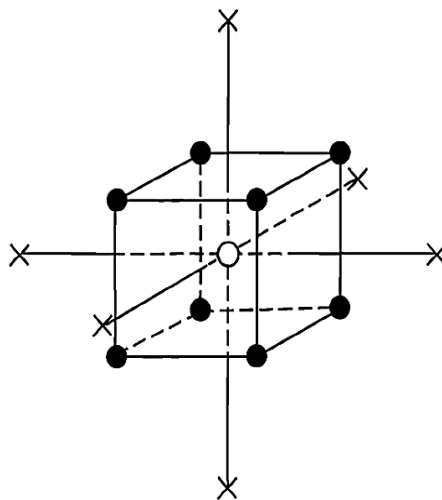


Εικόνα 27: Βήματα κατασκευής ενός Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού (CCD) [20]

Τα αξονικά και τα κεντρικά σημεία δεν συμμετέχουν στην εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων. Επίσης, ενώ ο αριθμός των παραγοντικών σημείων καθορίζεται από την επιλογή ενός πλήρους ή κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού, ο αριθμός των αξονικών σημείων είναι πάντα διπλάσιος από τον αριθμό των παραγόντων. Όσον αφορά τα κεντρικά σημεία δεν υπάρχει κάποιος κανόνας για την επιλογή τους, μελέτες όμως έχουν δείξει ότι οι καλύτεροι σχεδιασμοί αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα κεντρικά σημεία, τα οποία στοχεύουν στη διερεύνηση της καμπυλότητας στην περιοχή γύρω από το κέντρο. Ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται για τον συγκεκριμένο σχεδιασμό είναι:

$$N = 2^k + 2k + C_0$$

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



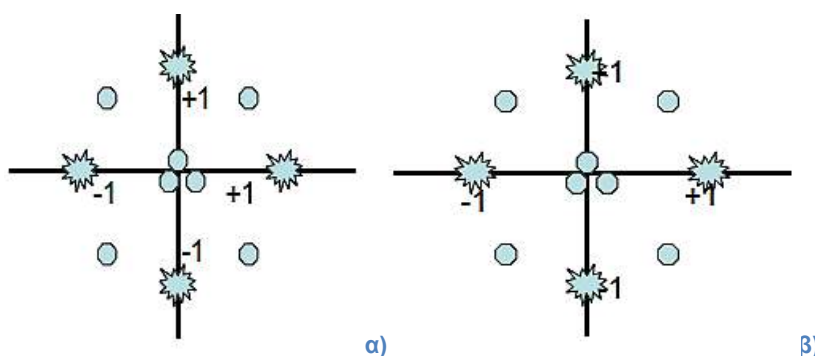
Εικόνα 28: Ένας Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός σε τρεις διαστάσεις με τα σημεία του κύβου (τελείες), τα αστρικά σημεία (X) και το κεντρικό σημείο (κύκλος) [68]

3.2.1.1 Είδη του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού ανάλογα με την επιλογή της τιμής α

Γενικά, η επιλογή του α εξαρτάται από τους πρακτικούς περιορισμούς και τη γεωμετρική φύση του σχεδιασμού. Όταν είναι επιθυμητή η συλλογή πληροφοριών

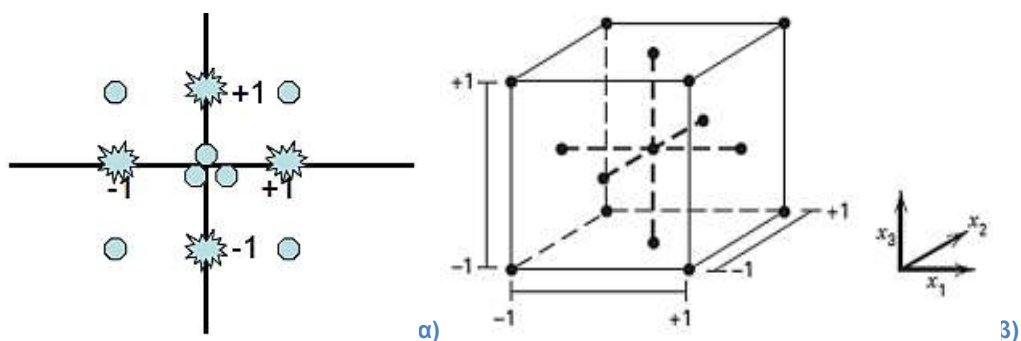
κοντά στις όψεις του κύβου επιλέγεται μικρή τιμή του α . Έτσι, οι τιμές του α συνήθως κυμαίνονται μεταξύ των δύο ακραίων τιμών 1 και $\sqrt{k}$.

* Για $\alpha=\sqrt{k}$, ο σχεδιασμός ονομάζεται *σφαιρικός*, η περιοχή ενδιαφέροντος είναι σφαιρική και τα αξονικά σημεία με τα σημεία του κύβου βρίσκονται πλέον στην ίδια σφαίρα. Αυτή η περίπτωση είναι εξαιρετικά σπάνια και απευθύνεται σε σχεδιασμούς σφαίρας. Για μεγάλη τιμή k , απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς τα αξονικά σημεία απομακρύνονται πολύ από το κέντρο και δεν δίνονται πληροφορίες για την αποκριτική επιφάνεια στο ενδιάμεσο εύρος των παραγόντων, ιδιαίτερα κατά μήκος των αξόνων [67]. Γενικά, σε περίπτωση που $\alpha>1$, προκύπτει ο *Περιγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Circumscribed)*, στον οποίο τα αξονικά σημεία αποτελούν και τα όρια του σχεδιασμού. Η ακριβής τιμή του α εξαρτάται από τον αριθμό των παραγόντων και απαιτούνται πέντε επίπεδα, Εικόνα 29α. Αντίθετα, αν $\alpha<1$ προκύπτει ο *Εγγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Inscribed)*, του οποίου τα αξονικά σημεία είναι μέσα στο εύρος των ακραίων σημείων, Εικόνα 29β. Ομοίως και σε αυτή την περίπτωση απαιτούνται πέντε επίπεδα των παραγόντων.[69-70]

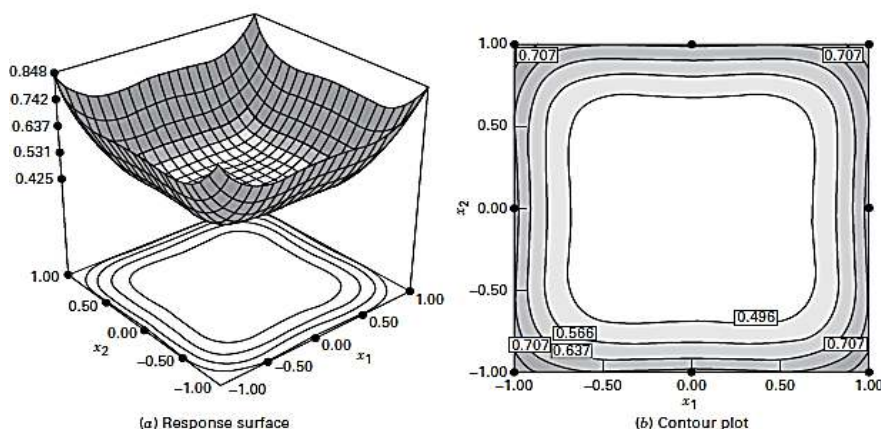


Εικόνα 29: α) Περιγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCC) για δύο παράγοντες β) Εγγεγραμμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός για δύο παράγοντες (CCI).[69]

* Για $\alpha=1$, τα αξονικά σημεία τοποθετούνται στο κέντρο των όψεων του κύβου, επομένως σε περίπτωση που $k=3$, τα έξι αξονικά σημεία βρίσκονται στο κέντρο των έξι όψεων του 2^3 κύβου, Εικόνα 30β. Ο σχεδιασμός τότε ονομάζεται *Εδροκεντρωμένος (Face-Centered)*, δεν είναι περιστρεψίμος και είναι ο μοναδικός σχεδιασμός που διαθέτει τρία επίπεδα [68-70]. Εάν ένας ή περισσότεροι παράγοντες είναι ποιοτικοί και μπορούν να πάρουν μόνο τρεις τιμές, οι Κεντρικοί Σύνθετοι Σχεδιασμοί πέντε επιπέδων δεν θα λειτουργούσαν. Αυτή η περίπτωση που $\alpha=1$, είναι κατάλληλη για περιπτώσεις που η περιοχή ενδιαφέροντος είναι κυβοειδής, Εικόνα 31.



Εικόνα 30: Εδροκεντρωμένος Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCF) α) για δύο παράγοντες.[43] και β) για τρεις παράγοντες [54,69]



Εικόνα 31: Κυβοειδής περιοχή ενδιαφέροντος για Εδροκεντρωμένο Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό [54]

3.2.1.2 Αριθμός επαναλήψεων στο κεντρικό σημείο

➤ Για $\alpha = \sqrt{k}$, είναι απαραίτητο τουλάχιστον ένα κεντρικό σημείο, ώστε να γίνει εκτίμηση των παραμέτρων σε ένα μοντέλο δευτέρου βαθμού. Διαφορετικά η διακύμανση του $y(x)$ γίνεται άπειρη. Για την σταθεροποίηση, όμως, της διακύμανσης χρειάζονται τρεις με πέντε επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο.

➤ Για $\alpha = 1$, είναι αρκετές μία ή δύο επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο για τη σταθεροποίηση της διακύμανσης, ενώ

➤ Για $\sqrt{k} < \alpha < 1$, χρειάζονται δύο με τέσσερις επαναλήψεις. Αν, όμως, ο πρωταρχικός στόχος των επαναλήψεων στο κεντρικό σημείο είναι η εκτίμηση της διακύμανσης του λάθους είναι απαραίτητες περισσότερες από τέσσερις ή πέντε επαναλήψεις [68].

3.2.2 Σχεδιασμός Box-Behnken

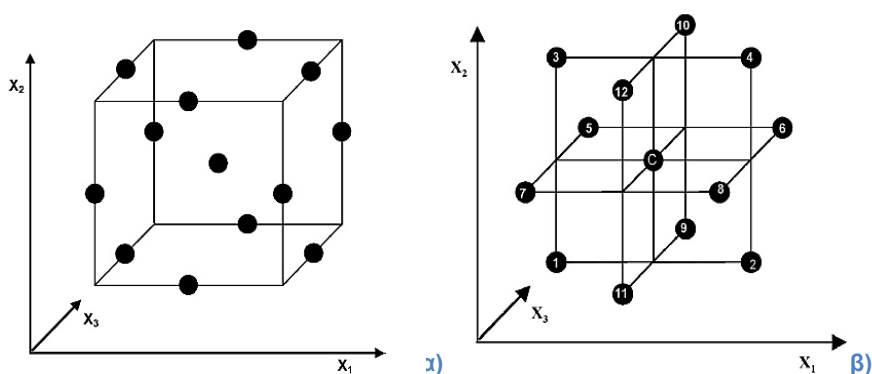
Ο σχεδιασμός Box-Behnken ανήκει στα περιστρεφόμενα μοντέλα δευτέρου βαθμού που βασίζονται σε παραγοντικούς σχεδιασμούς τριών επιπέδων. Θεωρείται σφαιρικός σχεδιασμός, στον οποίο όλα τα σημεία του βρίσκονται πάνω σε μια σφαίρα ακτίνας

$\sqrt{2}$. Επίσης, ο σχεδιασμός Box-Behnken δεν περιέχει σημεία στις όψεις του κύβου που δημιουργούνται από τα ανώτερα και κατώτατα κάθε μεταβλητής. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένα πλεονέκτημα, όταν τα σημεία στις γωνίες του κύβου αντιπροσωπεύουν συνδυασμούς από επίπεδα παραγόντων που είναι αδύνατο να εξεταστούν, λόγω φυσικών περιορισμών ή κόστους.

Η γραφική του προβολή για τρεις παράγοντες μπορεί να πάρει δύο μορφές που περιγράφονται ως εξής:

- ❖ Ένας κύβος που αποτελείται από το κεντρικό σημείο και τα σημεία στη μέση των άκρων, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 32α και

- ❖ Ένα σχέδιο τριών αλληλοσυνδεόμενων 2^2 παραγοντικών σχεδιασμών με ένα κεντρικό σημείο, όπως στην Εικόνα 32β.



Εικόνα 32: α) Ο κύβος για τον BBD και β) σχέδιο τριών αλληλοσυνδεόμενων 2^2 παραγοντικών σχεδιασμών με ένα κεντρικό σημείο [44]

Ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται για τη διεξαγωγή του BBD προκύπτει από την εξίσωση:

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

Όπου k ο αριθμός των παραγόντων και C_0 ο αριθμός των κεντρικών σημείων. Όλα τα σημεία του σχεδιασμού εκτός από το κέντρο βρίσκονται στην ίδια σφαίρα, για αυτό το λόγο απαιτούνται τρεις με πέντε επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο [44].

Συγκριτικά με τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό υπάρχουν κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, απαιτούνται μόνο 12 πειράματα συν το κεντρικό σημείο, ενώ ο τριών επιπέδων CCD έχει 14 πειράματα, χωρίς τις επαναλήψεις στο κέντρο. Επίσης, απαιτούνται μόνο τρία επίπεδα για κάθε παράγοντα έναντι του Κεντρικού Σύνθετου Σχεδιασμού, όπου απαιτούνται πέντε επίπεδα εκτός των περιπτώσεων που το $\alpha=1$. Στις περισσότερες πραγματικές εφαρμογές, αυτές οι διαφορές πιθανώς να μην είναι καθοριστικές για την επιλογή του σχεδιασμού που θα χρησιμοποιηθεί, τουλάχιστον για αυτόν τον αριθμό παραγόντων. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι σχεδιασμοί Box-Behnken δεν περιέχουν συνδυασμούς όπου οι παράγοντες είναι όλοι στα ανώτερα ή κατώτατα επίπεδά τους, μπορεί να είναι χρήσιμοι για την

αποφυγή πειραμάτων κάτω από ακραίες συνθήκες, για τις οποίες ενδέχεται να προκύψουν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, αυτοί οι σχεδιασμοί δεν ενδείκνυνται για καταστάσεις στις οποίες επιζητούνται πληροφορίες στα άκρα, δηλαδή στις κορυφές ή όψεις του κύβου [44,71].

3.2.3 Σχεδιασμός D-optimal

Οι σχεδιασμοί CCD και Box-Behnken έχουν ευρεία χρήση καθώς είναι πιο γενικοί και ευέλικτοι. Οι σχεδιασμοί D-optimal, όμως, είναι πολύ ελκυστικοί στους ερευνητές καθώς η εφαρμογή τους προσφέρει την βέλτιστη ακρίβεια. Ο τελικός αριθμός πειραμάτων προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$N = 2^k + k \times 2^{k-1} + k(k-1)/2 \times 2^{k-2}$$

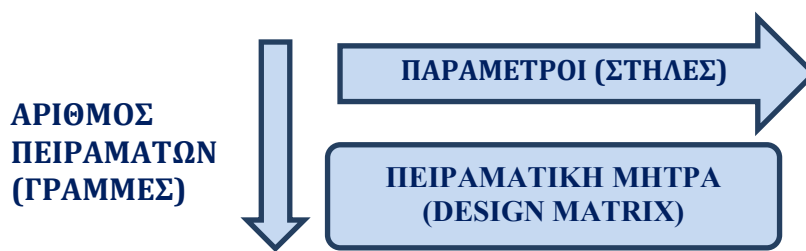
Όπου k , είναι ο αριθμός των παραγόντων [23].

Ο σχεδιασμός D-optimal είναι ένας σχεδιασμός υποβοηθούμενος από υπολογιστή που εμπεριέχει το βέλτιστο υποσύνολο όλων των πιθανών πειραμάτων. Ο ερευνητής ορίζει τα κριτήρια του και δημιουργείται ο κατάλληλος σχεδιασμός με μια διαδικασία επιλογής. Η υποψήφια συλλογή είναι μία μήτρα (design matrix), η οποία περιλαμβάνει όλα τα πιθανά πειράματα που μπορούν να διεξαχθούν κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Κάθε σειρά σε αυτή τη μήτρα αντιστοιχεί σε ένα πείραμα και κάθε στήλη σε μια μεταβλητή. Η μήτρα των υποψήφιων σημείων έχει N σειρές που απευθύνονται στον αριθμό των πειραμάτων και συμβολίζεται με ξ_N . Οι στήλες αναφέρονται σε συγκεκριμένες παραμέτρους στο μαθηματικό μοντέλο ή στη συνάρτηση που αντιστοιχεί την απόκριση με τις τιμές των παραγόντων. Συμπερασματικά, η μήτρα του σχεδιασμού X είναι μια μήτρα $n \times p$ η οποία εξαρτάται από το μοντέλο με p παραμέτρους και εμπεριέχει n πειράματα. Με ένα δεδομένο μοντέλο και μια δεδομένη μήτρα είναι εύκολο να κατασκευαστεί η μήτρα του σχεδιασμού στην οποία κάθε στήλη περιλαμβάνει έναν συνδυασμό παραγόντων από την υποψήφια συλλογή. Η μήτρα που εμπεριέχει τη πληροφορία (information matrix) και καθορίζει την επιλογή του καταλληλότερου σχεδιασμού είναι η $X'X$. Το κριτήριο του σχεδιασμού D-optimal έχει ως βάση τη μεγιστοποίηση της ορίζουσας $|X'X|$. Αυτό σημαίνει πως η βέλτιστη μήτρα X^* περιέχει n πειράματα που μεγιστοποιούν την ορίζουσα $|X'X|$ της μήτρας που εμπεριέχει την πληροφορία, με άλλα λόγια καλύπτουν τον μεγαλύτερο δυνατό όγκο της πειραματικής περιοχής.

Έτσι, ως D-optimal ορίζεται ο σχεδιασμός που ικανοποιεί την παρακάτω εξίσωση:

$$|M(\xi^*)| = \max_{\xi \in D} |M(\xi)|$$

Όπου M είναι η μήτρα πληροφοριών που περιγράφουν ένα πείραμα [62]



Εικόνα 33: Πειραματική μήτρα σε σύγχρονα πακέτα υπολογιστών και υπολογιστικά φύλλα

3.2.3.1 Αλγόριθμος του D-optimal

Σε γενικές γραμμές, με τον αλγόριθμο του D-optimal:

- * Ορίζεται ένα μαθηματικό μοντέλο που συνδέει τις αποκρίσεις y με τις ανεξάρτητες μεταβλητές.
- * Δημιουργείται μια συλλογή υποψήφιων σημείων ανάλογα με το μοντέλο.
- * Από τα υποψήφια σημεία επιλέγεται το υποσύνολο εκείνο που μεγιστοποιεί την ορίζουσα $|X'X|$

Ο D-optimal αλγόριθμος ξεκινά με την τυχαία επιλογή υποψήφιων σημείων, στη συνέχεια αφαιρεί και προσθέτει σημεία από τον τρέχοντα σχεδιασμό έως ότου δεν μπορεί να βρεθεί αλλαγή που να αυξάνει επιπλέον την ορίζουσα $|X'X|$ [62].

3.2.3.2 Πλεονεκτήματα του D-optimal

Παρακάτω εξηγούνται κάποιες περιπτώσεις για τις οποίες είναι χρήσιμος ένας σχεδιασμός D-Optimal [72]:

1. Μια ακανόνιστη πειραματική περιοχή με περιορισμούς.

Εάν η περιοχή ενδιαφέροντος για το πείραμα δεν είναι κύβος ή σφαίρα, οι τυποποιημένοι σχεδιασμοί μπορεί να μην είναι η καλύτερη επιλογή. Ακανόνιστες περιοχές ενδιαφέροντος παρουσιάζονται αρκετά συχνά. Για παράδειγμα, ένας πειραματιστής ερευνά τις ιδιότητες ενός συγκεκριμένου συγκολλητικού. Η κόλλα εφαρμόζεται σε δύο μέρη και στη συνέχεια σκληραίνει σε αυξημένη θερμοκρασία. Οι δύο παράγοντες ενδιαφέροντος είναι η ποσότητα κόλλας και η θερμοκρασία σκλήρυνσης. Επί των σειρών αυτών των δύο παραγόντων, που ελήφθησαν ως -1 σε +1 στη συνηθισμένη κωδικοποιημένη μεταβλητή κλίμακα, ο πειραματιστής γνωρίζει ότι αν μικρή ποσότητα κόλλας εφαρμόζεται και η θερμοκρασία σκλήρυνσης είναι πολύ χαμηλή, τα εξαρτήματα δεν θα συγκολληθούν ικανοποιητικά. Όσον αφορά τις κωδικοποιημένες μεταβλητές, αυτό οδηγεί σε έναν περιορισμό δηλαδή

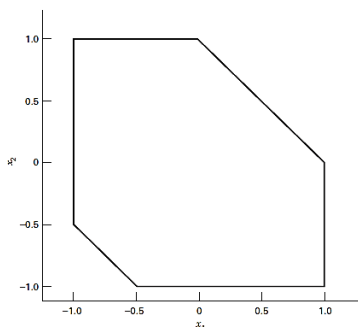
$$-1.5 \leq x_1 + x_2$$

όπου x_1 αντιπροσωπεύει την ποσότητα εφαρμογής της κόλλας και x_2 τη θερμοκρασία. Επιπλέον, εάν η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή και εφαρμόζεται υπερβολικά μεγάλη

κόλλα, τα εξαρτήματα θα καταστραφούν λόγω θερμικής καταπόνησης ή θα προκύψει ένας ανεπαρκής δεσμός. Έτσι, υπάρχει ένας άλλος περιορισμός στα επίπεδα των παραγόντων, δηλαδή

$$x_1 + x_2 \leq 1$$

Στην Εικόνα 24, φαίνεται η πειραματική περιοχή που προκύπτει από την εφαρμογή αυτών των περιορισμών.



Εικόνα 34: Μια περιορισμένη πειραματική περιοχή για δύο μεταβλητές

Οι περιορισμοί αφαιρούν τις δύο γωνίες του τετραγώνου, δημιουργώντας μια ακανόνιστη πειραματική περιοχή. Γίνεται κατανοητό ότι δεν υπάρχει τυποποιημένος σχεδιασμός που να ταιριάζει ακριβώς σε αυτήν την περιοχή.

2. Ένα μη τυποποιημένο μοντέλο

Συνήθως ένας ερευνητής επιλέγει ένα εμπειρικό μοντέλο πρώτου ή δευτέρου βαθμού θεωρώντας ότι θα προσεγγίσει το στόχο του. Ωστόσο μερικές φορές, το κατάλληλο μοντέλο μπορεί να διαφέρει π.χ.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{112}x_1^3x_2 + b_{1112}x_1^3x_2 + \varepsilon$$

ή να εμφανίζονται προβλήματα στις επιφάνειες απόκρισης όταν κάποιοι παράγοντες είναι ποιοτικοί. Δεν υπάρχουν σχεδιασμοί που να καλύπτουν αυτή την κατάσταση.

3. Μεγάλου μεγέθους δείγμα

Όταν η διεξαγωγή των πειραμάτων είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και δαπανηρή, είναι απαραίτητη η μείωση των πειραμάτων. Οι σχεδιασμοί D-optimal μειώνουν το κόστος των πειραμάτων και επιτρέπουν στα στατιστικά μοντέλα που εφαρμόζονται να προσδιοριστούν με λιγότερα πειράματα. Για παράδειγμα ο CCD για τέσσερις μεταβλητές απαιτεί 28 με 30 πειράματα, ανάλογα με τα κεντρικά σημεία που θα επιλεγούν. Σε αυτήν την περίπτωση μια εναλλακτική είναι και η επιλογή σχεδιασμού D-Optimal.

4. Είδη παραγόντων

Σε αυτούς τους σχεδιασμούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο ποσοτικοί παράγοντες, αλλά και ποιοτικοί.

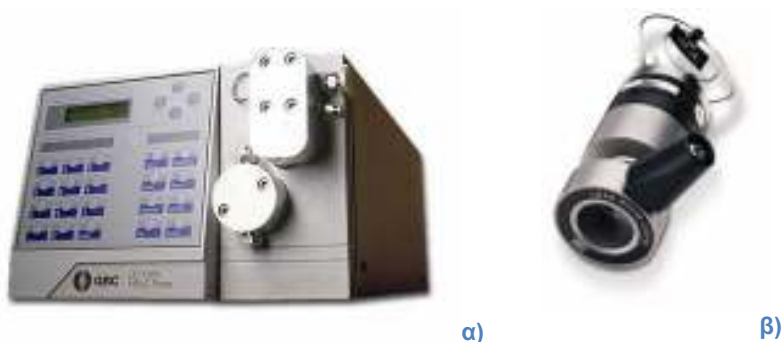
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1 Χρωματογραφικό Σύστημα

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων αποτελείται από μια αντλία HPLC GBC LC 1150 (Εικόνα 35) με ανιχνευτή Υπεριώδους-Ορατού UV/Vis GBC LC 1210 (Εικόνα 35) και έναν απαερωτή (Biotech model 2003). Το σύστημα είναι εξοπλισμένο με ένα χειροκίνητο σύστημα έγχυσης, και ένα βρόγχο 20 μL Rheodyne 7725i S/Steel. Η έγχυση πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα με σύριγγα Agilent των 100 μL . Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) υπό ισοκρατικές συνθήκες.



Εικόνα 35: α) Αντλία HPLC GBC LC 1150 και β) Rheodyne 7725i S/Steel Manual Analytical Sample Injector Switch



Εικόνα 36: Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού UV/Vis GBC LC 1210

4.2 Ηλεκτρονικός Υπολογιστής-Λογισμικό

Η επεξεργασία και η καταγραφή των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με το υπόλοιπο σύστημα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Empower Pro της Waters. Για κάθε χρωματογράφημα

είναι δυνατό να παρέχονται πληροφορίες σχετικά με το χρόνο ανάλυσης, το εμβαδό και το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής, τη διαχωριστική ικανότητα, τον παράγοντα ασυμμετρίας καθώς και άλλες πληροφορίες. Η ανάλυση δεδομένων και ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Design-Expert 10.0.0 trial version (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) και Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

4.3 Σύστημα Διήθησης-Απαέρωσης

Ο διαλυμένος αέρας και τυχόν σωματίδια πρέπει να απομακρύνονται από την κινητή φάση διότι μπορεί να προκληθεί πρόβλημα στο χρωματογράφο. Έτσι, κάθε κινητή φάση διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο Durapore membrane 0,45 μm της Millipore.

4.4 Αναλυτικός Ζυγός

Για τις ζυγίσεις των προτύπων ουσιών χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός Kern 770 με ακρίβεια ανάγνωσης πέντε δεκαδικών ψηφίων.

4.5 Πιπέττες

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων και την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν πιπέττες μεταβλητού όγκου 20-200 μL και 200-1000 μL Finnpiquette.

4.6 Πεχάμετρο

Για την μέτρηση του pH της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε βολτάμετρο Jenway με συνδυαστικό ηλεκτρόδιο υάλου Schott.

4.7 Διαλύτες-Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας και της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη (MeOH) και ακετονιτρίλιο (ACN), καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Fisher Chemical και το δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4 , $M = 119,98 \text{ g/mol}$) από την εταιρεία Riedel de Haen, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το φωσφορικό οξύ H_3PO_4 και το υδροξείδιο του νατρίου NaOH αναλυτικού βαθμού καθαρότητας χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση των τιμών του pH της κινητής φάσης. Επίσης, το νερό ήταν καθαρότητας HPLC ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) και ελήφθη από συσκευή Synergy UV της εταιρείας Merck.

4.8 Πρότυπες Ουσίες

Οι πρότυπες ουσίες αμλοδιπίνη, βαλσαρτάνη και υδροχλωροθειαζίδιο που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας 99,6, 99,5 και 99,3% αντίστοιχα και ελήφθησαν από την εταιρεία RAFARM.

4.9 Ογκομετρικές φιάλες

Ογκομετρικές φιάλες: 1000 mL ($\pm 0,40$ mL Borosilikat, Germany DIN A), 25 mL (BLAN BRAND, Glasfurn Colordur Duran DIN A $\pm 0,04$ mL), 100 mL (Glasfurn Simplex Germany 100:1 mL σε $20^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ mL, DIN B).

5.0 Αναλυτικές στήλες

Οι αναλυτικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η στήλη Zorbax Eclipse XDB-C8 διαστάσεων 4,6 x 150 mm με διάμετρο σωματιδίων 5 μm και η στήλη Nucleosil C18 διαστάσεων 150 x 4,6 mm με διάμετρο σωματιδίων 5 μm των εταιρειών Agilent και Macherey-Nagel, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

5.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία θα επιχειρηθεί η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό τριών δραστικών ουσιών, της αμλοδιπίνης, της βαλσαρτάνης και του υδροχλωροθειαζιδίου, χρησιμοποιώντας την αναλυτική τεχνική της αντιστρόφου φάσεως υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού, με την χρήση πειραματικού σχεδιασμού κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης.

Στόχος αυτής της ανάπτυξης είναι ο σχεδιασμός μια απλής αναλυτικής μεθόδου που θα επιτρέπει τον γρήγορο και αξιόπιστο διαχωρισμό και ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών δραστικών ουσιών, καθώς και η εφαρμογή και σύγκριση τριών διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών. Η χρήση του πειραματικού σχεδιασμού εξαπλώνεται ολοένα και περισσότερο, σε διάφορους τομείς.

5.2 Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου

5.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock solutions) της αμλοδιπίνης, του υδροχλωροθειαζιδίου και της βαλσαρτάνης ζυγίστηκαν 25,0 mg πρότυπης ουσίας για την κάθε μια, με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού ακρίβειας 5 δεκαδικών ψηφίων, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με MeOH. Με τον τρόπο αυτό, προέκυψαν διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1000 µg/mL. Τα διαλύματα παρακαταθήκης μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμους γυάλινους περιέκτες και διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

5.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

Τα διαλύματα εργασίας (working solutions) παρασκευάστηκαν μέσω κατάλληλων αραιώσεων των διαλυμάτων παρακαταθήκης. Από αυτά τα διαλύματα, 100µL αραιώθηκαν με MeOH, ενώ ο τελικός όγκος των διαλυμάτων εργασίας ήταν 4 mL. Οι διάφοροι όγκοι τόσο του διαλυμάτων παρακαταθήκης, όσο και της MeOH

μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια αναλυτικής πιπέτας. Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου.

5.3 Επιλογή μήκους κύματος

Η ανίχνευση με ανιχνευτή UV-vis βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (~190-900 nm) από τα μόρια διαφόρων χημικών ενώσεων. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση (π.χ αρωματικό δακτύλιος, συζυγιστικοί διπλοί δεσμοί), καλείται χρωμοφόρο και η απεικόνιση της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος παρέχει το φάσμα απορρόφησης της αναλυόμενης ουσίας. Όταν η ακτινοβολία διέλθει από το διάλυμα του αναλύτη, η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του και του μήκους της οπτικής διαδρομής:

$$\text{Νόμος Lambert-Beer: } A = \epsilon bc = \log(I_0/I),$$

όπου ϵ είναι η μοριακή απορροφητικότητα, b το μήκος της διαδρομής μέσα στο διάλυμα σε cm, c η συγκέντρωση του δείγματος σε mol/L, I_0 η ένταση του διαλύματος αναφοράς και I η ένταση του διαλύματος του προς μέτρηση δείγματος.

Το μήκος της διαδρομής και η μοριακή απορροφητικότητα είναι σταθερές για μία συγκεκριμένη ένωση σε ένα δεδομένο ανιχνευτή, οπότε η απορρόφηση εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση. Η μοριακή απορροφητικότητα είναι συγκεκριμένη για κάθε μόριο, βασισμένη στην κατασκευή και το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποικίλλει ευρέως ανάμεσα σε μόρια σε κάθε δεδομένο μήκος κύματος και ανάμεσα στα μήκη κύματος για κάθε δεδομένο μόριο. Αυτό εξηγεί τις διαφορές στην ευαισθησία και την εκλεκτικότητα για την απορρόφηση στο UV των διαφόρων ενώσεων.

Τα μόρια που, επομένως είναι εύκολο να ανιχνευθούν με ανιχνευτή UV/vis. Προτιμάται το μήκος κύματος στο οποίο απορροφά μόνο η προσδιοριζόμενη ένωση και δεν απορροφούν συνυπάρχουσες ουσίες, διότι τότε η μέθοδος είναι ειδική για την ουσία X.

Σύμφωνα, με τη βιβλιογραφία που αφορά αναλυτικές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για τις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες επιλέχθηκε το μήκος κύματος $\lambda=232$ nm [73].

5.4 Προκαταρκτικά πειράματα

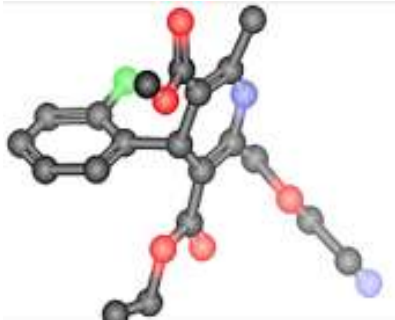
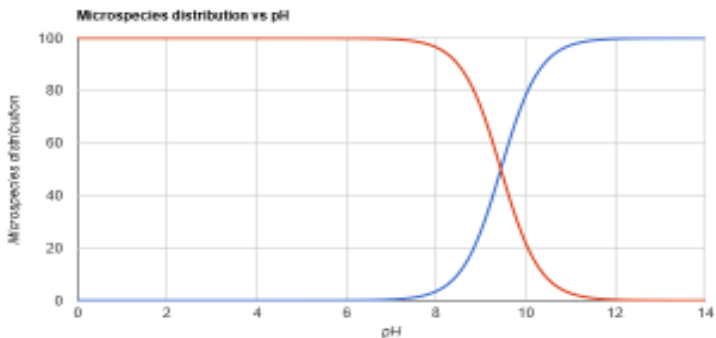
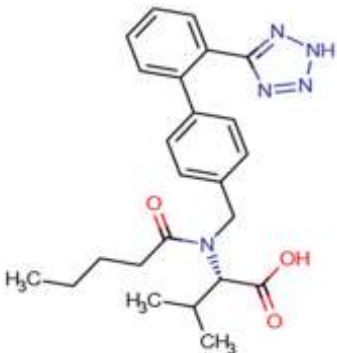
Λαμβάνοντας υπόψη τη λιποφιλία των τριών ουσιών, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, θεωρήθηκε χρήσιμο να επιλεγεί η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Σε

αυτού του είδους την χρωματογραφία η στατική φάση είναι μικρότερης πολικότητας από την κινητή φάση. Αυτό σημαίνει πως όσο πιο άπολη είναι μια ουσία τόσο περισσότερο κατακρατείται και όσο πιο πολική είναι μια κινητή φάση τόσο μειώνεται η εκλουστική της ισχύ. Το νερό, για παράδειγμα, που είναι το πιο ισχυρό εκλουστικό μέσο στη χρωματογραφία, σε αυτή την περίπτωση είναι ακριβώς το αντίθετο, καθώς δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την άπολη στατική φάση. Το αποτέλεσμα είναι ότι όσο το νερό αυξάνεται, τόσο αυξάνονται οι χρόνοι κατακράτησης κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής διαδικασίας. Τα μη πολικά μόρια έχουν την ικανότητα να κατακρατούνται παραπάνω στην άπολη στατική φάση και ένας πολύ πολικός διαλύτης δεν μπορεί να τα συμπαρασύρει και να εκλουστούν. Στην προκειμένη περίπτωση οι δύο δραστικές ουσίες αμλοδιπίνη και βαλσαρτάνη έχουν μεγαλύτερο $\log P$ από το υδροχλωροθειαζίδιο με αποτέλεσμα η πιο λιπόφιλη (άπολη) να κατακρατείται περισσότερο και να εκλούεται τελευταία, ενώ η πιο υδρόφιλη (πολική) να εκλούεται πρώτη και αρκετά σύντομα.

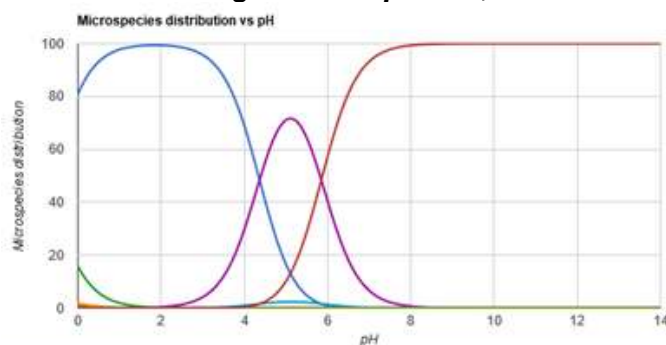
Οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι υπόστρωμα πυριτία, το οποίο έχει επικαλυφθεί με υγρή στατική φάση μη πολικού χαρακτήρα ή υπόστρωμα πυριτία που έχει υποστεί χημική κατεργασία με αντιδραστήρια και έχουν συνδεθεί στην επιφάνειά της αλυσίδες μήκους 8 ατόμων άνθρακα (C8) ή 18 ατόμων άνθρακα (C18) [73].

Σε αυτή τη φάση των προκαταρκτικών πειραμάτων στόχος είναι να εντοπιστούν και να εξεταστούν όλοι οι παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν μετέπειτα στις διαδικασίες των πειραματικών σχεδιασμών για τη βελτιστοποίηση των μεθόδων. Επίσης, πρέπει να αποσαφηνιστεί και να οριστεί το εύρος τιμών για τον κάθε παράγοντα, όπως επίσης να διεξαχθούν κάποια βασικά συμπεράσματα για την ανταπόκριση των ουσιών στις χρωματογραφικές συνθήκες.

Πίνακας 8: Βασικές ιδιότητες των τριών δραστικών ουσιών αμλοδιπίνης, υδροχλωροθειαζιδίου και βαλσαρτάνης [74].

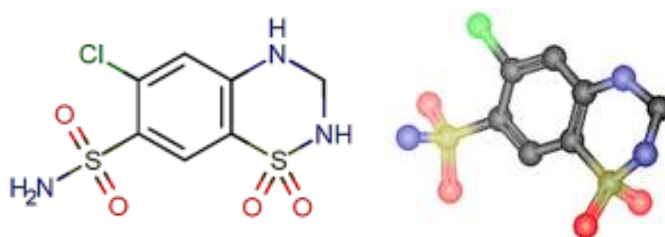
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	
Αμλοδιπίνη	
Χημική δομή	
 	
$\log P=1,64$	
$pK_a=9,45$	
	
Βαλσαρτάνη	
Χημική δομή	
 	
$\log P= 5,27$	

Strongest acidic $pK_a=4,35$
Strongest basic $pK_a=-0,64$



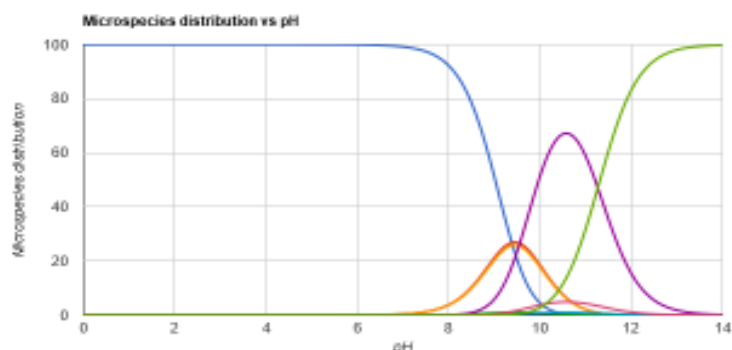
Υδροχλωροθειαζίδιο

Χημική δομή



$\log P=-0,07$

Strongest Acidic $pK_a =9,09$
Strongest Basic $pK_a =-2,70$



5.4.1 Δοκιμές διαφορετικών κινητών φάσεων στη στήλη C18

Αρχικά δοκιμάστηκε στήλη C18, κινητή φάση με ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου 40 mM σε διάφορες αναλογίες (ACN από 70 έως 40%) με σταθερό $pH=3,00$, $\lambda=232$ nm και ταχύτητα ροής 1 mL/min. Διαφορετικές αναλογίες δοκιμάστηκαν και με μεθανόλη (MeOH από 70 έως 50%), όπως επίσης και συνδυασμός των δύο διαλυτών.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18 και pH=3,00, NaH₂PO₄ 40,0 mM για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης με ACN, με MeOH ή με συνδυασμό και των δύο διαλυτών

ACN/H ₂ O	70/30			60/40			50/50			45/55			40/60		
C18	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,45	2,40	0,65	1,43	2,51	0,76	1,49	3,12	1,09	1,44	3,96	1,75	1,80	8,09	3,49
HCTZ	1,46	1,69	0,16	1,44	1,73	0,20	1,50	2,25	0,50	1,46	2,32	0,59	1,80	2,70	0,50
VAL	1,46	2,65	0,82	1,43	3,20	1,24	1,49	4,90	2,29	1,48	7,47	4,05	1,80	19,06	9,59

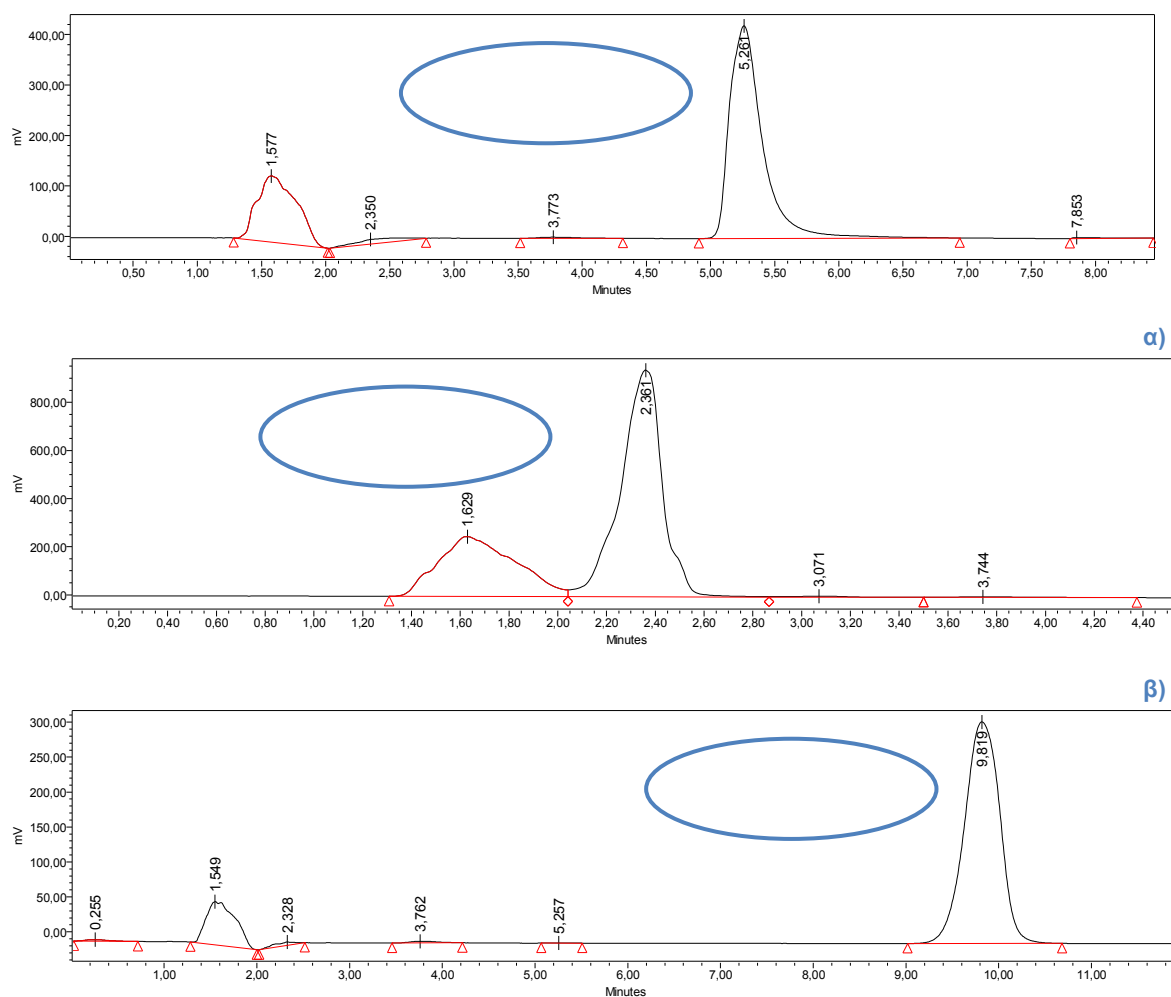
MeOH/H ₂ O	70/30			65/35			60/40			55/45			50/50		
C18	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,76	4,04	1,30	1,78	5,46	2,07	1,77	8,06	3,55	1,85	14,95	7,08	1,81	24,00	12,26
HCTZ	1,75	1,86	0,06	1,77	1,87	0,06	1,78	1,88	0,06	1,81	2,03	0,12	1,83	2,10	0,15
VAL	1,77	4,15	1,35	1,79	6,30	2,52	1,78	10,79	5,06	1,85	23,84	11,89	1,81	43,11	22,82

ACN/MeOH/H ₂ O	45/10/45			40/10/50			40/20/40			40/5/55			35/5/60		
C18	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,58	3,64	1,30	1,60	4,77	1,98	1,64	3,73	1,27	1,58	5,26	2,33	1,58	5,26	2,33
HCTZ	1,61	2,16	0,34	1,65	2,18	0,32	1,66	2,04	0,23	1,63	2,36	0,45	1,63	2,36	0,45
VAL	1,58	5,11	2,23	1,60	7,77	3,86	1,65	4,65	1,82	1,55	9,82	5,34	1,55	9,82	5,34

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτή τη σειρά πειραμάτων είναι τα εξής:

- Όσο μειώνεται η αναλογία του οργανικού τροποποιητή, τόσο μειώνεται η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης και η έκλουση των ουσιών καθυστερεί. Αυτό ισχύει και για τα δύο είδη οργανικού τροποποιητή που δοκιμάστηκαν.
- Το ACN οδήγησε σε καλό διαχωρισμό, αλλά με μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης από τον επιθυμητό.
- Με τη χρήση MeOH προέκυψαν κάποιες αναλογίες κινητής φάσης κατά τις οποίες υπήρξε καλός διαχωρισμός, όμως αυτές οι αναλογίες χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλους χρόνους έκλουσης.
- Ο συνδυασμός και των δύο οργανικών τροποποιητών πέτυχε πολύ καλό διαχωρισμό των ουσιών και μικρούς χρόνους έκλουσης.

Παρακάτω, στην Εικόνα 37, φαίνονται τα χρωματογραφήματα των τριών δραστικών ουσιών που προέκυψαν από την ιδανικότερη αναλογία διαλυτών.



Εικόνα 37: Χρωματογραφήματα των τριών δραστικών ουσιών με κινητή φάση 40/5/55 v/v, στήλη C18, pH=3,00, NaH₂PO₄ 40,0 mM, λ=232 nm και ροή 1 mL/min α) αμλοδιπίνης β) υδροχλωροθειαζιδίου και γ) βαλσαρτάνης

5.4.2 Δοκιμές διαφορετικών τιμών pH στη στήλη C18

Στο επόμενο βήμα, προκειμένου να εξακριβωθεί η επιρροή του pH δοκιμάστηκαν κινητές φάσεις με σταθερή αναλογία διαλυτών στη στήλη C18, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση άλατος (NaH₂PO₄ 40,0 mM). Δοκιμάστηκαν τιμές pH από 4,00 έως 5,00. Οι αναλογία διαλυτών επιλέχθηκε με βάση τα καλύτερα αποτελέσματα από το προηγούμενο στάδιο των πειραμάτων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18 και pH=4,00-5,00 για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης, με ACN και MeOH

ACN/MeOH/H ₂ O	30/5/65 pH=4,00			35/5/60 pH=4,00			35/5/60 pH=4,50			40/5/55 pH=4,50			40/5/55 pH=5,00		
C18	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,64	16,44	9,02	1,6	9,98	5,24	1,59	11,28	6,09	1,55	6,90	3,45	1,55	7,88	4,08
HCTZ	1,80	2,72	0,51	1,74	2,54	0,46	1,73	2,54	0,47	1,66	2,39	0,44	1,66	2,38	0,43
VAL	1,64	18,07	10,02	1,6	10,48	5,55	1,61	6,13	2,81	1,53	4,25	1,78	1,56	2,90	0,86

Βασική παρατήρηση από τα συγκεκριμένα πειράματα είναι ότι σε pH πάνω από 4,00 υπάρχει διαφορά στη σειρά έκλουσης των δραστικών ουσιών. Η βαλσαρτάνη στη συγκεκριμένη περίπτωση εκλούεται πριν από την αμλοδιπίνη, γεγονός που δείχνει ότι λόγω της αλλαγής του pH διαφοροποιείται ο ιοντισμός των δύο ουσιών, με αποτέλεσμα η αμλοδιπίνη να κατακρατείται περισσότερο χρόνο στη στατική άπολη φάση της στήλης C18 από την βαλσαρτάνη και να οδηγούμαστε σε αυτή την αναστροφή έκλουσης.

5.4.3 Δοκιμές διαφορετικών συγκεντρώσεων ρυθμιστικού άλατος της υδατικής φάσης στη στήλη C18

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε μια αναλογία κινητής φάσης με καλό διαχωρισμό και μικρό χρόνο έκλουσης των ουσιών, το pH διατηρήθηκε σταθερό και στην ίδια στήλη δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού άλατος δισόξινου φωσφορικού νατρίου για να παρατηρηθεί η επίδραση του στα αποτελέσματα των χρωματογραφικών δεδομένων.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C18, pH=3,00, για κινητή φάση 45/55 (ACN/H₂O) v/v και διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος

ACN/H ₂ O	45/55 pH=3,00, 40,0 mM,			45/55 pH=3,00, 5,0 mM,			45/55 pH=3,00, 80,0 mM,			45/55 pH=3,00, 320,0 mM		
C18	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,44	3,96	1,75	1,65	7,87	3,77	1,61	4,03	1,50	1,67	2,84	0,70
HCTZ	1,46	2,32	0,59	1,71	2,41	0,41	1,74	2,49	0,43	1,64	2,68	0,63
VAL	1,48	7,47	4,05	1,64	8,17	3,98	1,60	8,55	4,34	1,62	7,54	3,65

Το συμπέρασμα των συγκεκριμένων δοκιμών είναι πως δεν έχουν σημαντική επίδραση στον παράγοντα χωρητικότητας της βαλσαρτάνης, σε αντίθεση με την αμλοδιπίνη για την οποία η μικρή συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος (οχτώ φορές μικρότερη) αύξησε σημαντικά τον παράγοντα χωρητικότητας, ενώ η αύξησή της (οχτώ φορές μεγαλύτερη) τον μείωσε τουλάχιστον στο μισό.

5.4.4 Δοκιμές διαφορετικών κινητών φάσεων στη στήλη C8

Στο επόμενο στάδιο δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες κινητής φάσης και συγκεκριμένες αλλαγές στην τιμή του pH, με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, στη στήλη C8.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων σε στήλη C8, pH=3,00-4,50, για κινητές φάσεις με διαφορετικό ποσοστό οργανικού τροποποιητή/υδατικής φάσης (ACN, MeOH ή συνδυασμό και των δύο διαλυτών) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος

ACN/H ₂ O	60/40 pH=3,00, 40,0 mM,			40/60 pH=3,00, 40,0 mM,			35/65 pH=3,00, 40,0 mM			30/70 pH=3,00, 40,0 mM		
C8	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,26	1,83	0,45	1,40	3,47	1,48	1,50	5,50	2,67	1,51	11,82	6,83
HCTZ	1,26	1,39	0,10	1,40	2,10	0,50	1,50	2,25	0,50	1,52	2,54	0,67
VAL	1,24	3,67	1,96	1,48	10,25	5,93	1,50	18,70	11,47	1,51	43,20	27,61
ACN/H ₂ O	35/65 pH=4,00, 40,0 mM			35/65 pH=4,50, 60,0 mM,								
C8	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'						
AML	1,48	5,66	2,82	1,45	5,44	2,75						
HCTZ	1,37	2,35	0,72	1,45	2,33	0,61						
VAL	1,44	11,22	6,79	1,40	6,06	3,33						

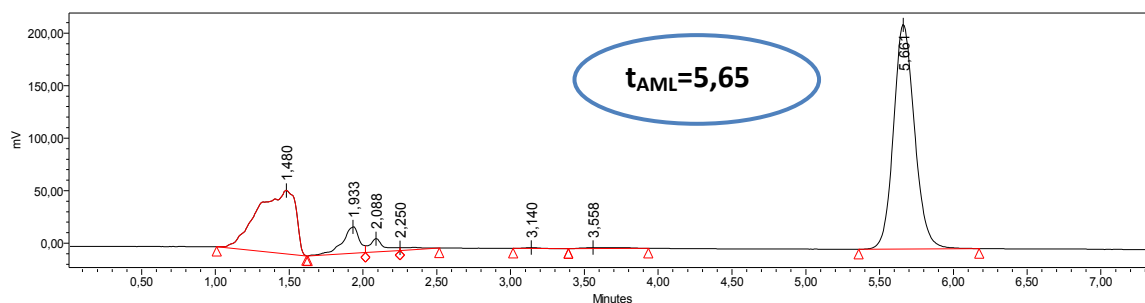
MeOH/H ₂ O	60/40 pH=3,00, 40,0 mM			55/45 pH=3,00, 40,0 mM			50/50 pH=3,00, 40,0 mM		
C8	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'	t ₀	t _r	k'
AML	1,56	6,85	3,39	1,54	10,81	6,02	1,58	22,78	13,42
HCTZ	1,54	1,55	0,01	1,53	1,53	0,00	1,56	1,56	0,00
VAL	1,55	10,60	5,84	1,54	19,52	11,68	1,56	51,00	31,69
ACN/MeOH/H ₂ O	40/5/55 pH4,50, 60,0 mM								
C8	t ₀	t _r	k'						
AML	1,37	3,32	1,42						
HCTZ	1,38	1,88	0,36						
VAL	1,34	3,44	1,57						

Από τις πειραματικές δοκιμές στη στήλη C8 βγήκαν τα εξής συμπεράσματα:

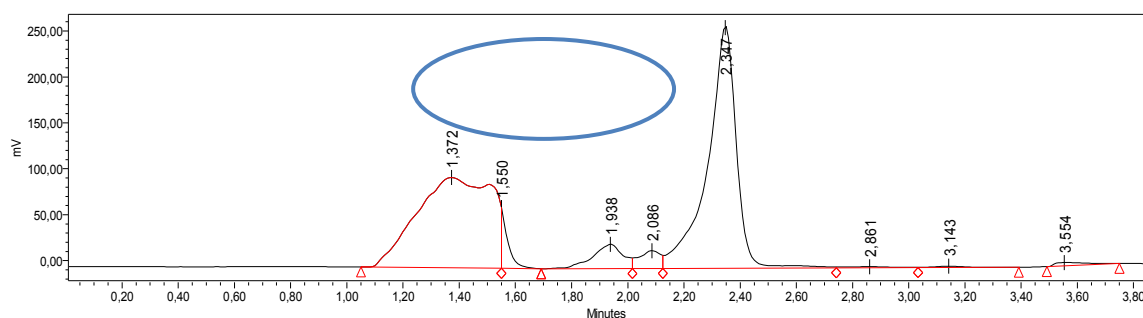
- Σε υψηλή αναλογία ACN η έκλουση των ουσιών έγινε άμεσα με αποτέλεσμα να μην διαχωριστούν, ενώ σε χαμηλή αναλογία ο χρόνος ανάλυσης αυξήθηκε υπερβολικά.
- Με την MeOH είχαμε καλό διαχωρισμό των ουσιών, αλλά και πάλι ο χρόνος ανάλυσης αυξήθηκε.

- Με την κινητή φάση 40/5/55 (ACN/MeOH/H₂O) ν/ν, pH 4,50 και συγκέντρωση άλατος 40,0 mM δεν προέκυψε καλός διαχωρισμός, παρόλο που σε προηγούμενο στάδιο η ίδια αναλογία κινητής φάσης απέδωσε πολύ καλό αποτέλεσμα.

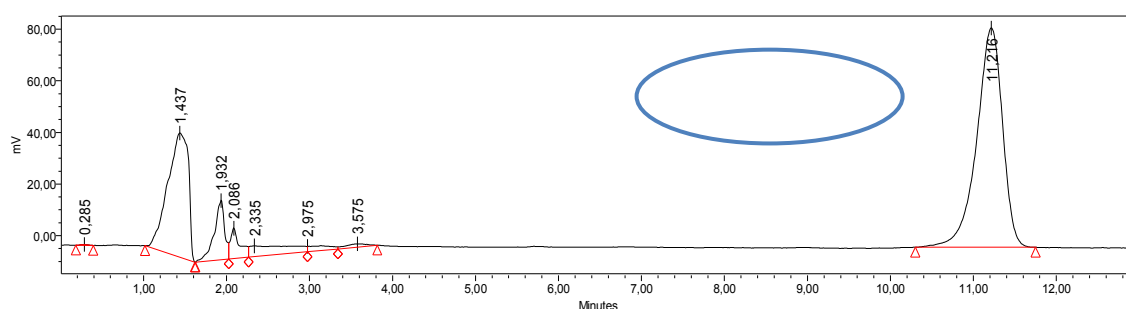
- Από την κινητή φάση 35/65 (ACN/H₂O) ν/ν σε pH=3,00 και συγκέντρωση άλατος 40,0 mM φάνηκε να προκύπτουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα και για αυτό το λόγο δοκιμάστηκε και σε άλλες τιμές pH και συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος. Τα χρωματογραφήματα με τον καλύτερο διαχωρισμό και χρόνο ανάλυσης φαίνονται στην Εικόνα 38.



α)



β)



γ)

Εικόνα 38: Χρωματογραφήματα των τριών δραστικών ουσιών με κινητή φάση 35/65 (ACN/H₂O) ν/ν, στήλη C8, pH=3,00, buffer 40,0 mM, λ=232 nm, ταχύτητα ροής 1 mL/min α) αμλοδιπίνης (AML) β) υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ) και γ) βαλσαρτάνης (VAL)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ C8 ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ BOX-BEHNKEN

6.1 Εισαγωγή

Μετά από τη διεξαγωγή των προκαταρκτικών πειραμάτων αποφασίστηκε ο αριθμός, το είδος και το εύρος των παραγόντων, όπως επίσης και το είδος των αποκρίσεων που θέλουμε να μελετήσουμε. Η στήλη που επιλέχθηκε ήταν η C8. Για το σχεδιασμό Box-Behnken, όλα αυτά τα στοιχεία συνοψίζονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό Box-Behnken

Παράγοντες	Είδος παραγόντων	Τύπος παραγόντων	Εύρος παραγόντων	Κωδικοποιημένες τιμές κατώτατου και ανώτατου επιπέδου
A	ACN%	Ποσοτικός	32,0-38,0	(-1), (+1)
B	pH	Ποσοτικός	3,50-4,50	(-1), (+1)
Γ	Συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος (mM)	Ποσοτικός	20,0-60,0	(-1), (+1)
Αποκρίσεις				
	Y_1			k_{HCTZ}
	Y_2			$R_{AML/VAL}$
	Y_3			k_{VAL}

Με βάση τα συμπεράσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, οι συγκεκριμένοι τρεις παράγοντες θεωρήθηκαν καθοριστικοί για τη διαμόρφωση των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων και οι αποκρίσεις επιλέχθηκαν για τους παρακάτω λόγους:

1) k_{HCTZ} : στα περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα υπήρξαν προβλήματα με το μικρό χρόνο ανάσχεσης του υδροχλωροθειαζιδίου, άρα στόχος είναι να μεγιστοποιηθεί.

2) $R_{AML/VAL}$: οι δύο ουσίες αμλοδιπίνη και βαλσαρτάνη σε κάποιες περιπτώσεις συνεκλούονταν ή δεν είχαν καλό διαχωρισμό, άρα επιθυμητό είναι ένα ικανοποιητικό R (πάνω από 2,2) μεταξύ των δύο κορυφών, αλλά εντός συγκεκριμένων ορίων.

3) k_{VAL} : η βαλσαρτάνη σε κάποιες περιπτώσεις χαρακτηρίστηκε από πολύ μεγάλους χρόνους ανάσχεσης και για αυτό το λόγο ο παράγοντας χωρητικότητας πρέπει να παραμείνει μικρός, ώστε ο συνολικός χρόνος ανάλυσης να είναι ικανοποιητικά μικρός, με δεδομένο ότι η σειρά έκλουσης παραμένει ίδια καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τα πειράματα που πρέπει να διεξαχθούν μετά από τα εισαγόμενα δεδομένα, σύμφωνα με τον σχεδιασμό Box-Behnken, και όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 10 trial version παρατίθενται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Τα πειράματα για τον σχεδιασμό Box-Behnken, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 10 trial version, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Πείραμα	Παράγοντας Α	Παράγοντας Β	Παράγοντας Γ	Υ1	Υ2	Υ 3
	ACN%	pH	Συγκέντρωση ρυθμ.διαλύματος (mM)	k_{HCTZ}	$R_{AML/VAL}$	k'_{VALS}
1	32,0	4,50	40,0	0,87	1,72	6,43
2	35,0	4,50	60,0	0,78	2,45	3,47
3	35,0	4,50	20,0	0,69	2,20	3,77
4	32,0	4,00	60,0	0,70	14,10	10,14
5	35,0	4,00	40,0	0,73	14,20	7,67
6	38,0	3,50	40,0	0,60	19,60	6,78
7	35,0	4,00	40,0	0,70	13,70	8,28
8	35,0	4,00	40,0	0,72	13,50	7,27
9	38,0	4,00	20,0	0,61	15,60	5,08
10	32,0	4,00	20,0	0,79	14,50	11,84
11	35,0	3,50	20,0	0,67	20,80	11,16
12	35,0	4,00	40,0	0,75	13,30	7,35
13	38,0	4,50	40,0	0,68	2,60	2,59
14	32,0	3,50	40,0	0,67	23,30	16,82
15	38,0	4,00	60,0	0,56	12,50	3,82
16	35,0	3,50	60,0	0,65	22,10	11,41

6.2 Εύρεση και αξιολόγηση μοντέλου

Μετά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και αφού συγκεντρωθούν όλα τα δεδομένα που περιγράφουν τις αποκρίσεις, μπορεί να «χτιστεί» ένα μοντέλο που θα περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα και θα στηρίζεται σε μία δευτέρου βαθμού πολυωνυμική συνάρτηση. Σε αυτή τη συνάρτηση προστίθενται οι όροι πρώτου βαθμού, οι τετραγωνικοί, οι όροι των αλληλεπιδράσεων και το υπόλοιπο ε (τυχαία σφάλματα). Συνήθως, μόνο οι αλληλεπιδράσεις δευτέρου βαθμού λαμβάνονται υπόψη, διότι οι αλληλεπιδράσεις μεγαλύτερου βαθμού μπορεί να συγχέονται με τις κύριες επιδράσεις. Οι συντελεστές της συνάρτησης του μοντέλου,

προσδιορίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Least Square Methodology), μια τεχνική σύμφωνα με την οποία η εκτίμηση της ευθείας γραμμικής παλινδρόμησης γίνεται βρίσκοντας τις τιμές συντελεστών που ελαχιστοποιούν τον όρο ε , δηλαδή τα υπόλοιπα που προκύπτουν από την διαφορά των θεωρητικών και των πειραματικών τιμών της εξαρτημένης μεταβλητής. Η εκτίμηση της ευθείας παλινδρόμησης, η οποία δεν είναι πάντοτε γραμμική, ονομάζεται ευθεία ελαχίστων τετραγώνων από τον τρόπο υπολογισμού των συντελεστών της [18,75-77].

Αρχικά, κατά την αξιολόγηση του μοντέλου ελέγχουμε αν το σύστημα εμφανίζει αλλοιώσεις (aliases) για το μοντέλο επιλογής που σε αυτή την περίπτωση είναι τετραγωνικό (quadratic). Εφόσον δεν εμφανίζεται ως αλλοιωμένο, σημαίνει πως ο σχεδιασμός έχει επαρκή και σωστά σημεία, ώστε να υπολογιστούν οι συντελεστές για την επιθυμητή συνάρτηση.

Στη συνέχεια, ελέγχεται αν η τιμή VIF είναι μεγαλύτερη ή ίση με 1,0 για τον κάθε ένα συντελεστή ξεχωριστά, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 15. Ο VIF μετράει αν η διακύμανση ενός συντελεστή του μοντέλου αυξάνεται σημαντικά, λόγω της έλλειψης ορθογωνιότητας του μοντέλου. Η επιθυμητή του τιμή είναι 1,0, ενώ μια ή πολλές τέτοιες αυξημένες τιμές είναι ένδειξη πολυσυγγραμικότητας (multicollinearity). Το τυπικό σφάλμα (standard error) του μοντέλου αυξάνεται αναλογικά με την τετραγωνική ρίζα του VIF, ενώ το VIF σχετίζεται με το R_i -Squared με την παρακάτω συνάρτηση:

$$VIF = 1 / (1 - R_i\text{squared})$$

Ιδανικά, σε έναν ορθογώνιο σχεδιασμό η τιμή του R_i squared είναι μηδέν. Από τον Πίνακα 15 συμπεραίνουμε ότι όλες οι τιμές VIF και R_i squared είναι ιδανικές και το Std.Error είναι επίσης ικανοποιητικό, αφού είναι παρόμοιο για κάθε τύπο παράγοντα.

Πίνακας 15: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού Box-Behnken

Όρος	Τυπικό σφάλμα**	VIF	Ri-Squared	Ισχύς σε επίπεδο α% για επίδραση του		
				0,5 τυπ.απόκλιση	1 τυπ.απόκλιση	2 τυπ.απόκλιση
A	0,35	1,00	0,0000	9,2 %	22,3 %	65,7 %
B	0,35	1,00	0,0000	9,2 %	22,3 %	65,7 %
C	0,35	1,00	0,0000	9,2 %	22,3 %	65,7 %
AB	0,50	1,00	0,0000	7,1 %	13,6 %	39,1 %
AC	0,50	1,00	0,0000	7,1 %	13,6 %	39,1 %
BC	0,50	1,00	0,0000	7,1 %	13,6 %	39,1 %
A ²	0,50	1,00	0,0000	13,6 %	39,1 %	91,2 %
B ²	0,50	1,00	0,0000	13,6 %	39,1 %	91,2 %
C ²	0,50	1,00	0,0000	13,6 %	39,1 %	91,2 %

****Βάση της τυπικής απόκλισης = 1,0**

6.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται για τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά με τη χρήση ANOVA (ανάλυση διακύμανσης). Η ANOVA είναι η συλλογή στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών δύο ομάδων και αλληλένδετων εννοιών, όπως η διακύμανση. Για να προσδιοριστεί η στατιστική σημαντικότητα ενός μοντέλου χρησιμοποιείται το F-test και η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης σημαίνει ότι τουλάχιστον μια μεταβλητή είναι σημαντική για το μοντέλο.

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 F. 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 [76-78].

6.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}

Από τα αποτελέσματα διακύμανσης για τον παράγοντα χωρητικότητας του υδροχλωροθειαζιδίου και για διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Πίνακας 16), αποδεικνύεται ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, αφού η τιμή p είναι <0.05 . Συγκεκριμένα, η τιμή $p=0,0231$ υποδεικνύει ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα υπάρχει πιθανότητα μικρότερη από 2,31% οι παράγοντες να μην έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση. Οι επιδράσεις A και B είναι στατιστικά σημαντικές, διότι οι τιμές p είναι $<0,05$, ενώ ο παράγοντας Γ που έχει τιμή $p>0,05$, θα μπορούσε να αποκλεισθεί από την συνάρτηση. Παρόλα αυτά δεν είναι απαραίτητο να εξαιρεθεί από το μοντέλο.

Επίσης, η τιμή *Lack of fit* είναι μη σημαντική, που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μοντέλο δεν παρουσιάζει έλλειψη προσαρμογής και είναι κατάλληλο για την περιγραφή της απόκρισης. Οι τιμές των Adj R-Squared και Pred R-Squared ιδανικά διαφέρουν λιγότερο από 0,2. Σε αυτή την περίπτωση, αυτό δεν συμβαίνει όμως δεν είναι το σημαντικότερο κριτήριο για την απόρριψη του μοντέλου.

Πίνακας 16: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητα k_{HCTZ}

ANOVA						
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ k_{HCTZ}						
Πηγή	Αθροισμά Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F Τιμή	p-τιμή Prob > F	
<u>Μοντέλο</u>	0,080	9	8,919E-003	5,71	<u>0,0231</u>	<u>Σημαντικό</u>
A-ACN%	0,042	1	0,042	26,91	0,0020	
B-pH	0,023	1	0,023	14,79	0,0085	
C-άλας	6,125E-004	1	6,125E-004	0,39	0,5543	
AB	3,600E-003	1	3,600E-003	2,30	0,1798	
AC	4,000E-004	1	4,000E-004	0,26	0,6309	
BC	3,025E-003	1	3,025E-003	1,94	0,2135	
A ²	2,756E-003	1	2,756E-003	1,76	0,2324	
B ²	1,562E-004	1	1,562E-004	0,100	0,7625	
C ²	4,556E-003	1	4,556E-003	2,92	0,1386	
Υπόλοιπο	9,375E-003	6	1,563E-003			
Έλλειψη προσαρμογής	8,075E-003	3	2,692E-003	6,21	0,0839	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	1,300E-003	3	4,333E-004			
Cor Total	0,090	15				
R-Squared				0,8954		
Adj. R-Squared				0,7385		
Pred. R-Squared				-0,4670		

Η τελική συνάρτηση που περιγράφει το μοντέλο με κωδικοποιημένους παράγοντες:

$$\begin{aligned}
 k'_{HCTZ} = & +0.72 - 0.073 A + 0.054 B - (8.750E-003) C \\
 & - 0.030 A*B + 0.010 A*C + 0.028 B*C \\
 & - 0.026 A^2 + (6.250E-003) B^2 - 0.034 C^2
 \end{aligned}$$

6.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την διαχωριστικότητα $R_{AML/VAL}$

Από τα αποτελέσματα διακύμανσης για την διαχωριστικότητα $R_{AML/VAL}$, φαίνεται ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι ικανοποιητικό, καθώς από την τιμή $p < 0,0001$ είναι στατιστικά σημαντικό. Οι επιδράσεις A και Γ είναι στατιστικά μη σημαντικές (οι τιμές p είναι $> 0,05$), ενώ η B είναι σημαντική. Η τιμή για την έλλειψη προσαρμοστικότητας είναι $> 0,05$, άρα το συγκεκριμένο μοντέλο δεν παρουσιάζει έλλειψη προσαρμογής και είναι κατάλληλο. Οι τιμές των Adj. R-Squared και Pred. R-Squared διαφέρουν

ελάχιστα μεταξύ τους, και η τιμή R-Squared τείνει στο ένα, άρα είναι πολύ ικανοποιητικές.

Πίνακας 17: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την διαχωριστικότητα μεταξύ αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης $R_{AML/VAL}$

ANOVA						
	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ $R_{AML/VAL}$					
Πηγή	Αθροισμά Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p τιμή Prob>F	
Μοντέλο	764,85	9	84,98	117,99	< 0,0001	<u>Σημαντικό</u>
A-ACN%	1,38	1	1,38	1,91	0,2159	
B-pH	737,86	1	737,86	1024,39	< 0,0001	
C-άλας	0,48	1	0,48	0,66	0,4476	
AB	5,24	1	5,24	7,28	0,0357	
AC	1,82	1	1,82	2,53	0,1628	
BC	0,28	1	0,28	0,38	0,5589	
A ²	0,17	1	0,17	0,24	0,6402	
B ²	17,28	1	17,28	24,00	0,0027	
C ²	0,34	1	0,34	0,47	0,5181	
Υπόλοιπο	4,32	6	0,72			
Έλλειψη προσαρμογής	3,87	3	1,29	8,66	0,0548	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	0,45	3	0,15			
Cor Total	769,17	15				
	R-Squared		0,9944			
	Adj. R-Squared		0,9860			
	Pred. R-Squared		0,9184			

Τελική συνάρτηση της απόκρισης $R_{AML/VAL}$ με κωδικοποιημένες τιμές:

$$R_{AML/VAL} = 13.68 - 0.41 A - 9.60 B - 0.24 C + 1.14 A*B - 0.67 A*C - 0.26 B*C + 0.21 A^2 - 2.08 B^2 + 0.29 C^2$$

6.3.3 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας βαλσαρτάνης k_{VAL}

Από τα αποτελέσματα διακύμανσης για τον παράγοντα χωρητικότητας βαλσαρτάνης k_{VAL} , φαίνεται ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι και πάλι ικανοποιητικό, με στατιστικά σημαντική την τιμή p. Οι επιδράσεις A, B είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ η Γ δεν είναι. Η τιμή για την έλλειψη προσαρμοστικότητας είναι μη σημαντική, άρα το συγκεκριμένο μοντέλο δεν παρουσιάζει έλλειψη προσαρμογής και είναι κατάλληλο. Οι τιμές των Adj. R-Squared και Pred. R-Squared διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους, ενώ η τιμή R-Squared είναι σχεδόν ένα, οπότε όλες είναι πολύ ικανοποιητικές.

Πίνακας 18: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητα k_{VAL}

ANOVA		ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ k_{VAL}				
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p-τιμή Prob > F	
Μοντέλο	214,61	9	23,85	77,74	< 0,0001	Σημαντικό
A-ACN%	90,86	1	90,86	296,22	< 0,0001	
B-pH	111,83	1	111,83	364,59	< 0,0001	
C-Salt	1,13	1	1,13	3,69	0,1030	
AB	9,61	1	9,61	31,33	0,0014	
AC	0,048	1	0,048	0,16	0,7049	
BC	0,076	1	0.076	0,25	0,6372	
A ²	0,61	1	0,61	1,98	0,2087	
B ²	0,060	1	0,060	0,20	0,6737	
C ²	0,39	1	0,39	1,27	0,3022	
Υπόλοιπο	1,84	6	0,31			Μη σημαντικό
Έλλειψη προσαρμογής	1,21	3	0,40	1,91	0,3036	
Σφάλμα	0,63	3	0,21			
Cor Total	216,45	15				
	R-Squared			0,9915		
	Adj R-Squared			0,9787		
	Pred R-Squared			0,9055		

Τελική συνάρτηση της απόκρισης $R_{AML/VAL}$ με κωδικοποιημένες τιμές

$$\begin{aligned}
 k_{VAL} = & +7.64 - 3.37 A - 3.74 B - 0.38 C \\
 & + 1.55 A*B + 0.11 A*C - 0.14 B*C \\
 & +0.39 A^2 + 0.12 B^2 - 0.31 C^2
 \end{aligned}$$

6.4 Διαγνωστικά διαγράμματα

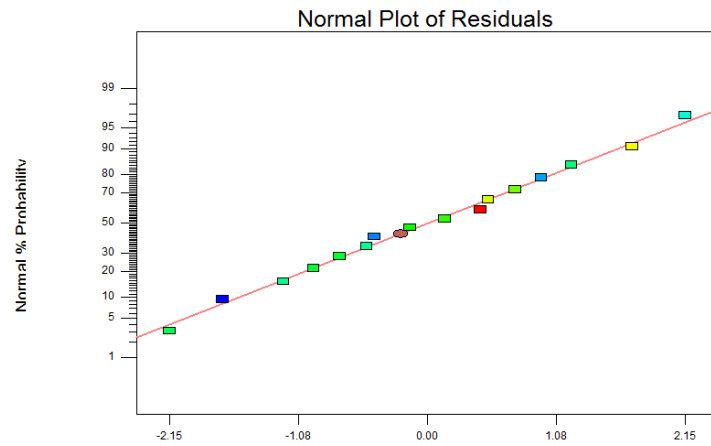
6.4.1 Διαγράμματα κανονικής κατανομής υπολοίπων (Normal plot of residuals)

Ένα πολύ βασικό στοιχείο για την ανάλυση ενός παράγοντα είναι οι πειραματικές τιμές στα διάφορα επίπεδα του να μην έχουν μεγάλη απόκλιση από τις θεωρητικές τιμές οι οποίες προκύπτουν από το μοντέλο που περιγράφει αυτά τα δεδομένα. Όταν τα υπόλοιπα μεταξύ αυτών των τιμών ακολουθούν κανονική κατανομή και δεν υπάρχουν έκτροπες τιμές (>95%), τότε το μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Στην Εικόνα 39, απεικονίζονται τα διαγράμματα κανονικής κατανομής των υπολοίπων των πειραματικών μετρήσεων για τις αποκρίσεις, τα

οποία και παρουσιάζουν κανονική κατανομή, καθώς κατανέμονται πάνω σε ευθεία γραμμή.

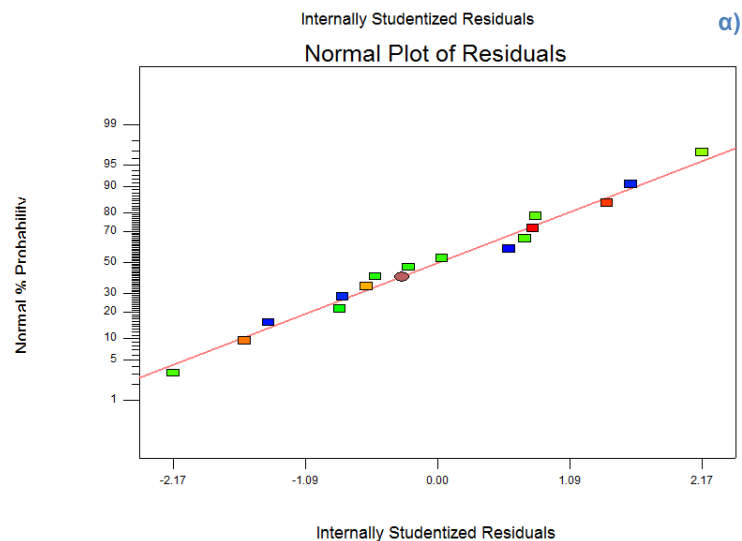
Design-Expert® Software
k'HCTZ

Color points by value of
k'HCTZ:



Design-Expert® Software
RAMLO/VALS

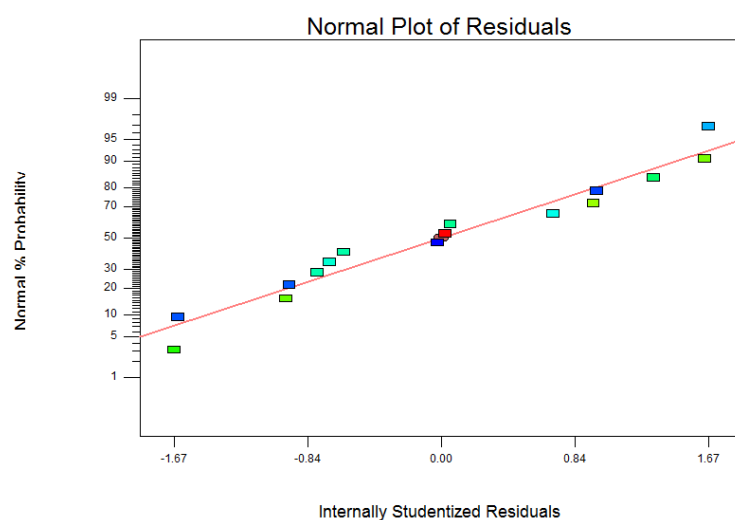
Color points by value of
RAMLO/VALS:



α)

Design-Expert® Software
k'VALS

Color points by value of
k'VALS:



β)

γ)

Εικόνα 39: Διάγραμμα κανονικής κατανομής υπολοίπων για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ γ) k_{VAL} σχεδιασμού BBD

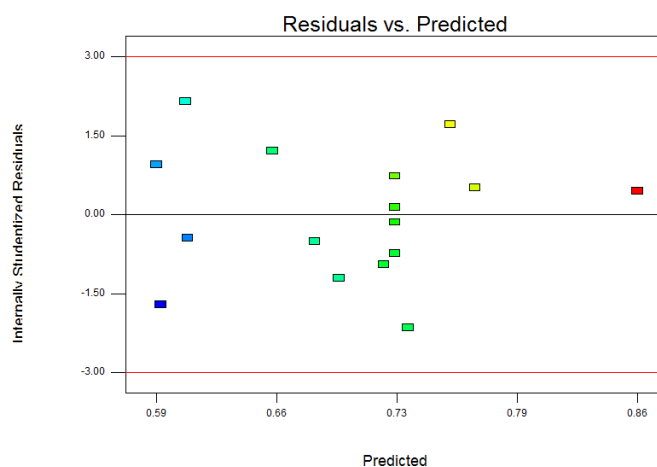
6.4.2 Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (Residuals vs Predicted)

Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζει την ομοιογένεια στη 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.

Σε όλη την έκταση των αποκρίσεων παρατηρείται ομοσκεδαστικότητα, Εικόνα 40, των υπολοίπων σε σχέση με τις προβλεπόμενες τιμές.

Design-Expert® Software
κ'HCTZ

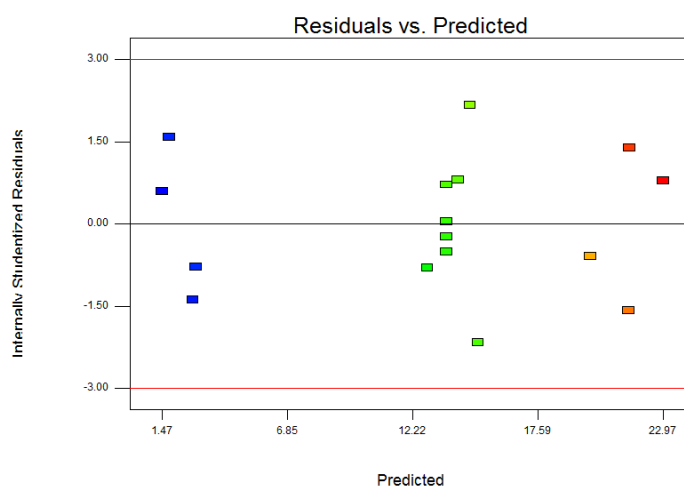
Color points by value of
κ'HCTZ:
0.87
0.56



α)

Design-Expert® Software
RAMLO/VALS

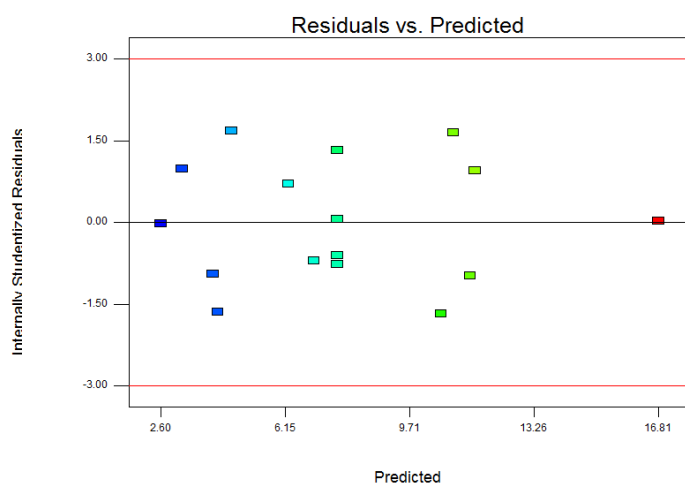
Color points by value of
RAMLO/VALS:
23.3
1.72



β)

Design-Expert® Software
K'VALS

Color points by value of
K'VALS:
16.82
2.59



Εικόνα 40: Διάγραμμα υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων τιμών για τις πειραματικές μετρήσεις α) K_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ γ) K_{VAL} του σχεδιασμού BBD

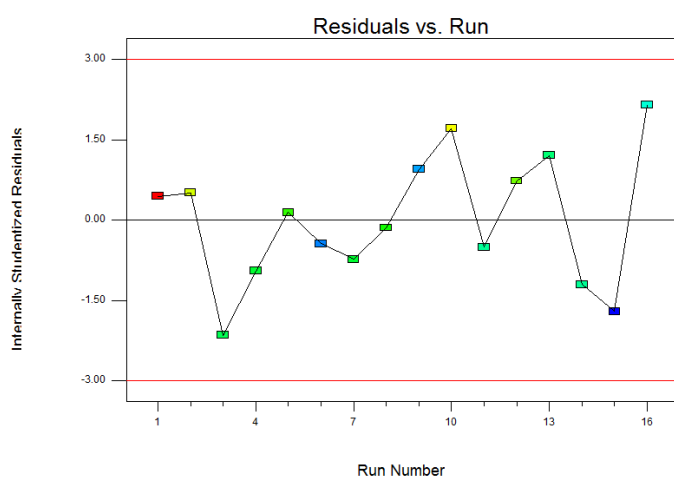
6.4.3 Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων (Predicted vs Run)

Με το διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων ελέγχεται αν υπάρχουν παράμετροι που έχουν επηρεάσει τη απόκριση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το διάγραμμα πρέπει να παρουσιάζει τυχαία διασπορά των σημείων, καθώς οι «τάσεις» υποδηλώνουν μεταβλητές που προκαλούν σφάλματα. Η ομαδοποίηση (blocking) και η τυχαιοποίηση (randomization) βοηθούν τη σωστή διεξαγωγή της ανάλυσης.

Από το διάγραμμα συμπεραίνεται ότι τα υπόλοιπα παρουσιάζουν τυχαιότητα, άρα η σειρά διεξαγωγής των πειραμάτων δεν επηρέασε την υπό μελέτη απόκριση, Εικόνα 41.

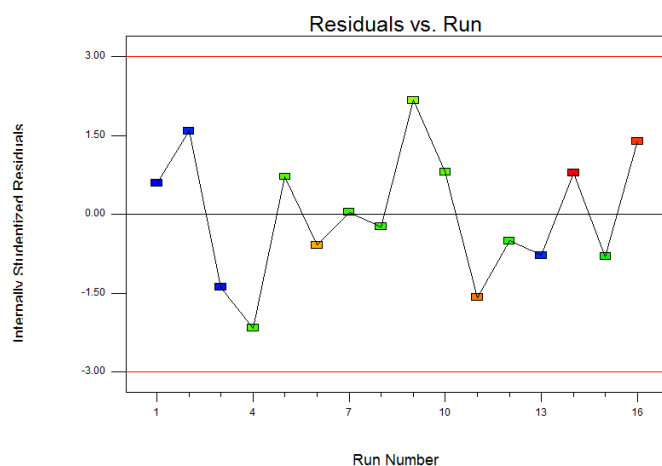
Design-Expert® Software
K_{HCTZ}

Color points by value of
K_{HCTZ}:
0.87
0.56



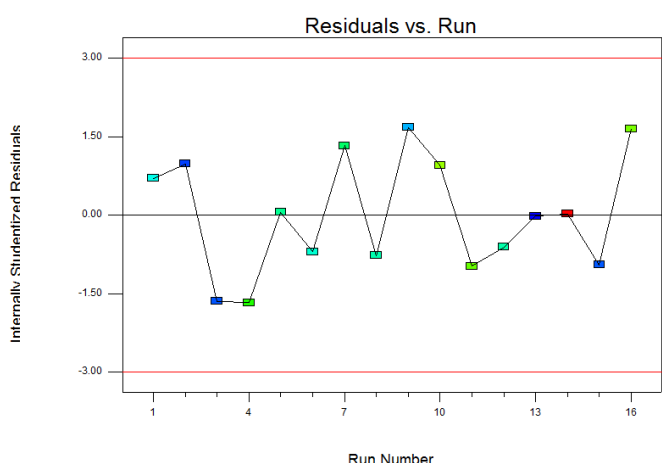
Design-Expert® Software
RAMLO/VALS

Color points by value of
RAMLO/VALS:
23.3
1.72



Design-Expert® Software
K'VALS

Color points by value of
K'VALS:
16.82
2.59



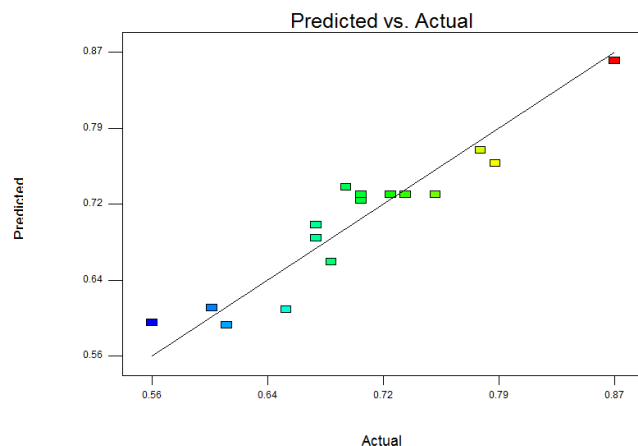
Εικόνα 41: Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης πειραμάτων για τις αποκρίσεις
α) k_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ γ) k_{VAL} του σχεδιασμού BBD

6.4.4 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 ταυτίζονται με τις πραγματικές. Στην Εικόνα 42, γίνεται αναπαράσταση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών της κάθε μια απόκρισης. Παρατηρείται 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
K_{HCTZ}

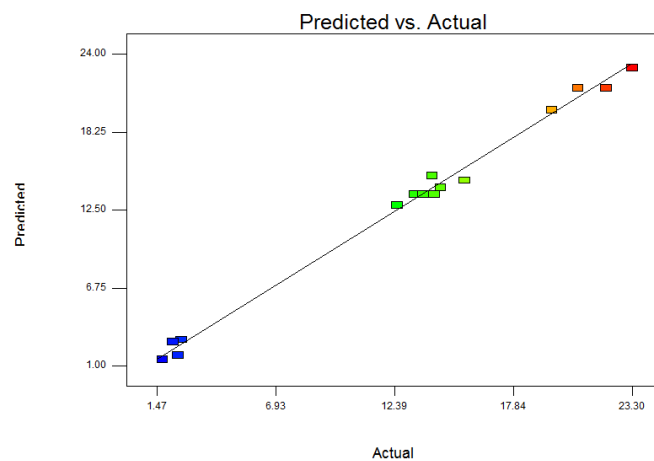
Color points by value of
K_{HCTZ}:
0.87
0.56



α)

Design-Expert® Software
R_{AML/VALS}

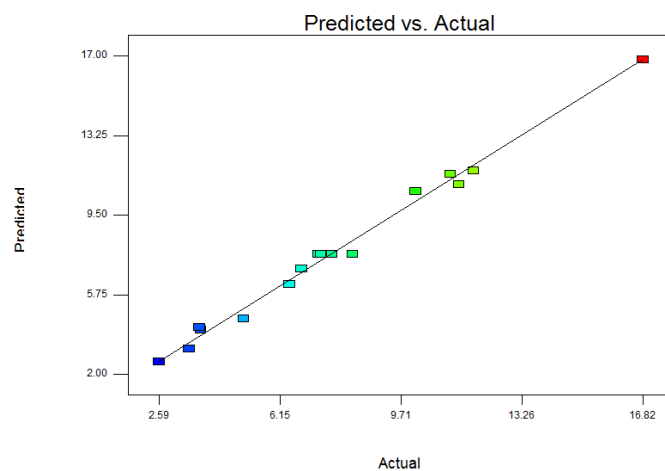
Color points by value of
R_{AML/VALS}:
23.3
1.72



β)

Design-Expert® Software
K_{VALS}

Color points by value of
K_{VALS}:
16.82
2.59

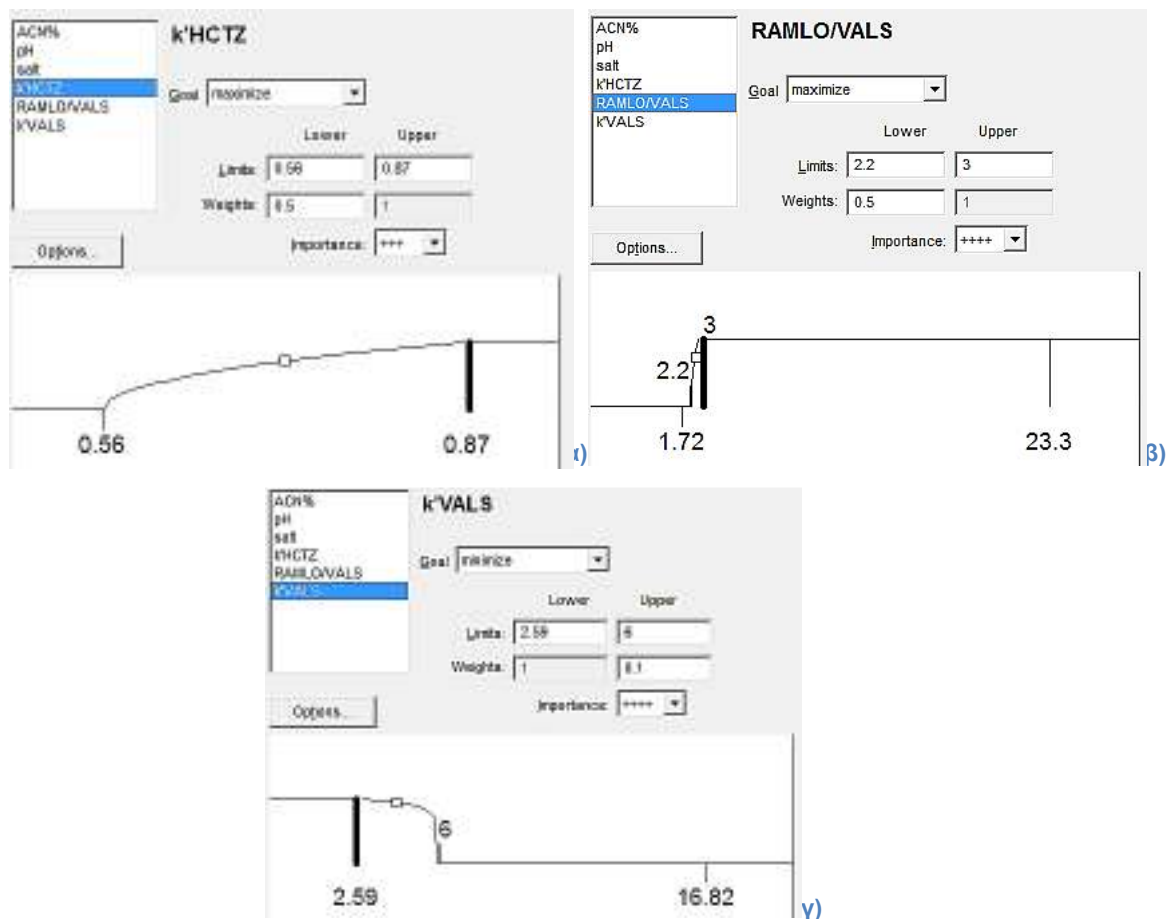


γ)

Εικόνα 42: Αναπαράσταση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών έναντι των πραγματικών τιμών των αποκρίσεων α) K_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ και γ) K_{VAL} για τον σχεδιασμό BBD

6.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για τον σχεδιασμό Box Behnken

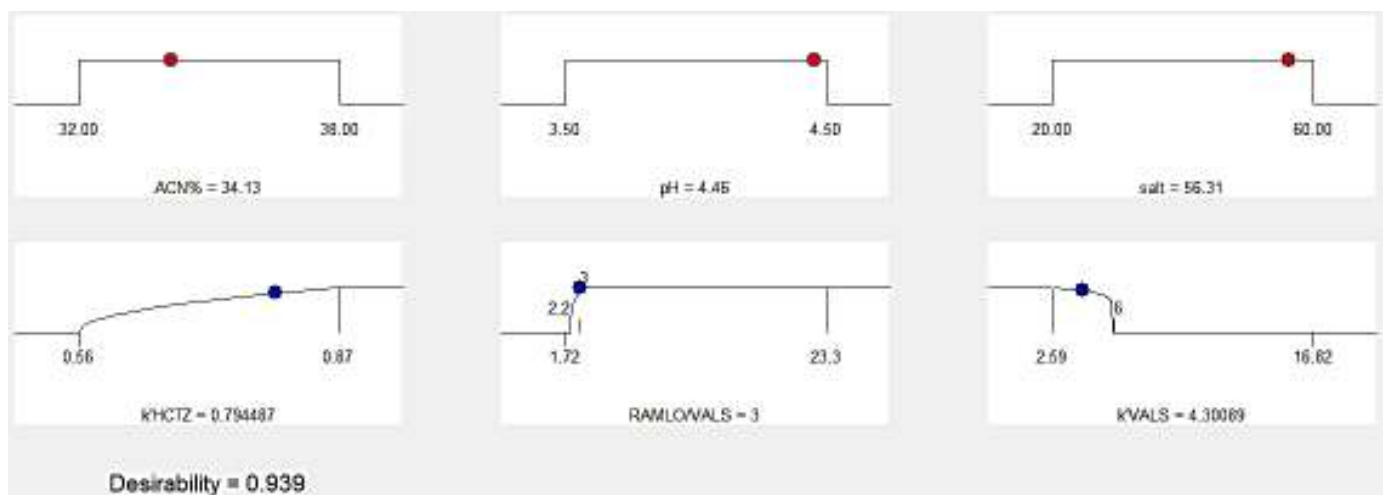
Τελευταίο στάδιο προς τον στόχο είναι η εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραγόντων. Στην Εικόνα 43, φαίνονται οι στόχοι που δηλώθηκαν στο λογισμικό για την κάθε απόκριση (μεγιστοποίηση, ελαχιστοποίηση, οριοθέτηση) καθώς και το βάρος (weight) για την κάθε μια ξεχωριστά.



Εικόνα 43: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) $R_{AML/VAL}$ και γ) k_{VAL} του σχεδιασμού BBD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας

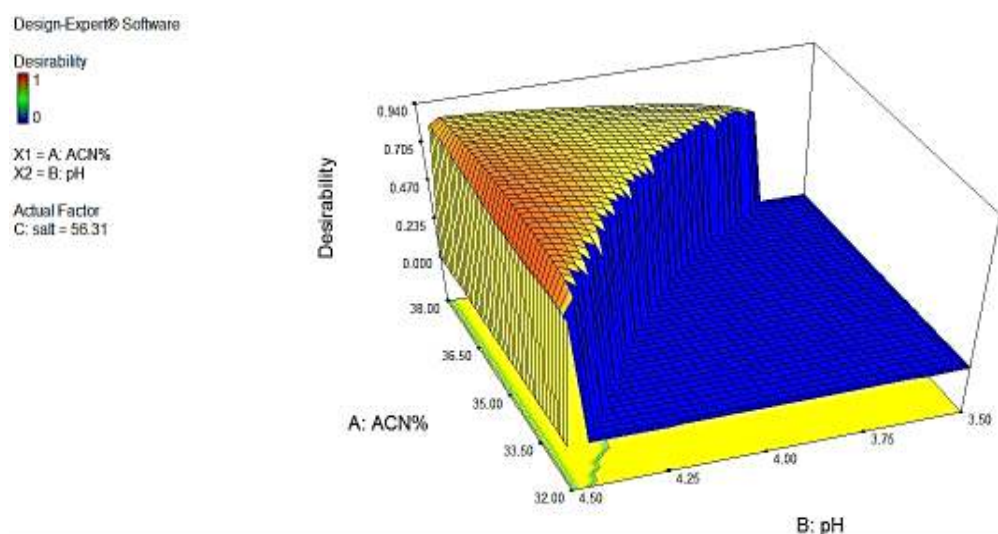
Η προτεινόμενη λύση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του k_{HCTZ} και $R_{AML/VAL}$, καθώς και την ελαχιστοποίηση του k_{VAL} δίνεται για τις παρακάτω τιμές παραγόντων, όπως στην Εικόνα 44:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 34,1 για εύρος 32,0-38,0
- ❖ pH: 4,46 για εύρος 3,50-4,50
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 56,3 για εύρος 20,0-60,0



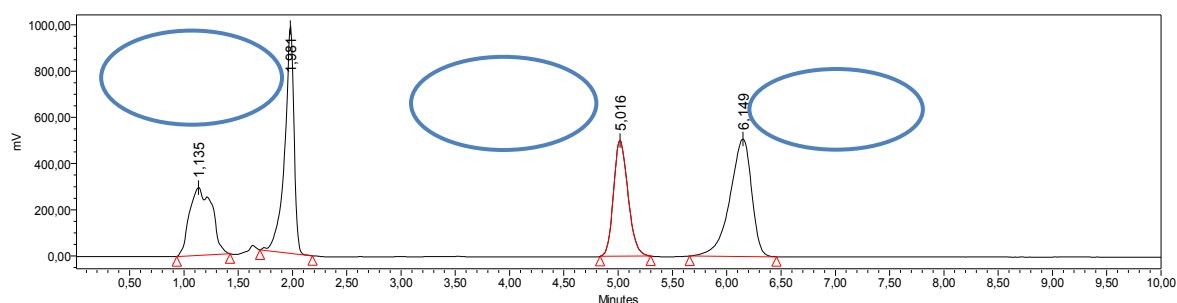
Εικόνα 44: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων και των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , $R_{AML/VAL}$, k_{VAL} και επιθυμητότητας (desirability)

Οι τιμές των αποκρίσεων που προβλέπει το σύστημα για αυτές τις τιμές των παραγόντων είναι $k_{HCTZ}=0,79$, $R_{AML/VAL}=3,0$, $k_{VAL}=4,30$ και η λαμβανόμενη επιθυμητότητα είναι ίση με 0,939. Η συγκεκριμένη λύση βελτιστοποίησης επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλές προτεινόμενες από το λογισμικό. Στην Εικόνα 45, απεικονίζεται το 3D-γράφημα επιθυμητότητας.



Εικόνα 45: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH

Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε από την προτεινόμενη λύση που επιλέχθηκε, στην Εικόνα 49. Οι πραγματικές τιμές για τις αποκρίσεις ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικές ($k_{HCTZ}=0,74$, $R_{AML/VAL}=3,8$, $k_{VAL}=4,40$).



Εικόνα 46: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδής (HCTZ), αμλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες

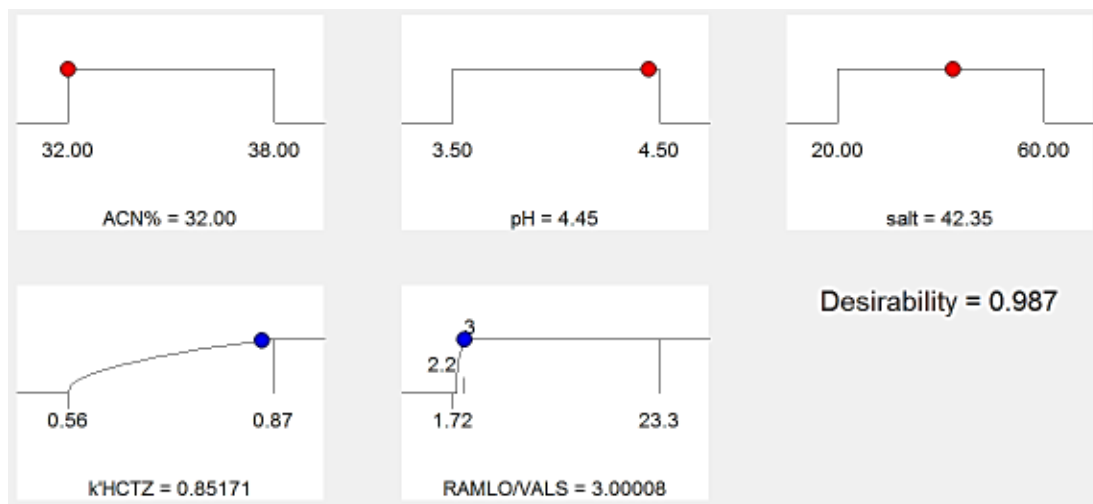
6.6 Εναλλακτική βέλτιστη λύση

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης του μοντέλου, διερευνήθηκε και η περίπτωση αφαίρεσης της μίας απόκρισης από την συνάρτηση επιθυμητότητας, καθώς διαπιστώθηκε ότι ο στόχος που αφορά τον χρόνο έκλουσης της βαλσαρτάνης μπορούσε να καλυφθεί από τα κριτήρια της δεύτερης απόκρισης, δηλαδή της διαχωριστικότητας μεταξύ της αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης.

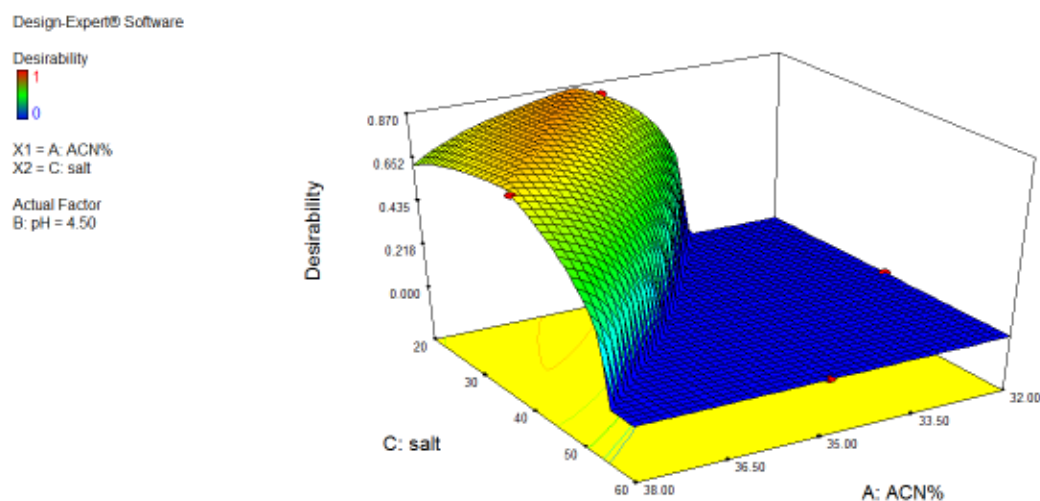
Με αυτά τα δεδομένα, στο λογισμικό αποκλείστηκε ο ένας παράγοντας k_{VAL} , ενώ οι στόχοι και τα βάρη για τις άλλες δύο αποκρίσεις παρέμειναν ίδια. Μία από τις καλύτερες λύσεις που προτάθηκε από το Design Expert, παρουσιάζει βελτιωμένη τιμή για την επιθυμητότητα ($D=0,987$), όπως επίσης και για τον παράγοντα χωρητικότητας του υδροχλωροθειαζιδίου ($k_{HCTZ}=0,85$), για τον οποίο στόχο έχουμε τη μεγιστοποίηση. Οι τιμές των παραγόντων για τη νέα βέλτιστη λύση ήταν οι εξής:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 32,0 για εύρος 32,0-38,0
- ❖ pH: 4,45 για εύρος 3,50-4,50
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 42,4 για εύρος 20,0-60,0

Στην Εικόνα 47 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των αποκρίσεων που θα προέκυπταν από τη διεξαγωγή του πειράματος με τη βέλτιστη λύση, δηλαδή $k_{HCTZ}=0,85$ και $R_{AML/VAL}=3,0$. Στην Εικόνα 48, απεικονίζεται το 3D-γράφημα επιθυμητότητας ACN% σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση άλατος (salt) που προέκυψε από τη συγκεκριμένη λύση.



Εικόνα 47: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων και των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , $R_{AML/VAL}$, k_{VAL} και επιθυμητότητας



Εικόνα 48: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και συγκέντρωση άλατος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ C18 ΜΕ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ

7.1 Εισαγωγή

Μετά από τη διεξαγωγή του πειραματικού σχεδιασμού Box Behnken, εφαρμόστηκε και ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης, για την περίπτωση της στήλης C18. Στους παράγοντες προστέθηκε και το ποσοστό μεθανόλης, διότι από τα προκαταρκτικά πειράματα στη συγκεκριμένη στήλη διαπιστώθηκαν καλύτερες κορυφές. Η απόκριση k_{VAL} αφαιρέθηκε μετά τη διαπίστωση, κατά το σχεδιασμό Box-Behnken, πως δεν ήταν σημαντική η συμβολή της, καθώς μετά τον αποκλεισμό της αυξήθηκε η ολική επιθυμητότητα. Η απόκριση $R_{AML/VAL}$ αντικαταστάθηκε από την εκλεκτικότητα α , διότι ο συντελεστής αυτός διευκολύνει τη λήψη δύο υποπεριπτώσεων επιθυμητότητας ανάλογα με τη σειρά έκλουσης της βαλσαρτάνης και της αμλοδιπίνης.

Πίνακας 19: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό CCD

Παράγοντες	Είδος παραγόντων	Τύπος παραγόντων	Εύρος παραγόντων	Κωδικοποιημένες τιμές κατώτατου και ανώτατου επιπέδου
A	ACN%	Ποσοτικός	36,0-46,0,	(-1), (+1)
B	MeOH%	Ποσοτικός	2,0-8,0	(-1), (+1)
B	pH	Ποσοτικός	2,80-4,80	(-1), (+1)
Γ	Συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος (mM)	Ποσοτικός	20,0-60,0	(-1), (+1)
Αποκρίσεις				
	Y_1			k_{HCTZ}
	Y_2			α

Τα πειράματα που πρέπει να διεξαχθούν μετά από τα εισαγόμενα δεδομένα, σύμφωνα με τον σχεδιασμό CCD, και όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 10 trial version παρατίθενται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Τα πειράματα για τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Πείραμα	Παράγοντας Α	Παράγοντας Β	Παράγοντας Γ	Παράγοντας Δ	Υ1	Υ2
	ACN%	MeOH	pH	Συγκέντρωση ρυθμ.διαλύματος (mM)	k _{HCTZ}	α
1	41,0	5,0	3,80	30,0	0,42	1,19
2	36,0	2,0	4,80	20,0	0,54	0,23
3	36,0	2,0	2,80	20,0	0,54	2,52
4	38,5	5,0	3,80	40,0	0,38	1,29
5	46,0	2,0	4,80	20,0	0,42	0,13
6	43,5	5,0	3,80	40,0	0,39	1,16
7	46,0	8,0	2,80	60,0	0,34	2,18
8	41,0	6,5	3,80	40,0	0,38	1,14
9	41,0	5,0	3,80	40,0	0,42	1,21
10	36,0	8,0	2,80	20,0	0,39	2,14
11	46,0	2,0	2,80	60,0	0,45	2,59
12	41,0	5,0	3,80	40,0	0,42	1,26
13	46,0	8,0	4,80	20,0	0,37	0,13
14	46,0	2,0	4,80	60,0	0,41	0,37
15	46,0	2,0	2,80	20,0	0,42	1,96
16	36,0	8,0	2,80	60,0	0,39	2,47
17	36,0	2,0	2,80	60,0	0,46	3,01
18	41,0	3,5	3,80	40,0	0,44	1,27
19	46,0	8,0	4,80	60,0	0,32	0,21
20	41,0	5,0	3,80	40,0	0,42	1,19
21	41,0	5,0	3,30	40,0	0,39	1,90
22	36,0	8,0	4,80	60,0	0,42	0,31
23	46,0	8,0	2,80	20,0	0,34	1,65
24	36,0	8,0	4,80	20,0	0,39	0,19
25	41,0	5,0	4,30	40,0	0,37	0,68
26	41,0	5,0	3,80	50,0	0,41	1,30
27	36,0	2,0	4,80	60,0	0,47	0,31
28	41,0	5,0	3,80	40,0	0,37	1,25

7.2 Αξιολόγηση μοντέλου

Στην αξιολόγηση του μοντέλου ελέγχεται αν το μοντέλο επιλογής το οποίο είναι τετραγωνικό (quadratic) δεν εμφανίζει αλλοιώσεις (aliases). Εφόσον δεν είναι αλλοιωμένο, στη συνέχεια, ελέγχεται η τιμή VIF, η οποία, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 21, είναι 1 για όλους τους όρους, εκτός από τους τετραγωνικούς. Επίσης, όλες οι τιμές του Std.Error είναι ίδιες για κάθε τύπο παράγοντα.

Πίνακας 21: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού CCD

Όρος	Τυπικό σφάλμα**	VIF	Ri-Squared	Ισχύς σε επίπεδο α% για επίδραση του		
				0,5 τυπ.απόκλιση	1 τυπ.απόκλιση	2 τυπ.απόκλιση
A	0,25	1,00	0,0000	15,6 %	46,8 %	96,3 %
B	0,25	1,00	0,0000	15,6 %	46,8 %	96,3 %
C	0,5	1,00	0,0000	15,6 %	46,8 %	96,3 %
D	0,25	1,00	0,0000	15,6 %	46,8 %	96,3 %
AB	0,25	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
AC	0,25	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
AD	0,25	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
BC	0,25	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
BD	0,25	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
CD	2,45	1,00	0,0000	15,3 %	45,7 %	95,8 %
A ²	2,45	38,47	0,9740	5,4%	6,7%	11,8%
B ²	2,45	38,47	0,9740	5,4%	6,7%	11,8%
C ²	2,45	38,47	0,9740	5,4%	6,7%	11,8%
D ²	2,45	38,47	0,9740	5,4%	6,7%	11,8%

****Βάση της τυπικής απόκλισης = 1,0**

7.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

7.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}

Τα αποτελέσματα διακύμανσης για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ} , δείχνουν ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι ικανοποιητικό, (τιμή p στατιστικά σημαντική). Η τιμή $p=0,0007$ υποδεικνύει ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα υπάρχει πιθανότητα μικρότερη από 0,07% οι παράγοντες να μην έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση. Οι επιδράσεις A και B είναι στατιστικά σημαντικές (οι τιμές p είναι $<0,05$), ενώ οι Γ και Δ είναι στατιστικά μη σημαντικές. Επίσης, η τιμή για την έλλειψη προσαρμογής είναι μη σημαντική, που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο για την περιγραφή του συγκεκριμένου παράγοντα.

Πίνακας 22: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας k_{HCTZ}

ANOVA						
Απόκριση k_{HCTZ}						
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p-τιμή Prob > F	
Μοντέλο	0,061	14	4,366E-003	6,70	0,0007	<u>Σημαντικό</u>
A-ACN	0,017	1	0,017	25,63	0,0002	
B-MeOH	0,037	1	0,037	56,57	< 0,0001	
C-pH	0,000	1	0,000	0,000	1,0000	
D-ρυθμ.διάλυμα	1,456E-003	1	1,456E-003	2,23	0,1589	
AB	5,062E-004	1	5,062E-004	0,78	0,3941	
AC	3,062E-004	1	3,062E-004	0,47	0,5051	
AD	5,062E-004	1	5,062E-004	0,78	0,3941	
BC	3,063E-004	1	3,063E-004	0,47	0,5051	
BD	7,562E-004	1	7,562E-004	1,16	0,3010	
CD	1,562E-004	1	1,562E-004	0,24	0,6326	
A ²	3,504E-004	1	3,504E-004	0,54	0,4764	
B ²	4,872E-004	1	4,872E-004	0,75	0,4029	
C ²	7,223E-004	1	7,223E-004	1,11	0,3116	
D ²	9,139E-004	1	9,139E-004	1,40	0,2575	
Υπόλοιπο	8,473E-003	13	6,518E-004			
Έλλειψη προσαρμογής	6,598E-003	10	6,598E-004	1,06	0,5458	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	1,875E-003	3	6,250E-004			
Cor Total	0,070	27				
R-Squared				0,8783		
Adj. R-Squared				0,7472		
Pred. R-Squared				0,1812		

Η τελική συνάρτηση που περιγράφει το μοντέλο με κωδικοποιημένους παράγοντες είναι:

$$k'_{HCTZ} = +0.40 - 0.032A - 0.047B + 0.000C - (9.394E-003)D + (5.625E-003)AB - (4.375E-003)AC + 0.028BC + (5.625E-003)AD + (4.375E-003)BC - (3.125E-003)CD + (6.875E-003)BD - 0.046A^2 + 0.054B^2 - 0.066C^2 + 0.074D^2$$

7.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την εκλεκτικότητα α

Από τα αποτελέσματα διακύμανσης για την εκλεκτικότητα α, φαίνεται ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι ικανοποιητικό, καθώς από την τιμή p είναι στατιστικά σημαντική. Όλες οι επιδράσεις A, B, Γ και Δ είναι στατιστικά σημαντικές (οι τιμές p είναι <0,05). Επίσης, η τιμή για την έλλειψη προσαρμογής είναι μη σημαντική, άρα το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο.

Πίνακας 23: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την εκλεκτικότητα α

ANOVA		Απόκριση α				
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p-τιμή Prob > F	
Μοντέλο	19,35	14	1,38	491,10	< 0,0001	<u>Σημαντικό</u>
A-ACN	0,25	1	0,25	88,29	< 0,0001	
B-MeOH	0,22	1	0,22	78,13	< 0,0001	
C-pH	18,03	1	18,03	6406,51	< 0,0001	
D-ρυθμ.διάλυμα	0,40	1	0,40	140,55	< 0,0001	
AB	4,000E-004	1	4,000E-004	0,14	0,7123	
AC	0,15	1	0,15	54,03	< 0,0001	
AD	0,013	1	0,013	4,70	0,0494	
BC	0,13	1	0,13	46,04	< 0,0001	
BD	9,025E-003	1	9,025E-003	3,21	0,0967	
CD	0,13	1	0,13	47,33	< 0,0001	
A ²	5,020E-004	1	5,020E-004	0,18	0,6797	
B ²	3,029E-003	1	3,029E-003	1,08	0,3185	
C ²	6,998E-003	1	6,998E-003	2,49	0,1389	
D ²	1,046E-004	1	1,046E-004	0,037	0,8501	
Υπόλοιπο	0,037	13	2,815E-003			
Έλλειψη προσαρμογής	0,033	10	3,332E-003	3,05	0,1944	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	3,275E-003	3	1,092E-003	491,10	< 0,0001	
Cor Total	19,39	27	1,38	88,29	< 0,0001	
R-Squared					0,9981	
Adj. R-Squared					0,9961	
Pred. R-Squared					0,9884	

Η τελική συνάρτηση της απόκρισης α με κωδικοποιημένες τιμές είναι:

$$\alpha = +1.23 - 0.12A - 0.12B - 1.05C + 0.15D + 5.000E-003AB - 0.67AC - 0.26BC + 0.098AC + 0.029AD + 0.090BC - 0.024BD - 0.091CD - 0.055A^2 - 0.13B^2 + 0.21C^2 + 0.025D^2$$

7.4 Διαγνωστικά διαγράμματα

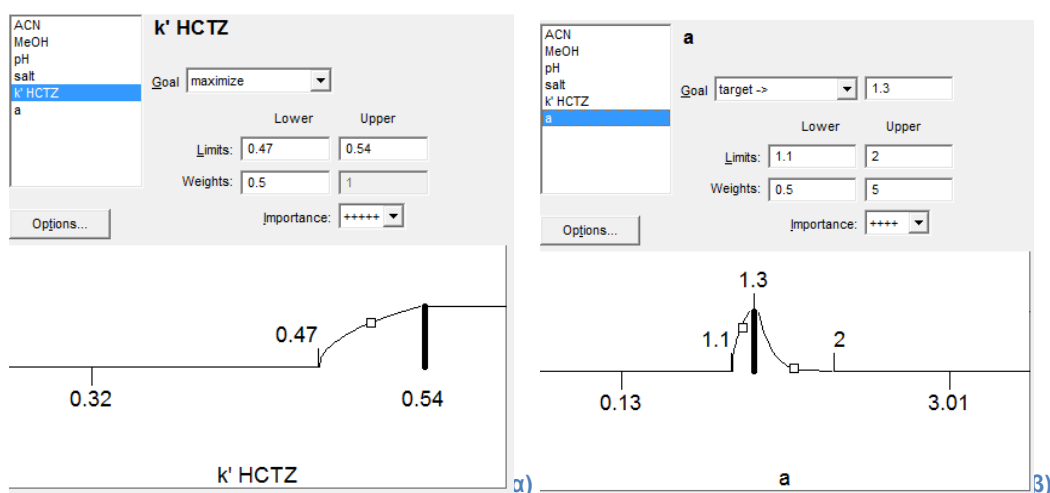
Τα διαγνωστικά διαγράμματα των δύο αποκρίσεων πληρούν τις προϋποθέσεις, όπως και στο σχεδιασμό Box-Behnken. Τα υπόλοιπα παρουσιάζουν κανονική κατανομή πάνω σε ευθεία γραμμή, ομοσκεδαστικότητα στα διαγράμματα έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών και τυχαιότητα έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων. Στα διαγράμματα των προβλεπόμενων έναντι των πραγματικών τιμών, παρατηρείται καλή συσχέτιση των τιμών, οι οποίες βρίσκονται πάνω σε ευθεία γραμμή, άρα η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου είναι αυξημένη.

7.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για το σχεδιασμό CCD

7.5.1 Συνάρτηση επιθυμητότητας για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=1,30$

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν στη στήλη C18, φάνηκε ότι για $\text{pH} < 4,00$ η βαλσαρτάνη εκλούεται τελευταία, ενώ για $\text{pH} > 4,00$ τελευταία εκλούεται η αμλοδιπίνη. Ο νέος παράγοντας που προστέθηκε (εκλεκτικότητα) μας διευκόλυνε στον διαχωρισμό αυτών των περιπτώσεων ως προς την επιθυμητότητα, χωρίς να περιορίζουμε το βέλτιστο εύρος του pH στην κάθε περίπτωση. Για $\alpha=1,30$ η βαλσαρτάνη εκλούεται μετά την αμλοδιπίνη και υπάρχει ένας καλός διαχωρισμός κορυφών.

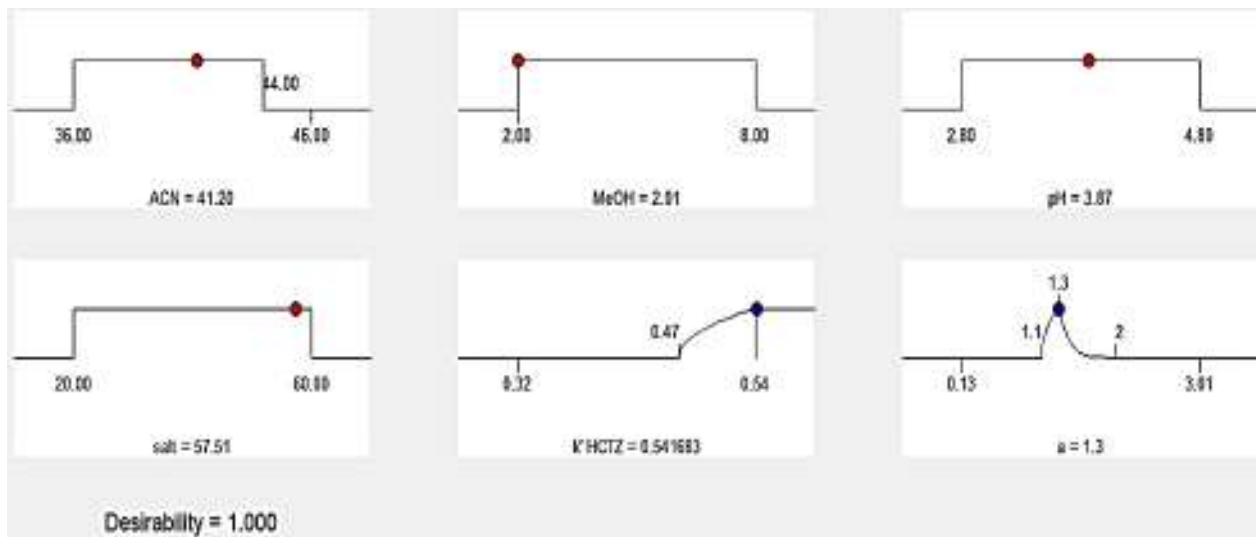
Στη συνέχεια, έγινε εισαγωγή των στόχων στο λογισμικό για κάθε μία απόκριση, όπως επίσης και το βάρος (weight) για την κάθε μια ξεχωριστά, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 49.



Εικόνα 49: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού CCD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας

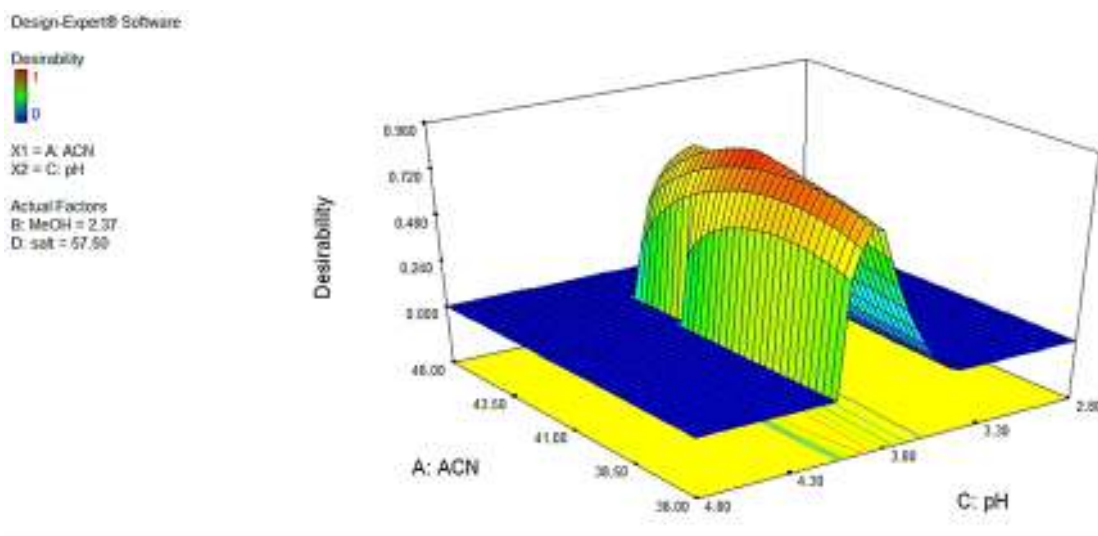
Η προτεινόμενη λύση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του k_{HCTZ} και στόχευση του α στην τιμή 1,30, δίνεται για τις παρακάτω τιμές παραγόντων, στην Εικόνα 50:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 41,2 για εύρος 36,0-46,0
- ❖ Ποσοστό MeOH (%): 2,0 για εύρος 2,0-8,0
- ❖ pH: 3,87 για εύρος 2,80-4,80
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 57,5 για εύρος 20,0-60,0



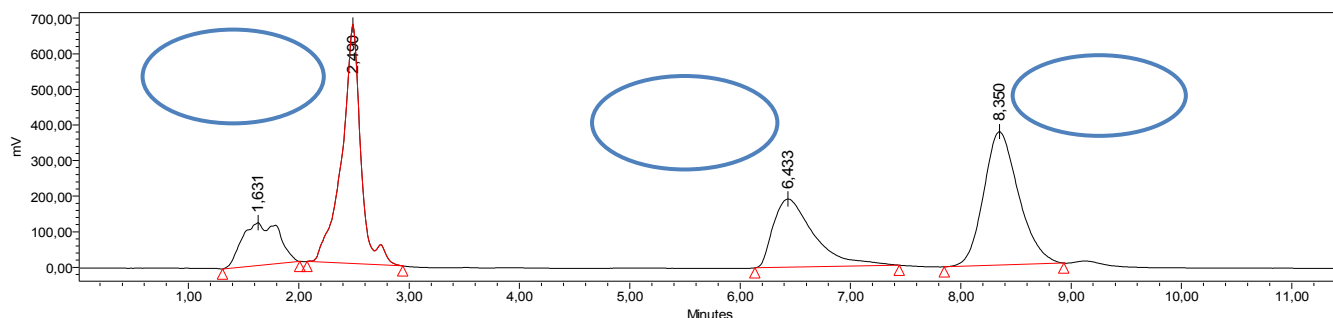
Εικόνα 50: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)

Οι τιμές των αποκρίσεων που προβλέπει το σύστημα για αυτές τις τιμές των παραγόντων είναι $k_{HCTZ}=0,54$, $\alpha=1,30$ και η λαμβανόμενη επιθυμητότητα είναι ίση με 1,000. Η συγκεκριμένη λύση βελτιστοποίησης επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλές προτεινόμενες από το λογισμικό. Στην Εικόνα 51, απεικονίζεται το 3D-γράφημα επιθυμητότητας.



Εικόνα 51: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH

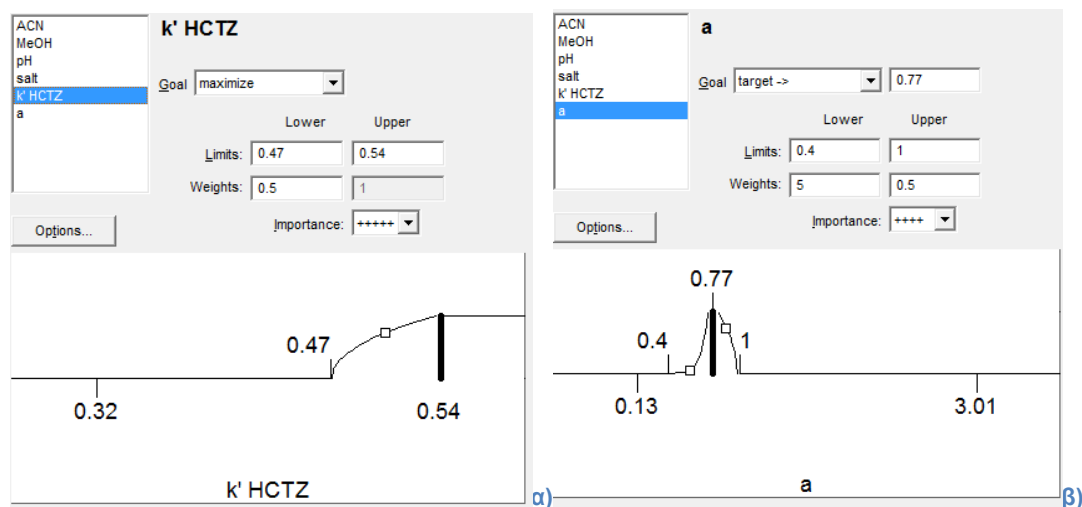
Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε από την προτεινόμενη λύση που επιλέχθηκε, στην Εικόνα 52. Οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικές ($k_{\text{HCTZ}}=0,53$, $\alpha=1,40$).



Εικόνα 52: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες

7.5.2 Συνάρτηση επιθυμητότητας για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=0,77$

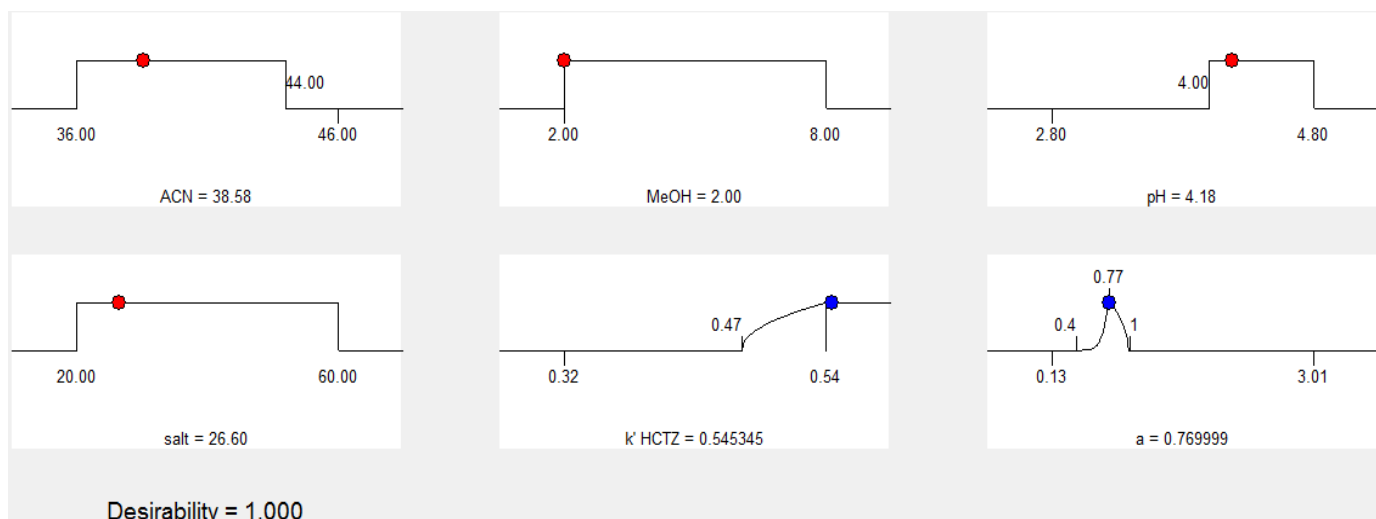
Για $\text{pH} > 4,00$, η βαλσαρτάνη εκλούεται πριν την αμλοδιπίνη. Έτσι, ο στόχος για το α άλλαξε από 1,30 σε 0,77, ώστε πέρα από τη διαφορετική σειρά έκλουσης των ίδιων ουσιών να υπάρχει επίσης καλός διαχωρισμός. Για το k_{HCTZ} παρέμειναν ίδια τα δεδομένα (Εικόνα 53).



Εικόνα 53: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού CCD για τη συνάρτηση επιθυμητότητας

Η προτεινόμενη λύση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του k_{HCTZ} και στόχευση του α στην τιμή 0,77, δίνεται για τις παρακάτω τιμές παραγόντων, στην Εικόνα 54:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 38,6 για εύρος 36,0-46,0
- ❖ Ποσοστό MeOH (%): 2,0 για εύρος 2,0-8,0
- ❖ pH: 4,18 για εύρος 3,50-4,50
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 26,6 για εύρος 20,0-60,0



Εικόνα 54: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)

Οι τιμές των αποκρίσεων που προβλέπει το σύστημα για αυτές τις τιμές των παραγόντων είναι $k_{HCTZ}=0,54$, $\alpha=0,77$ και η λαμβανόμενη επιθυμητότητα είναι ίση με 1,000. Η συγκεκριμένη λύση βελτιστοποίησης επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλές προτεινόμενες από το λογισμικό. Στην Εικόνα 55, απεικονίζονται δύο 3D-γραφήματα επιθυμητότητας που προέκυψαν.

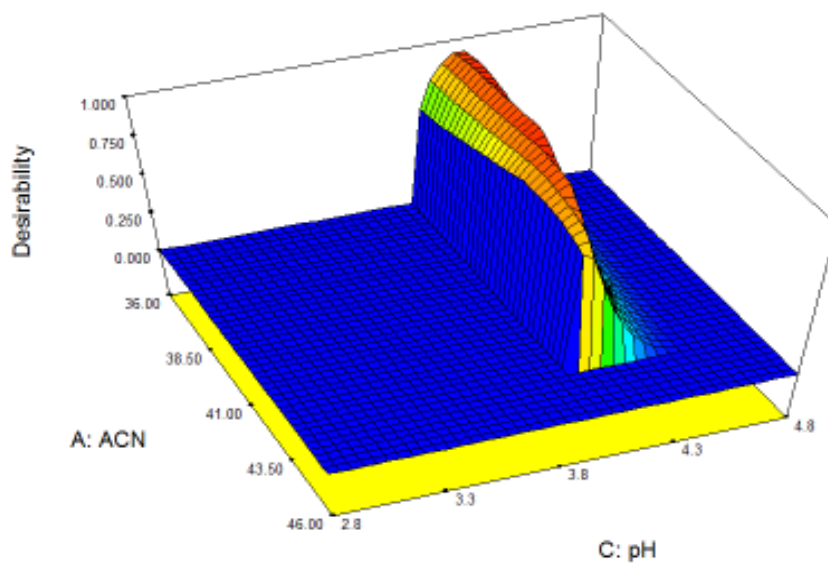
Design-Expert® Software

Desirability



X1 = A: ACN
X2 = C: pH

Actual Factors
B: MeOH = 2.00
D: salt = 26.60



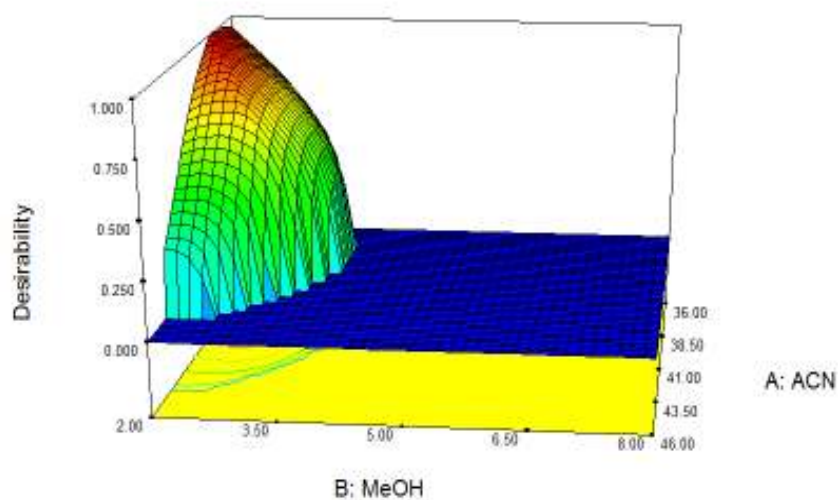
α)

Desirability



X1 = A: ACN
X2 = B: MeOH

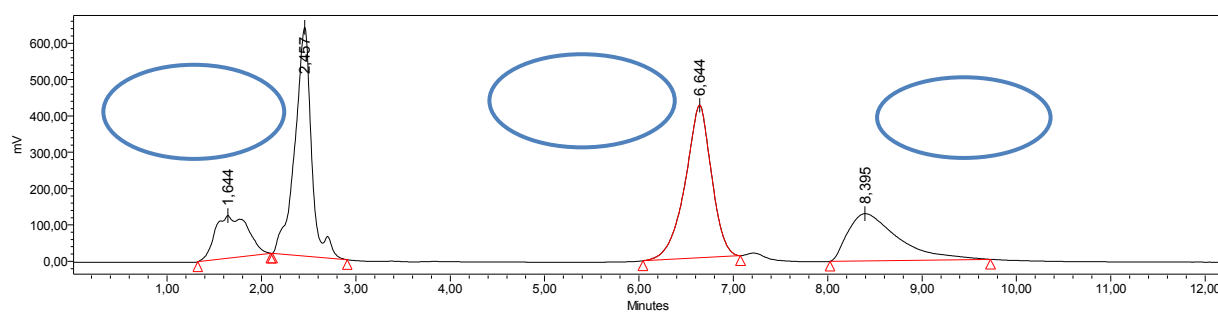
Actual Factors:
C: pH = 4.18
D: salt = 20.00



β)

Εικόνα 55: 3D γράφημα επιθυμητότητας α) ποσοστού ACN και pH β) ποσοστού ACN και ποσοστού MeOH

Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε από την προτεινόμενη λύση που επιλέχθηκε, στην Εικόνα 56. Οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικές ($k_{HCTZ}=0,50$, $\alpha=0,77$).



Εικόνα 56: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΥΟ ΣΤΗΛΕΣ ΜΕ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ D-OPTIMAL

8.1 Εισαγωγή

Μετά από τη διεξαγωγή δύο διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών εφαρμόστηκε και ο σχεδιασμός D-Optimal για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης. Στους παράγοντες προστέθηκε και η στήλη, ενώ οι αποκρίσεις παρέμειναν ίδιες, όπως στον CCD, με διαφορές στο εύρος ποσοστού ACN, ποσοστού MeOH και του pH, το οποίο περιορίσαμε με σκοπό να αποκλείσουμε την περίπτωση αντιστροφής στη σειρά έκλουσης της αμλοδιπίνης και της βαλσαρτάνης. Τα στοιχεία αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω, Πίνακα 24.

Πίνακας 24: Στοιχεία για τους παράγοντες και τις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για τον σχεδιασμό D-Optimal

Παράγοντες	Είδος παραγόντων	Τύπος παραγόντων	Εύρος παραγόντων	Κωδικοποιημένες τιμές κατώτατου και ανώτατου επιπέδου
A	ACN%	Ποσοτικός	33,0-42,0	(-1), (+1)
B	MeOH%	Ποσοτικός	0,0-3,0	(-1), (+1)
B	pH	Ποσοτικός	4,00-4,80	(-1), (+1)
Γ	Συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος (mM)	Ποσοτικός	20,0-60,0	(-1), (+1)
Δ	Στήλη	Κατηγορικός	C8,C18	1,2
Αποκρίσεις				
	Y₁			k _{HCTZ}
	Y₂			a

Τα πειράματα που πρέπει να διεξαχθούν μετά από τα εισαγόμενα δεδομένα, σύμφωνα με τον σχεδιασμό D-Optimal, και όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert 10 trial version παρατίθενται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25: Τα πειράματα για τον Σχεδιασμό D-Optimal, όπως ελήφθησαν από το πρόγραμμα Design-Expert, και τα αποτελέσματα των αποκρίσεων που προέκυψαν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Πείραμα	Παράγ. Α	Παράγ. Β	Παράγ. Γ	Παράγ. Δ	Παράγ. Ε	Υ1	Υ2
	ACN%	MeOH	pH	Συγκέντρωση ρυθμ.διαλύματος (mM)	Στήλη	k _{HCTZ}	α
1	39,5	2,6	4,50	60,0	C18	0,42	0,52
2	33,0	3,0	4,00	35,0	C18	0,56	0,36
3	33,0	3,0	4,80	20,0	C8	0,57	0,65
4	36,4	1,1	4,51	60,0	C8	0,46	1,13
5	33,0	3,0	4,80	60,0	C8	0,53	0,64
6	42,0	3,0	4,80	60,0	C8	0,39	0,83
7	33,7	3,0	4,30	20,0	C8	0,53	1,42
8	33,0	0,0	4,00	20,0	C8	0,69	2,39
9	42,0	3,0	4,00	38,4	C18	0,40	1,16
10	42,0	0,0	4,00	36,8	C8	0,38	2,33
11	33,0	0,0	4,00	20,0	C18	0,64	1,37
12	41,0	0,3	4,00	60,0	C8	0,44	2,55
13	33,0	0,0	4,80	60,0	C18	0,61	0,26
14	42,0	0,0	4,35	60,0	C18	0,46	0,67
15	37,8	1,4	4,00	20,0	C18	0,52	1,18
16	42,0	3,0	4,00	60,0	C8	0,33	2,24
17	42,0	3,0	4,80	44,6	C8	0,31	0,76
18	42,0	3,0	4,00	60,0	C18	0,41	1,19
19	37,5	0,0	4,49	60,0	C18	0,55	0,69
20	33,0	0,0	4,80	60,0	C18	0,56	0,23
21	42,0	0,0	4,00	20,0	C8	0,45	2,55
22	33,0	3,0	4,80	60,0	C18	0,53	0,22
23	42,0	0,9	4,80	20,0	C18	0,44	0,34
24	33,0	0,0	4,80	60,0	C8	0,74	0,63
25	33,0	1,5	4,39	20,0	C8	0,64	1,23
26	42,0	3,0	4,80	60,0	C18	0,43	0,20
27	33,0	3,0	4,00	35,0	C8	0,47	1,92
28	36,2	2,7	4,50	20,0	C18	0,53	0,26
29	42,0	0,9	4,80	60,0	C18	0,43	0,37
30	42,0	0,0	4,80	60,0	C8	0,44	0,44

8.2 Αξιολόγηση μοντέλου

Στην αξιολόγηση του μοντέλου ελέγχεται αν το μοντέλο επιλογής το οποίο είναι τετραγωνικό (quadratic) δεν εμφανίζει αλλοιώσεις (aliases). Εφόσον δεν είναι αλλοιωμένο, στη συνέχεια, ελέγχεται η τιμή VIF η οποία, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 26, είναι κοντά στο 1 σχεδόν για όλους τους όρους και δεν

ξεπερνάει την τιμή 10 για κανέναν από αυτούς. Επίσης, όλες οι τιμές του Std.Error είναι παρόμοιες για κάθε τύπο παράγοντα.

Πίνακας 26: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων για το μοντέλο του σχεδιασμού D-Optimal

Όρος	Τυπικό σφάλμα**	VIF	Ri-Squared	Ισχύς σε επίπεδο α% για επίδραση του		
				0.5 τυπ.απόκλιση	1 τυπ.απόκλιση	2 τυπ.απόκλιση.
A	0,23	1,31	0,2390	17,7 %	53,5 %	98,3 %
B	0,23	1,25	0,2002	17,4 %	52,7 %	98,1 %
C	0,23	1,25	0,2011	17,2 %	51,8 %	97,9 %
D	0,24	1,40	0,2873	16,4 %	49,5 %	97,2 %
E	0,23	1,57	0,3643	17,2 %	52,0 %	97,9 %
AB	0,24	1,27	0,2109	15,5 %	46,2 %	96,0 %
AC	0,24	1,20	0,1690	16,0 %	48,2 %	96,7 %
AD	0,23	1,16	0,1367	16,2 %	48,8 %	96,9 %
AE	0,25	1,55	0,3552	14,7 %	43,6 %	94,7 %
BC	0,25	1,28	0,2191	14,6 %	43,3 %	94,5 %
BD	0,25	1,25	0,2000	15,2 %	45,3 %	95,6 %
BE	0,23	1,24	0,1966	17,0 %	51,3 %	97,7 %
CD	0,24	1,27	0,2107	15,3 %	45,6 %	95,7 %
CE	0,23	1,24	0,1967	16,5 %	49,7 %	97,2 %
DE	0,24	1,36	0,2631	16,1 %	48,4 %	96,8 %
A ²	0,81	2,37	0,5775	8,7 %	20,3 %	61,1 %
B ²	0,69	1,69	0,4098	10,1 %	26,2 %	74,8 %
C ²	0,67	2,22	0,5489	10,3 %	26,9 %	76,3 %
D ²	0,66	1,79	0,4413	10,5 %	27,7 %	77,7 %

****Βάση της τυπικής απόκλισης = 1,0**

8.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

8.3.1 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ}

Τα αποτελέσματα διακύμανσης για τον παράγοντα χωρητικότητας υδροχλωροθειαζιδίου k_{HCTZ} δείχνουν ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι ικανοποιητικό, (τιμή p στατιστικά σημαντική). Η τιμή $p=0,0002$ υποδεικνύει ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα υπάρχει πιθανότητα μικρότερη από 0,02% οι παράγοντες να μην έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση. Οι επιδράσεις A και B είναι στατιστικά σημαντικές (οι τιμές p είναι $<0,05$), ενώ οι Γ, Δ και Ε είναι στατιστικά μη σημαντικές. Επίσης, η τιμή για την έλλειψη προσαρμογής είναι μη σημαντική, που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μοντέλο κατάλληλο για την περιγραφή του συγκεκριμένου παράγοντα.

Πίνακας 27 :Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για τον παράγοντα χωρητικότητας K_{HCTZ}

ANOVA						
		Απόκριση K_{HCTZ}				
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p-τιμή Prob > F	
Μοντέλο	0,29	19	0,015	11,18	0,0002	<u>Σημαντικό</u>
A-%ACN	0,16	1	0,16	114,72	< 0,0001	
B-% MeOH	0,050	1	0,050	36,09	0,0001	
C-pH	7,665E-008	1	7,665E-008	5,569E-005	0,9942	
D-ρυθμ.διαλυμα mM	1,651E-004	1	1,651E-004	0,12	0,7362	
E-Στήλη	3,759E-003	1	3,759E-003	2,73	0,1294	
AB	2,567E-003	1	2,567E-003	1,87	0,2020	
AC	7,116E-005	1	7,116E-005	0,052	0,8247	
AD	1,293E-003	1	1,293E-003	0,94	0,3552	
AE	9,212E-003	1	9,212E-003	6,69	0,0271	
BC	1,111E-003	1	1,111E-003	0,81	0,3900	
BD	1,136E-003	1	1,136E-003	0,83	0,3850	
BE	7,231E-003	1	7,231E-003	5,25	0,0448	
CD	5,459E-003	1	5,459E-003	3,97	0,0744	
CE	5,185E-003	1	5,185E-003	3,77	0,0809	
DE	5,744E-004	1	5,744E-004	0,42	0,5328	
A ²	6,265E-004	1	6,265E-004	0,46	0,5152	
B ²	4,006E-004	1	4,006E-004	0,29	0,6013	

C ²	3,454E-004	1	3,454E-004	0,25	0,6272	
D ²	7,915E-004	1	7,915E-004	0,58	0,4657	
Υπόλοιπο	0,014	10	1,376E-003			
Έλλειψη προσαρμογής	6,763E-003	5	1,353E-003	0,97	0,5146	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	7,000E-003	5	1,400E-003			
Cor Total	0,31	29				

R-Squared	0,9550
Adj. R-Squared	0,8696
Pred. R-Squared	0,4166

Η τελική συνάρτηση που περιγράφει το μοντέλο με κωδικοποιημένους παράγοντες είναι:

$$K'_{HCTZ} = +0.47 - 0.092A - 0.051B + (6.425E-005)C - (3.100E-003)D + 0.014E + 0.012AB - (1.991E-003)AC - (8.423E-003)AD + 0.024AE + (8.410E-003)BC - (8.268E-003)BD + 0.019BE + 0.018CD - 0.017CE - (5.643E-003)DE + 0.020A^2 + 0.014B^2 - 0.013C^2 + 0.019D^2$$

8.3.2 Αποτελέσματα ANOVA για την εκλεκτικότητα α

Από τα αποτελέσματα διακύμανσης για την εκλεκτικότητα α, φαίνεται ότι το τετραγωνικό μοντέλο είναι ικανοποιητικό, καθώς είναι στατιστικά σημαντικό. Όλες οι επιδράσεις είναι στατιστικά σημαντικές (οι τιμές p είναι <0,05). Επίσης, η τιμή για την έλλειψη προσαρμογής είναι μη σημαντική, άρα το συγκεκριμένο μοντέλο δεν παρουσιάζει έλλειψη προσαρμογής.

Πίνακας 28: Εξαγωγή αποτελεσμάτων από το λογισμικό Design Expert για την εκλεκτικότητα α

ANOVA	Απόκριση α					
Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων	β.ε.	Μέσο Τετραγώνων	F τιμή	p-τιμή Prob > F	
Μοντέλο	16,70	19	0,88	182,64	< 0,0001	<u>Σημαντικό</u>
A-%ACN	0,067	1	0,067	13,93	0,0039	
B-% MeOH	0,13	1	0,13	26,27	0,0004	
C-pH	6,79	1	6,79	1409,61	< 0,0001	
D-ρυθμ.διάλυμα mM	0,075	1	0,075	15,65	0,0027	
E-Στήλη	3,00	1	3,00	623,97	< 0,0001	

AB	0,12	1	0,12	25,41	0,0005	
AC	0,091	1	0,091	18,98	0,0014	
AD	8,326E-007	1	8,326E-007	1,730E-004	0,9898	
AE	3,580E-003	1	3,580E-003	0,74	0,4087	
BC	0,27	1	0,27	55,74	< 0,0001	
BD	9,115E-003	1	9,115E-003	1,89	0,1988	
BE	0,043	1	0,043	8,83	0,0140	
CD	8,169E-004	1	8,169E-004	0,17	0,6891	
CE	0,90	1	0,90	186,58	< 0,0001	
DE	0,081	1	0,081	16,80	0,0021	
A ²	0,020	1	0,020	4,14	0,0693	
B ²	4,989E-005	1	4,989E-005	0,010	0,9209	
C ²	0,069	1	0,069	14,26	0,0036	
D ²	1,477E-003	1	1,477E-003	0,31	0,5918	
Υπόλοιπο	0,048	10	4,814E-003			
Έλλειψη προσαρμογής	0,020	5	4,028E-003	0,72	0,6368	<u>Μη σημαντικό</u>
Σφάλμα	0,028	5	5,600E-003			
Cor Total	16,75	29				
R-Squared			0,9971			
Adj. R-Squared			0,9917			
Pred. R-Squared			0,9688			

Η τελική συνάρτηση που περιγράφει το μοντέλο με κωδικοποιημένους παράγοντες είναι:

$$a = +1.00 + 0.060A - 0.081B - 0.60C + 0.066D - 0.40E + 0.085AB - 0.071AC - 2.137E-004AD + 0.015AE + 0.13BC + 0.023BD - 0.047BE - (6.987E-003)CD + 0.22CE + 0.067DE - 0.11A^2 + (4.842E-003)B^2 + 0.18C^2 - 0.025D^2$$

8.4 Διαγνωστικά διαγράμματα

Όπως στους δύο σχεδιασμούς, τα διαγράμματα των υπολοίπων και τα διαγνωστικά διαγράμματα των δύο αποκρίσεων πληρούν τις απαιτούμενες προϋποθέσεις. Τα υπόλοιπα παρουσιάζουν κανονική κατανομή πάνω σε ευθεία γραμμή, ομοσκεδαστικότητα στα διαγράμματα έναντι των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών και τυχαιότητα έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων. Στα διαγράμματα των προβλεπόμενων έναντι των πραγματικών τιμών, παρατηρείται

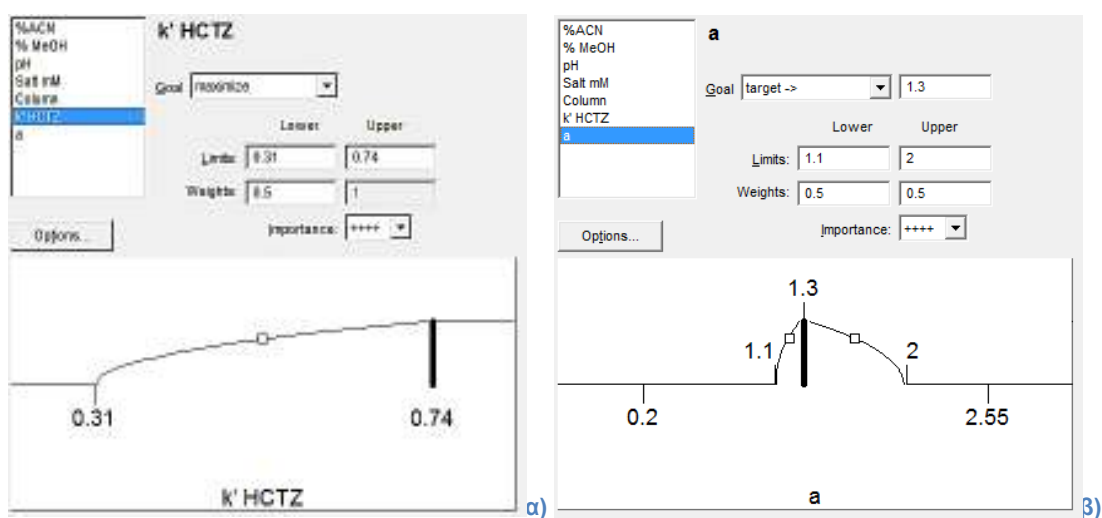
καλή συσχέτιση των τιμών, οι οποίες βρίσκονται πάνω σε ευθεία γραμμή, άρα η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου είναι αυξημένη.

8.5 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για το σχεδιασμό D-Optimal

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων το pH περιορίστηκε σε τιμές από 4,00 έως 4,80 με σκοπό να μην υπάρξουν διαφορετικές σειρές έκλουσης.

8.5.1 Συνάρτηση επιθυμητότητας για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=1,30$

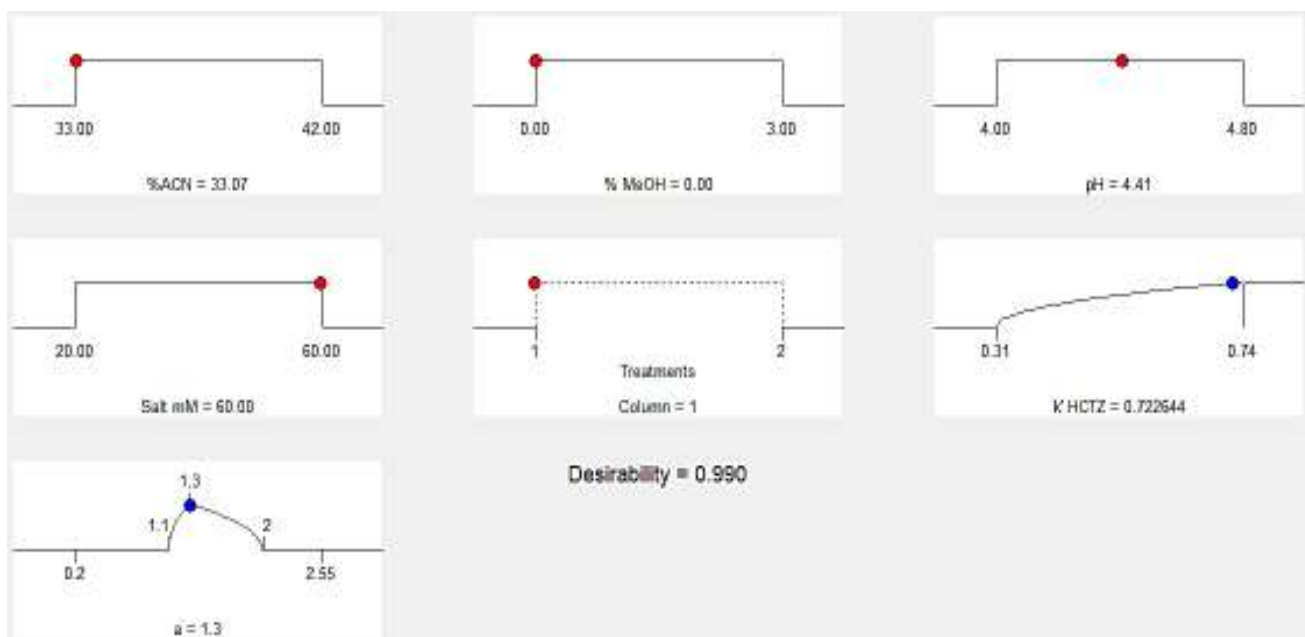
Όπως είναι γνωστό από το σχεδιασμό CCD, για $\alpha > 1,0$ η βαλσαρτάνη εκλούεται μετά την αμλοδιπίνη. Στην Εικόνα 58, φαίνεται η εισαγωγή των στόχων στο λογισμικό για κάθε απόκριση, όπως επίσης και το βάρος (weight) για την κάθε μια ξεχωριστά.



Εικόνα 57: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού D-Optimal για τη συνάρτηση επιθυμητότητας

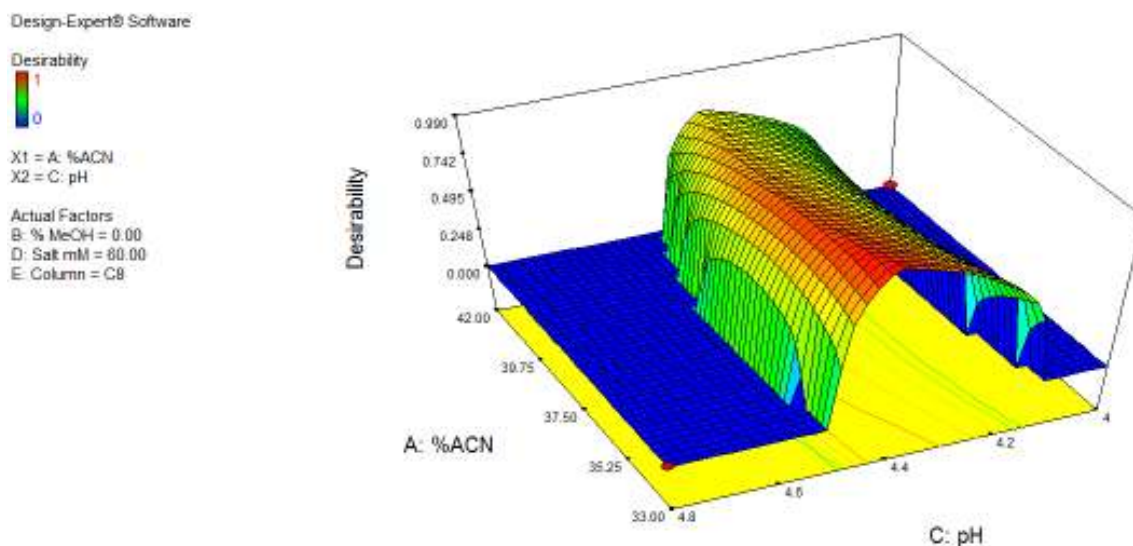
Η προτεινόμενη λύση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του k_{HCTZ} και στόχευση του α στην τιμή 1,30, δίνεται για τις παρακάτω τιμές παραγόντων, στην Εικόνα 58:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 33,1 για εύρος 33,0-42,0
- ❖ Ποσοστό MeOH (%): 0,0 για εύρος 0,0-3,0
- ❖ pH: 4,41 για εύρος 4,00-4,80
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 60,0 για εύρος 20,0-60,0
- ❖ Στήλη: C8



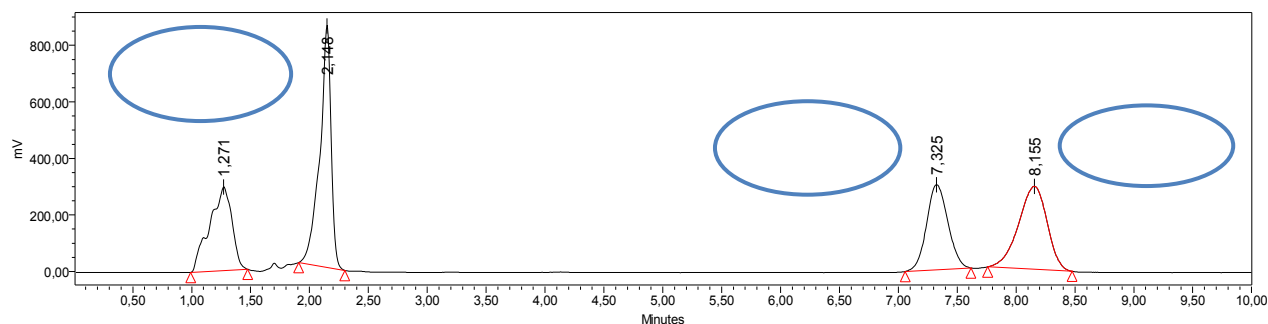
Εικόνα 58: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)

Οι τιμές των αποκρίσεων που προβλέπει το σύστημα για αυτές τις τιμές των παραγόντων είναι $k_{HCTZ}=0,72$, $\alpha=1,30$ και η λαμβανόμενη επιθυμητότητα είναι ίση με 0,990. Η συγκεκριμένη λύση βελτιστοποίησης επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλές προτεινόμενες από το λογισμικό. Στην Εικόνα 59, απεικονίζεται το 3D-γραφήμα επιθυμητότητας που προέκυψε.



Εικόνα 59: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH

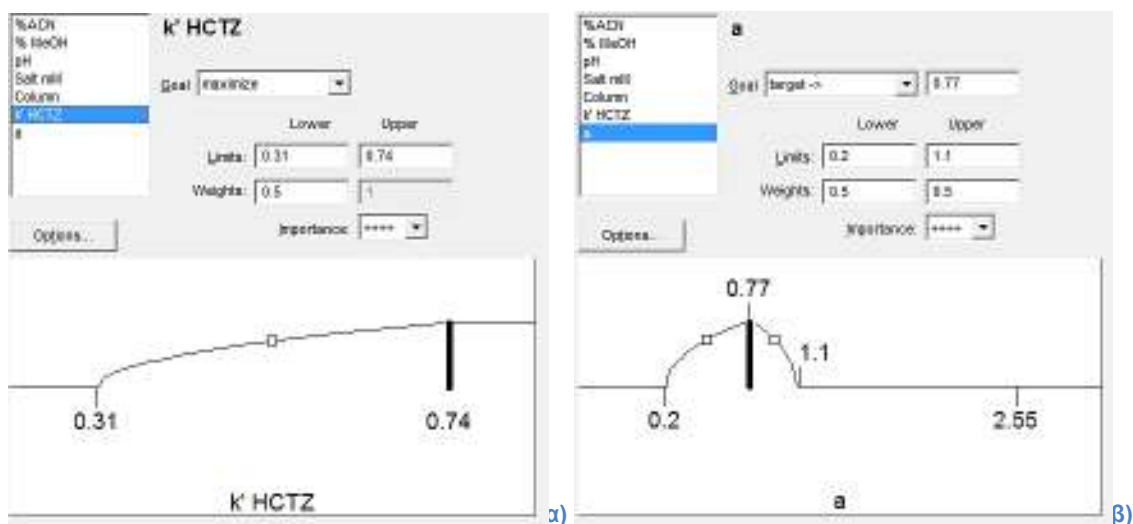
Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε από την προτεινόμενη λύση που επιλέχθηκε, στην Εικόνα 60. Οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικές ($k_{HCTZ}=0,69$, $\alpha=1,40$).



Εικόνα 60: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), αλοδιπίνης (AML) και βαλσαρτάνης (VAL) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες για τον σχεδιασμό D-Optimal και με $\alpha=1,3$

8.5.2 Desirability για τιμή εκλεκτικότητας $\alpha=0,77$

Για $\alpha < 1,00$, η βαλσαρτάνη εκλούεται πριν την αμλοδιπίνη. Έτσι, ο στόχος για το α άλλαξε από 1,3 σε 0,77, ενώ για το k_{HCTZ} παρέμειναν ίδια τα δεδομένα (Εικόνα 61).



Εικόνα 61: Το εύρος και ο συντελεστής βάρους που εισήχθησαν στο λογισμικό για τις αποκρίσεις α) k_{HCTZ} β) α του σχεδιασμού D-Optimal για τη συνάρτηση επιθυμητότητας

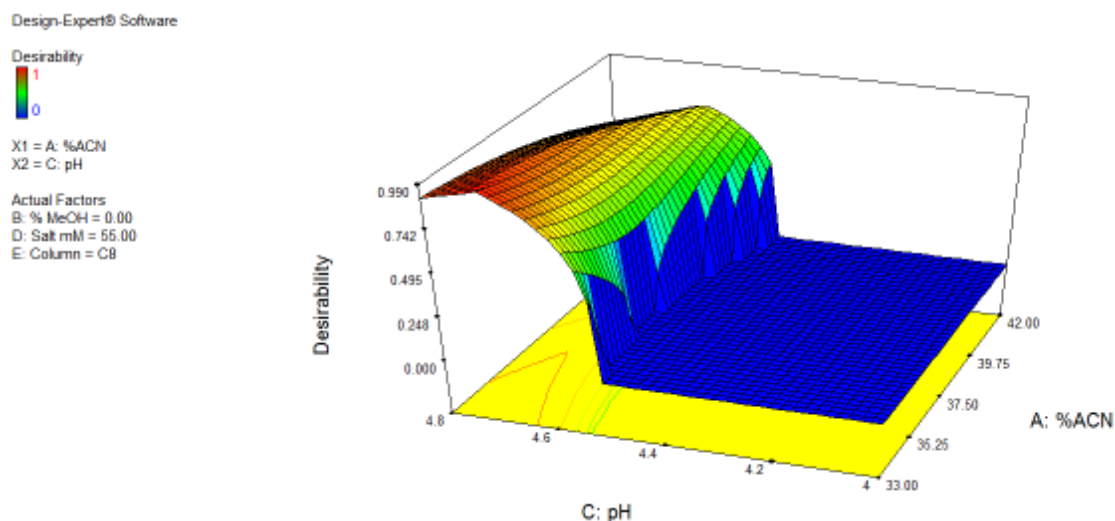
Η προτεινόμενη λύση για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του k_{HCTZ} και στόχευση του α στην τιμή 0,77, δίνεται για τις παρακάτω τιμές παραγόντων, στην Εικόνα 55:

- ❖ Ποσοστό ACN (%): 33,0 για εύρος 33,0-42,0
- ❖ Ποσοστό MeOH (%): 0,0 για εύρος 0,0-6,0
- ❖ pH: 4,70 για εύρος 4,00-4,80
- ❖ Συγκέντρωση άλατος (mM): 55,0 για εύρος 20,0-60,0
- ❖ Στήλη: C8



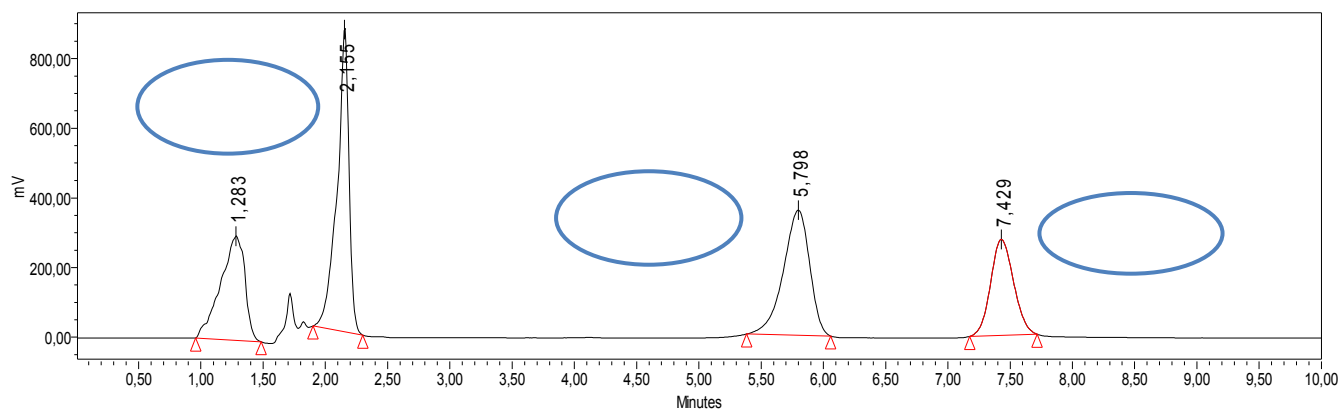
Εικόνα 62: Αναπαράσταση των προτεινόμενων τιμών των παραγόντων, των αναμενόμενων τιμών των αποκρίσεων k_{HCTZ} , α και επιθυμητότητας (desirability)

Οι τιμές των αποκρίσεων που προβλέπει το σύστημα για αυτές τις τιμές των παραγόντων είναι $k_{HCTZ}=0,72$, $\alpha=0,77$ και η λαμβανόμενη επιθυμητότητα είναι ίση με 0,990. Η συγκεκριμένη λύση βελτιστοποίησης επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλές προτεινόμενες από το λογισμικό. Στην Εικόνα 56, απεικονίζεται το 3D-γραφήμα επιθυμητότητας που προέκυψε.



Εικόνα 63: 3D γράφημα επιθυμητότητας ποσοστού ACN και pH

Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε από την προτεινόμενη λύση που επιλέχθηκε, στην Εικόνα 64. Οι πραγματικές τιμές των αποκρίσεων ήταν πολύ κοντά στις θεωρητικές ($k_{HCTZ}=0,69$, $\alpha=0,74$).



Εικόνα 64: Χρωματογράφημα των δραστικών ουσιών υδροχλωροθειαζιδίου (HCTZ), βαλσαρτάνης (VAL) και αμλοδιπίνης (AML) που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες για τον σχεδιασμό D-Optimal και με $\alpha=0,77$

Σημειώνεται πως και για τις δύο τιμές α , η προτεινόμενη λύση από το λαγισμικό περιείχε τη στήλη C8.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΓΚΡΙΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την βελτιστοποίηση της κινητής φάσης κατά την ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί πειραματικοί σχεδιασμοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από δομικές διαφορές, διαφορές στην ικανότητα πρόβλεψης, καθώς και στις βέλτιστες συνθήκες που προτείνονται από το κάθε μοντέλο.

9.1 Δομικά χαρακτηριστικά των πειραματικών σχεδιασμών

Ανάλογα με τη δομή του κάθε παράγοντα και των αριθμό των παραγόντων από τον κάθε πειραματικό σχεδιασμό απορρέει διαφορετικός αριθμός πειραμάτων και ο κάθε παράγοντας εξετάζεται σε διαφορετικό αριθμό επιπέδων. Τα στοιχεία αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 29: Δομικά χαρακτηριστικά των τριών πειραματικών σχεδιασμών που διεξάχθηκαν για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης

Σχεδιασμοί	Αριθμός πειραμάτων	Παράγοντες	Επίπεδα παραγόντων	Επαναλήψεις κεντρ. σημείου
Box-Behnken	16	3	3	4
CCD	28	4	5	4
D-Optimal	30	5	9 για %ACN, %MeOH 8 για το pH 6 για το ρυθμ.διάλυμα	2

Σχολιασμός πίνακα

- κάθε σχεδιασμός εξετάζει τον κάθε παράγοντα σε διαφορετικά επίπεδα. Ο BBD παρουσιάζει τα λιγότερα επίπεδα παραγόντων
- οι επαναλήψεις των κεντρικών σημείων είναι τέσσερις για τους BBD και CCD, ενώ για το σχεδιασμό D-Optimal μόνο δύο
- ο αριθμός των παραγόντων είναι διαφορετικός για τον κάθε σχεδιασμό, οπότε δεν μπορεί να γίνει σύγκριση από άποψη εξοικονόμησης χρόνου
- ο BBD δεν έχει ακραίες τιμές των παραγόντων
- στο BBD χρησιμοποιήθηκε η στήλη C8, ενώ στο CCD η στήλη C18, άρα δεν είναι εφικτή η άμεση σύγκριση των στατιστικών μοντέλων

- στο σχεδιασμό D-Optimal χρησιμοποιήθηκε και ένας κατηγορικός παράγοντας η στήλη (C8,C18), ενώ στο BBD χρησιμοποιήθηκε μόνο η στήλη C8 και στο CCD η στήλη C18
- παρόλο που ο σχεδιασμός D-Optimal εμπεριείχε και τις δύο στήλες ο αριθμός των πειραμάτων ήταν περίπου ο ίδιος με του CCD, ο οποίος εφαρμόστηκε μόνο στη μία στήλη
- ο σχεδιασμός D-Optimal βασίστηκε σε δεδομένα των προηγούμενων δύο σχεδιασμών πέραν των προκαταρκτικών πειραμάτων

9.2 Διαφορές ως προς τη βέλτιστη λύση

9.2.1 Από τον σχεδιασμό Box-Behnken προέκυψαν τα παρακάτω:

- η βέλτιστη λύση του ACN% δόθηκε στο 34,0%, με εύρος τιμών 32,0-38,0
- στη στήλη C8 και εύρος pH 3,50-4,50, δεν υπήρξε αντιστροφή στη σειρά έκλουσης των ουσιών βαλσαρτάνης και αμλοδιπίνης
- η σειρά έκλουσης παρέμεινε η ίδια σε όλα τα πειράματα, με τη βαλσαρτάνη να εκκλύεται πάντα στο τέλος
- ο συνολικός χρόνος ανάλυσης με τις βέλτιστες συνθήκες ήταν 6,15 min
- η βέλτιστη τιμή του pH ήταν αρκετά υψηλή περίπου στο 4,50, δηλαδή στο ανώτερο άκρο
- η μέγιστη τιμή του k_{HCTZ} που επιτεύχθηκε ήταν 0,87
- για τον k_{HCTZ} και k_{VAL} σημαντικοί παράγοντες είναι το ACN% και το pH, ενώ για την $R_{AML/VAL}$ μόνο το pH
- η τιμή της επιθυμητότητας είναι 0,939. Παρόλα αυτά σε περίπτωση αφαίρεσης της μιας απόκρισης (k_{VAL}) η τιμή της επιθυμητότητας φαίνεται να αυξάνεται στο 0,987

9.2.2 Από τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό προέκυψαν τα παρακάτω:

- η βέλτιστη λύση του ποσοστού ACN (εύρος 36,0-46,0) εντοπίστηκε στο 41,0% για εκλεκτικότητα $\alpha=1,30$ και $pH=3,87$, ενώ για $\alpha=0,77$ και $pH=4,13$ ήταν περίπου στο 38%, δηλαδή αυξημένο σε σχέση με το βέλτιστο στην περίπτωση Box-Behnken
- στη στήλη C18 που χρησιμοποιήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα, υπήρξε αντιστροφή στη σειρά έκλουσης της αμλοδιπίνης και της βαλσαρτάνης σε εύρος pH 2,80-4,80. Η αμλοδιπίνη εκκλύεται τελευταία σε τιμές $pH>4,00$.
- το προτεινόμενο ποσοστό MeOH ήταν στην χαμηλότερη τιμή του, δηλαδή στο 2,0% για εύρος 2,0-8,0

- ο χρόνος ανάλυσης και τις δύο περιπτώσεις ($\alpha=1,30$ και $\alpha=0,77$) ήταν περίπου 8,4 min, δηλαδή αρκετά μικρότερος από τον χρόνο ανάλυσης που προέκυψε από τον σχεδιασμό Box-Behnken, για άλλη, όμως στήλη.

- η μέγιστη τιμή του k_{HCTZ} που επιτεύχθηκε ήταν 0,54, αρκετά μικρότερη σε σχέση με την στήλη C8 και την βελτιστοποίηση με Box-Behnken

- για τον k_{HCTZ} σημαντικοί παράγοντες είναι το ACN% και το MeOH%, ενώ για την εκλεκτικότητα α σημαντικοί είναι όλοι οι παράγοντες (ACN%, MeOH%, pH, συγκέντρωση άλατος)

- η επιθυμητότητα ήταν 1,000 και τις δύο περιπτώσεις, μεγαλύτερη δηλαδή από τον σχεδιασμό Box-Behnken (0,939)

9.2.3 Από τον σχεδιασμό D-Optimal προέκυψαν τα παρακάτω:

- οι βέλτιστες λύσεις και στις δύο περιπτώσεις ($\alpha=1,30$ και $\alpha=0,77$) είναι στο 33,1% για το ποσοστό ACN, χωρίς καθόλου MeOH και συγκέντρωση άλατος 60,0 mM και 55,0 mM αντίστοιχα. Το pH αλλάζει από 4,41 για $\alpha=1,30$, στο 4,70 για $\alpha=0,77$.

- η στήλη προστέθηκε ως παράγοντας σε αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό και αυτή που προτείνεται ως βέλτιστη και στις δύο περιπτώσεις είναι η C8

- παρόλο που στη στήλη C8 στο σχεδιασμό Box-Behnken δεν υπήρξε αντιστροφή στη σειρά έκλουσης, στο σχεδιασμό D-optimal σε υψηλό pH η αμλοδιπίνη εκλούστηκε τελευταία.

- ο χρόνος ανάλυσης είναι 8,16 min για $\alpha=1,30$ και 7,43 min για $\alpha=0,77$

- η μέγιστη τιμή του k_{HCTZ} ήταν 0,74

- για τον k_{HCTZ} σημαντικοί παράγοντες είναι το ACN% και το MeOH%, ενώ για την α σημαντικοί είναι όλοι οι παράγοντες (ACN%, MeOH%, pH, συγκέντρωση άλατος, στήλη)

- η επιθυμητότητα είναι 0,990 και στις δύο περιπτώσεις

9.3 Διαφορές και ομοιότητες στην ικανότητα πρόβλεψης

9.3.1 Για τον Box-Behnken:

- η τιμή VIF ήταν 1,00, δηλαδή πολύ ικανοποιητική

- για την απόκριση k_{HCTZ} προέκυψαν ότι R-Squared=0,8954, Adj. R-Squared=0,7385, Pred. R-Squared=-0,4670

- για την $R_{AML/VAL}$ το R-Squared=0,9944, Adj. R-Squared=0,9860, Pred. R-Squared=0,9184

- ενώ, για την k_{VAL} το $R\text{-Squared}=0,9915$, $Adj. R\text{-Squared}=0,9787$, $Pred. R\text{-Squared}=0,9055$

9.3.2. Για τον CCD:

- Η τιμή VIF δεν ήταν ικανοποιητική για τους τετραγωνικούς όρους (38,47), ενώ για τους υπόλοιπους ήταν στο 1,00
- για την απόκριση k_{HCTZ} το $R\text{-Squared}=0,8783$, $Adj. R\text{-Squared}=0,7472$, $Pred. R\text{-Squared}=0,1812$
- για την εκλεκτικότητα α το $R\text{-Squared}=0,9981$, $Adj. R\text{-Squared}=0,9961$, $Pred. R\text{-Squared}=0,9884$

Παρατηρούμε πως σε όλες τις περιπτώσεις ασχέτως στήλης και σχεδιασμού η τιμή του $Pred. R\text{-Squared}$ για k_{HCTZ} δεν είναι αποδεκτή.

9.3.3 Για τον D-Optimal:

- η τιμή VIF κυμαίνεται από 1,31 έως 2,22 για όλους τους όρους
- για την απόκριση k_{HCTZ} το $R\text{-Squared}=0,9550$, $Adj R\text{-Squared}=0,8696$, $Pred R\text{-Squared}=0,4160$,
- για την εκλεκτικότητα α το $R\text{-Squared}=0,9971$, $Adj R\text{-Squared}=0,9917$, $Pred R\text{-Squared}=0,9688$

9.4 Συμπερασματικά

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα του σχεδιασμού Box-Behnken ήταν ότι διεξάχθηκε πολύ πιο γρήγορα από τους άλλους δύο, λόγω του μικρού αριθμού πειραμάτων και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν ο μικρότερος που επετεύχθη. Ο στόχος της μεγιστοποίησης του k_{HCTZ} υλοποιήθηκε πιο ικανοποιητικά σε σχέση με τους άλλους δύο πειραματικούς σχεδιασμούς παρουσίασε, όμως, αρνητική τιμή για το $Pred R\text{-Squared}$.

Ο Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός διεξάχθηκε με περισσότερα πειράματα και παρουσίασε τον μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης, παρόλα αυτά ήταν ο μοναδικός που πέτυχε επιθυμητότητα 1,000. Κάποια από τα μειονεκτήματά του είναι ότι ο στόχος μεγιστοποίησης του k_{HCTZ} δεν είχε το ίδιο καλό αποτέλεσμα σε σχέση με τους άλλους δύο, το ποσοστό ACN που προτείνεται για την κινητή φάση είναι αρκετά μεγαλύτερο και η τιμή VIF είναι πάνω από 10 για τους τετραγωνικούς όρους.

Τέλος, ο D-Optimal απαιτούσε, επίσης, αρκετά πειράματα για τη διεξαγωγή του, ενώ ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν ελαφρώς μικρότερος από του CCD. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος πειραματικός σχεδιασμός έχοντας και έναν πέμπτο παράγοντα την στήλη, πρότεινε ως βέλτιστη την C8, δηλαδή αυτή που

χρησιμοποιήθηκε στον Box-Behnken, επιφέροντας όμως μεγαλύτερη τιμή επιθυμητότητας. Λόγω της χρήσης και των δύο στηλών σε αυτό το σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες τιμές pH από ότι στο σχεδιασμό BBD και έτσι αποκαλύφθηκε αντιστροφή της σειράς έκλουσης των ουσιών αμλοδιπίνης-βαλσαρτάνης, η οποία δεν είχε διαφανεί στο BBD.

Θεωρώντας πως σε όλες τις περιπτώσεις η ποιότητα των χρωματογραφικών κορυφών είναι ικανοποιητική και με κριτήριο το χρόνο ανάλυσης αποδοτικότερος σχεδιασμός είναι ο σχεδιασμός Box-Behnken.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού τριών αντιϋπερτασικών ουσιών (υδροχλωροθειαζίδιο-HCTZ, αμλοδιπίνη-AML, βαλσαρτάνη-VAL), με RP-HPLC/UV, κάτω από ισοκρατικές συνθήκες και με τη χρήση C8 και C18 στηλών. Η βελτιστοποίηση της κινητής φάσης επιτεύχθηκε με τη χρήση τριών πειραματικών σχεδιασμών, τον Box-Behnken (στήλη C8), τον Κεντρικό Σύνθετο Σχεδιασμό-CCD (στήλη C18) και τον σχεδιασμό D-Optimal (C8,C18), ενώ το λογισμικό μοντελοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Design Expert 10 trial version.

Από τον κάθε πειραματικό σχεδιασμό, οι οποίοι μεταξύ τους παρουσιάζουν διαφορές ως προς τα δομικά τους χαρακτηριστικά (αριθμό πειραμάτων, επίπεδα των παραγόντων κτλ), προτάθηκαν δύο βέλτιστες λύσεις της κινητής φάσης ανάλογα με τη σειρά έκλουσης των ουσιών AML-VAL ($\alpha=1,30$) ή VAL-AML ($\alpha=0,77$). Εξαίρεση αποτελεί ο Box-Behnken, στον οποίο δεν παρουσιάστηκε αντιστροφή στη σειρά έκλουσης για το εύρος pH που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Η βέλτιστη κινητή φάση για τον Box-Behnken χαρακτηρίστηκε από ποσοστό ACN 34,0%, ακραία τιμή του pH στο 4,46 και συγκέντρωση άλατος 56,0 mM (μη σημαντικός παράγοντας). Για τον CCD και για τιμές εκλεκτικότητας $\alpha=1,30$ και $\alpha=0,77$, το ποσοστό ACN ήταν υψηλότερο στο 38,6% και 41,2%, το ποσοστό MeOH ήταν 2,0% (χαμηλότερη ακραία τιμή), τιμές pH 3,87 και 4,18, συγκέντρωση άλατος 57,0 mM και 26,0 mM, αντίστοιχα. Όσον αφορά τον D-Optimal, το ποσοστό ACN ήταν χαμηλότερο 33,1%, ποσοστό MeOH στο 0,0%, τιμές pH 4,41 και 4,70, συγκέντρωση άλατος 60,0 mM και 55,0 mM, για $\alpha=1,30$ και $\alpha=0,77$ αντίστοιχα, με βέλτιστη στήλη την C8 και στις δύο περιπτώσεις.

Και οι τρεις σχεδιασμοί απέδωσαν ικανοποιητική βελτιστοποίηση, η οποία οδηγεί σε πολύ καλό διαχωρισμό των ουσιών, καλές χρωματογραφικές κορυφές και μικρό χρόνο ανάλυσης. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης κυμάνθηκε από 6,15 min έως 8,40 min. Βασικό συμπέρασμα της σύγκρισής τους είναι πως από τον Box-Behnken η βέλτιστη λύση προέκυψε με μικρό αριθμό πειραμάτων και παρουσίασε το μικρότερο χρόνο ανάλυσης, άρα προκύπτει ως συμφερότερος οικονομικά και χρονικά. Ο CCD, όμως, παρουσίασε την μέγιστη επιθυμητότητα και ο D-Optimal την καλύτερη ικανότητα πρόβλεψης για τον παράγοντα χωρητικότητας του υδροχλωροθειαζιδίου.

Συνολικά, αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι προσδιορισμού υδροχλωροθειαζιδίου, αμλοδιπίνης και βαλσαρτάνης με χρήση στηλών C8 και C18, για τις οποίες εκκρεμεί η επικύρωση μεθόδου.

ABSTRACT

In the present study, new methods for the determination of three antihypertensive substances (hydrochlorothiazide-HCTZ, amlodipine-AML, valsartan-VAL) were achieved by RP-HPLC/UV, under isocratic conditions and using C8 and C18 columns. Mobile phase optimization was completed using three different experimental designs, Box-Behnken design (C8 column), Central Composite Design-CCD (C18 column) and D-Optimal design (C8, C18). The software model that was used was the trial version of Design Expert 10.

From each experimental design, which differ in their structural characteristics (number of experiments, levels of factors, etc.), two optimal solutions of the mobile phase were proposed depending on the elution order of the substances AML-VAL ($\alpha=1,3$) or VAL-AML ($\alpha=0,77$). Box-Behnken design is an exception as there was no reversal in the elution order in the pH range used in this case.

The optimum mobile phase for Box-Behnken design was characterized by ACN percentage 34,0%, an extreme pH value of 4,46 and salt concentration 56,0 mM (non-significant factor). For CCD and for selectivity factors $\alpha = 1,30$ and $\alpha = 0,77$, ACN percentage was higher at 38,6% and 41,2%, MeOH percentage 2,0% (lowest extreme value), pH values 3,87 and 4,18, salt concentration 57,0 mM and 26,0 mM, respectively. For D-Optimal, ACN percentage was lower 33,0%, MeOH percentage at zero, pH values 4,41 and 4,70, salt concentration 60,0 mM and 55,0 mM, for $\alpha = 1,30$ and $\alpha = 0,77$ respectively, with an optimal C8 column in both cases.

All three designs yielded optimal conditions, which lead to very good separation of substances, good chromatographic peaks and short time analysis. Total time analysis ranged from 6,15 min to 8,40 min. The main conclusion of their comparison is that the optimal solution for Box-Behnken design resulted with a small number of experiments and presented the shortest time analysis, so it appears as a more economical and time-consuming one. The CCD, however, showed maximum desirability and D-Optimal had the best predictive ability for the capacity factor of hydrochlorothiazide.

In total, new methods of determination of hydrochlorothiazide, amlodipine and valsartan were developed using C8 and C18 columns, for which method validation is pending.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Shaalán R. A., Belal T. S., El Yazbi, F. A., et al.**, Validated stability-indicating HPLC-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets, *Arabian Journal of Chemistry*, 2013.
- [2] **Guyton A. C.**, Human physiology and mechanisms of disease, 1987.
- [3] **Katzung B. G.**, Basic & Clinical Pharmacology, McGraw-Hill Companies, 11th Edition, 2009.
- [4] **Brewster U. C., Perazella, M. A.**, The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease, *American Journal of Medicine*, 2004, 116 (4) 263-272
- [5] **Brunton L. L., Chabner B., Knollmann B. C.**, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 2011
- [6] **Michelle A. C., Finkel R., Jose A. R., Whalen K.**, Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, 5th edition, 2012.
- [7] **Anandakumar K., Jothieswari D., Subathrai R., et al.**, Validated RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate, Valsartan, and Hydrochlorothiazide in Bulk and in Pharmaceutical Formulation, *Acta Chromatographica*, 2012, 24 (1) 37–50.
- [8] **Vignaduzzo S. E., Castellano P. M, Kaufman T.S.**, Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan in Tablets of their Novel Triple Combination and Binary Pharmaceutical, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2011, 34 (19) 2383–2395.
- [9] **Ahmed S., Atia N. N., Mohamed N. A.**, Dual separation mode for simultaneous determination of antihypertensive drug combinations by high-performance liquid chromatography, *Talanta*, 2011, 84 (3) 666–672.
- [10] **Celebier M., Kaynak M. S., Altınöz S., Sahin S.**, HPLC method development for the simultaneous analysis of amlodipine and valsartan in combined dosage forms and in vitro dissolution studies, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 46 (4) 761-768

- [11] **Ramadan, N. K., Mohamed, H. M., Moustafa, A. A.**, Rapid and Highly Sensitive HPLC and TLC Methods for Quantitation of Amlodipine Besilate and Valsartan in bulk Powder and in Pharmaceutical Dosage Forms and in Human Plasma, *Analytical Letters*, 2010, 43 (4) 570–581
- [12] **Gupta K. R., Mahapatra A. D., Wadodkar A. R., et al.**, Simultaneous UV spectrophotometric determination of valsartan and amlodipine in tablet, *International Journal ChemTech Research*, 2010, 2 (1) 551-556.
- [13] **Patel S. B., Chaudhari B. G., Buch M. K., et al.**, Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Valsartan and Amlodipine from their Combination Drug, *International Journal of ChemTech Research*, 2009, 1 (4) 1257-1267.
- [14] **Venkata E., Jayaraman V., Vidiyala S. R., et al.**, New Stability Indicating Method for Quantification of Impurities in Amlodipine and Valsartan Tablets by Validated HPLC, *ISRN Medicinal Chemistry*, 2013
- [15] **Deshpande M. M., Mahajan M. P., Sawant S. D.**, Simultaneous estimation of valsartan and hydrochlorothiazide in fixed dose combination in UV spectrophotometry, *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 3 (1) 235-240
- [16] **Hillaert S., Van den Bossche. W.**, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 31 (2) 329-339.
- [17] **Kadam B. R., Bari S. B.**, Quantitative Analysis of Valsartan and Hydrochlorothiazide in tablets by High performance Thin-Layer Chromatography with Ultraviolet absorption densitometry, *Acta Chromatographica*, 2007, 18, 260
- [18] **Bruns R. E., Scarminio I. S., de Barros Neto B.**, *Statistical Design-Chemometrics*, Elsevier, Vol 25, 2006
- [19] **Fisher A. R.**, *The design of Experiments*, Hafner Publishing Company, New York, 1971
- [20] **Panel on Statistical Methods for Testing and Evaluating Defense System, Committee on National Statistics, Commission on Behavioral and Social Sciences and Education, National Research Council**, *Statistical methods for Testing and Evaluating Defense Systems*, National Academy Press, Washington, 1995, 55-61

- [21] **Taguchi G.**, Taguchi on Robust Technology Development Bringing Quality Engineering Upstream, American Society of Mechanical Engineers, New York, 1993.
- [22] **Lewis G. A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R.**, Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, 1999
- [23] **Lazic Z. R.**, Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide, John Wiley & Sons, 2006
- [24] **Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., et al.**, Experimental design and optimization, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998, 42 (1) 3–40.
- [25] **Hibbert D. B.**, Experimental design in chromatography: A tutorial review, Journal of Chromatography B, 2012, 910, 2– 13
- [26] **Giacomino A., Abollino O., Malandrino M., Mentasti, E.**, The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A Review.Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution,experimental design and other techniques, Analytica Chimica Acta, 2011, 688 (2) 122–139.
- [27] **Brereton R. G.**, Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plan, John Wiley & Sons, 2003
- [28] **Mead R.**, The design of experiments: statistical principles for practical applications, Cambridge University Press,1990.
- [29] **Dejaegher B., Heyden Y. V.**, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation and analytical application, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011,56 (2), 141-158.
- [30] **Dejaegher B., Heyden Y. V.**, Sequential Optimization Methods, Elsevier, 2009, 547-575
- [31] **Vander H. Y., Perrin C., Massart D. L.**, Optimization strategies for HPLC and CZE, Handbook of Analytical Separations, 2000, 1, 163–212
- [32] **Oehlert G. W.**, A first course in design and analysis of experiments, 2010
- [33] **Fang K. T., Li R., Sudjianto A.**, Design and Modeling for Computer Experiments, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006
- [34] **Box G. E. P., Draper D. R.**, Response Surfaces, Mixtures and Ridge Analyses, Wiley and Sons, New York, Vol 649, 2007.

- [35] **Anderson-Cook C. M., Borror C. M., Jones B.**, Graphical Tools for Assessing the Sensitivity of Response Surface Designs to Model Misspecification, *Technometrics*, 2009, 51 (1) 75–87.
- [36] **Carlyle W. M., Montgomery D. C., Runger G. C.**, Optimization Problems and Methods in Quality Control and Improvement, *Journal of Quality Technology*, 2000, 32 (1) 1–17.
- [37] **Box G. E. P., Draper N. R.**, Empirical Model-Building and Response Surfaces, John Wiley & Sons, New York, Vol 424, 1987
- [38] **European Medicines Agency**, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, June 1995.
- [39] **Xiao L., Lin D. K. J., Bai F.**, Construction of Definitive Screening Designs Using Conference Matrices, *Journal of Quality Technology*, 2012, 44 (1) 2–8.
- [40] **Welch W. J., Buck R. J., Sacks J., et al.**, Screening, Predicting, and Computer Experiments, *Technometrics*, 1992, 34 (1) 15–25.
- [41] **Torbeck L. D.**, Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design, CRC Press, 2007
- [42] **Morris M. D.**, A Class of Three-Level Experimental Designs for Response Surface Modeling, *Technometrics*, 2000, 42 (2) 111–121.
- [43] **Leardi R.**, Experimental design in chemistry: a tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 2009, 652 (1) 161-172.
- [44] **Ferreira S. C., Bruns R. E., Ferreira H. S., et al.**, Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597 (2) 179–186
- [45] **Mason R. L., Gunst R. F., Hess J. L.**, Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science, John Wiley and Sons, Vol 474, 2003.
- [46] **Weaver B. P., Warr R. L., Anderson-Cook C. M., Higdon D. M.**, Visualizing Discrepancies from Nonlinear Models and Computer Experiments, *Statistical Analysis and Data Mining*, 2015, 8 (5-6) 274–286.
- [47] **Vining G. G., Kowalski S. M., Montgomery, D. C.**, Response Surface Designs Within a Split-Plot Structure, *Journal of Quality Technology*, 2005, 37 (2) 115–129.
- [48] **Dejaegher B., Vander Heyden Y.**, The use of experimental design in separation science, *Acta Chromatographica*, 2009, 21 (2) 161–201.

- [49] **Dejaegher B., Durand A., Vander Heyden Y.**, Experimental design in method optimization and robustness testing, *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, John Wiley and Sons, 2009.
- [50] **Zahran A., Anderson-Cook C. M., Myers R. H.**, Fraction of Design Space to Assess the Prediction Capability of Response Surface Designs, *Journal of Quality Technology*, 2003, 35 (4) 377–386
- [51] **Myers R. H., Montgomery D. C., Vining G. G., et al.**, Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey, *Journal of Quality Technology*, 2004, 36 (1) 53–77.
- [52] **Khuri A. I.**, *Response Surface Methodology And Related Topics*. World Scientific Publishing Co, 2006.
- [53] **Hill W. J., Hunter W. G.**, A Review of Response Surface Methodology: A Literature Review, *Technometrics*, 1996, 8 (4) 571–590.
- [54] **Montgomery D. C.**, *Design and analysis of experiments*, John Wiley and Sons, 2017
- [55] **Lu L., Anderson-Cook C. M., Robinson T. J.**, Optimization of Designed Experiments Based on Multiple Criteria Utilizing a Pareto Frontier, *Technometrics*, 2011, 53 (4) 353–365.
- [56] **Anderson-Cook C. M., Borror C. M., Montgomery D. C.**, Response Surface Design Evaluation and Comparison, *Journal of Statistical Planning and Inference*, 2009, 139 (2) 629–674.
- [57] **Harrington E. C.**, The desirability function, *Industrial quality control*, 1965, 21 (10) 494-498.
- [58] **Derringer G., Suich R.**, Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, 1980, 12 (4) 214–219
- [59] **Vining G. G.**, A Compromise Approach to Multiresponse Optimization, *Journal of Quality Technology*, 1998, 30 (4) 309–313
- [60] **Raissi S., R-Eslami Farsani**, Statistical process optimization through multi-response surface methodology, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2009, 51 (46) 267-271.
- [61] **Hsieh K. L., Tong L. I., Chiu H. P., Yeh H. Y.**, Optimization of a multi-response problem in Taguchi's dynamic system, *Computers and Industrial Engineering*, 2005, 49 (4) 556–571.

- [62] **John R. S., Draper, N. R.**, D-optimality for regression designs: a review. *Technometrics*, 1975, 17 (1) 15-23.
- [63] **Bezerra M. A. et al.**, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 2008, 76.(5) 965-977.
- [64] **Khuri A. I., Conlon M.**, Simultaneous Optimization of Multiple Responses Represented by Polynomial Regression Functions, *Technometrics*, 1981, 23 (4) 363–375.
- [65] **Myers R. H., Montgomery D. C., Anderson-Cook C. M.**, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments, fourth Edition, John Wiley and Sons, 2016
- [66] **Martins S. A. M., Prazeres D. M. F., Fonseca L. P., Monteiro G. A.**, Application of Central Composite Design for DNA Hybridization onto Magnetic Microparticles, *Analytical Biochemistry*, 2009, 391 (1) 17–23.
- [67] **Bas D., Boyacı I H.**, Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 2007, 78 (3) 836-845.
- [68] **Jeff Wu CF, Hamada M. S.**, Experiments Planning, Analysis, and Optimization, John Wiley and Sons, Vol 552, 2011
- [69] **Diamond W. J.**, Practical experiment designs: for engineers and scientists, John Wiley and Sons, 2001.
- [70] **Cavazzuti M.**, Optimization methods: from theory to design scientific and technological aspects in mechanics, Springer Science and Business Media, 2012.
- [71] **Maruyama S. A., Palombinin S. V., Claus T., et al.**, Application of Box–Behnken Design to the Study of Fatty Acids and Antioxidant Activity from Enriched White Bread, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2013, 24 (9) 1520–1529.
- [72] **Lunney P. D., Cogdill R. P., Drennen J. K.**, Innovation in pharmaceutical experimentation Part 1: review of experimental designs used in industrial pharmaceuticals research and introduction to Bayesian D-optimal experimental design, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2008, 3 (3) 188-203.
- [73] **Πούλου Μ.**, Σημειώσεις Τεχνικών Διαχωρισμού, Αθήνα, 1999.
- [74] <https://chemicalize.com>, Πρόσβαση 10/2017

[75] Candiotti L. V., et al., Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*, 2014, 124, 123-138.

[76] Myers R. H., Montgomery C. G., Anderson-Cook C. M., Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley and Sons, 2016.

[77] Koliva-Machaira F., Mpora-Senta E., Statistics, Theory and Applications, Thessaloniki, Zitis Publications, 1995.

[78] Sailer O. S., Thomas P. Ryan: Modern Experimental Design, *Statistical Papers*, 2008, 49 (3) 597-598.