



Σχολή Θετικών Επιστημών & Τεχνολογίας

Διαχείριση και Τεχνολογία Ποιότητας

Διπλωματική Εργασία

Εφαρμογές του Σχεδιασμού Πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία

Μαρία Λυσικάτου

Επιβλέπων καθηγητής: Αθανάσιος Καλλιώρας

Πάτρα, Σεπτέμβριος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Λυσικάτου Μαρίας που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Εφαρμογές του Σχεδιασμού Πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία

Μαρία Λυσικάτου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:
Αθανάσιος Καλλιώρας
ΣΕΠ, ΕΑΠ

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:
Χαράλαμπος Ευαγγελάρας
ΣΕΠ, ΕΑΠ

Πάτρα, Σεπτέμβριος 2023

«Ευχαριστίες»

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Καλλιώρα Αθανάσιο για την αποδοχή του θέματος της διπλωματικής εργασίας καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Ευαγγελάρα Χαράλαμπο για τη συνεπίβλεψη της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την κάθε είδους υποστήριξη που μου πρόσφερε.

Περίληψη

Η εν λόγω εργασία πραγματεύεται τις εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία. Το Κεφάλαιο 1 αναφέρεται στο σκοπό, στη μεθοδολογία, στη συμβολή και στη δομή της εργασίας.

Το δεύτερο κεφάλαιο αναφέρεται στη θεωρία του σχεδιασμού πειραμάτων. Αρχικά, παρουσιάζεται μια σύγκριση του σχεδιασμού πειραμάτων και της μονοπαραγοντικής μεθόδου καθώς και οι χρήσεις και τα στάδια του σχεδιασμού πειραμάτων. Στη συνέχεια, αναλύεται ο ρόλος της μαθηματικής μοντελοποίησης και τα είδη του σχεδιασμού πειραμάτων. Επίσης, επεξηγείται ο τρόπος επιλογής του σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία με αναφορά στα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του κάθε είδους. Ακόμη, αναφέρεται ο ρόλος του σχεδιασμού πειραμάτων στην ποιότητα μέσω σχεδιασμού.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων. Συγκεκριμένα, γίνεται μια σύντομη αναφορά στη χρωματογραφία και στα είδη της και παρουσιάζονται εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων που αναφέρονται στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων της αναλυτικής αυτής τεχνικής. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και στα είδη της και στη συνέχεια παρουσιάζονται εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων που αναφέρονται στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων αυτής της αναλυτικής τεχνικής.

Στο τέταρτο κεφάλαιο συνοψίζονται τα αποτελέσματα των εφαρμογών του σχεδιασμού πειραμάτων σε δύο πίνακες. Ο πρώτος πίνακας περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των εφαρμογών που αναφέρονται στη χρωματογραφία, ενώ ο δεύτερος τα αποτελέσματα που αναφέρονται στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Το πέμπτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τη συζήτηση των αποτελεσμάτων και εστιάζει στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη σχεδιασμών καθώς και στους παράγοντες που συνήθως βελτιστοποιούνται στη χρωματογραφία και στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Τέλος, το έκτο κεφάλαιο πραγματεύεται τα συμπεράσματα καθώς και ενδεχόμενες μελλοντικές ερευνητικές προτάσεις.

Λέξεις – Κλειδιά

Σχεδιασμός Πειραμάτων, Αναλυτική Χημεία, Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου,
Βελτιστοποίηση, Χρωματογραφία, Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

Applications of Design of Experiments in Analytical Chemistry

Maria Lyssikatos

Abstract

The subject of the present study is the applications of design of experiments in Analytical Chemistry. Chapter 1 includes the aim, the methodology, the contribution and the structure of the study.

The second chapter refers to the theory of the design of experiments. At first, a comparison between the design of experiments and the univariate approach is presented as well as the uses and steps of the design of experiments. Then, the role of mathematical modelling is analysed and the types of experimental design. In addition, the way of selection of the appropriate design of experiments in Analytical Chemistry is explained with reference to the advantages and disadvantages of each type. The role of the design of experiments in quality by design is also reported.

In the third chapter the applications of the design of experiments in analytical method development are presented. In particular, chromatography and its types are shortly described and applications of the design of experiments in method development and optimization of this analytical technique are presented. Furthermore, capillary electrophoresis and its types are reported followed by the applications of the design of experiments in method development and optimization of this analytical technique.

In the fourth chapter the results of the applications of the design of experiments are summarized in two matrices. The first matrix includes the results that refer to the chromatography, while the second one includes the results that refer to the capillary electrophoresis.

The fifth chapter includes the discussion of the results and focuses on the mostly used types of the design of experiments and the factors that are usually optimized in chromatography and capillary electrophoresis.

Finally, in the sixth chapter the conclusions that emerged from the present study are presented as well as proposals for future research.

Keywords

Design of Experiments, Analytical Chemistry, Development of analytical method, Optimization, Chromatography, Capillary Electrophoresis.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iv
Abstract	viii
Κατάλογος Σχημάτων	xiii
Κατάλογος Πινάκων	xiii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Σκοπός της εργασίας	2
1.2 Μεθοδολογία	2
1.3 Συμβολή της εργασίας.....	5
1.4 Δομή της εργασίας.....	5
2. Σχεδιασμός πειραμάτων	7
2.1 Παραγοντικός σχεδιασμός πειραμάτων και μονοπαραγοντική μέθοδος.....	7
2.2 Χρήσεις σχεδιασμού πειραμάτων.....	8
2.3 Στάδια σχεδιασμού πειραμάτων	9
2.4 Μαθηματική μοντελοποίηση στο σχεδιασμό πειραμάτων	10
2.5 Μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης	12
2.6 Είδη σχεδιασμού πειραμάτων	15
2.6.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός	17
2.6.2 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός	18
2.6.3 Σχεδιασμός Plackett-Burman.....	20
2.6.4 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων	21
2.6.5 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός.....	22
2.6.6 Σχεδιασμός Box-Behnken.....	23
2.6.7 Σχεδιασμός Doehlert.....	24
2.6.8 D-βέλτιστος σχεδιασμός	25
2.6.9 Σχεδιασμός μειγμάτων	25
2.6.10 Σχεδιασμός ορθογώνιου πίνακα	26
2.7 Επιλογή σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία	27
2.8 Ο ρόλος του σχεδιασμού πειραμάτων στην ποιότητα μέσω σχεδιασμού	30
3. Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων	32
3.1 Χρωματογραφία	33
3.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	35
3.1.2 Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (HPTLC)	42
3.1.3 Χρωματογραφία ζεύγους - ιόντων (IPC)	43
3.1.4 Χειρόμορφη υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	44
3.1.5 Μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC).....	45
3.1.6 Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)	46
3.1.7 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC).....	47
3.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.....	48
3.2.1 Τριχοειδής ηλεκτρόφορηση ζώνης (CZE)	49
3.2.2 Μη υδατική τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (NACE).....	51
4. Αποτελέσματα	53
4.1 Χρωματογραφία	53
4.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.....	70

5.	Συζήτηση αποτελεσμάτων	75
6.	Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις.....	78
	Βιβλιογραφία.....	80

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1 Βασικά στάδια βιβλιογραφικής ανασκόπησης	3
Σχήμα 2 Κριτήρια αναζήτησης βιβλιοπηγών πηγών	4
Σχήμα 3 Διαδικασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης	5
Σχήμα 4 Επιφάνειες απόκρισης ως συναρτήσεις δύο παραγόντων α) Ύπαρξη μέγιστου, β) Μη ύπαρξη μέγιστου (σέλα) και γ) πλατώ.....	13
Σχήμα 5 Διαγράμματα περιγράμματος	14
Σχήμα 6 Είδη σχεδιασμού πειραμάτων	15
Σχήμα 7 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός με 2 και 3 παράγοντες	18
Σχήμα 8 Κλασματικός 2^3-1 παραγοντικός σχεδιασμός με δύο πιθανά υποσύνολα πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού	20
Σχήμα 9 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός με 3 παράγοντες α) εδροκεντρώμενος β) περιγεγραμμένος	23
Σχήμα 10 Σχεδιασμός Box-Behnken	24
Σχήμα 11 Σχεδιασμός Doehlert για 3 παράγοντες	24
Σχήμα 12 α) Σχεδιασμός μείγματος για 3 συστατικά που αθροίζονται σε 100% και β) το επίπεδο του σχεδιασμού στον τρισδιάστατο χώρο παραγόντων	26
Σχήμα 13 Τυπικά χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων που ελήφθησαν με εφαρμογή της βελτιστοποιημένης χρωματογραφικής μεθόδου.	39

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Πίνακας πλήρους 2^3 παραγοντικού σχεδιασμού	18
Πίνακας 2 Πίνακας κλασματικού 2^{3-1} παραγοντικού σχεδιασμού	20
Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά κύριων σχεδιασμών πειραμάτων διαλογής και βελτιστοποίησης.....	27
Πίνακας 4 Επιλογή σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία.....	29
Πίνακας 5 Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στην χρωματογραφία.....	53
Πίνακας 6 Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση	70

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ANOVA	Analysis of Variance	Ανάλυση διακύμανσης
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Ενεργό φαρμακευτικό συστατικό
AQbD	Analytical Quality-by-Design	Αναλυτική ποιότητα μέσω σχεδιασμού
ATP	Analytical Target Profile	Αναλυτικό προφίλ στόχου
BBD	Box-Behnken Design	Σχεδιασμός Box-Behnken
BGE	Background Electrolyte	Ηλεκτρολύτης υπόβαθρου
CCCD	Central Circumscribed Composite Design	Περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός
CCD	Central Composite Design	Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός
CCID	Central Composite Inscribed Design	Εγγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός
CD	Cyclodextrin	Κυκλοδεξτρίνη
CE	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης
CMA	Critical Method Attribute	Κρίσιμο χαρακτηριστικό μεθόδου
CMP	Critical Method Parameter	Κρίσιμη παράμετρος μεθόδου
CS	Chiral Selector	Χειρόμορφος επιλογέας
Do-D	D-optimal Design	D-βέλτιστος σχεδιασμός
DS	Design Space	Χώρος σχεδιασμού
EAT	Environmental Assessment Tool	Περιβαλλοντικό εργαλείο αξιολόγησης
FCCD	Face Centered Central Composite Design	Εδροκεντρώμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός
FDA	Federal Drug Administration	Αμερικάνικος οργανισμός φαρμάκων
FFD	Full Factorial Design	Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός
FrFD	Fractional Factorial Design	Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography	

ICH	International Council for Harmonization	Διεθνές Συμβούλιο Εναρμόνισης
IEC	Ion Exchange Chromatography	Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
IPC	Ion Pair Chromatography	Χρωματογραφία ζεύγους - ιόντων
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography	Μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία
MODR	Method Operable Design Region	Λειτουργική περιοχή σχεδιασμού μεθόδου
MS	Mass Spectrometer	Φασματόμετρο μάζας
NACE	Non-Aqueous Capillary Electrophoresis	
OAD	Orthogonal Array Design	Σχεδιασμός ορθογώνιου πίνακα
OFAT	One Factor At A Time	Ένας παράγοντας τη φορά
PBD	Plackett-Burman Design	Σχεδιασμός Plackett Burman
QbD	Quality-by-Design	Ποιότητα μέσω σχεδιασμού
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
RSM	Response Surface Methodology	Μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης
RSD	Response Surface Design	Σχεδιασμός επιφανειών απόκρισης
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Δωδεκακυλο-θειικό νάτριο
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
SFC	Supercritical Fluid Chromatography	Χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού
TBAH	Tetra Butyl Ammonium Hydroxide	Υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης
ΣΕΠ	Συνεργαζόμενο Εκπαιδευτικό Προσωπικό	

1. Εισαγωγή

Ο σχεδιασμός πειραμάτων είναι μια μαθηματική μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό και τη διεξαγωγή πειραμάτων καθώς και για την ανάλυση και την ερμηνεία δεδομένων που προέρχονται από τα πειράματα. Είναι ένας κλάδος εφαρμοσμένης στατιστικής που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή επιστημονικών μελετών ενός συστήματος, διεργασίας ή προϊόντος στο οποίο προσδιορίζονται οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών εισόδου (x_i -ανεξάρτητες μεταβλητές) που επηρεάζουν μία ή περισσότερες μεταβλητές απόκρισης (y -εξαρτημένες μεταβλητές) μέσω της καθιέρωσης μαθηματικών μοντέλων ($y = f(x_i)$) (Duraković, 2017). Στην προσέγγιση του σχεδιασμού πειραμάτων οι ελεγχόμενες μεταβλητές εισόδου μεταβάλλονται συστηματικά προκειμένου να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις τους στις μεταβλητές απόκρισης (Fukuda et al., 2018). Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον προσδιορισμό των πιο σημαντικών μεταβλητών εισόδου, την αναγνώριση και ρύθμιση των μεταβλητών εισόδου που οδηγούν σε βελτιστοποιημένες αποκρίσεις εξόδου καθώς και την αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών εισόδου (Fukuda et al., 2018).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες ο σχεδιασμός πειραμάτων αποτέλεσε ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για τη βελτίωση της ποιότητας και της αξιοπιστίας των προϊόντων (Duraković & Bašić, 2013). Η χρήση του έχει επεκταθεί σε πολλές βιομηχανίες και αποτελεί μέρος της διαδικασίας λήψης αποφάσεων είτε κατά τη διαδικασία ανάπτυξης ενός νέου προϊόντος, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής και βελτίωσης. Δεν χρησιμοποιείται μόνο σε τομείς μηχανικής, αλλά έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη διοίκηση, στο μάρκετινγκ, στη φαρμακευτική (Supare et al., 2021), στη βιομηχανία τροφίμων (Yu et al., 2018), στην ενέργεια (Duraković & Torlak, 2017) και την αρχιτεκτονική (Schlueter & Geyer, 2018) καθώς και στην Αναλυτική Χημεία (Hibbert, 2012). Ο σχεδιασμός πειραμάτων εφαρμόζεται σε φυσικές διεργασίες καθώς και σε μοντέλα προσομοίωσης (Garud et al., 2017).

Στην Αναλυτική Χημεία ο σχεδιασμός πειραμάτων εφαρμόζεται για τη βελτιστοποίηση χημικών ή ενόργανων παραγόντων και την εξαγωγή μέγιστων πληροφοριών από τα πειραματικά δεδομένα (Otto, 2017). Καθώς οι ποσότητες των διαφόρων αναλυτών βρίσκονται συνήθως σε ίχνη και υπάρχουν πάντα μερικές παρεμβολές που εμποδίζουν την άμεση ανάλυση των αναλυτών, μια αναλυτική τεχνική συνήθως περιλαμβάνει μια τεχνική

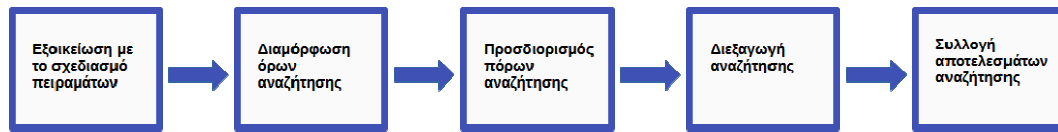
προσυγκέντρωσης ή προκατεργασίας δείγματος, όπως π.χ. την εκχύλιση, την πέψη, τη διάλυση, την απόσταξη κ.α. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να βελτιστοποιηθούν με τη χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων. Μετά την προσυγκέντρωση, δηλαδή την αύξηση της συγκέντρωσης ενός αναλύτη πριν την ανάλυσή του, οι αναλύσεις των αναλυτών διεξάγονται κυρίως με τεχνικές όπως η χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η ηλεκτροανάλυση και φασματοσκοπικές τεχνικές.

1.1 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση διαφόρων μεθόδων χημικής ανάλυσης. Η εργασία εστιάζει στις εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση διαφόρων μεθόδων της χρωματογραφίας και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που αποτελούν και τις πιο δημοφιλείς αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού.

1.2 Μεθοδολογία

Σύμφωνα με τους Chigbu et al. (2023), ανεξάρτητα από τον τρόπο ολοκλήρωσης της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει πέντε βασικά στάδια. Αυτά αναφέρονται: 1) στην εξοικείωση με το αντικείμενο του σχεδιασμού πειραμάτων και στο ακαδημαϊκό ενδιαφέρον για τις εφαρμογές του στην Αναλυτική Χημεία 2) στη διαμόρφωση των σχετικών όρων αναζήτησης (λέξεις κλειδιά) 3) στον προσδιορισμό των βιβλιογραφικών πόρων προς αναζήτηση 4) στη διεξαγωγή της πραγματικής αναζήτησης και τέλος 5) στη συλλογή των αποτελεσμάτων αναζήτησης. Τα παραπάνω στάδια δεν αποτελούν απαραίτητα μια γραμμική διαδικασία, ωστόσο έχουν κοινή αφετηρία και καταλήγουν στη συλλογή των αποτελεσμάτων αναζήτησης (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1 Βασικά στάδια βιβλιογραφικής ανασκόπησης
(Chigbu et al., 2023 προσαρμογή στα Ελληνικά)**

Μολονότι υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι αναζήτησης, ο σημαντικότερος παράγοντας για τη διεξαγωγή μιας βιβλιογραφικής ανασκόπησης αποτελεί η επισημάνση και εύρεση αντιπροσωπευτικού αριθμού αναφορών. Επομένως, προκειμένου να χαρακτηριστεί μια αναφορά κατάλληλη, αυτό εξαρτάται από τα ερευνητικά ερωτήματα και τους στόχους που έχουν τεθεί. Συνεπώς, θα πρέπει να έχουν καθοριστεί τα κριτήρια αναζήτησης όσο είναι δυνατόν πιο συγκεκριμένα, όπως για παράδειγμα η γλώσσα συγγραφής των άρθρων, η χρονολογία έκδοσης και οι λέξεις κλειδιά, προκειμένου να αντληθούν τα πιο σημαντικά αποτελέσματα.

Το σημείο εκκίνησης της συγκεκριμένης βιβλιογραφικής αναζήτησης περιλαμβάνει τη χρήση λέξεων-κλειδιών σε ηλεκτρονικές βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων όπως είναι η Scopus και Google Scholar για ηλεκτρονικές πηγές, ερευνητικές εργασίες και άρθρα ανασκόπησης. Οι παραπάνω πηγές θεωρούνται έγκριτοι και αξιόπιστοι πόροι. Η μορφή της βιβλιογραφίας που υιοθετήθηκε από κάθε βάση δεδομένων εξαρτάται από την κάλυψη αναγκών και το εύρος της εν λόγω εργασίας και προσδιορίστηκε με βάση το θέμα, τις έννοιες και τη χρονική περίοδο.

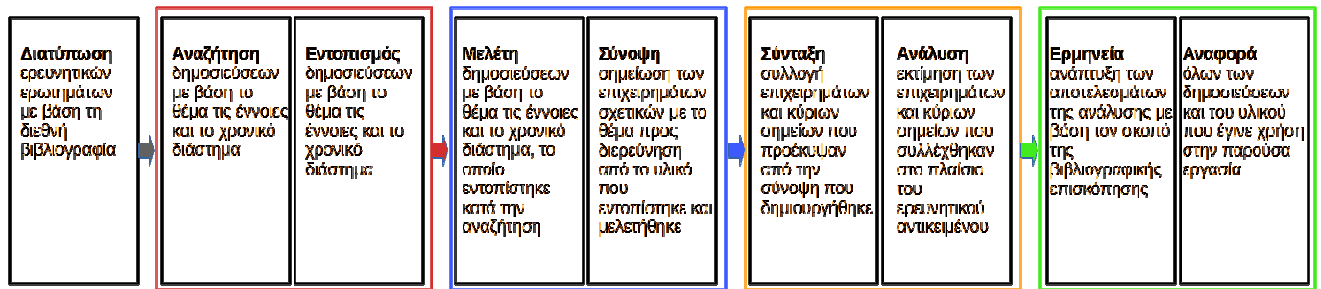
Η αναζήτηση βιβλιογραφίας (Σχήμα 2) με επίκεντρο το θέμα βασίζεται σε γενικά θέματα αντί για συγκεκριμένες ή περιορισμένες έννοιες. Μια τέτοια αναζήτηση είναι βέβαιο ότι παράγει ένα ευρύτερο πεδίο αποτελεσμάτων, το οποίο έπρεπε να επεξεργαστεί περαιτέρω για να εντοπιστούν συγκεκριμένα άρθρα κατάλληλα για την έρευνα που εκτελείται. Σε αντίθεση, η αναζήτηση βασισμένη στις έννοιες που σχετίζονται με το θέμα στηρίχθηκε στις κατάλληλες λέξεις-κλειδιά. Ακόμη, η αναζήτηση μέσα σε συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο βασίζεται στο φιλτράρισμα δημοσιευμένου υλικού με βάση το έτος δημοσίευσης

(για παράδειγμα, από το 2014 μέχρι το 2023). Αυτού του είδους η προσέγγιση είναι πολύ σχετική κατά την αναζήτηση σε μια βάση δεδομένων που εστιάζει στο θέμα.



Σχήμα 2 Κριτήρια αναζήτησης βιβλιογραφικών πηγών

Το Σχήμα 3 αναφέρεται στη διαδικασία της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και περιλαμβάνει διάφορες φάσεις, όπως η αναζήτηση, ο εντοπισμός, η μελέτη, σύνοψη, σύνταξη, ανάλυση, ερμηνεία και αναφορά (συγγραφή) με βάση τον ερευνητικό στόχο που διατυπώθηκε. Η διεξαγωγή της επικεντρώθηκε στο σκοπό, στη διαδικασία, στη δομή και τα αποτελέσματά της, ακολουθώντας με αυτό τον τρόπο ένα συστηματικό πρότυπο αναζήτησης και ανάλυσης της επιχειρηματολογίας με βάση τα δεδομένα έρευνας. Η ερμηνεία έγινε μέσα από το πρίσμα της Αναλυτικής Χημείας εστιάζοντας στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων, ενώ η αξιολογική προσέγγιση στηρίχθηκε στις αναλυτικές τεχνικές της χρωματογραφίας και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.



Σχήμα 3 Διαδικασία βιβλιογραφικής ανασκόπησης
(Chigbu et al., 2023 προσαρμογή στα Ελληνικά)

1.3 Συμβολή της εργασίας

Η αναγκαιότητα της έρευνας για το συγκεκριμένο θέμα πηγάζει από την ύπαρξη κενού για το συγκεκριμένο θέμα στην ελληνική βιβλιογραφία και ως εκ τούτου η παρούσα εργασία θα συμβάλλει στην κάλυψη αυτού του κενού. Ωστόσο, η σημαντικότητα της έρευνας επιβεβαιώνεται από την ραγδαία αύξηση των δημοσιευμένων εργασιών τα τελευταία χρόνια σε διεθνή έγκυρα περιοδικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι χημειομετρικά εργαλεία όπως ο σχεδιασμός πειραμάτων αποτελούν αναμφισβήτητα έναν τομέα αυξανόμενης προοπτικής για το μέλλον της Αναλυτικής Χημείας. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι ο ρόλος του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση βιοαναλυτικών μεθόδων είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς μπορεί να συμβάλλει στην ανακάλυψη βιοδεικτών χρήσιμων για την ταχεία διάγνωση ασθενειών.

1.4 Δομή της εργασίας

Η δομή που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Εισαγωγή: Γενικά ζητήματα, σκοπός και μεθοδολογία.
2. Σχεδιασμός πειραμάτων: Αναφορά των χρήσεων, των σταδίων και των ειδών του σχεδιασμού πειραμάτων. Αναφορά στην ποιότητα μέσω σχεδιασμού .
3. Εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων: Σύνοψη παρουσίαση των αναλυτικών τεχνικών χρωματογραφία και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και περιγραφή των μελετών που σχετίζονται με τη χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων

στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων των προαναφερόμενων αναλυτικών τεχνικών.

4. Αποτελέσματα: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ερευνητών για τις εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην χρωματογραφία και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

5. Συζήτηση αποτελεσμάτων: Αναφορά στα κύρια σημεία που προέκυψαν από τις μελέτες.

6. Συμπεράσματα που προέκυψαν από την περιγραφή των μελετών. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

Βιβλιογραφία

2. Σχεδιασμός πειραμάτων

Ο σχεδιασμός πειραμάτων είναι μια πολυμεταβλητή στατιστική τεχνική που στοχεύει στον αποτελεσματικό σχεδιασμό, εκτέλεση και ανάλυση δεδομένων από πειράματα (Hibbert, 2012). Στις μελέτες σχεδιασμού πειραμάτων μία ή περισσότερες μεταβλητές εισόδου (παράγοντες) μεταβάλλονται σκόπιμα ώστε να αποκαλυφθεί ο αντίκτυπός τους στην παρατηρούμενη απόκριση (πειραματικό αποτέλεσμα). Η αναγνώριση των σημαντικών παραγόντων και η επιλογή των κατάλληλων επιπέδων τους οδηγεί στο βέλτιστο αποτέλεσμα με τις λιγότερες πειραματικές δοκιμές.

2.1 Παραγοντικός σχεδιασμός πειραμάτων και μονοπαραγοντική μέθοδος

Παραδοσιακά, η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων έχουν πραγματοποιηθεί με την ανάλυση ενός παράγοντα τη φορά (One Factor At A Time, OFAT) (Politis et al., 2017). Στην προσέγγιση OFAT αλλάζει ένας από τους παράγοντες μέσα σε ένα κατάλληλο εύρος (ή επίπεδο) και οι άλλοι διατηρούνται σταθεροί. Η συγκεκριμένη προσέγγιση εκτός του ότι απαιτεί έναν υψηλό αριθμό πειραμάτων, δεν επιτρέπει την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή διεξαγωγή της ανάπτυξης και της βελτιστοποίησης (Politis et al., 2017; Candiotti et al., 2014). Με τη χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων μπορούν να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί και να εξαχθούν καλύτερα αποτελέσματα με λίγα πειράματα. Συχνά υποστηρίζεται ότι ο παραγοντικός σχεδιασμός πειραμάτων είναι ανώτερος από την προσέγγιση OFAT ιδιαίτερα όταν η απόκριση βελτιστοποιείται (Hibbert, 2012). Αν οι παράγοντες στο σχεδιασμό συσχετίζονται, δηλαδή αν η αλλαγή στην απόκριση που προέρχεται από μια αλλαγή στο επίπεδο ενός παράγοντα εξαρτάται από το επίπεδο ενός άλλου παράγοντα, τότε είναι απίθανο να ανακαλυφθεί η βέλτιστη απόκριση ενώ παράλληλα θα χρειαστεί να έχουν διεξαχθεί περισσότερα πειράματα από όσα είναι απαραίτητα (Hibbert, 2012). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η προσέγγιση OFAT παρουσιάζει τα εξής μειονεκτήματα (Ebrahimi-Najafabadi et al., 2014):

- Απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραμάτων.
- Οι πληροφορίες που λαμβάνονται είναι έγκυρες μόνο σε εκείνα τα σημεία όπου έχουν πραγματοποιηθεί τα πειράματα.

- Δεν παρέχει κατανόηση της πιθανής αλληλεπίδρασης παραγόντων και ως εκ τούτου τα αποτελέσματα είναι δυνατόν να παρερμηνευτούν μερικές φορές.
- Ο ερευνητής μπορεί να βρει μια αποδεκτή απόκριση, αλλά η πιθανότητα να εξαχθεί η βέλτιστη απόκριση είναι πολύ μικρή.

Σε αντίθεση, ο παραγοντικός σχεδιασμός πειραμάτων παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς αξιολογεί την αλληλεπίδραση μεταξύ παραγόντων, παρέχει πληροφορίες υψηλής ποιότητας σε κάθε σημείο του πειραματικού χώρου και απαιτεί λιγότερα πειράματα από την παραδοσιακή προσέγγιση OFAT (Stojanović et al., 2021).

Μερικά πλεονεκτήματα του παραγοντικού σχεδιασμού πειραμάτων στη βελτιστοποίηση ενός προϊόντος είναι τα παρακάτω (Sharma et al., 2022):

- Μείωση χρόνου και κόστους.
- Λιγότερες αστοχίες παρτίδας.
- Πιο αποτελεσματική μεταφορά τεχνολογίας στην παραγωγή.
- Προσέγγιση και ταυτοποίηση με βάση τον κίνδυνο.
- Καινοτόμες προσεγγίσεις διαδικασιών επικύρωσης.
- Υψηλότερα ποσοστά καινοτομίας εξαιτίας της ικανότητας βελτίωσης διαδικασιών.

2.2 Χρήσεις σχεδιασμού πειραμάτων

Ο σχεδιασμός πειραμάτων είναι ένα εργαλείο πολλαπλών χρήσεων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό σημαντικών παραγόντων εισόδου (μεταβλητή εισόδου) και για το πώς σχετίζονται οι παράγοντες αυτοί με τα αποτελέσματα (μεταβλητή απόκρισης) (Duraković, 2017). Επιπλέον, ο σχεδιασμός πειραμάτων είναι βασικά μια ανάλυση παλινδρόμησης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες καταστάσεις. Οι κύριες χρήσεις του σχεδιασμού πειραμάτων είναι οι ακόλουθες (Guo & Mettas, 2012):

1. Σύγκριση

Αυτός είναι ένας παράγοντας μεταξύ πολλαπλών συγκρίσεων που οδηγεί στην καλύτερη επιλογή που χρησιμοποιεί t-test, Z-test ή F-test.

2. Έλεγχος μεταβλητών

Αυτοί είναι συνήθως παραγοντικοί σχεδιασμοί δύο επιπέδων που προορίζονται για την επιλογή σημαντικών παραγόντων (μεταβλητών) μεταξύ πολλών που επηρεάζουν την απόδοση ενός συστήματος, διεργασίας ή προϊόντος.

3. Αναγνώριση συνάρτησης μεταφοράς

Αν εντοπιστούν σημαντικές μεταβλητές εισόδου, η σχέση μεταξύ των μεταβλητών εισόδου και της μεταβλητής εξόδου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω διερεύνηση της απόδοσης ενός συστήματος, μιας διεργασίας ή ενός προϊόντος μέσω της συνάρτησης μεταφοράς.

4. Βελτιστοποίηση συστήματος

Η συνάρτηση μεταφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βελτιστοποίηση με διεξαγωγή του πειράματος στη βέλτιστη ρύθμιση των μεταβλητών. Με αυτόν τον τρόπο η απόδοση του συστήματος, της διεργασίας ή του προϊόντος μπορεί να βελτιωθεί.

5. Σχεδιασμός ανθεκτικότητας

Ο σχεδιασμός αυτός ασχολείται με τη μείωση της διαφοροποίησης στο σύστημα, τη διεργασία ή το προϊόν χωρίς την εξάλειψη των αιτιών της. Ο σχεδιασμός αυτός εισήχθηκε από τον Ιάπωνα μελετητή της ποιότητας Δρ. Taguchi, ο οποίος έκανε το σύστημα ανθεκτικό έναντι του θορύβου (περιβαλλοντικοί και ανεξέλεγκτοι παράγοντες θεωρούνται θόρυβος). Γενικά, οι παράγοντες που προκαλούν τη διαφοροποίηση του προϊόντος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες ομάδες:

- εξωτερικοί/περιβαλλοντικοί (όπως θερμοκρασία, υγρασία και σκόνη)
- εσωτερικοί (φθορά μιας μηχανής και γήρανση των υλικών)
- διακύμανση από μονάδα σε μονάδα (παραλλαγές σε υλικά, διαδικασίες και εξοπλισμό).

2.3 Στάδια σχεδιασμού πειραμάτων

Κατά την εφαρμογή του σχεδιασμού πειραμάτων συνήθως ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια (Goupy, 1993):

1. Δήλωση προβλήματος

- Ορισμός της μεταβλητής απόκρισης ή εξόδου που πρέπει να περιγράφει επαρκώς τη διαδικασία.
- Προσδιορισμός των παραγόντων (συνεχών ή διακριτών)

- Επιλογή των επιπέδων και της πειραματικής περιοχής
- Προσδιορισμός μη ελεγχόμενων παραγόντων (θόρυβος)
- Ορισμός αναλογίας σήματος/θορύβου
- Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας του συστήματος
- Επιλογή πειραματικής μεθοδολογίας (πειραματική διάταξη)

2. Πειραματισμός

- Τυχαιοποίηση
- Ομαδοποίηση
- Επανάληψη

3. Αποτελέσματα και ανάλυση (ερμηνεία)

- Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA)

4. Βελτιστοποίηση

- Επιλογή των πειραματικών συνθηκών που δημιουργούν την επαρκή αναλογία σήματος/θορύβου

5. Συμπεράσματα

- Ανατροφοδότηση

2.4 Μαθηματική μοντελοποίηση στο σχεδιασμό πειραμάτων

Το μαθηματικό μοντέλο είναι μια έκφραση που ορίζει την εξάρτηση μιας μεταβλητής απόκρισης από τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Αφού μετρηθούν οι αποκρίσεις υπό διαφορετικές συνθήκες, τα δεδομένα πολλαπλών μεταβλητών προσαρμόζονται σε γραμμικό ή τετραγωνικό μοντέλο ανάλογα με τον προκαθορισμένο στόχο. Ένα μοντέλο μπορεί να είναι εμπειρικό, το οποίο επιλέγεται για τη μαθηματική μορφή ή βασίζεται σε μια θεωρητική κατανόηση της διαδικασίας που δίνει την απόκριση. Τα μαθηματικά μοντέλα, όπως προαναφέρθηκε, αναπτύσσονται για να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ πειραματικών παραγόντων και παρατηρούμενων αποκρίσεων. Συνήθως περιγράφονται από την πολυωνυμική τάξη (μοντέλο πρώτης τάξης ή γραμμικό μοντέλο, μοντέλο δεύτερης τάξης ή τετραγωνικό μοντέλο). Τα γραμμικά μοντέλα για τρεις παράγοντες (x_1 , x_2 και x_3) μπορούν να γραφούν χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις 1 και 2 αντίστοιχα (Stojanović et al., 2021):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + \varepsilon \quad (1)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + \varepsilon \quad (2)$$

Τα παραπάνω μοντέλα (1) και (2) είναι γραμμικά. Το μοντέλο (1) περιέχει γραμμικές επιδράσεις και αλληλεπιδράσεις, ενώ το (2) περιέχει επιπλέον και τετραγωνικές επιδράσεις. Στις παραπάνω εξισώσεις το y είναι μια μετρημένη απόκριση, το b_0 είναι το σημείο τομής με τον άξονα, τα b_1 , b_2 και b_3 είναι γραμμικοί όροι (παράμετροι πρώτης τάξης), τα b_{12} , b_{23} και b_{13} είναι τετραγωνικοί όροι (παράμετροι δεύτερης τάξης) και ε είναι ένα κατάλοιπο. Αν η εξίσωση του μοντέλου αντιπροσωπεύει όλα τα αποτελέσματα του συστήματος, η διαφορά μεταξύ της πρόβλεψης του μοντέλου και της μετρούμενης απόκρισης είναι τυχαία διακύμανση και συνήθως εκφράζεται με το σύμβολο ε (Hibbert, 2012). Οι συντελεστές σε ένα μοντέλο υπολογίζονται από τον πίνακα του μοντέλου (Brereton, 2003). Η απόλυτη τιμή ενός συντελεστή δίνει μια εικόνα για το μέγεθος της επίδρασης του παράγοντα. Ένας αρνητικός ή θετικός συντελεστής δείχνει αν η απόκριση μειώνεται ή αυξάνεται με την αύξηση της τιμής του παράγοντα. Τα κατάλοιπα αντιπροσωπεύουν τις διαφορές μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και της προβλεπόμενης τιμής μιας δεδομένης απόκρισης. Στην ιδανική περίπτωση, όλα τα κατάλοιπα είναι μηδέν και το μοντέλο έχει άριστη προβλεπτική ικανότητα στη διερευνώμενη πειραματική περιοχή.

Αν οι παράγοντες διερευνηθούν σε δύο επίπεδα (σχεδιασμοί διαλογής), μόνο ένα γραμμικό μοντέλο μπορεί να προσαρμοστεί στα δεδομένα και δεν επιτυγχάνεται καμπυλότητα. Κατά συνέπεια, η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή δεν μπορεί να βρεθεί σε τρισδιάστατα γραφήματα. Η γραμμική σχέση δεν είναι κατάλληλη για επιλογή των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, αλλά είναι πολύ χρήσιμη για την εκτίμηση της σημασίας των επιδράσεων των παραγόντων. Αν οι παράγοντες διερευνηθούν σε τρία επίπεδα, η τετραγωνική σχέση μπορεί να προσαρμόζεται στα δεδομένα και μπορεί να επιτευχθεί σημαντική καμπυλότητα. Σημαντική καμπυλότητα που προκύπτει από τετραγωνικούς όρους επιτρέπει στον αναλυτή να κατανοήσει τη συμπεριφορά του συστήματος και να επιλέξει τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες με την εύρεση της ελάχιστου ή του μέγιστου της απόκρισης (Stojanović et al., 2021). Η λήψη αποφάσεων πολλαπλών κριτηρίων πρέπει να πραγματοποιείται ώστε να επιτυγχάνονται οι βέλτιστες

συνθήκες αν υπάρχουν περισσότερες αποκρίσεις ενδιαφέροντος, δεδομένου ότι ένα μοντέλο χρησιμοποιείται για μια απόκριση (Dejaegher & Vander Heyden, 2011).

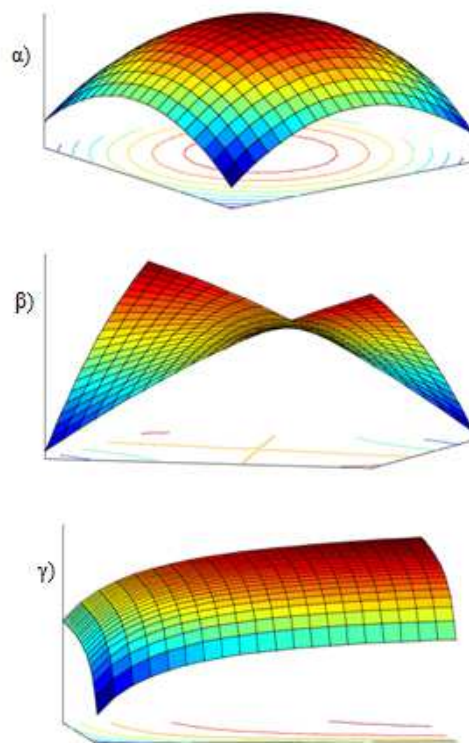
2.5 Μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης

Η επιφάνεια απόκρισης (Response Surface) είναι ένα μοντέλο μιας συνάρτησης (απόκρισης) προσαρμοσμένης σε πειραματικά δεδομένα που προέρχονται από έναν παράγοντα (ή παράγοντες) ή μεταβλητή (ή μεταβλητές) ή συνδυασμούς αυτών, τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για την εξαγωγή των πληροφοριών σχετικά με το σύστημα (Skartland et al., 2011). Η μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) αναφέρεται σε τεχνικές πολλαπλών μεταβλητών που μπορούν να δημιουργήσουν επιφάνειες απόκρισης και παρέχουν λύσεις για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών, έτσι ώστε η απόκριση να μεγιστοποιείται, να ελαχιστοποιείται ή να αποκτά μια βέλτιστη τιμή (Ranade & Thiagarajan, 2017). Στη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης τα πολυωνμικά μοντέλα πρώτης τάξης με αλληλεπιδράσεις και κατά συνέπεια και οι σχεδιασμοί πειραμάτων, όπως οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο όταν τα δεδομένα δεν παρουσιάζουν καμπυλότητα. Ωστόσο, συνήθως είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σχεδιασμοί πειραμάτων που είναι ικανοί να υπολογίσουν τους συντελεστές πολυωνύμου δεύτερης τάξης. Αυτό είναι δυνατό με τη χρήση σχεδιασμών όπου για κάθε παράγοντα ο αριθμός επιπέδων είναι $L \geq 3$, επειδή οι σχεδιασμοί δύο επιπέδων δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες για μέγιστα ή για μη γραμμικές επιδράσεις (Bezerra et al., 2008).

Τα μοντέλα των επιφανειών απόκρισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση μιας μεμονωμένης απόκρισης. Ωστόσο, όταν απαιτείται η βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων (δύο ως πέντε αποκρίσεις) κάθε φορά, αυτή μπορεί να γίνει με απλή οπτική παρατήρηση των διαφόρων επιφανειών απόκρισης που λαμβάνονται για μια συγκεκριμένη απόκριση αντίστοιχα και με επικάλυψη τους ώστε να βρεθεί η πειραματική περιοχή που υποτίθεται ότι ικανοποιεί όλες τις προς μελέτη αποκρίσεις (Sivertsen et al., 2007). Εντός του εύρους των τιμών των παραγόντων σε ένα πείραμα θα υπάρχουν καλές τιμές απόκρισης και όχι τόσο καλές. Μέσω της διαδικασίας της βελτιστοποίησης θα ανακαλυφθούν οι βέλτιστες τιμές. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει πάντα ένα μοναδικό μέγιστο μιας συνάρτησης που μπορεί να ανακαλυφθεί, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4) (Hibbert, 2012). Συχνά η απόκριση πλατύνει και υπάρχει μια περιοχή επιφανείας

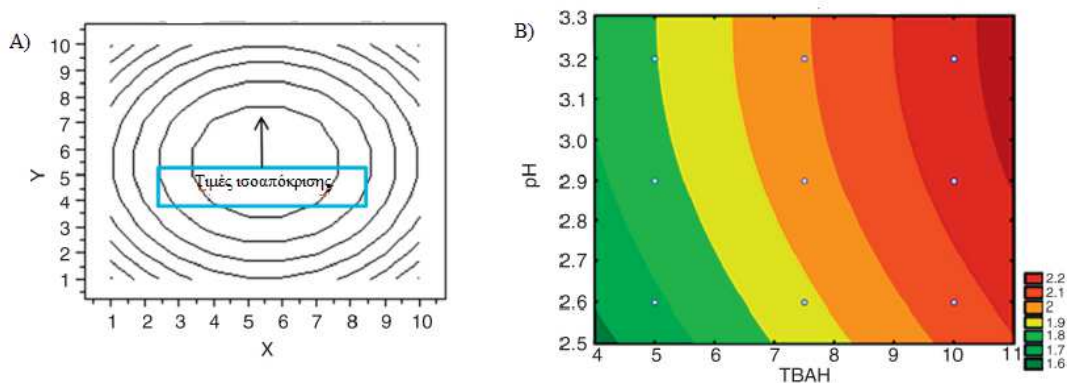
απόκρισης με περίπου την ίδια τιμή (Σχήμα 4γ). Μερικές φορές η συνάρτηση παριστάνεται με μια σέλα με μέγιστες τιμές στις άκρες της (Σχήμα 4β). Στην περίπτωση αυτή, οι συντεταγμένες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βέλτιστες τιμές και κατά συνέπεια η βέλτιστη περιοχή είναι δυνατό να εντοπιστεί μέσω οπτικής επιθεώρησης των επιφανειών και να γίνουν οι απαραίτητες αλλαγές στο σχεδιασμό που εφαρμόζεται (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017).

Στη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης οι ποιοτικοί παράγοντες δεν μπορούν να μελετηθούν. Αντίθετα, οι ποσοτικοί και οι παράγοντες που σχετίζονται με μείγματα μπορούν να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται ορισμένες επαναλήψεις του κεντρικού σημείου ή διπλές/τριπλές μετρήσεις σε κάθε εκτέλεση προκειμένου να υπολογίζονται μοντέλα για την πραγματοποίηση προβλέψεων. Από αυτές τις επαναλήψεις είναι δυνατό να εκτιμηθεί η πειραματική διακύμανση με την οποία μπορεί να διαπιστωθεί η εγκυρότητα του μοντέλου (Dejaegher et al., 2013).



Σχήμα 4 Επιφάνειες απόκρισης ως συναρτήσεις δύο παραγόντων α) Ύπαρξη μέγιστου, β) Μη ύπαρξη μέγιστου (σέλα) και γ) πλατώ (Hibbert, 2012)

Αφού γίνει η στατιστική αξιολόγηση του μοντέλου μπορούν να σχεδιαστούν εκτός από τρισδιάστατες επιφάνειες απόκρισης και δισδιάστατα γραφήματα περιγραμμάτων (contour plots) ώστε να οπτικοποιηθεί η τάση της προβλεπόμενης απόκρισης (Dejaegher et al., 2013). Αυτά τα δισδιάστατα διαγράμματα αποτελούν μια εναλλακτική ιδιαίτερα για μεγάλο αριθμό δεδομένων, όπως για παράδειγμα στη φαρμακευτική ανάλυση. Ένα τέτοιο διάγραμμα είναι ένα γράφημα μεταξύ z (τιμές ισο-απόκρισης) που αναπαρίσταται ως γραμμές έναντι (x , y) συντεταγμένων που απεικονίζονται αντί για μήκος, πλάτος και υψόμετρο (Dejaegher & Vander Heyden, 2011). Στο Σχήμα 5 απεικονίζεται ένα δισδιάστατο περίγραμμα δείγματος (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017) και ακόμα ένα που δημιουργήθηκε για τη βελτιστοποίηση ενός παράγοντα χωρητικότητας κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής χρωματογραφικής μεθόδου (Murthy et al., 2013). Η επίδραση δύο ανεξάρτητων μεταβλητών "X" και "Y" στους αντίστοιχους άξονες προς μια απόκριση αναπαρίσταται ως ένα σύνολο γραμμών ισοαπόκρισης (πλέγματα) ως συνάρτηση δύο παραγόντων στο Σχήμα 5Α, ενώ το Σχήμα 5Β αποτελεί την οπτική απεικόνιση για την επίδραση του υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου (TBAH) στον παράγοντα χωρητικότητας και δείχνει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του TBAH αυξάνει τον παράγοντα χωρητικότητας στο διαχωρισμό μιας χημικής ένωσης με αντιμυκητιακή δράση (Krishna et al., 2016). Η δημιουργία τιμών "z" και γραμμών ισοαπόκρισης από αυτές εκτελούνται από αντίστοιχο πρόγραμμα λογισμικού (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017).



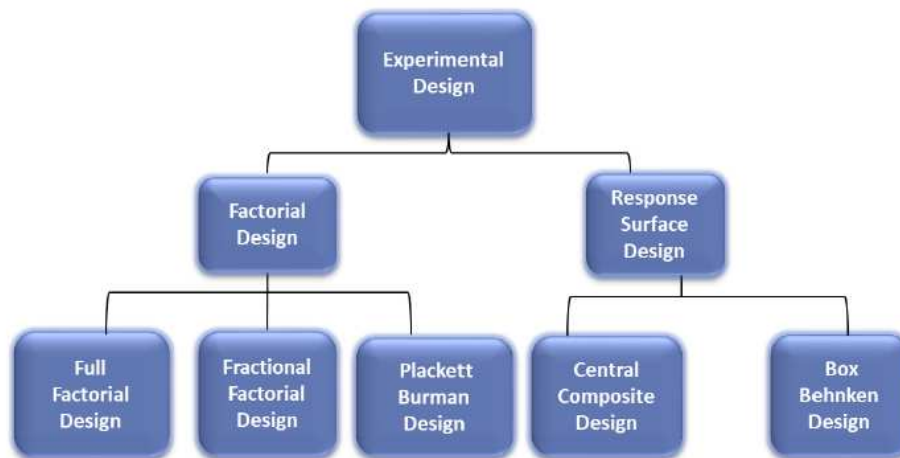
Σχήμα 5 Διαγράμματα περιγράμματος

A) επίδραση δύο ανεξάρτητων μεταβλητών X και Y στον αντίστοιχο άξονα προς μια απόκριση που αναπαρίσταται ως ένα σύνολο γραμμών ισοαπόκρισης (πλέγματα). B) Επίδραση της συγκέντρωσης του TBAH στον παράγοντα χωρητικότητας μιας χημικής ένωσης (Murthy et al., 2013 προσαρμογή στα Ελληνικά)

Οι διάφοροι χημειομετρικοί σχεδιασμοί που βασίζονται στην RSM και είναι γνωστοί ως σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης (Response Surface Designs, RSD) είναι αποτελεσματικοί στη συστηματική ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που περιλαμβάνουν σημαντικές σχέσεις μεταβλητής-απόκρισης (Singh et al., 2013). Οι σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης αποτελούν σχεδιασμούς βελτιστοποίησης και επιτρέπουν τη λήψη πειραματικών δεδομένων που μπορούν να προσαρμοστούν σε ένα τετραγωνικό πολυωνυμικό μοντέλο για τη δημιουργία μιας επιφάνειας απόκρισης, το οποίο περιγράφει τη συμπεριφορά του συνόλου των δεδομένων και κάνει προβλέψεις σε όλο τον πειραματικό χώρο (Bezerra et al., 2008).

2.6 Είδη σχεδιασμού πειραμάτων

Ανάλογα με το σκοπό ενός πειράματος όλοι οι σχεδιασμοί πειραμάτων μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ευρείες κατηγορίες: Σχεδιασμοί Διαλογής (Screening Designs), που συνήθως είναι γνωστοί ως Παραγοντικοί Σχεδιασμοί (Factorial Designs) και Σχεδιασμοί Επιφανειών Απόκρισης (Response Surface Designs) (σχεδιασμοί βελτιστοποίησης). (Σχήμα 6).



Σχήμα 6 Είδη σχεδιασμού πειραμάτων
(Supare et al., 2021)

Σχεδιασμοί διαλογής

Καθώς ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων επηρεάζει κάθε αναλυτική διαδικασία, ορισμένοι από αυτούς που δεν έχουν σημαντική επίδραση σε αυτήν πρέπει να απορρίπτονται. Η διαλογή των παραγόντων με τη μεγαλύτερη επιρροή αποτελεί τον

πρωταρχικό στόχο της εφαρμογής σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία. Αυτοί οι σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται με σκοπό τον εντοπισμό των πιο σημαντικών παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων τους από όλους τους δυνατούς παράγοντες και είναι πολύ χρήσιμοι για την ταυτόχρονη εξέταση ποιοτικών και ποσοτικών παραγόντων (Dejaegher & Vander Heyden, 2011). Σε αυτό το πλαίσιο η μελέτη διαλογής είναι η διερεύνηση των παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν μια αναλυτική μέθοδο και πραγματοποιείται με ένα ελάχιστο αριθμό πειραμάτων που διεξάγονται σε ένα μέγιστο αριθμό παραγόντων. Λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόντων που μελετώνται, γενικά λαμβάνεται ένα γραμμικό μοντέλο και απαιτείται ένας υψηλά κλασματοποιημένος σχεδιασμός. Ο σχεδιασμός διαλογής περιλαμβάνει κυρίως παραλλαγές των k παραγόντων σε $L = 2$ επίπεδα, σε ένα σχετικά μικρό αριθμό N πειραμάτων ($N \geq k+1$) (Dejaegher & Vander Heyden, 2011).

Οι παράγοντες που μελετώνται μπορεί να είναι ποσοτικοί, όπως π.χ. η συγκέντρωση του αναλύτη, το pH, η θερμοκρασία, το δυναμικό, κ.α., ή ποιοτικοί, όπως π.χ. είδος διαλύτη, είδος χρωματογραφικής στήλης, είδος ανιχνευτή κ.α. Μετά την εκτέλεση των πειραμάτων διαλογής γίνεται η αξιολόγηση της σημασίας των παραγόντων με στατιστική ανάλυση των συντελεστών με σκοπό την ανάδειξη των παραγόντων με τη σημαντικότερη επίδραση στις αποκρίσεις. Η στατιστική αξιολόγηση γενικά περιλαμβάνει την εφαρμογή του t-test ή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Για τη γραφική ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν κανονικά ή ημικανονικά διαγράμματα πιθανοτήτων ή γραφήματα Pareto. Στις δύο πρώτες προσεγγίσεις οι σημαντικές επιδράσεις δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και έτσι αποκλίνουν από την ευθεία που σχηματίζεται από τους μη σημαντικούς παράγοντες. Ωστόσο, στην τελευταία περίπτωση οι επιδράσεις των τυποποιημένων μεταβλητών αναπαρίστανται ως ράβδοι και αυτές που υπερβαίνουν μια γραμμή που αντιστοιχεί στην κρίσιμη τιμή t θεωρούνται σημαντικές (Dejaegher et al., 2013). Ως σχεδιασμοί διαλογής χρησιμοποιούνται συχνά οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί (Full Factorial Designs, FFD), οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί (Fractional Factorial Designs, FrFD) και οι σχεδιασμοί Plackett-Burman (PBD) (Dejaegher & Vander Heyden, 2009).

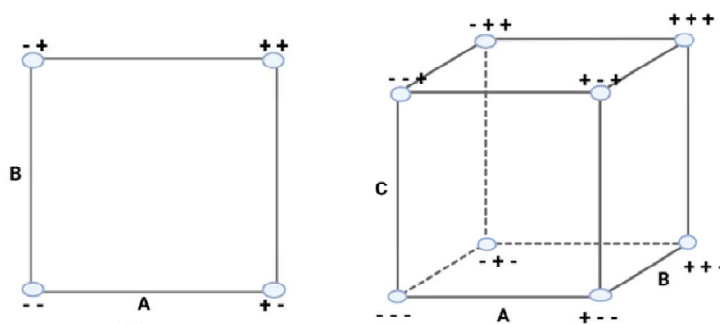
2.6.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός

Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί (FFD) γίνονται με πειράματα κάθε συνδυασμού επιπέδου παραγόντων ώστε να αποτελούνται από συνδυασμούς L_k των L επιπέδων των k παραγόντων. Σους πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς δύο επιπέδων ο κάθε παράγοντας αξιολογείται με 2 επίπεδα, που ονομάζονται "υψηλό" και "χαμηλό" και εκφράζονται ως (+1) και (-1) σε κωδικοποιημένες μεταβλητές (Montgomery, 2013 όπως αναφ. σε Durakovic, 2017). Όταν ο αριθμός των παραγόντων k είναι μικρός ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δυο επιπέδων μπορεί να εφαρμοστεί για σκοπούς διαλογής και θα πρέπει να εκτελεστούν $N = 2k$ πειράματα ώστε να εκτιμηθούν οι κύριες επιδράσεις των παραγόντων καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους (Montgomery, 2013 όπως αναφ. σε Durakovic, 2017). Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός καθίσταται γρήγορα ανέφικτος όσο ο αριθμός των παραγόντων k αυξάνεται, επειδή ο συγκεκριμένος σχεδιασμός παρέχει πληροφορίες για όλες τις αλληλεπιδράσεις μέχρι την k -τάξη και έτσι ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων αυξάνεται γρήγορα λόγω του υψηλού αριθμού των όρων αλληλεπίδρασης του μοντέλου. Τα αποτελέσματα τρίτης και ανώτερης τάξης μπορούν συχνά να θεωρηθούν αμελητέα και δεν παρέχουν συνήθως καμία χρήσιμη πληροφορία (Lee, 2019). Στον Πίνακα 1 απεικονίζεται ο πίνακας αλγεβρικών προσήμων του 2^3 πλήρους σχεδιασμού (Durakovic, 2017). Τα κεφαλαία γράμματα A, B, C, απεικονίζουν τους παράγοντες, ενώ τα μικρά, a, b, c τις θεραπείες, δηλαδή τους συνδυασμούς τους. Η στήλη I έχει πάντα θετικό πρόσημο (+) και αποτελεί τη στήλη ταυτότητας.

	I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
(1)	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
a	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
b	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
ab	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
c	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
ac	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
bc	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
abc	1	1	1	1	1	1	1	1

Πίνακας 1 Πίνακας αλγεβρικών προσήμων πλήρους 2^3 παραγοντικού σχεδιασμού
(Durakovic, 2017)

Στο Σχήμα 7 απεικονίζεται μια γραφική αναπαράσταση του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού με 2 και 3 παράγοντες αντιστοίχως (Stojanović et al., 2021).



Σχήμα 7 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός με 2 και 3 παράγοντες
(Stojanović et al., 2021)

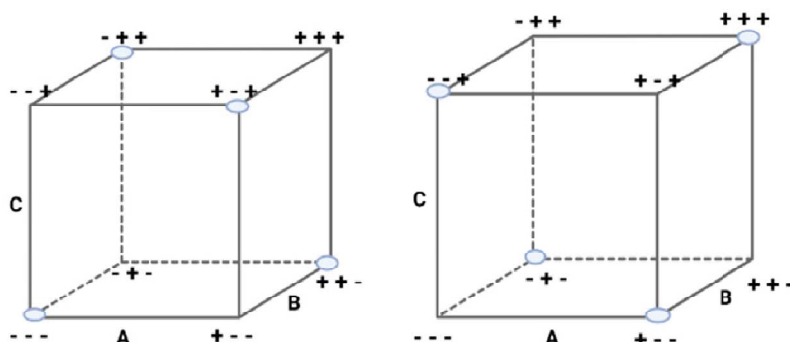
2.6.2 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός

Ο αριθμός των πειραμάτων στον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό είναι $N = n^{k-p}$, όπου n είναι ο αριθμός των επιπέδων (συνήθως 2), k ο αριθμός των παραγόντων και p το μέγεθος του κλάσματος. Ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων επιτρέπει τη διερεύνηση μεγάλου αριθμού παραγόντων με μικρότερο αριθμό πειραμάτων.

Μπορούν να δημιουργηθούν διαφορετικοί κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί για μεγάλο αριθμό παραγόντων και το μέγεθος του κλάσματος επηρεάζει τον αριθμό των επιδράσεων που μπορούν να εκτιμηθούν καθώς και τον αριθμό πειραμάτων που απαιτούνται. Στον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό πρέπει πάντα ο αριθμός των πειραμάτων να υπερβαίνει τον αριθμό των παραγόντων (Dejaegher et al., 2013). Το μειονέκτημα της κλασματοποίησης είναι ότι κάποιες πληροφορίες χάνονται γιατί μόνο ορισμένοι συντελεστές του μοντέλου υπολογίζονται με σαφήνεια. Στην πραγματικότητα, ο σχεδιασμός αυτός δεν επιτρέπει την εκτίμηση όλων των κύριων επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων τους ξεχωριστά, επειδή μερικές από αυτές υπολογίζονται μαζί (Hibbert, 2012). Έτσι, ο σχεδιασμός λαμβάνει υπόψη μόνο ένα μικρό αριθμό κύριων επιδράσεων καθώς και τις αλληλεπιδράσεις χαμηλών τάξεων, ενώ οι αλληλεπιδράσεις υψηλής τάξης αγνοούνται λόγω των αμελητέων επιδράσεων που έχουν στην μεταβλητή απόκρισης. Για παράδειγμα, ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός $2^3 = 8$ απαιτεί 8 πειράματα και 8 συνδυασμούς θεραπειών όπως παρουσιάστηκε στον Πίνακα 1. Αν κάποιος ερευνητής για κάποιο λόγο δεν μπορεί να διεξάγει όλα αυτά τα πειράματα και δημιουργήσει έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό $2^{3-1} = 4$, τότε αντί για 8 πειράματα θα χρειαστεί να διεξάγει μόνο τα 4. Το μόνο που χρειάζεται να αποφασιστεί είναι ποιοί συνδυασμοί θεραπειών να δοκιμαστούν. Αν π.χ. επιλεγούν οι θεραπείες με θετικές τιμές στη στήλη ABC, τότε προκύπτει ο πίνακας αλγεβρικών προσήμων του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 2^{3-1} (Πίνακας 2) (Durakovic, 2017). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, ορισμένες στήλες έχουν τις ίδιες τιμές (είναι ίδιες) και είναι χρωματισμένες με το ίδιο χρώμα ($I=ABC$, $A=BC$, $B=AC$, $C=AB$). Στο Σχήμα 8 απεικονίζεται μια γραφική αναπαράσταση του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 2^{3-1} και δύο διαφορετικά υποσύνολα πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού (Stojanović et al., 2021).

	I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
a	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
b	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
c	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
abc	1	1	1	1	1	1	1	1
(1)	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
ab	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
ac	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
bc	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1

Πίνακας 2 Πίνακας αλγεβρικών προσήμων κλασματικού 2^{3-1} παραγοντικού σχεδιασμού
(Durakovic, 2017)



Σχήμα 8 Κλασματικός 2^{3-1} παραγοντικός σχεδιασμός με δύο πιθανά υποσύνολα πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού
(Stojanović et al., 2021)

2.6.3 Σχεδιασμός Plackett-Burman

Στο σχεδιασμό Plackett-Burman (PB) λαμβάνονται υπόψη δύο επίπεδα (-1, +1) για κάθε παράγοντα. Αυτός ο σχεδιασμός καθιστά δυνατή την εκτίμηση γραμμικών μοντέλων χωρίς αλληλεπιδράσεις και για αυτό το λόγο εφαρμόζεται και σε δοκιμές ανθεκτικότητας. Στο συγκεκριμένο σχεδιασμό ο αριθμός των πειραμάτων N είναι πάντα πολλαπλάσιο του 4 και με N πειράματα εξετάζονται $k = N-1$ παράγοντες (Dejaegher & Vander Heyden, 2011). Επομένως, το κύριο πλεονέκτημα του σχεδιασμού είναι η ικανότητα αξιολόγησης μεγάλου αριθμού παραγόντων με μικρό αριθμό δοκιμών (π.χ. η εξέταση 7 παραγόντων

απαιτεί μόνο 8 πειράματα). Τα επίπεδα των παραγόντων μεταβάλλονται με κυκλική σειρά και ο πίνακας δημιουργείται από αρχικές ακολουθίες με κωδικοποιημένα επίπεδα παραγόντων για την πρώτη σειρά (πρώτο πείραμα). Οι υπόλοιπες σειρές δημιουργούνται μετακινώντας κυκλικά το τελευταίο πρόσημο της μιας σειράς στην αρχή της επόμενης σειράς οπότε μετακινείται το πρόσημο μια θέση προς τα δεξιά. Η ακολουθία τελειώνει με όλες τις (-1) τιμές, που αντιπροσωπεύουν το τελευταίο πείραμα στον πίνακα (Lee, 2019). Όταν το k είναι μεγαλύτερο από τον αριθμό των πραγματικών παραγόντων που πρέπει να εξεταστούν, εισάγονται εικονικοί παράγοντες που δεν έχουν καμία πραγματική φυσικοχημική έννοια και δεν επηρεάζουν το παρατηρούμενο σύστημα (Stojanović et al., 2021).

Σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης

Οι σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης (RSD) περιλαμβάνουν: α) συμμετρικούς σχεδιασμούς και β) ασύμμετρους σχεδιασμούς. Η πρώτη κατηγορία σχεδιασμών περιέχει ένα κεντρικό σημείο και περιλαμβάνει τους παρακάτω σχεδιασμούς (Hibbert, 2012):

- Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων
- Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD)
- Σχεδιασμός Box-Behnken (Box-Behnken Design, BBD)
- Σχεδιασμός Doehlert

Η δεύτερη κατηγορία σχεδιασμών εξετάζει παράγοντες σε διαφορετικούς αριθμούς επιπέδων με αποτέλεσμα το πεδίο διερεύνησης να αποκτά ασύμμετρο σχήμα. Για παράδειγμα, ο D-βέλτιστος σχεδιασμός (D-optimal Design, Do-D) είναι ένας ασύμμετρος σχεδιασμός. Σχεδιασμοί που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη μελέτη μείγματος μεταβλητών ονομάζονται σχεδιασμοί μείγματος (Stojanović et al., 2021).

2.6.4 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων

Ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων χρησιμοποιείται σπάνια, επειδή ο αριθμός των πειραμάτων είναι αρκετά υψηλός ($N = 3^k$). Ο σχεδιασμός αυτός περιέχει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των παραγόντων k και των 3 επιπέδων τους και η αποτελεσματικότητα του μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των παραγόντων που πρέπει να μελετηθούν (Hibbert, 2012).

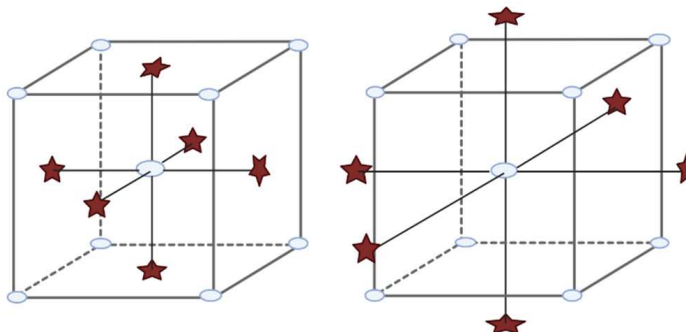
2.6.5 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός

Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός απαιτεί $2^{k-p} + 2k + C_p$ πειράματα, όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων, p το μέγεθος του κλάσματος και C_p είναι το κεντρικό σημείο του πειραματικού πεδίου. Σε αντίθεση με τους σχεδιασμούς διαλογής, οι σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης έχουν υποχρεωτικά κεντρικά σημεία (Stojanović et al., 2021). Οι παράγοντες μελετώνται σε πέντε επίπεδα $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$. Όλοι οι παράγοντες στα σημεία αστέρα ορίζονται στο 0 εκτός από έναν παράγοντα που λαμβάνει την τιμή $\pm\alpha$. Η τιμή α εξαρτάται από τον αριθμό των παραγόντων και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 1 και \sqrt{k} . Ο σχεδιασμός μπορεί να γίνει περιστροφικός με επιλογή της τιμής του α . Έτσι, η τιμή $\alpha = (f)^{1/4}$ δίνει έναν περιστροφικό σχεδιασμό, όπου f ο αριθμός των σημείων του παραγοντικού σχεδιασμού (Candiotti et al, 2014). Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός μπορεί να ταξινομηθεί στα παρακάτω είδη:

- Στον περιγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Circumscribed Design, CCCD).
- Στον εγγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Inscribed Design, CCID).
- Στον εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Face Centered Composite Design, FCCD).

Στον περιγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCCD) τα αξονικά σημεία βρίσκονται σε κύκλο που είναι περιγεγραμμένος στο τετράγωνο του σχεδιαστικού χώρου και σε ίση απόσταση από το κέντρο με $|\alpha| > 1$. Εξαιτίας της πιθανότητας να λείπουν κάποια σημαντικά δεδομένα ο περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός θεωρείται ακατάλληλος όταν τα αξονικά σημεία βρίσκονται πολύ μακριά από το κεντρικό σημείο ή όταν τέτοιες ακραίες τιμές των εξεταζόμενων παραγόντων δεν είναι εφικτές (Leardi, 2013). Στον εγγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCID) τα σημεία αστέρων βρίσκονται εντός του χώρου του παραγοντικού σχεδιασμού και τα αξονικά σημεία $+\alpha$ και $-\alpha$ παίρνουν τις τιμές των ορίων ± 1 . Στον εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (FCCD) το α παίρνει την τιμή 1, οπότε τα σημεία αστέρων βρίσκονται στο κέντρο κάθε πλευράς του παραγοντικού χώρου (Hibbert, 2012). Στο Σχήμα 9 απεικονίζονται μια γραφική αναπαράσταση ενός εδροκεντρώμενου κεντρικού σύνθετου

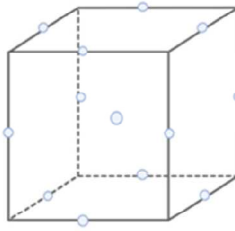
σχεδιασμού (αριστερά) και ενός περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (δεξιά).



Σχήμα 9 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός με 3 παράγοντες α) εδροκεντρώμενος β) περιγεγραμμένος (Stojanović et al., 2021)

2.6.6 Σχεδιασμός Box-Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken αποτελεί μια τροποποίηση ενός παραγοντικού σχεδιασμού τριών επιπέδων, όπου ένας παράγοντας διατηρείται στην κεντρική τιμή σε κάθε πείραμα, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται ακόμα ένα τουλάχιστον πείραμα στο κέντρο. Ο σχεδιασμός αυτός μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για τρεις ή περισσότερους παράγοντες, όπου κάθε παράγοντας εξετάζεται σε τρία επίπεδα και τα πειραματικά σημεία τοποθετούνται σε ίση απόσταση από το κεντρικό σημείο (Ranade & Thiagarajan, 2017). Ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων είναι $N = 2k(k-1) + C_p$ και ο σχεδιασμός είναι σχεδόν περιστροφικός (Stojanović et al., 2021). Οι παράγοντες στο σχεδιασμό Box-Behnken δεν εξετάζονται στα υψηλότερα και στα χαμηλότερα επίπεδα όπως φαίνεται στο Σχήμα 10 (Stojanović et al., 2021). Ο σχεδιασμός Box-Behnken εφαρμόζεται όταν είναι γνωστό ότι το βέλτιστο βρίσκεται στο κέντρο του εύρους των παραγόντων ή όταν τα πειραματικά σημεία με όλους τους παράγοντες σε ακραία επίπεδα δεν είναι χρήσιμα ή εφικτά (Hibbert, 2012; Dejaegher & Vander Heyden, 2011).

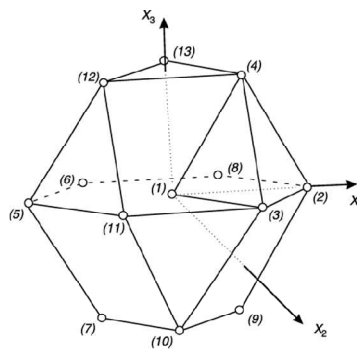


Σχήμα 10 Σχεδιασμός Box-Behnken

(Stojanović et al., 2021)

2.6.7 Σχεδιασμός Doehlert

Στο σχεδιασμό Doehlert τα πειραματικά σημεία κατανέμονται σε ένα σφαιρικό κέλυφος. Ο σχεδιασμός δεν είναι περιστροφικός, δηλαδή μπορεί να δώσει διαφορετικά επίπεδα ποιότητας εκτιμήσεων για διαφορετικούς παράγοντες (Hibbert, 2012). Παρόλα αυτά, ο σχεδιασμός αυτός έχει υψηλή απόδοση, καθώς ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται είναι $N = k^2 + k + C_p$. Ως προς την κατανομή των πειραματικών σημείων, για δύο παράγοντες ο σχεδιασμός Doehlert είναι ένα κανονικό εξάγωνο, ενώ για τρεις παράγοντες είναι ένα γεωμετρικό στερεό που ονομάζεται κεντρώμενο δωδεκάεδρο (Bezzera et al., 2008), όπως φαίνεται στο Σχήμα 11 (Stojanović et al., 2021).



Σχήμα 11 Σχεδιασμός Doehlert για 3 παράγοντες

(Stojanović et al., 2021)

Ο κάθε παράγοντας μελετάται σε διαφορετικό αριθμό επιπέδων. Το γεγονός αυτό συντελεί στη διαφοροποίηση των μεταβλητών, καθώς οι παράγοντες που θεωρούνται πιο σημαντικοί μπορούν να δοκιμαστούν σε περισσότερα επίπεδα (Hibbert, 2012).

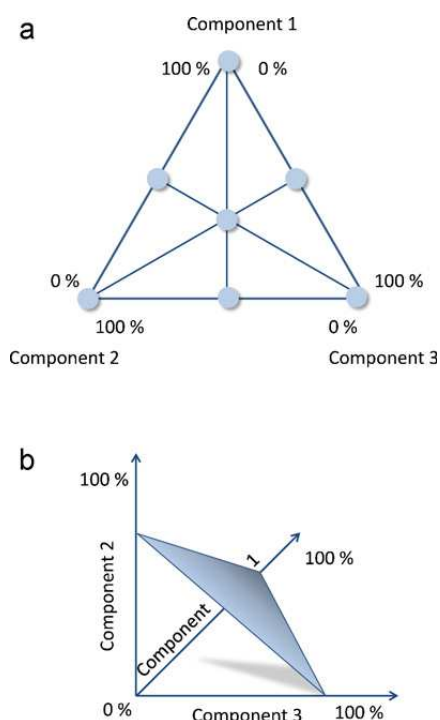
2.6.8 D-βέλτιστος σχεδιασμός

Ο D-βέλτιστος (Do-D) σχεδιασμός δημιουργείται με βάση αλγόριθμους υπολογιστών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για διαλογή όσο και για βελτιστοποίηση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμος όταν ο επιθυμητός αριθμός των πειραμάτων είναι μικρότερος από αυτόν που απαιτείται για ένα κλασικό σχεδιασμό ή όταν οι πειραματικές περιοχές είναι ακανόνιστες (Ranade & Thiagarajan, 2017). Οι πειραματικοί περιορισμοί μπορεί να αποτελέσουν εμπόδιο στην εφαρμογή των συμμετρικών σχεδιασμών βελτιστοποίησης. Στην περίπτωση αυτή ο D-βέλτιστος σχεδιασμός είναι μια πολύτιμη λύση, αφού λειτουργεί ικανοποιητικά τόσο με ασύμμετρες όσο και με συμμετρικές περιοχές. Το ιδιαίτερο πλεονέκτημα του σχεδιασμού έγκειται στην ικανότητά του να εκτιμά ποσοτικούς και ποιοτικούς παράγοντες και να προκαθορίζει το μαθηματικό μοντέλο. Ο ελάχιστος αριθμός πειραμάτων είναι ίσος με τον αριθμό των συντελεστών στο υποθετικό μοντέλο (συνήθως τετραγωνικό μοντέλο χωρίς όρους αλληλεπίδρασης) (Stojanović et al., 2021). Το σύνολο των πειραμάτων που θα εκτελεστούν επιλέγεται από το συνολικό αριθμό των πιθανών συνδυασμών των παραγόντων. Αυτό το υποσύνολο είναι ένας συνδυασμός πειραμάτων με τη μέγιστη ορίζουσα για $X^T X$ (όπου X είναι ο πίνακας του μοντέλου, X^T είναι ο ανάστροφος του X και $X^T X$ είναι ο πίνακας πληροφορίας του γραμμικού μοντέλου που προσαρμόζεται). Όταν επιτευχθεί η μέγιστη ορίζουσα, η ακρίβεια των συντελεστών του μαθηματικού μοντέλου διασφαλίζεται ακόμα και πριν τη διενέργεια του πειραματισμού και της στατιστικής αξιολόγησης (Leardi, 2009). Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία της διερεύνησης όλων των πιθανών συνδυασμών των παραγόντων. Για την απλοποίηση αυτής της διαδικασίας και την παροχή ακριβών συντελεστών του μοντέλου εφαρμόζονται διάφοροι αλγόριθμοι (Komsta et al., 2018).

2.6.9 Σχεδιασμός μειγμάτων

Ο σχεδιασμός μειγμάτων (Mixture Design) χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση μειγμάτων, όπως για παράδειγμα οι κινητές φάσεις στην χρωματογραφική ανάλυση. Ο περιορισμός του σχεδιασμού έγκειται στο γεγονός ότι το άθροισμα όλων των συστατικών του μείγματος πρέπει να είναι 1 (100%) σε κάθε σημείο της πειραματικής περιοχής. Έτσι, το μαθηματικό μοντέλο που λαμβάνεται δεν περιέχει το σημείο τομής με τον άξονα των y ,

επειδή δεν είναι δυνατό η περιεκτικότητα όλων των συστατικών ενός μείγματος να είναι 0%. Οι όροι του μαθηματικού μοντέλου δεν συσχετίζονται ικανοποιητικά με τις επιδράσεις των παραγόντων και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αξιολόγησή τους (Stojanović et al., 2021). Η γραφική αναπαράσταση ενός μείγματος τριών συστατικών είναι ένα ισόπλευρο τρίγωνο του οποίου οι κορυφές αναφέρονται σε μεμονωμένα συστατικά, οι πλευρές σε δυαδικά μείγματα και τα εσωτερικά σημεία σε τριαδικά μείγματα (Stojanović et al., 2021), όπως φαίνεται στο Σχήμα 12 (Hibbert, 2012).



Σχήμα 12 α) Σχεδιασμός μείγματος για 3 συστατικά που αθροίζονται σε 100% και β) το επίπεδο του σχεδιασμού στον τρισδιάστατο χώρο παραγόντων (Hibbert, 2012)

2.6.10 Σχεδιασμός ορθογώνιου πίνακα

Ο σχεδιασμός ορθογώνιου πίνακα (Orthogonal Array Design, OAD) είναι ένα είδος κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού που βασίζεται σε έναν πίνακα σχεδιασμού με επιλεγμένους συνδυασμούς πολλαπλών παραγόντων σε πολλαπλά επίπεδα. Σύμφωνα με τις ιδιότητες του ορθογώνιου πίνακα, μεταξύ κάθε ζεύγους στηλών κάθε συνδυασμός επιπέδων εμφανίζεται ίσες φορές. Με αυτόν τον σχεδιασμό είναι δυνατόν να εκτιμηθούν τα κύρια αποτελέσματα και οι αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων. Ο OAD μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο στη διαδικασία διαλογής όσο και βελτιστοποίησης για όσο διάστημα τα δεδομένα δεν παρουσιάζουν καμπυλότητα (Montgomery, 1997).

Μια σύνοψη των χαρακτηριστικών των κύριων σχεδιασμών διαλογής και βελτιστοποίησης απεικονίζεται στον Πίνακα 3 (Park et al., 2022).

Είδος Σχεδιασμού Πειραμάτων	Σχεδιασμός Πειραμάτων	Γενικός Αριθμός Παραγόντων (k)	Επίπεδα	Αριθμός Πειραμάτων (N)
Σχεδιασμοί Διαλογής	FFD 2 επιπέδων	$2 < k < 5$	2	2^k
	FrFD 2 επιπέδων	$k > 3$	2	2^{k-p}
	Plackett-Burman	$k < N - 1$	2	N
Σχεδιασμοί βελτιστοποίησης	FFD 3 επιπέδων	$2 < k < 3$	3	3^k
	CCD	$2k < 5$	5	$2^k + 2k + C_p$
	Box-Behnken	$3 < k < 5$	3	$2k(k-1) + C_p$
	Doehlert	2 ή 3	Πολλαπλά	$k^2 + k + C_p$

Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά κύριων σχεδιασμών πειραμάτων διαλογής και βελτιστοποίησης
(Park et al., 2022 προσαρμογή στα Ελληνικά)

2.7 Επιλογή σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία

Ο κύριος σκοπός της ανάπτυξης μιας μεθόδου στην Αναλυτική Χημεία είναι η ανακάλυψη των συνθηκών μιας αναλυτικής διαδικασίας που οδηγούν στη βέλτιστη απόδοση. Σε αυτό το πλαίσιο ο σχεδιασμός πειραμάτων διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο (Candiotti et al., 2014). Η ανάπτυξη μιας μεθόδου μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα δύο είδη αναλυτικών ζητημάτων: το στάδιο διαλογής και το στάδιο βελτιστοποίησης. Στο στάδιο της διαλογής διερευνώνται πολλοί παράγοντες προκειμένου να εντοπιστούν αυτοί που ασκούν σημαντική επίδραση στις επιλεγμένες αποκρίσεις, ενώ στο στάδιο της βελτιστοποίησης οι παράγοντες εξετάζονται περαιτέρω σε βάθος για τον εντοπισμό των καλύτερων αναλυτικών συνθηκών που επιφέρουν τη βελτιστοποίηση των αποκρίσεων (Eriksson et al., 2008). Μετά τη βελτιστοποίηση ο

σχεδιασμός πειραμάτων χρησιμοποιείται επίσης στην επικύρωση μεθόδου για την εκτέλεση δοκιμών ανθεκτικότητας (robustness) και επομένως για την αξιολόγηση της επίδρασης μικρών και σκόπιμων αλλαγών των συνθηκών λειτουργίας στην απόδοση της μεθόδου (ICH, 2005a).

Η επιλογή του κατάλληλου είδους πειραματικού σχεδιασμού που θα εφαρμοστεί θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά λαμβάνοντας υπόψη διάφορες πτυχές που σχετίζονται κυρίως με τους στόχους της μελέτης καθώς και το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου. Άλλες θεμελιώδεις πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του κατάλληλου σχεδιασμού είναι ο τύπος του πολυωνυμικού μοντέλου που εκτιμάται (γραμμικό ή τετραγωνικό, με ή χωρίς αλληλεπιδράσεις), ο αριθμός των παραγόντων, το λειτουργικό κόστος και οι χρονικοί περιορισμοί (Hibbert, 2012).

Στο στάδιο διαλογής και στη δοκιμή ανθεκτικότητας εφαρμόζονται κυρίως σχεδιασμοί διαλογής, ενώ κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης χρησιμοποιούνται σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης. Ο σχεδιασμός διαλογής επιτρέπει την αξιολόγηση των επιπτώσεων ενός σχετικά μεγάλου αριθμού παραγόντων από ένα μικρό αριθμό πειραμάτων ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των βασικών παραγόντων που επηρεάζουν την αναλυτική απόδοση της μεθόδου (Montgomery, 1997). Ο σχεδιασμός επιφάνειας απόκρισης ερευνά τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επιλέγονται γενικά με βάση τα αποτελέσματα του σταδίου διαλογής, προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες μέσω των επιφανειών απόκρισης ή των περιγραμμάτων καμπύλης (Dejaegher et al., 2013).

Γενικά, η απόφαση για την επιλογή του κατάλληλου σχεδιασμού πειραμάτων πρέπει να γίνεται με βάση τον αριθμό των μεταβλητών εισόδου, τη γνώση σχετικά με τις ελεγχόμενες παραμέτρους και την κατανόηση της σχέσης μεταξύ αποτελέσματος και μεταβλητής (αν υπάρχει). Η στατιστική γνώση είναι πρωταρχικής σημασίας για την ερμηνεία της αλληλεπίδρασης και της συμβολής των μεταβλητών (X_n) στις αποκρίσεις μεθόδου (Y_n), που χρησιμεύουν ως εργαλείο για την επιλογή μεταβλητών στα βέλτιστα επίπεδα (Peraman et al., 2015). Για παράδειγμα, αν πρέπει να μετρηθεί η επίδραση όλων των μεταβλητών εισόδου και των αλληλεπιδράσεων τους, τότε μπορεί να εφαρμοστεί παραγοντικός σχεδιασμός και η βελτιστοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με σχεδιασμούς επιφανειών απόκρισης (RSD). Η μέθοδος Taguchi μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μικρότερο αριθμό πειραμάτων σε σύγκριση με τους παραγοντικούς σχεδιασμούς (50%,

25% κ.λπ.), αλλά οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων σύγχυσης πρέπει να επιλυθούν (Peraman et al., 2015). Όταν πρέπει να μελετηθούν μεγάλοι αριθμοί μεταβλητών εισόδου χωρίς τις επιδράσεις αλληλεπίδρασης, τότε μπορούν να εφαρμοστούν οι σχεδιασμοί Plackett-Burman. Μια τυπική επιλογή σχεδιασμών πειραμάτων απεικονίζεται στον Πίνακα 4 (Peraman et al., 2015).

Σχεδιασμός Πειραμάτων	Αριθμός Παραγόντων και χρήση	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός	Βελτιστοποίηση/ 2-5 μεταβλητές	Αναγνώριση των κύριων επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων χωρίς σύγχυση	Τα πειράματα αυξάνονται με τον αριθμό των μεταβλητών
Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός ή μέθοδοι Taguchi	Βελτιστοποίηση/και μεταβλητές διαλογής	Μικρός αριθμός πειραμάτων	Η επίλυση των επιδράσεων σύγχυσης των αλληλεπιδράσεων είναι δύσκολη
Plackett-Burman	Διαλογή/ή αναγνώριση λίγων σημαντικών παραγόντων από έναν μεγάλο αριθμό μεταβλητών	Μικρός αριθμός πειραμάτων για ένα μεγάλο αριθμό μεταβλητών	Δεν αποκαλύπτει τις επιδράσεις των αλληλεπιδράσεων

Πίνακας 4 Επιλογή σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία
(Peraman et al., 2015 προσαρμογή στα Ελληνικά)

2.8 Ο ρόλος του σχεδιασμού πειραμάτων στην ποιότητα μέσω σχεδιασμού

Η ποιότητα μέσω σχεδιασμού (Quality-by-Design, QbD) εισήχθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (Federal Drug Administration, FDA) και χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη φαρμάκων με απώτερο στόχο την ενσωμάτωση της ποιότητας στο τελικό προϊόν (Stojanović et al., 2021). Οι αναλυτικές διαδικασίες παίζουν σημαίνοντα ρόλο στην εκτίμηση αυτής της ποιότητας και για το λόγο αυτό το η QbD έχει εγκριθεί από το Διεθνές Συμβούλιο Εναρμόνισης (International Council for Harmonization, ICH) και έχουν δημοσιευτεί ειδικές ICH κατευθυντήριες γραμμές για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων (ICH Q8, 2009; ICH Q9, 2005b; ICH Q10, 2008, ICH Q11, 2012). Αυτή η προσέγγιση έχει μεταφερθεί στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων με την επωνυμία αναλυτική ποιότητα μέσω σχεδιασμού (Analytical Quality by Design, AQbD) (Vogt & Kord, 2011). Σε μια σχετικά πρόσφατη κατευθυντήρια γραμμή που δημοσιεύτηκε από τον FDA αναφέρεται ότι η ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου για φάρμακα και βιολογικά προϊόντα θα πρέπει να αξιολογείται με συστηματική προσέγγιση που περιλαμβάνει αρχική εκτίμηση κινδύνου και πολυπαραγοντική πειραματική προσέγγιση, όπως ο σχεδιασμός πειραμάτων (FDA, 2015). Ωστόσο, αυτή η κατευθυντήρια γραμμή αποτελεί ένα σύνολο συστάσεων και δεν αποδίδει νομικές ευθύνες σε περίπτωση μη τήρησης των γραμμών αυτών (Stojanović et al., 2021).

Σύμφωνα με την ροή εργασιών της AQbD, η ανάπτυξη μεθόδου μπορεί να χωριστεί στα παρακάτω βήματα (Park et al., 2022):

- Ορισμός αναλυτικού προφίλ στόχου και ανίχνευσης μεθόδου.
- Εκτίμηση κινδύνου και ορισμός των κρίσιμων παραμέτρων μεθόδου (Critical Method Parameters, CMPs) καθώς και των κρίσιμων χαρακτηριστικών μεθόδου (Critical Method Attributes, CMAs).
- Σχεδιασμός πειραμάτων για την αξιολόγηση των επιπτώσεων των CMPs στα CMAs.
- Ορισμός του χώρου σχεδιασμού (Design Space, DS) ή της λειτουργικής περιοχής σχεδιασμού μεθόδου (Method Operable Design Region, MODR).
- Έλεγχος μεθόδου.

Η λειτουργική περιοχή σχεδιασμού μεθόδου (MODR), που προαναφέρθηκε και είναι γνωστή και ως χώρος σχεδιασμού (DS), αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου. Είναι η περιοχή ανθεκτικότητας, όπου η επίδραση των CMPs (μεταβλητές εισόδου) στα CMAs πληροί τις επιθυμητές αναλυτικές παραμέτρους που συντάσσονται στο αναλυτικό προφίλ στόχου (Analytical Target Profile, ATP), το οποίο συνοψίζει τις απαιτήσεις που σχετίζονται με μια μέτρηση σε ένα χαρακτηριστικό ποιότητας που πρέπει να ικανοποιείται και χρησιμοποιείται για τον ορισμό και την αξιολόγηση της καταλληλότητας μιας αναλυτικής διαδικασίας στη φάση ανάπτυξης και κατά τη διάρκεια όλων των αλλαγών στον αναλυτικό κύκλο ζωής (Jackson et al., 2019). Ο προσδιορισμός της MODR κατά την ανάπτυξη της μεθόδου μπορεί να υποκαταστήσει τη δοκιμή ανθεκτικότητας στο τέλος της επικύρωσης της μεθόδου (Saha et al., 2020). Η MODR είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη μεταφορά μεθόδων ανάμεσα στα εργαστήρια (Ganorkar & Gupta, 2017).

Μέσω αυτής της συστηματικής ανάπτυξης είναι δυνατόν να επιτευχθούν βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης καθώς και ανθεκτικές αναλυτικές μέθοδοι. Σε αυτό το πλαίσιο βασικό ρόλο παίζει ο σχεδιασμός πειραμάτων ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού μαθηματικών μοντέλων που συσχετίζουν τις CMPs με τα CMAs καθώς και εντοπισμού της βέλτιστης ζώνης με τη χρήση εργαλείων πολυκριτηριακής λήψης αποφάσεων (Orlandini et al., 2013). Ο σχεδιασμός πειραμάτων ουσιαστικά αποτελεί μέρος της AQbD και αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβλητών εισόδου που επηρεάζουν τελικά την απόκριση της μεθόδου και τα αποτελέσματα (Peraman et al., 2015). Γενικά, αρχικά επιτελούνται σχεδιασμοί διαλογής που επικεντρώνονται σε όλες τις επιλεγμένες από την ανάλυση κινδύνου CMPs και στη συνέχεια πραγματοποιείται η φάση βελτιστοποίησης με τη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (RSM) για να αποκτηθεί σε βάθος γνώση για την επίδραση των επιλεγμένων CMPs (Deidda et al., 2018).

3. Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων

Η εφαρμογή του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων διαχωρισμού παρουσιάζει αναμφίβολα σημαντικά πλεονεκτήματα καθιστώντας δυνατή την απόκτηση αποτελεσμάτων υψηλής ποιότητας με περιορισμένο αριθμό πειραμάτων. Ο κύριος στόχος της φαρμακευτικής ανάλυσης είναι η διασφάλιση της ποιότητας των ενεργών φαρμακευτικών συστατικών (Active Pharmaceutical Ingredients, APIs) ή και των φαρμακευτικών προϊόντων (Ahuja, 2011). Η ανάλυση περιλαμβάνει την αξιολόγηση της καθαρότητας της φαρμακευτικής ουσίας, την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ενεργών φαρμακευτικών συστατικών σε δοσολογικές μορφές, τον έλεγχο της σταθερότητας των ενεργών φαρμακευτικών συστατικών και του φαρμάκου, τη βιοανάλυση κ.α. (Watson, 2020, όπως αναφ. σε Jančić-Stojanović, 2013). Καθώς απαιτείται η τήρηση αυστηρών προδιαγραφών ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων, η μέθοδος πρέπει να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ανάπτυξης αποτελεσματικών μεθόδων. Η επικύρωση μεθόδου είναι μια διαδικασία που δείχνει την καταλληλότητα της αναπτυγμένης αναλυτικής μεθόδου για τον επιδιωκόμενο σκοπό και περιλαμβάνει την εκτίμηση της ανθεκτικότητας, της επιλεκτικότητας, της ακρίβειας καθώς και άλλων παραμέτρων επικύρωσης της μεθόδου (Lobrutto & Patel, 2007).

Οι κύριες διαχωριστικές τεχνικές που εφαρμόζονται γενικά στη σύγχρονη χημική και φαρμακευτική ανάλυση περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία και την ηλεκτροφόρηση με ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) ή φασματοόμετρο μαζών (Mass Spectrometer, MS). Αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ανάπτυξης και επικύρωσης των αναλυτικών μεθόδων των παραπάνω τεχνικών αποτελεί ο σχεδιασμός πειραμάτων. Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί την πιο συχνά εφαρμοζόμενη διαχωριστική τεχνική ιδιαίτερα στον έλεγχο των πρώτων υλών. Ακόμη, συχνά χρησιμοποιείται η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) με τις συναφείς τεχνικές της, ενώ πρόσφατα άρχισε να εφαρμόζεται και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical Fluid Chromatography, SFC).

3.1 Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, τον καθαρισμό και την ποσοτικοποίηση των διαφόρων χημικών ενώσεων. Ανάλογα με τη φύση αυτών των ενώσεων έχουν προκύψει διάφοροι τύποι υγρής χρωματογραφίας, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC), χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), χειρόμορφη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Chiral HPLC), μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (Ion Exchange Chromatography, IEC), χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (Ion Pair Chromatography, IPC), χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC) και υδρόφιλη υγρή χρωματογραφία αλληλεπίδρασης (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια από τις αναντικατάστατες τεχνικές στη σύγχρονη φαρμακευτική ανάλυση και όχι μόνο. Ωστόσο, παρά την ευρεία χρήση της σε διάφορους τομείς της έρευνας, η βελτιστοποίηση αξιόπιστων μεθόδων HPLC αποτελεί πρόκληση, καθώς ένας επιτυχής διαχωρισμός εξαρτάται από τον ταυτόχρονο έλεγχο πολυάριθμων παραγόντων που επηρεάζουν τη συγκράτηση των αναλυτών (Mattrey et al., 2017). Για δεκαετίες αυτό το πρόβλημα αντιμετωπιζόταν με την προσέγγιση δοκιμής-λάθους. Παρόλα αυτά, αυτή η μεθοδολογία είναι χρονοβόρα και περιλαμβάνει υψηλό φόρτο εργασίας και υπερβολική κατανάλωση αντιδραστηρίων και τοξικών οργανικών διαλυτών. Αξίζει να σημειωθεί ακόμα, ότι οι βέλτιστες συνθήκες εργασίας δεν μπορούν ποτέ να διασφαλιστούν πραγματικά και έτσι η χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων κρίνεται απαραίτητη (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017).

Η ποιότητα του διαχωρισμού της τεχνικής HPLC που βασίζεται στο σχεδιασμό πειραμάτων εξαρτάται από τη σωστή αναγνώριση όλων των σημαντικών μεταβλητών. Αν μια σημαντική μεταβλητή δεν εντοπιστεί ως παράγοντας μπορεί να εμφανιστούν προβλήματα στο αναλυτικό σύστημα. Από την άλλη, αν μια ασήμαντη μεταβλητή

προσδιορίζεται ως παράγοντας, μπορεί κάποια στάδια έρευνας να γίνουν ιδιαίτερα περίπλοκα (Jančić-Stojanović, 2013). Αν μια αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνει παραγωγοποίηση ή εκχύλιση, οι παράγοντες που σχετίζονται με αυτά τα στάδια θα πρέπει να διερευνηθούν χωριστά (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017). Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τον διαχωρισμό με HPLC είναι οι παρακάτω (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017):

- **Χρωματογραφική στήλη** (είδος, κατασκευαστής, ηλικία, μήκος, θερμοκρασία, χρόνος εξισορρόπησης).
- **Εκχύλιση** (θερμοκρασία, είδος διαλύτη)
- **Κινητή φάση** (είδος και συγκέντρωση οργανικών τροποποιητών, αναλογία συστατικών, κατασκευαστής διαλύτη, pH, συγκέντρωση ρυθμιστικού, συγκέντρωση άλατος, ιοντική δύναμη, ρυθμός ροής, παράμετροι βαθμωτής έκλουσης, όγκος οξέος, είδος οξέος που χρησιμοποιείται ως πρόσθετο)
- **Ανιχνευτής** (είδος, μήκος κύματος, αναλογία σήματος θορύβου, σταθερά χρόνου)
- **Παραγωγοποίηση** (θερμοκρασία, συγκέντρωση αντιδραστηρίων, είδος καταλύτη, είδος διαλύτη).
- **Διάφοροι** (όγκος έγχυσης, θερμοκρασία και συγκέντρωση στρεσογόνων παραγόντων για μελέτες σταθερότητας, είδος στρεσογόνου παράγοντα, προκατεργασία δείγματος).

Ο αριθμός των παραγόντων και η επιλογή των αντίστοιχων επιπέδων εξαρτώνται από την επιδιωκόμενη χρήση ενός συγκεκριμένου σχεδιασμού. Γενικά, όταν ο σχεδιασμός πειραμάτων χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη μεθόδων ή σε δοκιμές ανθεκτικότητας, θα πρέπει να εξεταστεί ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων σε δύο επίπεδα. Ωστόσο, στο στάδιο βελτιστοποίησης της μεθόδου ερευνώνται μόνο οι πιο σημαντικοί παράγοντες τουλάχιστον σε τρία επίπεδα. Η γενική διαδικασία υπόκειται σε αλλαγές ανάλογα με τον διαθέσιμο χρόνο, τους σχετικούς πόρους και την εμπειρία του αναλυτή (Stojanović et al., 2021). Συνήθως, τοποθετούνται τα επίπεδα συντελεστών συμμετρικά γύρω από το ονομαστικό επίπεδο (nominal level). Το διάστημα μεταξύ τους μπορεί να οριστεί με βάση την εμπειρία, ή την ακρίβεια, δηλαδή την αβεβαιότητα με την οποία μπορεί να προσαρμοστεί η τιμή ενός παράγοντα (Dejaegher & Vander Heyden, 2007). Η σωστή επιλογή του επιπέδου συντελεστών είναι πιο καθοριστική από την επιλογή του σχεδιασμού πειραμάτων (Hibbert, 2012).

Όσον αφορά τις αποκρίσεις, στη φάση διαλογής της ανάπτυξης μεθόδου μετρούνται συχνά οι παράγοντες κατακράτησης και η επιλεκτικότητα. Στη φάση της βελτιστοποίησης επιλέγονται συνήθως οι παράγοντες κατακράτησης, ανάλυσης και χρωματογραφικής απόκρισης. Σε δοκιμές ανθεκτικότητας επιλέγονται ποσοτικές αποκρίσεις (περιεχόμενο ενεργού φαρμακευτικού συστατικού (Active Pharmaceutical Ingredient, API), ή υποπροϊόντα, ύψος κορυφής, εμβαδό κορυφής. Ακόμη, μπορεί να επιλεγούν και αποκρίσεις που περιγράφουν την ποιότητα του διαχωρισμού (συντελεστής ανάλυσης, σχετικός χρόνος κατακράτησης, συντελεστής κατακράτησης, αριθμός θεωρητικών πλακών, ουρά κορυφής, αναλογία κορυφής προς κοιλάδα) (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017; Jančić-Stojanović, 2013).

3.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Σε μια πρόσφατη μελέτη που παρουσιάστηκε από τους Sylvester et al. (2018) η ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου HPLC για το διαχωρισμό κουρκουμινών και του αντιβιοτικού δοξορουβικίνη σε ένα σκεύασμα λιποσώματος μακράς κυκλοφορίας επιτεύχθηκε με χρήση ενός D-βέλτιστου πειραματικού σχεδιασμού. Χρησιμοποιώντας μια μέθοδο HPLC βαθμωτής έκλουσης το κρίσιμο βήμα στην ανάπτυξη μεθόδου και επομένως στο σχεδιασμό πειραμάτων ήταν η βελτιστοποίηση του προγράμματος βαθμωτής έκλουσης που όριζε το χρονικό διάστημα για τους δύο διαλύτες σε δεδομένο ποσοστό, στον αρχικό ισοκρατικό χρόνο συγκράτησης και καθαρισμού.

Μια άλλη μελέτη που παρουσιάστηκε από τους Kumar et al. (2015) περιέγραψε την ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό της βαλσαρτάνης σε νανοσωματίδια. Η βαλσαρτάνη είναι η δραστική ουσία ενός φαρμακευτικού σκευάσματος που χρησιμοποιείται για την υπέρταση. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός που συμπεριέλαβε ως παράγοντες το ρυθμό ροής, το μήκος κύματος ανίχνευσης και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Ως αποκρίσεις λήφθηκαν το εμβαδό κορυφής, η ουρά της κορυφής και ο αριθμός θεωρητικών πλακών. Οι βελτιστοποιημένες ρυθμίσεις παραμέτρων απέδωσαν καλά όσον αφορά τις προβλεπόμενες έναντι παρατηρούμενες τιμές απόκρισης, υποδεικνύοντας τη χρησιμότητα του σχεδιασμού πειραμάτων στην ανάπτυξη της μεθόδου.

Σε άλλη μελέτη αναπτύχθηκε μια μέθοδος HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φαμπριδίνης στη στερεά από του στόματος δοσολογική μορφή εφαρμόζοντας έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό πειραμάτων (Konács et al., 2020). Η φαμπριδίνη χρησιμοποιείται για τη βελτίωση των συμπτωμάτων της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Ο παραγοντικός σχεδιασμός συμπεριέλαβε ως παράγοντες το ρυθμό ροής, τη θερμοκρασία στήλης και την αναλογία του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση και ως αποκρίσεις το χρόνο κατακράτησης, τον αριθμό θεωρητικών πλακών και την ουρά κορυφής. Επιπλέον, κατά τη φάση επικύρωσης η ανθεκτικότητα της μεθόδου εξετάστηκε εφαρμόζοντας έναν σχεδιασμό Plackett-Burman, προκειμένου να αποδειχθεί ότι μικρές τροποποιήσεις στις ρυθμίσεις παραμέτρων δεν επηρεάζουν σημαντικά τις επιλεγμένες αποκρίσεις.

Σχεδιασμός πειραμάτων εφαρμόστηκε και στην ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό σακχάρων σε βοτανικά εκχύλισμα (Shao et al., 2018). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ο ταυτόχρονος προσδιορισμός D-φρουκτόζης, D-γλυκόζης ή σακχαρόζης και σουκρόζης σε δύο φαρμακευτικά βότανα που περιέχονται στη βοτανική ένεση Shenqi Fuzheng. Η ένεση αυτή χρησιμοποιείται ευρέως ως βοηθητικό φάρμακο για την κλινική θεραπεία του καρκίνου στην Κίνα (Qi et al., 2015). Ο προσδιορισμός των παραπάνω σακχάρων είναι χρήσιμος για τον ποιοτικό έλεγχο της ένεσης Shenqi Fuzheng. Διερευνήθηκαν ορισμένοι παράγοντες διαχωρισμού και ανίχνευσης, όπως η αρχική περιεκτικότητα του διαλύτη B στην κινητή φάση, η τελική περιεκτικότητα του διαλύτη B στην κινητή φάση, ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης, η θερμοκρασία στήλης, ο χρόνος βαθμωτής έκλουσης, η αναλογία τριαιθυλαμίνης στην κινητή φάση, η θερμοκρασία μετατόπισης του ανιχνευτή και ο ρυθμός ροής του αερίου αζώτου. Για την ανάλυση των επιδράσεων των παραπάνω παραμέτρων στα αναλυτικά αποτελέσματα εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων. Ως αποκρίσεις λήφθηκαν ο χρόνος κατακράτησης της D-γλυκόζης στο ένα βοτανικό εκχύλισμα, η αναλογία σήματος-θορύβου της D-γλυκόζης και ο χρόνος κατακράτησης της D-γλυκόζης στο άλλο βοτανικό εκχύλισμα. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ένας σχεδιασμός Box-Behnken με πέντε κεντρικά σημεία για την αξιολόγηση των ποσοτικών επιδράσεων των παραγόντων στις αποκρίσεις.

Σε μια μελέτη των R. M. Ahmed et al. (2018) χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός πειραμάτων για την ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου HPLC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων αντιδιαβητικών φαρμάκων (μετοφορμίνη HCl, βιλδαγλιπτίνη, μονοένυδρη

φωσφορική σιταγλιπτίνη και πιογλιταζόνη HCl) στη φαρμακευτική δοσολογική τους μορφή. Για τον έλεγχο των μεταβλητών και τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών χρησιμοποιήθηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (2^{4-1}) και κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός αντίστοιχα. Ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός συμπεριέλαβε ως παράγοντες το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, τα ποσοστά μεθανόλης και ακετονιτριλίου της κινητής φάσης και το μήκος κύματος του ανιχνευτή. Ως αποκρίσεις λήφθηκαν η συμμετρία της κορυφής της μετορμίνης, η ανάλυση ανάμεσα στην μετορμίνη και την βιλδαγλιπτίνη και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης.

Παρομοίως, σε μια μελέτη των Gundala et al. (2019) αναπτύχθηκε μια απλή, ευαίσθητη, ακριβής και ανθεκτική μέθοδος HPLC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο αντιδιαβητικών φαρμάκων και συγκεκριμένα της σαξαγλιπτίνης (Saxagliptin, SAXA) και της δαπαγλιφοζίνης (Dapagliflozin, DAPA) σε φαρμακευτικό σκεύασμα. Εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (3^2) με παράγοντες την αναλογία του οργανικού διαλύτη (ακετονιτριλίου) στην κινητή φάση, το ρυθμό ροής της κινητής φάσης και την θερμοκρασία στήλης. Ως αποκρίσεις στο σχεδιασμό πειραμάτων λήφθηκαν ο χρόνος κατακράτησης της SAXA, ο χρόνος κατακράτησης της DAPA και η ανάλυση. Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός εφαρμόστηκε για τη μελέτη των επιδράσεων των τριών ανεξάρτητων παραγόντων στις τρεις μεταβλητές απόκρισης.

Η κανναβιδιόλη (Cannabidiol, CBD) και η Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη (Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC) θεωρούνται ως τα πιο ενδιαφέροντα συστατικά της κάνναβης για την κλινική πρακτική. Σε αυτό το πλαίσιο αναπτύχθηκε μια γρήγορη μέθοδος HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της CBD και της Δ^9 -THC σε εκχυλίσματα ελαιολάδου κάνναβης (Deidda et al., 2019). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός Doehlert. Ως παράγοντες επιλέχθηκαν η θερμοκρασία στήλης, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και ο ρυθμός ροής και ως αποκρίσεις η ανάλυση ανάμεσα στις κορυφές των δύο συστατικών και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης.

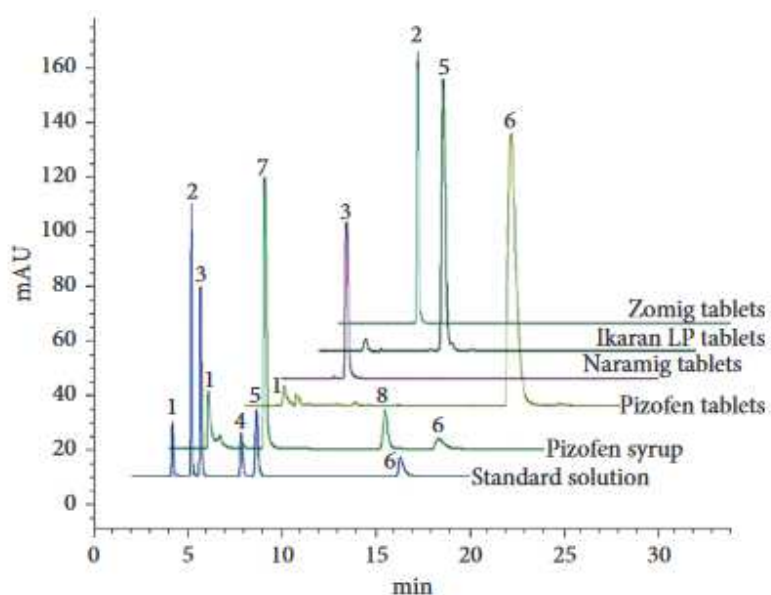
Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μια πρόσφατη μελέτη από τους Megahed et al. (2021) στην οποία αναπτύχθηκε μια ανθεκτική, ευαίσθητη και πράσινη HPLC μέθοδος για τον προσδιορισμό του αντιγριπικού φαρμάκου φαβιπιραβίρη σε χύμα φάρμακο και σε εμβολιασμένο ανθρώπινο πλάσμα. Το συγκεκριμένο φάρμακο χρησιμοποιήθηκε και κατά την περίοδο της πανδημίας για την καταπολέμηση του ιού COVID-19. Αρχικά,

εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός για τη διαλογή των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τις χρωματογραφικές αποκρίσεις και στη συνέχεια εφαρμόστηκε σχεδιασμός Box-Behnken για τη βελτιστοποίηση των κρίσιμων παραμέτρων.

Η κεφδιτορένη (Cefditoren Pivoxil) είναι μια ημισυνθετική κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς που χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό ευρέως φάσματος για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Για τον προσδιορισμό της κεφδιτορένης σε χύμα σκόνη και δισκία αναπτύχθηκε μια μέθοδος RP-HPLC (Gad et al., 2017). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εφαρμόστηκε κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός δύο παραγόντων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση που είχε το ποσοστό μεθανόλης της κινητής φάσης και η θερμοκρασία στήλης στην ασυμμετρία, στον αριθμό θεωρητικών πλακών, στις αναλύσεις και στο χρόνο κατακράτησης της τελευταίας εκλούμενης κορυφής.

Η ημικρανία είναι η τρίτη πιο διαδεδομένη ιατρική ασθένεια στον κόσμο, η οποία χαρακτηρίζεται από κρίσεις πονοκεφάλου διάρκειας 4-72 ωρών, μέτριας ως σοβαρής έντασης που σχετίζεται με ναυτία και φωτο- ή και φωνοφοβία (Abdou et al., 2017). Η ζολμιτριπτάνη (Zolmitriptan, Zol), η ναρατριπτάνη (Naratriptan, Nara), η διϋδροεργοταμίνη (Dihydroergotamine, DHE) και η πιζοτιφένη (Pizotifen, Pizo) συνιστώνται ως πρώτη σειρά φαρμάκων για τη θεραπεία οξείας ημικρανίας. Η κετοτιφένη (Ketotifen, Keto) έχει αντισταμινική δράση και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος. Μια ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος RP-HPLC αναπτύχθηκε από τους Jebali et al. (2019) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ζολμιτριπτάνης, της ναρατριπτάνης, της διϋδροεργοταμίνης, της κετοτιφένης και της πιζοτιφένης σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Εφαρμόστηκε σχεδιασμός πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών παραμέτρων. Αρχικά, εφαρμόστηκε ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων (2^K) για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων που έπρεπε να βελτιστοποιηθούν, λαμβάνοντας ως αποκρίσεις την ανάλυση ανάμεσα στη ζολμιτριπτάνη και ναρατριπτάνη και τον χρόνο ανάλυσης. Οι παράγοντες ήταν το ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, το pH της κινητής φάσης, η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος και η θερμοκρασία στήλης. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες αποδείχθηκαν ότι είναι το ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση και το pH της κινητής φάσης. Αυτές οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με σχεδιασμό Doehlert και βρέθηκε ότι το

βέλτιστο ποσοστό ακετονιτρίλιου για την κινητή φάση είναι 38:62 (v/v) Ακετονιτρίλιου (ACN): Υπερχλωρικό νάτριο ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM) σε pH 3.5. Η μέθοδος αυτή με τις βελτιστοποιημένες παραμέτρους εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα του εμπορίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 13. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δισκία Zomig, Naramig, Ikaran LP και σιρόπι Pizofen. Για την αναγνώριση των κορυφών του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο διάλυμα (Standard solution) με τις παραπάνω ουσίες.



Σχήμα 13 Τυπικά χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων που ελήφθησαν με εφαρμογή της βελτιστοποιημένης χρωματογραφικής μεθόδου.

Αναγνώριση κορυφών: 1 = 2 = ζολμιτριπτάνη, 3 = ναρατριπτάνη, 4 = κετοτιφένη, 5 = διϋδροεργοταμίνη, 6 = πιζοτιφένη, 7 = μεθυλοπαραμπέν, 8 = προπυλοπαραμπέν (Jebali et al., 2019).

Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αρκετών μεθόδων RP-HPLC. Έτσι, βασιζόμενες σε πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι RP-HPLC για τον προσδιορισμό αρκετών ενώσεων, όπως του αντιφλεγμονώδους φαρμάκου ασεμετασίνη και των προσμείξεων της (Abdelgawad et al., 2018), οκτώ αντιδιαβητικών φαρμάκων (πιογλιταζόνη, ροσιγλιταζόνη, γλυβουρίδη, γλιμεπιρίδη, γλικιδόνη, γλιπιζίνη και ρεπαγλινίδη) (Mokhtar et al., 2015), του αντιρετροϊκού φαρμάκου αβακαβίρη (Tol et al., 2016), του αντιόξινου φαρμάκου ομεπραζόλη (Åsberg et al., 2016) και τριών αντιμυκητιασικών φαρμάκων (φλουκοναζόλη,

ιτρακοναζόλη, τερβιναφίνη) σε πλάσμα αίματος (Roshdy et al., 2021). Επίσης, πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων σε συνδυασμό με εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας μεθόδου RP-HPLC για τον προσδιορισμό του αντιθρομβωτικού φαρμάκου ετεξιλική δαβιγατράνη (Baratu et al., 2016). Εκτός όμως από τον πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων, σε πολλές μελέτες εφαρμόστηκε πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων RP-HPLC που αφορούσαν τον προσδιορισμό του αντιμυκητιασικού φαρμάκου εβερκοναζόλη (Krishna et al., 2016) και της πραμιπεξόλης που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου του Parkinson (Schmidt et al., 2014).

Κλασματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη διαφόρων ευαίσθητων και εκλεκτικών RP-HPLC μεθόδων για διάφορες ενώσεις, όπως για τον προσδιορισμό του αντιπηκτικού φαρμάκου βαρφαρίνη και των προσμείξεων της σε δισκία του εμπορίου (Mannemala & Kannappan, 2015), του αντιθρομβωτικού τικαγρελόρη και των προσμείξεων του (Wingert et al., 2018), για τον ποιοτικό έλεγχο ενός φαρμακευτικού σκευάσματος που περιέχει αμλοδιπίνη (φάρμακο παθήσεων κυκλοφορικού) και σελεκοξίμη (αντιφλεγμονώδες) (Attimarad et al., 2020), για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αντιδιαβητικών φαρμάκων γλικαζίδη και υδροχλωρική μετφορμίνη χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό τους σε δισκία (Thakur, Kaur, et al., 2017) καθώς και για τον προσδιορισμό της φαινοβερίνης, ενός φαρμάκου που χορηγείται για λειτουργικές διαταραχές του εντέρου, σε χύμα σκόνη και στη δοσολογική μορφή (Saroj et al., 2017). Στην τελευταία περίπτωση εφαρμόστηκε και σχεδιασμός Box-Behnken για περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Ο σχεδιασμός Box-Behnken έχει εφαρμοστεί σε αρκετές περιπτώσεις βελτιστοποίησης μεθόδων RP-HPLC. Σε αυτό το πλαίσιο με εφαρμογή αυτού του σχεδιασμού πειραμάτων βελτιστοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι RP-HPLC για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων, όπως του αντιψυχωσικού φαρμάκου ρισπεριδόνη και των προσμείξεων του (Maljurić et al., 2020) και δύο π-τολουόλιο-σουλφονικών προσμείξεων της δραστικής ουσίας του αντιεμετικού φαρμάκου απρεπιτάντη (Zacharis & Vastardi, 2018). Στην τελευταία περίπτωση πριν τον σχεδιασμό Box-Behnken εφαρμόστηκε και σχεδιασμός Plackett-Burman για τη διαλογή των παραγόντων. Άλλες περιπτώσεις εφαρμογής

σχεδιασμού Box-Behnken στη βελτιστοποίηση μεθόδων RP-HPLC είναι ο προσδιορισμός του αντιδιαβητικού φαρμάκου βιλδαγλιπτίνη (Waghulde & Naik, 2018), του αντιεπιληπτικού φαρμάκου ρουφινamide σε πλάσμα ποντικών και στον εγκέφαλο (Dalvi et al., 2018) καθώς και έξι αλκαλοειδών σε ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βότανο παραδοσιακής κινέζικης ιατρικής, όπου προηγήθηκε σχεδιασμός Plackett-Burman (Dai et al., 2016). Ακόμη, σχεδιασμός Box-Behnken εφαρμόστηκε στον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ασπιρίνης και του φαρμάκου για τη μείωση της υψηλής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σιμβαστατίνη (Patel et al., 2017), του φαρμάκου για τη θεραπεία της υψηλής χοληστερόλης εξετιμίμπη (Dash et al., 2015), των αντιβιοτικών φθοριοκινολόνη και νιτροϊμιδαζόλη σε ορό και ούρα (Mannemala & Kannappan, 2016), του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου υδροχλωρική βιλαζοδόνη σε φαρμακευτική δοσολογική μορφή (Panda et al., 2016) και του φαρμάκου κιτρική ταμοξιφαίνη που χρησιμοποιείται στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Sandhu et al., 2016). Επίσης, ο σχεδιασμός Box-Behnken έχει εφαρμοστεί στη βελτιστοποίηση μεθόδων RP-HPLC για τον προσδιορισμό του μυοχαλαρωτικού φαρμάκου μεταξαλόνη (Swain et al., 2015), της χρωστικής κυανιδίνη σε μικροκάψουλες με βάση φυσικά βιοπολυμερή και σε δισκία (Thakur, Jain, et al., 2017) καθώς και του αντιθρομβωτικού φαρμάκου ετεξιλική δαβιγατράνη και δέκα προσμείξεων του (Pantović et al., 2015).

Τα είδη φυτού *Eremanthus* περιέχουν σесκιτερπενικές λακτόνες με θεραπευτικές ιδιότητες. Σε αυτό το πλαίσιο αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια νέα αναλυτική μέθοδος HPLC για τον χαρακτηρισμό των ειδών του φυτού *Eremanthus* και τις κύριες λακτόνες του σε πρώτη ύλη με χρήση του σχεδιασμού Plackett-Burman (Sousa et al., 2016). Επίσης, σχεδιασμός Plackett-Burman σε συνδυασμό με Box-Behnken εφαρμόστηκε για την διαλογή και βελτιστοποίηση της σύνθεσης της κινητής φάσης μιας RP-HPLC μεθόδου για τον προσδιορισμό της μετοφορμίνης και πέντε γλυπτινών σε πλαστά βοτανικά φάρμακα (Salem et al., 2021) καθώς και αντιθρομβωτικών παραγόντων όπως της ασπιρίνης, της πρασουγρέλης και κλοπιδογρέλης παρουσία ένωσης που σχετίζεται με την κλοπιδογρέλη (πρόσμειξη) (Mohammad et al., 2021). Στην τελευταία μελέτη ο στόχος ήταν ο εντοπισμός πλαστότητας σε ινδικά φαρμακευτικά σκευάσματα και βοτανικά φάρμακα που πωλούνται στην Κίνα.

Οι χαοτροπικοί παράγοντες είναι μικρά ανόργανα ιόντα που προστίθενται στην κινητή φάση ώστε να αλληλεπιδράσουν αναστρέψιμα με τη στατική φάση. Σε αυτό το πλαίσιο χρησιμοποιήθηκε το υπερχλωρικό οξύ ως χαοτροπικό αντιδραστήριο στην υδατική φάση για τη χρωματογραφική ανάλυση με RP-HPLC του αντιστηθαγχικού παράγοντα διυδροχλωρική τριμεταζιδίνη και δύο προσμείξεων του (Milošević et al., 2017). Η συγκέντρωση του υπερχλωρικού οξέος και άλλοι σημαντικοί παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν με κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό. Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός έχει εφαρμοστεί και σε αρκετές άλλες περιπτώσεις βελτιστοποίησης μεθόδων RP-HPLC, όπως για τον προσδιορισμό του αντιβιοτικού μοξιφλοξασίνη και του αντιφλεγμονώδους κετορολόκη σε οφθαλμικές σταγόνες, όπου εφαρμόστηκε FCCD (Kalariya et al., 2017), των β-αναστολέων για την καρδιακή ανεπάρκεια (Abdelhameed et al., 2015), φυσικών προϊόντων σε βοτανικό εκχύλισμα (Funari et al., 2018), 14 αντιβιοτικών (β-λακταμών) (Pham et al., 2019), των αντιυπερτασικών φαρμάκων νιφεδιπίνη και ατενολόλη (S. Ahmed et al., 2018), των φαρμάκων για την καρδιακή ανεπάρκεια σακουμπιτρίλη και βαλσαρτάνη (Moussa et al., 2018) και των διουρητικών υδροχλωρο-θειαζίδη και ινδαπαμίδη (Dawud & Shakya, 2019). Άλλες εφαρμογές του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού στη βελτιστοποίηση RP-HPLC μεθόδων αφορούν τον προσδιορισμό του αντineοπλασματικού φαρμάκου μεθοτρεξάτη (Montemurro et al., 2016), φαινολικών ενώσεων στο μέλι μελιτώματος (Silva et al., 2019), του αντιβιοτικού αζιθρομυκίνη και των αντιμυκητιασικών φαρμάκων σεκνιδαζόλη και φλουκοναζόλη (Sahoo & Sahu, 2015) καθώς και της θεοβρωμίνης, κατεχίνης, επικατεχίνης και καφεΐνης σε χύμα ουσία και χειροποίητες σοκολάτες (Nascimento et al., 2020). Επίσης, ο ίδιος σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αντιυπερτασικού φαρμάκου ολμεσαρτάνη (Beg et al., 2015) και του αντιασθματικού φαρμάκου ζηλευτόνη (Ganorkar et al., 2017).

3.1.2 Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (HPTLC)

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (HPTLC) έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της HPLC καθώς δεν απαιτεί περίπλοκα όργανα και προσφέρει γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό ανάλυσης με χαμηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών (Ivanova et al., 2022). Η HPTLC είναι γνωστή και ως επίπεδη χρωματογραφία.

Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας HPTLC μεθόδου με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των κύριων μεταβλητών, όπως το ποσοστό της μεθανόλης στην κινητή φάση, το χρόνο κορεσμού θαλάμου, το μήκος κύματος και το μέτωπο διαλύτη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του αντιβιοτικού ναδιφλοξασίνης, του αντιαλλεργικού φαρμάκου φουροϊκή μομεταζόνη και του αντιμυκητιασικού νιτρική μικοναζόλη (Patel, Shah, Shah, et al., 2016). Ο ίδιος σχεδιασμός εφαρμόστηκε και για την ανάλυση των βλενολυτικών φαρμάκων υδροχλωρική αμβροξόλη και δοξοφυλλίνη μέσω HPTLC σε χύμα φάρμακο και σε δισκία (Patel, Shah, Gandhi, et al., 2016).

3.1.3 Χρωματογραφία ζεύγους - ιόντων (IPC)

Η χρωματογραφία ζεύγους-ιόντων (IPC) χρησιμοποιεί τους ίδιους τύπους κινητών και στατικών φάσεων, όπως η RP-HPLC. Η IPC χαρακτηρίζεται από την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου ζεύγους ιόντων στην κινητή φάση. Ο παράγοντας ζεύγους ιόντων είναι ένα είδος ιόντων που έχει αντίθετο φορτίο από την αναλυόμενη ουσία και είναι σε θέση να συσχετιστεί μοριακά με μια στοχευμένη διαλυμένη ουσία.

Σε αυτό το πλαίσιο εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας απλής και γρήγορης μεθόδου IPC σε συνδυασμό με RP-HPLC με σκοπό τον ταυτόχρονο προσδιορισμό οκτώ διαφορετικών βιογενών αμινών και των μεταβολιτών τους σε μεταθανάτιο ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό (Van Dam et al., 2014). Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός Plackett-Burman ακολουθούμενος από εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (FCCD) για τη διαλογή σημαντικών παραγόντων στον διαχωρισμό με IPC των αντιδιαβητικών φαρμάκων υδροχλωρικής μετφορμίνης, βενζοϊκής αλογλιπτίνης και ρεπαγλινίδης (Mahrouse & Lamie, 2019). Οι βέλτιστες ρυθμίσεις επικυρώθηκαν και εφαρμόστηκαν στην ανάλυση ενώσεων σε σκόνη και δισκία.

3.1.4 Χειρόμορφη υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Για τον προσδιορισμό χειρόμορφων ενώσεων (εναντιομερών) χρησιμοποιείται η χειρόμορφη υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (χειρόμορφη HPLC) στην οποία η στατική φάση είναι χειρόμορφη. Σε αυτό το πλαίσιο αναπτύχθηκε μια χειρόμορφη HPLC μέθοδος με πρωτεϊνική χειρόμορφη στατική φάση για τον προσδιορισμό της S-τιμολόλης (Mitrović et al., 2020). Η τιμολόλη είναι φάρμακο που χορηγείται είτε για αυξημένη οφθαλμική πίεση (σταγόνες) είτε για υψηλή αρτηριακή πίεση (από το στόμα). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός Box-Behnken, ενώ για τη δοκιμή ανθεκτικότητας εφαρμόστηκε σχεδιασμός Plackett-Burman. Επίσης, Box-Behnken σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μιας χειρόμορφης HPLC μεθόδου σε χρωματογραφική στήλη κυτταρίνης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των εναντιομερών των αντιυπερτασικών φαρμάκων αμλοδιπίνης και ατενολόλης (Li et al., 2021) καθώς και των εναντιομερών του αντιδιαβητικού φαρμάκου αλογλιπτίνη σε πλάσμα ποντικών (Kant et al., 2019). Η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση τριών διαφορετικών εμπορικών σκευασμάτων.

Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη μιας χειρόμορφης HPLC μεθόδου για τον προσδιορισμό των εναντιομερών μορφών του φαρμάκου ιβαμπραδίνη που χρησιμοποιείται για τη μείωση της καρδιακής συχνότητας (Ferencz et al., 2020). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε σκόνη και εμπορικά δισκία.

Εδροκεντρώμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (FCCD) εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη μιας χειρόμορφης HPLC μεθόδου για τον προσδιορισμό των εναντιομερών μορφών του συνδυασμού δύο χειρόμορφων φαρμάκων και συγκεκριμένα του αντιυπερτασικού φαρμάκου ατενολόλη και του διουρητικού χλωροθαλιδόνη (Hassan et al., 2021).

Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε D-βέλτιστος σχεδιασμός για την αξιολόγηση της επίδρασης των αλλαγών στη σύνθεση της κινητής φάσης σε εξαρτημένες μεταβλητές καθώς και για τη βελτιστοποίηση μιας χειρόμορφης HPLC μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των εναντιομερών του αντιεμετικού φαρμάκου ονδανσετρόνη (Kannappan & Kanthiah, 2017).

3.1.5 Μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC)

Η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC) είναι ένα είδος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που επιτρέπει το διαχωρισμό ουδέτερων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τυπικά, τα ουδέτερα μόρια κινούνται με ηλεκτροοσμωτική ροή ή μαζική ροή κατά τους ηλεκτροφορητικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατός ο χρονικός διαχωρισμός μεταξύ μειγμάτων ουδέτερων αναλυτών. Η συμπερίληψη ιοντικών επιφανειοδραστικών μικκυλίων στο ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού επιτρέπει τον διαχωρισμό ουδέτερων αναλυτών μεταξύ τους, καθώς οι αναλύτες αυτοί συνδέονται με το μικκύλιο (Giordano et al., 2019).

Οι Orlandini et al. (2016) ανέπτυξαν μια μέθοδο MEKC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της εναντιομερικής καθαρότητας του φαρμάκου κατά της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης αμβρισεντάνη και τριών χειρόμορφων προσμείξεων του σε δισκία.. Ως επιφανειοδραστικό χρησιμοποιήθηκε το δωδεκακυλο-θεικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS). Για την επίδραση και βελτιστοποίηση των σημαντικών παραγόντων (επίδραση της συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη υπόβαθρου (Background Electrolyte, BGE), pH, συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης (Cyclodextrin, CD), θερμοκρασία και δυναμικό) χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός FCCD, ενώ η ανθεκτικότητα της μεθόδου επικυρώθηκε με σχεδιασμό Plackett-Burman. Παρόμοια, σχεδιασμός FCCD σε συνδυασμό με FrFD εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας μεθόδου MEKC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της χειρόμορφης πρόσμειξης δεξτρομεπρομαζίνη και του προϊόντος οξείδωσης σουλφοξειδίου λεβομεπρομαζίνη σε δείγματα του αντιψυχωσικού φαρμάκου λεβομεπρομαζίνη (Niedermeier & Scriba, 2017). Η ανθεκτικότητα της μεθόδου επικυρώθηκε με σχεδιασμό Plackett-Burman.

Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση μιας MEKC μεθόδου για τον έλεγχο της χειρόμορφης καθαρότητας του φαρμάκου μοντελουκάστης, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος (Flor et al., 2016). Για τη δοκιμή ανθεκτικότητας της μεθόδου εφαρμόστηκε σχεδιασμός Plackett-Burman.

3.1.6 Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)

Η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι μια νέα αναλυτική τεχνική για την ανάλυση πολικών και μικρότερων αναλυτών. Ως χρωματογραφική τεχνική χρησιμοποιεί κανονική στατική φάση σε συνδυασμό με αντίστροφη κινητή φάση. Ο μηχανισμός συγκράτησης είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές διαδικασίες: κατανομή των αναλυτών ανάμεσα στην στατική και κινητή φάση, προσρόφηση των αναλυτών στη στατική φάση και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Οι Kasagić-Vujanović et al. (2015) ανέπτυξαν μια μέθοδο HILIC για το διαχωρισμό των αντιυπερτασικών φαρμάκων βεσυλική αμλοδιπίνη και φουμαρική δισοπρολόλη. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός, ενώ για την επικύρωση της μεθόδου εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός. Επίσης, κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του χρόνου κατακράτησης 38 φαρμακευτικών ενώσεων (Taraji et al., 2017), ενώ για το διαχωρισμό του αντιεμετικού φαρμάκου γρανισετρόνη και δύο προϊόντων αποικοδόμησής του εφαρμόστηκε πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (Maksić et al., 2016).

Σχεδιασμός Plackett-Burman εφαρμόστηκε για τη δοκιμή ανθεκτικότητας μιας HILIC μεθόδου για το διαχωρισμό ενός σκιαγραφικού μέσου για ακτίνες X και συγκεκριμένα της ιοεξόλης και των προσμείξεων της (Jovanović et al., 2015). Επίσης, σχεδιασμός Plackett-Burman εφαρμόστηκε για τη δοκιμή ανθεκτικότητας μιας HILIC μεθόδου για τον προσδιορισμό του αντιμικροβιακού φαρμάκου ερταπενέμη (Pedroso et al., 2016). Στη μελέτη αυτή εφαρμόστηκε ο σχεδιασμός Plackett-Burman, ο οποίος εφαρμόστηκε και για τη δοκιμή ανθεκτικότητας μιας RP-HPLC μεθόδου για το ίδιο φάρμακο. Οι δύο μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στην παραπάνω μελέτη βασίστηκαν σε αρχές της Πράσινης Χημείας με ελαχιστοποίηση των παραγόμενων αποβλήτων οργανικών διαλυτών.

Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση μιας HILIC μεθόδου για τον προσδιορισμό του αντιυπερτασικού φαρμάκου μεδοξομιλική ολμεσαρτάνη (Beg et al., 2016).

Οι Terzić et al. (2016) ανέπτυξαν μια HILIC μέθοδο για τον προσδιορισμό του αντισταμινικού φαρμάκου βιλαστίνη και των προϊόντων αποικοδόμησής του με χρήση

σχεδιασμού Box-Behnken. Για τη δοκιμή ανθεκτικότητας της μεθόδου εφαρμόστηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός.

3.1.7 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC)

Μια νέα διαχωριστική τεχνική που αποτελεί παραλλαγή της HPLC είναι η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) η οποία λειτουργεί σε υψηλή πίεση (6000 - 15000 psi) σε αντίθεση με τη συμβατική HPLC που λειτουργεί σε πίεση 2000 - 4000 psi. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιούνται σωματίδια μικρότερης διαμέτρου στην UHPLC και έτσι επιτυγχάνεται αυξημένη ταχύτητα και ευαισθησία στο διαχωρισμό.

Οι Lafossas et al. (2019) ανέπτυξαν μια RP-UHPLC μέθοδο για το διαχωρισμό τεσσάρων αντιβιοτικών (τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη και οξυτετρακυκλίνη) με χρήση κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού. Επίσης, κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση μιας UHPLC μεθόδου για τον διαχωρισμό 11 διαφορετικών καρδιαγγειακών φαρμάκων (González Mendia et al., 2017), για τον προσδιορισμό της σουματριπτάνης και ναπροξένης που αποτελούν φάρμακα κατά της ημικρανίας (Patel et al., 2015) καθώς και για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών λεβοφλοξασίνη και σιπροφλοξασίνη σε ανθρώπινο πλάσμα και προστατικό ιστό (Szerkus et al., 2016). Στην τελευταία μελέτη χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός Box-Behnken για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, ενώ για τη βελτιστοποίηση της προκατεργασίας του δείγματος εφαρμόστηκε κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός. Επίσης, κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση μιας UHPLC μεθόδου για τον προσδιορισμό του αντιφλεγμονώδους φαρμάκου ακετονίδιο τριαμκινολόνης σε ενέσιμη οφθαλμική υδρογέλη (Oliva et al., 2016).

Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη μιας UHPLC μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοκανναβινοειδών (Fekete et al., 2018). Η συγκεκριμένη μέθοδος προορίζεται για εφαρμογή σε εργαστήρια ρουτίνας για τη διάκριση προϊόντων νόμιμης και παράνομης κάνναβης.

Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τους Saha et al. (2020) αναπτύχθηκε μια απλή, γρήγορη και ανθεκτική UHPLC-MS μέθοδος για τον προσδιορισμό της θεικής αταζαναβίρης η οποία χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο για τη θεραπεία της ανοσολογικής ανεπάρκειας. Εντοπίστηκαν παράγοντες όπως το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή, ο ρυθμός ροής και ο όγκος έγχυσης, οι οποίοι επηρεάζουν κρίσιμα τις επιλεγμένες αποκρίσεις: χρόνο κατακράτησης αναλυόμενης ουσίας, θεωρητικό αριθμό πλακών και ουρά σημάτων. Οι κρίσιμοι παράγοντες εξετάστηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό. Καθώς η θερμοκρασία της στήλης δεν είχε σημαντική επίδραση στην απόδοση της μεθόδου, αυτή διατηρήθηκε σταθερή στα περαιτέρω στάδια της ανάπτυξης της μεθόδου και οι υπόλοιποι παράγοντες βελτιστοποιήθηκαν με σχεδιασμό Box-Behnken.

Τα αποτελέσματα όλων των ερευνητών που αφορούν την εφαρμογή σχεδιασμών πειραμάτων στη χρωματογραφία παρουσιάζονται σε αύξουσα χρονολογική σειρά στον Πίνακα 5 του Κεφαλαίου 4.

3.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των εναντιομερών φαρμακευτικών ενώσεων και αποτελεί μια εναλλακτική και συμπληρωματική τεχνική της HPLC. Η CE είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιεί ένα πολύ λεπτό σωλήνα (τριχοειδή) για το διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (ιόντων) βάσει της μετακίνησής τους προς τα ηλεκτρόδια υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Η CE προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα για το διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων που είναι τα εξής (Chankvetadze, 2018):

- Ταχεία ανάπτυξη μεθόδου
- Υψηλή απόδοση διαχωρισμού
- Σχετικά σύντομο χρόνο ανάλυσης
- Χαμηλή κατανάλωση αναλυτών, αντιδραστηρίων και χειρόμορφων επιλογέων (Chiral Selectors, CS).

Επιπλέον, σε σύγκριση με την HPLC, η κατανάλωση διαλυτών στη CE είναι χαμηλότερη με αποτέλεσμα η CE να μπορεί να θεωρηθεί ως πιο πράσινη αναλυτική τεχνική (Krait et al., 2021).

Ένα γενικό πλεονέκτημα της CE είναι η ταχεία ανάπτυξη της μεθόδου, καθώς οι πειραματικές συνθήκες μπορούν εύκολα και γρήγορα να αλλάξουν από το ένα πείραμα στο άλλο, χωρίς την ανάγκη αλλαγής της στήλης όπως συμβαίνει στις χρωματογραφικές μεθόδους. Στη CE συνήθως χρησιμοποιείται μια μέθοδος άμεσου χειρόμορφου διαχωρισμού, που συνίσταται απλώς στην προσθήκη χειρόμορφων επιλογέων (CS) στον ηλεκτρολύτη υπόβαθρου (BGE) (Fanali & Chankvetadze, 2019). Ένας σχετικά μεγάλος αριθμός CS μπορεί να εφαρμοστεί, όπως τα μακροκυκλικά αντιβιοτικά, χειρόμορφα ιοντικά υγρά και χειρόμορφες επιφανειοδραστικές ενώσεις. Ωστόσο, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι CS είναι τα παράγωγα της κυκλοδεξτρίνης (CD) (Yu & Quirino, 2019).

3.2.1 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) είναι ο απλούστερος τρόπος τριχοειδούς ηλεκτροκινητικού διαχωρισμού που επιτυγχάνεται με βάση τις διαφορές στην αναλογία φορτίου προς μάζα των αναλυτών. Ως εκ τούτου, όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν το φορτίο των αναλυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή της επιλεκτικότητας. Ειδικότερα, το pH, η φύση και η συγκέντρωση του BGE καθώς και ο τύπος και η συγκέντρωση του CS μπορούν να επηρεάσουν τόσο την ταχύτητα μετακίνησης των αναλυτών όσο και τον διαχωρισμό (Chankvetadze, 2018). Η συμπλήρωση του BGE με CD είναι αναμφισβήτητη η πιο δημοφιλής και επιτυχημένη προσέγγιση για την απόκτηση άμεσης ανάλυσης εναντιομερών στη CE (Fanali & Chankvetadze, 2019).

Οι Harnisch και Scriba (2019) ανέπτυξαν μια μέθοδο CE για τον προσδιορισμό της χειρόμορφης καθαρότητας της δαποξετίνης, η οποία χρησιμοποιείται ως φάρμακο παθήσεων του ουροποιητικού συστήματος. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός ακολουθούμενος από εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό. Ο ίδιος συνδυασμός σχεδιασμών

εφαρμόστηκε και για τον προσδιορισμό της χειρόμορφης καθαρότητας του φαρμάκου κατά της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης αμβρισερτάνη (Krait et al., 2016), του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου σιταφλοξασίνη (Meng & Kang, 2017) του γενικού αναισθητικού φαρμάκου δεξμεντετομιδίνη (Krait & Scriba, 2018) και του αντιβηχικού δεξτρομεθορφάνη (Krait et al., 2018). Στην τελευταία μελέτη αξίζει να σημειωθεί ότι η δεξτρομεθορφάνη είναι αντιβηχικό φάρμακο, ενώ το εναντιομερές του η λεβομεθορφάνη είναι ένα παράνομο οπιοειδές αναλγητικό, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον διαχωρισμό των δύο ενώσεων. Επίσης, κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός ακολουθούμενος από εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση της CE μεθόδου για τον εναντιομερικό διαχωρισμό του αντικαταθλιπτικού σιταλοπράμη (Budău et al., 2020), ενώ για τον προσδιορισμό των αναστολέων της αντλίας πρωτονίων λανσοπραζόλη και ραβεπραζόλη, που δρουν ως ανασταλτικά της γαστρικής έκκρισης, μετά τον κλασματικό σχεδιασμό εφαρμόστηκε κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Papp et al., 2019). Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (3^{4-2}) εφαρμόστηκε όμως και για τη βελτιστοποίηση μιας CE μεθόδου για τον προσδιορισμό τεσσάρων χειρόμορφων βενζοδιαζεπινών (λοραζεπάμη, λορμεταζεπάμη, οξαζεπάμη, τεμαζεπάμη) που χρησιμοποιούνται ως αγχολυτικά φάρμακα (Vargas-Martínez & Ramírez-Galicia, 2018).

Εδροκεντρώμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση του εναντιομερικού διαχωρισμού με CE του ανοσοτροποποιητικού φαρμάκου λεναλιδομίδα (Szabó et al., 2018), του αναλγητικού φαρμάκου τραμαδόλη (Sarkany et al., 2019) καθώς και του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου βενλαφαζίνη (Milan et al., 2020).

Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας CE μεθόδου για τον εναντιομερικό προσδιορισμό ασπαρτικού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής (Wahl & Holzgrabe, 2015), των εναντιομερών του ψυχοενεργού φαρμάκου φαιναιθυλαμίνη (εφεδρίνη, μεθυλεφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη) (Wahl & Holzgrabe, 2018) καθώς και της δεξτροπροπιζίνης και της 1-φαινυλοπιπεραζίνης ως προσμείξεις σε χύμα δείγματα λεβοδροπροπιζίνης και σε φαρμακευτικές σταγόνες (Niedermeier & Scriba, 2020a). Η λεβοδροπροπιζίνη είναι ένα μη οπιοειδές φάρμακο περιφερικής δράσης που χρησιμοποιείται ως αντιβηχικό με τη μορφή καθαρού εναντιομερούς. Στην περίπτωση

αυτού του διαχωρισμού μετά τον πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό εφαρμόστηκε εδροκεντρώμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός.

Σχεδιασμός Doehlert εφαρμόστηκε στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας CE μεθόδου για τον προσδιορισμό της εναντιομερικής καθαρότητας του αντιψυχωσικού φαρμάκου λεβοσουλπιρίδη σε φαρμακευτικές δοσολογικές μορφές (Orlandini et al., 2015) καθώς και του αντισπασμωδικού και αγχολυτικού φαρμάκου πρεγκαμπαλίνη (Harnisch et al., 2018). Στην τελευταία μελέτη, εφαρμόστηκε και εδροκεντρώμενος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός για περαιτέρω βελτιστοποίηση.

Τα εναντιομερή της ασεναπίνης, ενός νέου αντιψυχωσικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται στη σχιζοφρένεια διαχωρίστηκαν με μια CE μέθοδο (Szabó, Tóth, et al., 2016). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εφαρμόστηκε σχεδιασμός OAD. Ο ίδιος σχεδιασμός εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση μιας CE μεθόδου για τον εναντιομερικό διαχωρισμό της πομαλιδομίδης, που είναι παράγωγο της θαλιδομίδης και χρησιμοποιείται ως ανοσοτροποποιητικό φάρμακο (Szabó, Szöcs, et al., 2016), του αντιδιαβητικού φαρμάκου βιλδαγλιπτίνη (Kazsoki et al., 2016), του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου φλουοξετίνη (Cârcu-Dobrin et al., 2017) και του αντιστηθαγχικού φαρμάκου αμλοδιπίνη (Cârcu-Dobrin et al., 2020).

Σχεδιασμός Box-Behnken εφαρμόστηκε για τη βελτιστοποίηση μιας CE μεθόδου για τον προσδιορισμό της χειρόμορφης καθαρότητας του ασβεστιομιμητικού παράγοντα κιννακαλκέτη (Pasquini et al., 2018).

3.2.2 Μη υδατική τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (NACE)

Ο όρος μη υδατική τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Non-Aqueous Capillary Electrophoresis, NACE) αναφέρεται στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με μη υδατικούς ηλεκτρολύτες υπόβαθρου (BGE). Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα ανάλυσης ουσιών με πολύ χαμηλή διαλυτότητα σε υδατικά μέσα καθώς και η επιλεκτικότητα διαχωρισμού που μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική στους οργανικούς διαλύτες (σε σύγκριση με το νερό), μια ιδιότητα που μπορεί να αξιοποιηθεί στον χειρισμό της επιλεκτικότητας διαχωρισμού (Klampfl & Himmelsbach, 2016).

Οι Niedermeier και Scriba (2020b) ανέπτυξαν μια μέθοδο NACE για τον προσδιορισμό της δεξτροπρομαζίνης ως χειρόμορφης πρόσμειξης του αντιψυχωσικού φαρμάκου λεβομεπρομαζίνη με χρήση κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού ακολουθούμενο από εδροκεντρώμενο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό.

Τα αποτελέσματα όλων των ερευνητών που αφορούν την εφαρμογή σχεδιασμών πειραμάτων στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται σε αύξουσα χρονολογική σειρά στον Πίνακα 6 του Κεφαλαίου 4.

.

4. Αποτελέσματα

4.1 Χρωματογραφία

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FFD	HPLC	Πραμιπεξόλη	Χύμα ουσία	Χρόνος έκλουσης, θερμοκρασία, pH, ρυθμός ροής, συγκέντρωση της οργανικής κινητής φάσης	Schmidt et al., 2014
FrFD	IPC /RP-HPLC	8 βιογενείς αμίνες και μεταβολίτες	Μεταθανάτιος ανθρώπινος εγκεφαλικός ιστός	Συγκέντρωση ιόντος-ζεύγους, ποσοστό % οργανικού τροποποιητή, pH, θερμοκρασία, δυναμικό ανιχνευτή	Van Dam et al., 2014
CCD	RP-HPLC	β-αναστολείς	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH	Abdelhameed et al., 2015

Πίνακας 5 Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στη χρωματογραφία

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
CCD	RP-HPLC	Ολμεσαρτάνη	Χύμα ουσία	Σύνθεση κινητής φάσης, ρυθμός ροής, όγκος έγχυσης, θερμοκρασία στήλης, είδος στήλης, διαστάσεις στήλης	Beg et al., 2015
Box-Behnken	RP-HPLC	Εζετιμίπη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου, pH ρυθμιστικού, ρυθμός ροής, όγκος έγχυσης, θερμοκρασία	Dash et al., 2015
Plackett-Burman	HILIC	Ιοεξόλη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου, pH και συγκέντρωση ρυθμιστικού	Jovanović et al., 2015
CCD	HILIC	Βεσυλική αμλοδιπίνη και φουμαρική δισοπρολόλη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου, pH και συγκέντρωση ρυθμιστικού	Kasagić-Vujanović et al., 2015
FFD	HPLC	Βαλσαρτάνη	Νανοσωματίδια	Ρυθμός ροής, μήκος κύματος ανιχνευτή, pH ρυθμιστικού	Kumar et al., 2015

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD	RP-HPLC	Βαρφαρίνη και προσμείξεις	Χύμα ουσία, δισκία εμπορίου	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου, ρυθμός ροής, είδος όξινου πρόσθετου	Mannemala & Kannappan, 2015
FFD	RP-HPLC	Αντιδιαβητικά φάρμακα	Χύμα ουσία	pH ρυθμιστικού, αναλογία τριαδικού μίγματος ανάμειξης, παράγοντες έκλυσης, θερμοκρασία στήλης	Mokhtar et al., 2015
Box-Behnken	RP-HPLC	Ετεξιλική δαβιγατράνη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου στην αρχή και στο τέλος του προγράμματος έκλυσης, χρόνος έκλυσης	Pantović et al., 2015
FrFD	UPLC	Σουματριπτάνη και ναπροξένη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτρίλιου, pH, είδος στήλης, ρυθμός ροής, θερμοκρασία, χρόνος έκλυσης	Patel et al., 2015
CCD	RP-HPLC	Αζιθρομυκίνη, σεκνιδαζόλη και φλουκοναζόλη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % μεθανόλης, ρυθμός ροής	Sahoo & Sahu, 2015

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Box-Behnken	RP-HPLC	Μεταξολόνη	Χύμα/Δισκία εμπορίου	pH ρυθμιστικού, ποσοστό % οργανικής φάσης, ρυθμός ροής	Swain et al., 2015
FFD	RP-HPLC	Ομεπραζόλη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου και μεθανόλης ως οργανικοί τροποποιητές, pH	Åsberg et al., 2016
FFD - FCCD	RP-HPLC	Ετεξιλική δαβιγατράνη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Θερμοκρασία στήλης, pH κινητής, ρυθμός ροής	Bapatu et al., 2016
CCD	UPLC	Μεθοξομιλική ολμεσαρτάνη	Χύμα ουσία	Αναλογία κινητής φάσης, όγκος έγχυσης	Beg et al., 2016
Plackett-Burman Box-Behnken	RP-HPLC	Αλκαλοειδή	Βοτανικό εκχύλισμα	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, ποσοστό % SDS, ποσοστό % φωσφορικού καλίου	Dai et al., 2016

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FFD	MEKC	Μοντελουκάστη	Χύμα, αναμασόμενα δισκία, από του στόματος κόκκοι	Συγκέντρωση BGE, δυναμικό	Flor et al., 2016
FFD	RP-HPLC	Εβερκοναζόλη	Χύμα ουσία	pH, αναλογία οργανικής φάσης, συγκέντρωση ρυθμιστικού TBAH	Krishna et al., 2016
FFD	HILIC	Γρανισετρόνη και προϊόντα αποικοδόμησης	Χύμα, δισκία, παρεντερική δοσολογική μορφή	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, συγκέντρωση ρυθμιστικού, pH, θερμοκρασία στήλης	Maksić et al., 2016
Box-Behnken	RP-HPLC	Φθοριοκινολόνη και νιτροϊμιδαζόλη	Ορός, ούρα	Ποσοστό % υδατικής κινητής φάσης, ποσοστό % οξικού τριοξυλαμμωνίου, ρυθμός ροής	Mannemala & Kannappan, 2016
CCD	RP-HPLC	Μεθοτρεξάτη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση και pH ρυθμιστικού, ποσοστό % ακετονιτριλίου, θερμοκρασία φούρνου	Montemurro et al., 2016

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
CCD	UHPLC	Ακετονίδιο τριαμκινολόνης	Ενέσιμη οφθαλμική υδρογέλη	Ποσοστό % μεθανόλης, ρυθμός ροής	Oliva et al., 2016
FCCD	MEKC	Αμβρισεντάνη	Χύμα ουσία, επικαλυμμένα δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση SDS, θερμοκρασία, δυναμικό, μήκος τριχοειδούς, συγκέντρωση και pH CD	Orlandini et al., 2016
Box-Behnken	RP-HPLC	Υδροχλωρική βιλαζοδόνη	Φαρμακευτική δοσολογική μορφή	Ποσοστό % μεθανόλης, ρυθμός ροής, pH ρυθμιστικού	Panda et al., 2016
FrFD	HPTLC	Υδροχλωρική αμβροξόλη και δοξοφυλλίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Όγκος διαλυτικού και n- βουτανόλης, μέτωπο διαλύτη, χρόνος κορεσμού θαλάμου	Patel, Shah, Gandhi, et al., 2016
FrFD	HPTLC	Ναδιφλοξασίνη, φουροϊκή μομεταζόνη και νιτρική μικοναζόλη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % μεθανόλης, χρόνος κορεσμού θαλάμου, μήκος κύματος, μέτωπο διαλύτη	Patel, Shah, Shah, et al., 2016

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Plackett-Burman	HILIC	Ερταπενέμη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, συγκέντρωση προσθετικού, ρυθμός ροής, μήκος κύματος, θερμοκρασία φούρνου	Pedroso et al., 2016
Box-Behnken	RP-HPLC	Κιτρική ταμοξιφαίνη	Χύμα ουσία, νανοδομημένα σκευάσματα	Ποσοστό % κινητής φάσης, ρυθμός ροής, όγκος έγχυσης, θερμοκρασία στήλης, pH ρυθμιστικού, ποσοστό % οργανικού τροποποιητή	Sandhu et al., 2016
Plackett-Burman	HPLC	6 σεσκιτερπενικές λακτόνες	Φυτό Eremanthus	Χρόνος εκχύλισης, ποσότητα δείγματος, διαλύτης εκχύλισης, ποσοστό % κινητής φάσης, ρυθμός ροής, θερμοκρασία, θερμοκρασία ανιχνευτή φωτός σκέδασης	Sousa et al., 2016

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD Box-Behnken CCD	UHPLC	Λεβοφλοξασίνη και σιπροφλοξασίνη	Ανθρώπινο πλάσμα, προστατικός ιστός	Αναλογία κινητής φάσης, όγκος έγχυσης, ρυθμός ροής	Szerkus et al., 2016
Box-Behnken	HILIC	Βιλαστίνη και προϊόντα αποκοδόμησης	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH, συγκέντρωση οξικού αμμωνίου	Terzić et al., 2016
FFD	RP-HPLC	Αβακαβίρη	Χύμα ουσία	Σύνθεση κινητής φάσης, pH, θερμοκρασία	Tol et al., 2016
CCD	RP-HPLC	Κεφδιτορένη	Χύμα ουσία, δισκία	Ποσοστό % μεθανόλης, θερμοκρασία στήλης	Gad et al., 2017
CCD	RP-HPLC	Ζηλευτόνη	Χύμα ουσία, δισκία	Ποσοστό % μεθανόλης, ρυθμός ροής, συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος	Ganorkar et al., 2017

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD	UHPLC	11 καρδιαγγειακά φάρμακα	Ανθρώπινο πλάσμα	Αναλογία κινητής φάσης, pH, φύση οργανικού τροποποιητή, είδος στατικής φάσης	González Mendia et al., 2017
FCCD	RP-HPLC	Μοξιφλοξασίνη και κετορολόκη	Οφθαλμικές σταγόνες	Ποσοστό % μεθανόλης, pH ρυθμιστικού, ρυθμός ροής	Kalariya et al., 2017
D-βέλτιστος	Χειρόμορφη-HPLC	Ονδανσετρόνη	Χύμα ουσία, δισκία	Σύνθεση κινητής φάσης	Kannappan & Kanthiah, 2017
CCD	RP-HPLC	Διυδροχλωρική τριμεταζιδίνη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH, συγκέντρωση υπερχλωρικού οξέος στην υδατική φάση	Milošević et al., 2017
FCCD FrFD	MEKC	Λεβοπρομαζίνη	Χύμα ουσία, ενέσιμο διάλυμα	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Niedermeier & Scriba, 2017

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Box-Behnken	RP-HPLC	Ασπιρίνη και σιμβαστατίνη	Χύμα ουσία	Όγκος ακετονιτριλίου, συγκέντρωση ρυθμιστικού, ρυθμός ροής	Patel et al., 2017
FrFD Box-Behnken	RP-HPLC	Φαινοβερίνη	Χύμα ουσία, δοσολογική μορφή	Συγκέντρωση, pH και είδος ρυθμιστικού, ποσοστό % οργανικού διαλύτη, θερμοκρασία στήλης, ρυθμός ροής, όγκος έγχυσης	Saroj et al., 2017
CCD	HILIC	38 φαρμακευτικές ενώσεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, συγκέντρωση και pH άλατος	Taraji et al., 2017
Box-Behnken	RP-HPLC	Κυανιδίνη	Μικροκάψουλες, δισκία	Σύνθεση κινητής φάσης, ρυθμός ροής, μήκος κύματος, θερμοκρασία στήλης	Thakur, Jain, et al., 2017
FrFD	RP-HPLC	Γλυκαζίδη και υδροχλωρική μετορμίνη	Δισκία	Αναλογία και pH κινητής φάσης, ρυθμός ροής, θερμοκρασία στήλης	Thakur, Kaur, et al., 2017

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FFD	RP-HPLC	Ασεμετασίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, ρυθμός ροής, ποσοστό % φωσφορικού οξέος	Abdelgawad et al., 2018
FrFD	RP-HPLC	4 αντιδιαβητικά φάρμακα	Φαρμακευτική δοσολογική μορφή	pH ρυθμιστικού, ποσοστό % μεθανόλης, ποσοστό % ακετονιτριλίου, μήκος κύματος	R. M. Ahmed et al., 2018
CCD	HPLC	Νιφεδιπίνη και ατενολόλη	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH ρυθμιστικού, συγκέντρωση, θερμοκρασία στήλης	S. Ahmed et al., 2018
Box-Behnken	RP-HPLC	Ρουφιναμίδη	Πλάσμα ποντικών, εγκέφαλος	pH, μήκος κύματος, αναλογία ρυθμιστικού	Dalvi et al., 2018
FFD	UHPLC	Φυτοκανναβινοειδή	Φυτικά εκχυλίσματα κάνναβης (Cannabis Sativa)	Φύση στατικής φάσης, φύση οργανικού τροποποιητή, pH κινητής φάσης	Fekete et al., 2018

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
CCD	RP-HPLC	Φυσικά προϊόντα	Βοτανικό εκχύλισμα	Ποσοστό % αιθανόλης, ρυθμός ροής, χρόνος έκλουσης	Funari et al., 2018
CCD	RP-HPLC	Σακουμπιτρίλη και βαλσαρτάνη	Χύμα ουσία, φαρμακευτική δοσολογική μορφή	Όγκος ακετονιτριλίου, pH ρυθμιστικού	Moussa et al., 2018
FrFD Box-Behnken	HPLC	D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, σουκρόζη	Βοτανικό εκχύλισμα	Αρχική και τελική συγκέντρωση κινητής φάσης, ρυθμός ροής κινητής φάσης και αζώτου, χρόνος έκλουσης, θερμοκρασία στήλης	Shao et al., 2018
D-βέλτιστος	HPLC	Κουρκουμίνες και δοξορουβικίνη	Λιπόσωμα μακράς κυκλοφορίας	Χρόνος βαθμωτής έκλουσης, αρχικό και τελικό ποσοστό συστατικών κινητής φάσης	Sylvester et al., 2018
Box-Behnken	RP-HPLC	Βιλδαγπιτίνη	Σκευάσματα μικροσωματιδίων	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, ρυθμός ροής, θερμοκρασία στήλης	Waghulde & Naik, 2018

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD	RP-HPLC	Τικαγρελόρη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH, ρυθμός ροής, θερμοκρασία, συγκέντρωση οξικού αμμωνίου	Wingert et al., 2018
Plackett-Burman Box-Behnken	RP-HPLC	π-Τολουόλιο- σουλφονικές προσμείξεις	Απρεπιτάντη (χύμα ουσία και παρτίδες)	Ρυθμός ροής, ποσοστό % ακετονιτριλίου, κλίση έκλουσης	Zacharis & Vastardi, 2018
CCD	RP-HPLC	Υδροχλωρο-θειαζίδη και ινδαπαμίδη	Φαρμακευτικά σκευάσματα	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, μεθανόλης και ρυθμιστικού	Dawud & Shakya, 2019
Doehleht	HPLC	Κανναβιδιόλη και Δ9- τετραϋδροκανναβιδιόλη	Βοτανικό εκχύλισμα	pH ρυθμιστικού, θερμοκρασία στήλης, ρυθμός ροής	Deidda et al., 2019
FrFD CCD	HPLC	Σαξαγλιπτίνη και δαπαγλιφοζίνη	Φαρμακευτική δοσολογική μορφή	Αναλογία ακετονιτριλίου, ρυθμός ροής, θερμοκρασία στήλης	Gundala et al., 2019

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FFD Doehlert	RP-HPLC	Ζολμιτριπτάνη, ναρατριπτάνη, διωδροεργοταμίνη, κετοτιφένη και πιζοτιφένη	Φαρμακευτική δοσολογική μορφή	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH κινητής φάσης, φύση ρυθμιστικού, θερμοκρασία στήλης	Jebali et al., 2019
Box-Behnken	Χειρόμορφη- HPLC	Αλογλιπτίνη	Δισκία, πλάσμα ποντικών	Ποσοστό % μεθανόλης, pH ρυθμιστικού, ρυθμός ροής,	Kant et al., 2019
FrFD	RP-UHPLC	Τετρακυκλίνη, δοξοκυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη και οξυτετρακυκλίνη	Χύμα ουσία	Σύνθεση κινητής φάσης, pH, θερμοκρασία στήλης, ρυθμός ροής	Lafossas et al., 2019
Plackett-Burman FCCD	IPC	Υδροχλωρική μετοφορμίνη, βενζοϊκή αλογλιπτίνη και ρεπαγλινιδίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Σύνθεση κινητής φάσης, pH, ρυθμός ροής, μήκος κύματος	Mahrouse & Lamie, 2019

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
CCD	RP-HPLC	14 β-λακτάμες	Χύμα ουσία	Θερμοκρασία στήλης, αναλογία αιθανόλης	Pham et al., 2019
CCD	RP-HPLC	Φαινολικές ενώσεις	Μέλι μελιτώματος	Ρυθμός ροής, θερμοκρασία	Silva et al., 2019
FrFD	RP-HPLC	Αμλοδιπίνη και σελεκοξίμπη	Χύμα ουσία, φαρμακευτικά σκευάσματα	Ποσοστό % ακετοντρίλιου, pH, ρυθμός ροής	Attimarad et al., 2020
FFD	Χειρόμορφη- HPLC	Ιβαμπραδίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Ποσοστό % ακετοντρίλιου, ρυθμός ροής, θερμοκρασία	Ferencz et al., 2020
FFD Plackett-Burman	HPLC	Φαμπριδίνη	Στερεά δοσολογική μορφή	Ρυθμός ροής, θερμοκρασία στήλης, αναλογία ρυθμιστικού	Kovács et al., 2020
Box-Behnken	RP-HPLC	Ρισπεριδόνη και προσμείξεις	Χύμα ουσία	Ποσοστό % οργανικού διαλύτη, θερμοκρασία, ρυθμός ροής	Maljurić et al., 2020

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Box-Behnken Plackett-Burman	Χειρόμορφη- HPLC	Τιμολόλη	Δοσολογική μορφή	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH, συγκέντρωση χλωριούχου αμμωνίου στην υδατική φάση	Mitrović et al., 2020
CCD	RP-HPLC	Θεοβρωμίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη και καφεΐνη	Χειροποίητες σοκολάτες	Συγκέντρωση μεθανόλης, χρόνος βαθμιδωτής έκλουσης, ρυθμός ροής,	Nascimento et al., 2020
FrFD Box-Behnken	UHPLC-MS	Θευική αταζαναβίρη	Δοσολογική μορφή	Ποσοστό % οργανικού τροποποιητή, ρυθμός ροής, όγκος έγχυσης	Saha et al., 2020
FCCD	Χειρόμορφη- HPLC	Ατενολόλη και χλωροθαλιδόνη	Δοσολογική μορφή	Είδος στατικής φάσης, ποσοστό % αιθανόλης και τριαιθυλαμίνης	Hassan et al., 2021
Box-Behnken	Χειρόμορφη- HPLC	Αμλοδιπίνη και ατενολόλη	Φαρμακευτικά σκευάσματα	Είδος στατικής φάσης, σύνθεση κινητής φάσης, είδος ρυθμιστικού	Li et al., 2021
FrFD Box-Behnken	HPLC	Φαβιπιραβίρη	Δισκία, ανθρώπινο πλάσμα	Σύνθεση κινητής φάσης, θερμοκρασία στήλης, ρυθμός ροής	Megahed et al., 2021

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Plackett-Burman Box-Behnken	RP-HPLC	Ασπιρίνη, πρασουγρέλη και κλοπιγρέλη παρουσία πρόσμειξης	Φαρμακευτικά σκευάσματα και βοτανικά φάρμακα (έλεγχος πλαστότητας)	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH και ισχύς ρυθμιστικού, ρυθμός ροής, μήκος κύματος	Mohammad et al., 2021
FFD	RP-HPLC	Φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη και τερβιναφίνη	Ανθρώπινο πλάσμα	Ποσοστό % μεθανόλης, pH, ρυθμός ροής	Roshdy et al., 2021
Plackett-Burman Box-Behnken	RP-HPLC	Μετοφορμίνη και 5 γλυπτίνες	Πλαστά βοτανικά φάρμακα	Ποσοστό % ακετονιτριλίου, pH και ισχύς ρυθμιστικού, ρυθμός ροής, μήκος κύματος	Salem et al., 2021

Πίνακας 5 (Συνέχεια)

4.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Doehlert	CZE	Λεβοσουλπιρίδη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, τύπος και συγκέντρωση ουδέτερης και φορτισμένης CD, δυναμικό	Orlandini et al., 2015
FFD	CZE	Ασπαρτικό οξύ	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD	Wahl & Holzgrabe, 2015
OAD	CZE	Βιδαγλιπτίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό, παράμετροι έγχυσης	Kazsoki et al., 2016
FrFD FCCD	CZE	Αμβισερετάνη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Krait et al., 2016

Πίνακας 6 Εφαρμογές σχεδιασμού πειραμάτων στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
OAD	CZE	Πομαλιδομίδη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση και pH BGE, θερμοκρασία, δυναμικό	Szabó, Szócs, et al., 2016
OAD	CZE	Ασenaπίνη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, συγκέντρωση μεθανόλης, θερμοκρασία, δυναμικό	Szabó, Tóth, et al., 2016
OAD	CZE	Φλουοξετίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό, παράμετροι έγχυσης	Cârcu-Dobrin et al., 2017
FrFD FCCD	CZE	Σιταφλοξασίνη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, συγκέντρωση D-Φαινυλαλανίνης, δυναμικό, συγκέντρωση ιόντων δισθενούς χαλκού (Cu^{2+})	Meng & Kang, 2017

Πίνακας 6 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
Doehlert FCCD	CZE	Πρεγκαμπαλίνη	Χύμα ουσία, κάψουλες	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Harnisch et al., 2018
FrFD FCCD	CZE	Δεξτρομεθορφάνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Krait et al., 2018
FrFD FCCD	CZE	Δεξμεντετομιδίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Krait & Scriba, 2018
Box-Behnken	CZE	Κινακαλκέτη	Χύμα ουσία, δισκία	pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, συγκέντρωση μεθανόλης, δυναμικό	Pasquini et al., 2018
FCCD	CZE	Λεναλιδομίδη	Χύμα ουσία	Συγκέντρωση BGE, θερμοκρασία, δυναμικό	Szabó et al., 2018

Πίνακας 6 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD	CZE	Βενζοδιαζεπίνες (λοραζεπάμη, λορμεταζεπάμη, οξαζεπάμη, τεμαζεπάμη)	Χύμα ουσία	pH BGE, είδος και συγκέντρωση CD, συγκέντρωση μεθανόλης	Vargas-Martínez & Ramírez-Galicia, 2018
FFD	CZE	Φαιναιθυλαμίνη (εφεδρίνη, μεθυλεφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη)	Χύμα ουσία	pH BGE, συγκέντρωση ιοντικών υγρών	Wahl & Holzgrabe, 2018
FrFD FCCD	CZE	Δαποξετίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD ₁ και CD ₂ , θερμοκρασία, δυναμικό	Harnisch & Scriba 2019
FrFD CCD	CZE	Λανσοπραζόλη και ραβεπραζόλη	Χύμα ουσία, κάψουλες	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD ₁ , θερμοκρασία, δυναμικό	Papp et al., 2019
FCCD	CZE	Τραμαδόλη	Χύμα ουσία, κάψουλες	pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία	Sarkany et al., 2019

Πίνακας 6 (Συνέχεια)

Τύπος Σχεδιασμού	Αναλυτική Τεχνική	Αναλύτες	Δείγμα	Παράγοντες	Αναφορά
FrFD FCCD	CZE	Σιταλοπράμη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό, πίεση έγχυσης	Budău et al., 2020
OAD	CZE	Αμλοδιπίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση και pH BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό, παράμετροι έγχυσης	Cârcu-Dobrin et al., 2020
FCCD	CZE	Βενλαφαζίνη	Χύμα ουσία, κάψουλες	Συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Milan et al., 2020
FFD FCCD	CZE	Λεβοδροπροπιζίνη	Χύμα ουσία, φαρμακευτικές σταγόνες	Συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό, συγκέντρωση 2- προπανόλης,	Niedermeier & Scriba, 2020a
FrFD FCCD	NACE	Λεβομεπρομαζίνη	Χύμα ουσία, δισκία	Συγκέντρωση BGE, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, δυναμικό	Niedermeier & Scriba, 2020b

Πίνακας 6 (Συνέχεια)

5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η τεράστια αύξηση των ερευνητικών εργασιών που σχετίζονται με τις εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία τα τελευταία χρόνια υποδεικνύει την πληθώρα των πλεονεκτημάτων της στρατηγικής αυτής στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων.

Οι αρχικές μελέτες συχνά βασίζονταν σε ένα μόνο σχεδιασμό για να καθορίσουν τις βέλτιστες αναλυτικές συνθήκες σε συνδυασμό με την προσέγγιση ενός παράγοντα τη φορά (μονοπαραγοντική προσέγγιση), ενώ η νεότερη τάση που ακολουθείται εστιάζει στη χρήση ενός σχεδιασμού διαλογής για τον εντοπισμό των σημαντικών πειραματικών παραγόντων ακολουθούμενο από έναν σχεδιασμό βελτιστοποίησης για την τελειοποίηση των συνθηκών διαχωρισμού. Η τελευταία στρατηγική είναι πιο αξιόπιστη και αποτελεσματική και ως εκ τούτου αξίζει να εφαρμόζεται στις περισσότερες περιπτώσεις. Αρχικά, δίνει τη δυνατότητα να εξεταστούν όλες οι πιθανές κριτικές παράμετροι, χωρίς να χρειάζεται να επιλεχθούν ποιές παράμετροι πρέπει να διορθωθούν ή να μελετηθούν κατά την εκτέλεση βελτιστοποίησης με τη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης. Επιπλέον, ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα μετακίνησης του πειραματικού πεδίου ορισμένων παραγόντων προς τη ζώνη που οδηγεί στα καλύτερα αποτελέσματα, ως αποτέλεσμα της φάσης διαλογής. Με αυτήν την προσέγγιση είναι δυνατόν να αποτραπούν αμφισβητούμενες διαδικασίες που μπορούν ωστόσο να βρεθούν στη βιβλιογραφία, όπως η εισαγωγή περαιτέρω παραγόντων που πρέπει να μελετηθούν με την ανάλυση ενός παράγοντα τη φορά μετά την ολοκλήρωση της βελτιστοποίησης πολλαπλών μεταβλητών. Αυτό οδηγεί σε εξοικονόμηση χρόνου, πειραμάτων και κόστους για τον ερευνητή.

Η χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία και ειδικότερα στις χρωματογραφικές αναλύσεις συνεχώς αυξάνεται. Για την εύρεση ενός συμβιβασμού μεταξύ της βελτιστοποίησης του διαχωρισμού και της ελαχιστοποίησης του χρόνου ανάλυσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διαφορετικές πειραματικές αποκρίσεις. Ως αποκρίσεις στην υγρή χρωματογραφία επιλέγονται η ανάλυση μεταξύ των κορυφών, ο χρόνος συγκράτησης, το εμβαδόν και το πλάτος κορυφής. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που επιλέγονται για να βελτιστοποιηθούν στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή, ο ρυθμός ροής, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, η θερμοκρασία κ.α. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας γίνεται αντιληπτό

ότι οι κεντρικοί σύνθετοι σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για τη βελτιστοποίηση, όπως φαίνεται από το πλήθος των μελετών.

Η ερμηνεία των δεδομένων των αναλύσεων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Το κύριο ερώτημα που τίθεται σχετικά με τη χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων για την ανάπτυξη μεθόδων υγρής χρωματογραφίας είναι αν ένα τετραγωνικό μοντέλο επαρκεί για να περιγράψει με ακρίβεια τη συμπεριφορά ενός συστατικού του δείγματος στην πειραματική περιοχή. Οι σχεδιασμοί Plackett-Burman χρησιμοποιούνται ευρέως για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης καθώς και για την ανάπτυξη και δοκιμή ανθεκτικότητας κατά τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς.

Συνήθως, στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) καθώς και στην MEKC οι πειραματικές μεταβλητές του σχεδιασμού πειραμάτων είναι η συγκέντρωση του BGE, το pH του BGE, η συγκέντρωση του CS, η θερμοκρασία και το δυναμικό. Ως αποκρίσεις συνήθως λαμβάνονται η χειρόμορφη ανάλυση, ο χρόνος ανάλυσης και μερικές φορές το παραγόμενο ρεύμα, η συμμετρία των κορυφών και η απόδοση. Τυπικά, αξιολογείται ένας αριθμός 4-7 παραγόντων στη φάση της διαλογής, ενώ στη φάση της βελτιστοποίησης η μελέτη περιορίζεται σε 3-4 παράγοντες. Είναι σημαντικό να ελεγχθούν αρχικά όλοι οι παράμετροι που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μέθοδο, προκειμένου να διερευνηθούν όλες οι επιδράσεις τους. Οι σημαντικοί παράγοντες για μια επιλεγμένη απόκριση προσδιορίζονται στη φάση της διαλογής. Οι βέλτιστες συνθήκες καθορίζονται με την αξιολόγηση της επίδρασης των επιλεγμένων σημαντικών παραγόντων στη φάση βελτιστοποίησης.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των ερευνητών για την CE που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, ο σχεδιασμός Doehlert και ο σχεδιασμός Plackett-Burman αποτελούν συχνές επιλογές, καθώς απαιτούν λιγότερα πειράματα από τον πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό. Ο σχεδιασμός Plackett-Burman αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική επιλογή καθώς απαιτεί λίγα πειράματα. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός χρησιμοποιείται κυρίως στη διαδικασία επικύρωσης για επαλήθευση της ανθεκτικότητας της μεθόδου, επειδή υποστηρίζει μόνο δύο επίπεδα για κάθε πειραματικό παράγοντα. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό στη φάση διαλογής των χειρόμορφων μεθόδων CE. Όσον αφορά τη βελτιστοποίηση, έχουν εφαρμοστεί αρκετοί σχεδιασμοί όπως οι CCD, OAD, Box-Behnken και Doehlert. Ο CCD

και ειδικά ο FCCD είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος σχεδιασμός στη βελτιστοποίηση των CE μεθόδων. Στη συνέχεια, η επιφάνεια απόκρισης εκτιμάται με βάση τα ευρήματα του σχεδιασμού, επιτρέποντας τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για τους παράγοντες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή των αρχών της ποιότητας μέσω σχεδιασμού (QbD) στον φαρμακευτικό τομέα κερδίζει ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Η εφαρμογή των αρχών QbD στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων επικεντρώνεται στη δόμηση της ποιότητας κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, αντί της δοκιμής μεθόδων για την ποιότητα μετά την ανάπτυξη (Megahed et al., 2021). Η εφαρμογή της προσέγγισης QbD εξασφαλίζει μια ανθεκτική μέθοδο ακολουθώντας μια συστημική και οργανωμένη πορεία στην ανάπτυξη μεθόδου.

Πρόσφατα, υπάρχει και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πράσινων αναλυτικών μεθόδων που αντικαθιστούν τους εξαιρετικά τοξικούς διαλύτες με φιλικούς προς το περιβάλλον και μειώνουν έτσι τον αριθμό και τα απόβλητα των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Δύο μελέτες χρωματογραφικής ανάλυσης που παρουσιάστηκαν ενσωμάτωσαν τις αρχές της Πράσινης Χημείας στην ανάπτυξη των μεθόδων (Pedroso et al., 2016; Megahed et al., 2021). Έχουν προταθεί διάφορα εργαλεία για την αξιολόγηση της πράσινης αναλυτικής διαδικασίας. Μεταξύ αυτών των εργαλείων, είναι διαθέσιμα δύο ποσοτικά εργαλεία: η αναλυτική οικολογική κλίμακα και το HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool). Η αναλυτική οικολογική κλίμακα αξιολογεί το πράσινο με βάση τους βαθμούς ποινής που δίνονται για κάθε ποσότητα και τύπο αντιδραστηρίου, την ενέργεια που καταναλώνεται από τα ηλεκτρικά όργανα και τον τρόπο επεξεργασίας των απορριμμάτων (Gałuszka et al., 2012). Το HPLC-EAT που αναπτύχθηκε από τους Gaber et al. (2011) είναι ένα ειδικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των χρωματογραφικών μεθόδων σχετικά με τους διαλύτες κινητής φάσης.

6. Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις

Το πλήθος των παραμέτρων βελτιστοποίησης και οι διαφορές των αναλυτών στην Αναλυτική Χημεία καθιστούν την ορθολογική επιλογή βέλτιστων πειραματικών συνθηκών μια σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου. Μια πολυμεταβλητή προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση όλων των τύπων μεταβλητών μιας αναλυτικής μεθόδου αντί της προσέγγισης της αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά, καθώς είναι οικονομική, λιγότερο χρονοβόρα και απαιτεί μικρότερο αριθμό πειραμάτων.

Ο σχεδιασμός πειραμάτων αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στη χημική ανάλυση. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η βελτίωση μεθόδου στην πειραματική έρευνα, όπως η ανάπτυξη μεθόδων σχεδιασμού πειραμάτων. Οι κύριες προσεγγίσεις στο σχεδιασμό πειραμάτων είναι οι σχεδιασμοί διαλογής και βελτιστοποίησης. Στους σχεδιασμούς διαλογής εκτιμώνται τα αποτελέσματα των παραγόντων και οι αλληλεπιδράσεις τους. Στους σχεδιασμούς βελτιστοποίησης μελετώνται οι επιδράσεις των παραγόντων που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν μια διαδικασία για να καθοριστεί πώς οι επιδράσεις τους μεγιστοποιούν ή ελαχιστοποιούν τις αποκρίσεις και συνεπώς πώς βελτιστοποιούν μια διαδικασία. Μια κύρια πρόκληση στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και συγκεκριμένα μιας χρωματογραφικής μεθόδου είναι να επιτευχθούν ικανοποιητικοί διαχωρισμοί στον μικρότερο δυνατό χρόνο, ιδιαίτερα όταν λαμβάνονται υπόψη αρκετές παράμετροι. Οι κύριες εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων στην Αναλυτική Χημεία είναι η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μεθόδου.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν πρόσφατες εφαρμογές του σχεδιασμού πειραμάτων σε δύο βασικές τεχνικές της Αναλυτικής Χημείας και συγκεκριμένα στην χρωματογραφία και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Ο σχεδιασμός πειραμάτων έχει εφαρμοστεί κυρίως για την ανακάλυψη των παραγόντων που επηρεάζουν το διαχωρισμό των φαρμακευτικών ενώσεων προκειμένου να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου και να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης.

Ο μεγάλος αριθμός των μελετών που παρουσιάστηκαν και αφορούν τη χρήση του σχεδιασμού πειραμάτων στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων αντιπροσωπεύει τη ραγδαία ανάπτυξη που συντελείται τα τελευταία χρόνια στον συγκεκριμένο τομέα. Ωστόσο, η ανάλυση των δεδομένων παραμένει μια μεγάλη

πρόκληση, καθώς απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην επεξεργασία των δεδομένων όταν λαμβάνονται πολύπλοκα μείγματα. Είναι σημαντικό να επιλεγθεί η κατάλληλη πειραματική περιοχή ώστε να αποφευχθεί η διακοπή του πειραματικού σχεδιασμού για πρακτικούς ή τεχνικούς λόγους (El Deeb et al., 2021). Για την ακριβή πρόβλεψη του χρόνου κατακράτησης των αναλυτών στη χρωματογραφία έχουν υιοθετηθεί μελλοντικές προσεγγίσεις και διαφαίνεται ότι πολλά υποσχόμενα εργαλεία, όπως οι προσομοιώσεις Monte Carlo και Μοριακής Δυναμικής, θεωρείται ότι εξηγούν και ερμηνεύουν σύνθετα δεδομένα (Gritti, 2021).

Υπάρχουν και άλλες διαδικασίες που μπορούν να βελτιστοποιηθούν στην Αναλυτική Χημεία, όπως η προκατεργασία του δείγματος καθώς και μέθοδοι που αφορούν τη σταθερότητα των δειγμάτων. Η επιλογή και ρύθμιση του κατάλληλου σχεδιασμού πειραμάτων βελτιώνει την απόδοση μιας μεθόδου. Συνεπώς, στο εγγύς μέλλον ο σχεδιασμός πειραμάτων θα αποτελεί αναμφισβήτητα διαδικασία ρουτίνας στην Αναλυτική Χημεία.

Βιβλιογραφία

Abdelgawad, M. A., Owis, A. I., & Abdelwahab, N. S. (2018). Design and optimization of a reversed-phase HPLC with diode array detection method for the determination of acemetacin and its toxic impurities using experimental design. *Separation Science Plus*, 1(4), 244-252. <https://doi.org/10.1002/sscp.201700045>

Abdelhameed, E. A., Abdelsalam, R. A., & Hadad, G. M. (2015). Chemometric-assisted spectrophotometric methods and high performance liquid chromatography for simultaneous determination of seven β -blockers in their pharmaceutical products: a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 141, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.01.035>

Abdou, E. M., Kandil, S. M., & Miniawy, H. M. F. E. (2017). Brain targeting efficiency of antimigrain drug loaded mucoadhesive intranasal nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1-2), 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.030>

Ahmed, R. M., Ibrahim, A., El-Gendy, A. E., & Hadad, G. M. (2018). Implementing a Quality by Design approach in chromatographic determination of some antidiabetic drugs. *ScienceForecast Journal of Pharmaceutical and Analytical Chemistry*, 1(1), 1-9. <https://scienceforecastoa.com/Articles/SJPAC-V1-E1-1001.pdf>

Ahmed, S., Alqurshi, A., & Mohamed, A. I. (2018). Development of a chromatographic method with multi-criteria decision making design for simultaneous determination of nifedipine and atenolol in content uniformity testing. *Talanta*, 184, 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.008>

Ahuja, S. (2011). Overview of modern pharmaceutical analysis. *Separations Science and Technology*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375680-0.00001-2>

Åsberg, D., Leško, M., Samuelsson, J., Karlsson, A., Kaczmariski, K., & Fornstedt, T. (2016). Combining Chemometric Models with Adsorption Isotherm Measurements to Study Omeprazole in RP-LC. *Chromatographia*, 79(19), 1283–1291. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3151-8>

Attimarad, M., Venugopala, K. N., Sreeharsha, N., Aldhubiab, B. E., & Nair, A. B. (2020). Validation of rapid RP-HPLC method for concurrent quantification of amlodipine and celecoxib in pure and formulation using an experimental design. *Microchemical Journal*, 152(3). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104365>

Bapatu, H. R., Maram, R. K., Cho, W. H., & Pasagadugula, V.B.R. (2016). QbD approach method development for estimation of dabigatran etexilate along with its impurities and identification of degradants in capsule dosage form. *American Journal of Analytical Chemistry* 7(6), 494–524. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2016.76047>

Beg, S., Jain, A., Kaur, R., Panda, S. S., Katare, O. P., & Singh, B. (2016). QbD-driven development and validation of an efficient bioanalytical UPLC method for estimation of olmesartan medoxomil. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(13), 585-597. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1206023>

Beg, S., Sharma, G., Katare, O. P., Lohan, S., & Singh, B. (2015). Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Estimating Olmesartan Medoxomil Using Quality by Design. *Journal of Chromatographic Science*, 53(7), 1048–1059. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu165>

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L .S., & Escaleira, L A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester: Wiley, p.489

Budău, M., Hancu, G., Muntean, D. L., Papp, L. A., Cârje, A. G., & Garaj, V. (2020). Enantioseparation of citalopram enantiomers by capillary electrophoresis: Method development through experimental design and computational modeling. *Chirality*, 32(8), 1119–1128. <https://doi.org/10.1002/chir.23255>

Candioti, L. V., De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in

analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>

Cârcu-Dobrin, M., Budău, M., Hancu, G., Gagy, L., Rusu, A., & Kelemen, H. (2017). Enantioselective analysis of fluoxetine in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 397-403.

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.09.007>

Cârcu-Dobrin, M., Sabău, A. G., Hancu, G., Árpád, G., Rusu, A., Kelemen, H., Papp, L. A., & Cârje, A. (2020). Chiral discrimination of amlodipine from pharmaceutical products using capillary electrophoresis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 1-9.

<https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000318259>

Chankvetadze B. (2018). Contemporary theory of enantioseparations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography, A*, 1567, 2-25.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.041>

Chigbu, U. E., Atiku, S. O., & Du Plessis, C. C. (2023). The Science of Literature Reviews: Searching, Identifying, Selecting and Synthesising. *Publications*, 11(1), 1-16.

<https://doi.org/10.3390/publications11010002>

Dai, S. Y., Xu, B., Zhang, Y., Li, J. Y., Sun, F., Shi, X. Y., & Qiao, Y. J. (2016). Establishment and reliability evaluation of the design space for HPLC analysis of six alkaloids in *Coptis chinensis* (Huanglian) using Bayesian approach. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(9), 697-708. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30083-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30083-8)

Dalvi, A. V., Uppuluri, C. T., Bommireddy, E. P., & Ravi, P. R. (2018). Design of experiments-based RP - HPLC bioanalytical method development for estimation of Rufinamide in rat plasma and brain and its application in pharmacokinetic study. *Journal of chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1102-1103, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.014>

Dash, R. N., Habibuddin, M., Humaira, T., & Patel, A. A. (2015). Application of quality by design for the optimization of an HPLC method to determine ezetimibe in a supersaturable self nanoemulsifying formulation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(8), 874-885. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.982867>

- Dawud, E. R., & Shakya, A. K. (2019). HPLC-PDA analysis of ACEinhibitors, hydrochlorothiazide and indapamide utilizing design of experiments. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 718–728. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.052>
- Deidda, R., Avohou, H. T., Baronti, R., Davolio, P. L., Pasquini, B., Del Bubba, M., Hubert, C., Hubert, P., Orlandini, S., & Furlanetto, S. (2019). Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.032>
- Deidda, R., Orlandini, S., Hubert, P., & Hubert, C. (2018). Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 161, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.050>
- Dejaegher, B., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2013). Experimental Design Methodologies in the Optimization of Chiral CE or CEC Separations: An Overview. In: Scriba, G. (eds) Chiral Separations. *Methods in Molecular Biology*, 970, 409-427. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-263-6_26
- Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2007). Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.086>
- Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2009). The use of experimental design in separation science. *Acta Chromatographica*, 21(2), 161-201. <https://doi.org/10.1556/achrom.21.2009.2.1>
- Dejaegher B., & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), 141-158. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.023>
- Durakovic, B. (2017). Design of Experiments Application, Concepts, Examples: State of the Art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 5(3), 421-439. <http://dx.doi.org/10.21533/pen.v5i3.145>

Durakovic, B., & Bašić, H. (2013). Continuous Quality Improvement in Textile Processing by Statistical Process Control Tools: A Case Study of Medium-Sized Company. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 1(1), 36-46. <http://dx.doi.org/10.21533/pen.v1i1.15>

Durakovic, B., & Torlak, M. (2017). Simulation and experimental validation of phase change material and water used as heat storage medium in window applications. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(5), 1837-1846. http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol8/vol8_N5/195-JMES-2566-Durakovic.pdf

Ebrahimi-Najafabadi, H., Leardi, R., & Jalali-Heravi, M. (2014). Experimental Design in Analytical Chemistry-Part I: Theory. *Journal of Association of Official Analytical Collaboration International*, 97(1), 3-11. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEEbrahimi1>

El Deeb, S., Silva, C. F., Junior, C. S. N., Hanafi, R. S., & Borges, K. B. (2021). Chiral Capillary Electrokinetic Chromatography: Principle and Applications, Detection and Identification, Design of Experiment, and Exploration of Chiral Recognition Using Molecular Modeling. *Molecules*, 26(10), 1-31. <https://doi.org/10.3390/molecules26102841>

Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., & Wold, S. (2008). *Design of Experiments-Principles and Applications*. Umetrics AB: Umeå, Sweden, 3rd Edition.

Fanali, S., & Chankvetadze, B. (2019). Some thoughts about enantioseparations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 40(18-19), 2420-2437. <https://doi.org/10.1002/elps.201900144>

FDA. (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration Silver Spring, Maryland. Ανακτήθηκε από <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>

Fekete, S., Sadat-Noorbakhsh, V., Schelling, C., Molnár, I., Guillarme, D., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2018). Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and Cannabis sativa extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.059>

Ferencz, E., Kovács, B., Boda, F., Foroughbakhshfasaei, M., Kelemen, É. K., Tóth, G., & Szabó, Z. I. (2020). Simultaneous determination of chiral and achiral impurities of ivabradine on a cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) chiral column using polar organic mode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 177, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112851>

Flor, S., Huala Juan, M., Tripodi, V., & Lucangioli, S. (2016). Development of an enantioselective capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of montelukast enantiomeric and diastereoisomeric forms and its main degradation product. *Electrophoresis*, 37(17-18), 2420–2428. <https://doi.org/10.1002/elps.201600191>

Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. dos S., Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 1-16. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>

Funari, C. S., Cavaleiro, A. J., & Carneiro, R. L. (2018). Coupled monolithic columns as an alternative for the use of viscous ethanol–water mobile phases on chromatographic fingerprinting complex samples, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(3), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.04.010>

Gaber, Y., Tömvall, U., Kumar, M.A. Amin, M.A., & Hatti-Kaul, R. (2011). HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. *Green Chemistry*, 13(8), 2021-2025. <https://doi.org/10.1039/C0GC00667J>

Gad, M., Zaazaa, H. E., Amer, S. M., & Korany, M. A. (2017). Quality by Design Approach for Establishment of Stability Indicating Method for Determination of Cefditoren Pivoxil. *Journal of Pharmaceutical Analysis and Insights*, 2(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.16966/2471-8122.112>

Gałaszka, A., Migaszewski, Z. M., Konieczka, P., & Namiesnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of Analytical Procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>

Ganorkar, A. V., & Gupta, K. R. (2017). Analytical Quality by Design: A mini review, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(6), 1555–1559. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2017.01.000484>

Ganorkar, S. B., Dhumal, D. M., & Shirkhedkar, A. A. (2017). Development and validation of simple RP-HPLC-PDA analytical protocol for zileuton assisted with design of experiments for robustness determination. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.03.009>

Ganorkar, S. B., & Shirkhedkar, A. A. (2017). Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: analytics, applications, implications and future prospects. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3), 1-43. <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0025>

Garud, S. S., Karimi, I. A., & Kraft, M. (2017). Design of computer experiments: A review. *Computers & Chemical Engineering*, 106, 71-95. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2017.05.010>

Giordano, B. C., Siefert, R., & Collins, G. E. (2019). Micellar Electrokinetic Chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 1906, 87–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8964-5_6

González Mendia, O., Blanco, M. E., Rico, E., Alonso, M. L., Maguregui, M. I., & Alonso, R. M. (2017). Efficient Method Development and Validation for the Determination of Cardiovascular Drugs in Human Plasma by SPE–UHPLC–PDA–FLD. *Chromatographia*, 80, 605–615. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3274-6>

Goupy, J. L. (1993). *Methods for Experimental Design*, Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 1st Edition. <https://doi.org/10.1002/cem.1180080408>

Gritti, F. (2021). Perspective on the Future Approaches to Predict Retention in Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 93(14), 5653–5664. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05078>

Gundala, A., Prasad, K., & Koganti, B. (2019). Application of quality by design approach in RP-HPLC method development for simultaneous estimation of saxagliptin and dapagliflozin in tablet dosage form. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000218129>

Guo, H., & Mettas, A. (2012). *Design of Experiments and Data Analysis*. Annual Reliability and Maintainability Symposium. https://www.weibull.com/pubs/2012_RAMS_design_of_experiments_and_data_analysis.pdf

Harnisch, H., Chien, Yh., & Scriba, G. K. E. (2018). Capillary Electrophoresis Method for the Chiral Purity Determination of Pregabalin Derivatized with Dansyl Chloride. *Chromatographia*, 81, 719–725. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3495-3>

Harnisch, H., & Scriba, G. K. E. (2019). Capillary electrophoresis method for the determination of (R)-dapoxetine, (3S)-3-(dimethylamino)-3-phenyl-1-propanol, (S)-3-amino-3-phenyl-1-propanol and 1-naphthol as impurities of dapoxetine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.039>

Hassan, R. M., Saleh, O. A., El-Azzouny, A. A., Aboul-Enein, H. Y., & Fouad, M. A. (2021). Experimental design optimization of simultaneous enantiomeric separation of atenolol and chlorthalidone binary mixture by high-performance liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. *Chirality*, 33(7), 397–408. <https://doi.org/10.1002/chir.23315>

Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>

ICH. (2005a). ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH: Geneva, Switzerland.

ICH. (2005b). ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Quality Risk Management Q9, current Step 4 version*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH: Geneva, Switzerland.

ICH. (2008). ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Pharmaceutical Quality System Q10, current Step 4 version*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH: Geneva, Switzerland

ICH. (2009). ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Pharmaceutical Development Q8(R2), current Step 4 version*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH: Geneva, Switzerland

ICH. (2012). ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Development and Manufacture of Drug Substances Q11, current Step 4 version*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH: Geneva, Switzerland

Ivanova, S., Todorova, V., Dyankov, S., & Ivanov, K. (2022). High-Performace Thin-Layer Chromatography (HPTLC) Method for Identification of Meloxicam and Piroxicam. *Processes*, 10(2), 394. <https://doi.org/10.3390/pr10020394>

Jackson, P., Borman, P., Campa, C., Chatfield, M., Godfrey, M., Hamilton, P., Hoyer, W., Norelli, F., Orr, R., & Schofield, T. (2019). Using the analytical target profile to drive the analytical method lifecycle. *Anaytical Chemistry*, 91(4), 2577–2585. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04596>

Jančić-Stojanović, B. (2013). Factorial-Based Designs in Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 76, 227–240. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2350-1>

Jebali, S., Belgacem, C., Louhaichi, M. R., Bahri, S., & Latrous El Atarche, L. (2019). Application of Factorial and Doehlert Designs for the Optimization of the Simultaneous Separation and Determination of Antimigraine Drugs in Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC-UV. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/9685750>

Jovanović, M., Rakić, T., Tumpa, A., & Jančić Stojanović, B. (2015). Quality by Design approach in the development of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of iohexol and its impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 110, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.046>

Kalariya, P. D., Namdev, D., Srinivas, R., & Gananadhamu, S. (2017). Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(1), S373–S382. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.04.004>

Kannappan, V., & Kanthiah, S. (2017). Enantiopurity Assessment of Chiral Switch of Ondansetron by Direct Chiral HPLC. *Chromatographia* 80(2), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3228-4>

Kant, R., Bodla, R. B., Bhutani, R., & Kapoor, G. (2019). Enantioselective Box Behenken Optimized HPLC-DAD Method for the Simultaneous Estimation of Alogliptin Enantiomorphs in Pharmaceutical Formulations and their Pharmacokinetic Study in Rat Plasma. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(1), 147–158. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.018>

Kasagić-Vujanović, I., Janić-Stojanović, B., Rakić, T., & Ivanović, D. (2015). Design of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(8), 919–928. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.991872>

Kazsoki, A., Fejős, I., Sohajda, T., Zhou, W., Hu, W., Szente, L., & Béni, S. (2016). Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers. *Electrophoresis*, 37(10), 1318–1325. <https://doi.org/10.1002/elps.201500442>

- Klampfl, C. W., & Himmelsbach, M. (2016). Nonaqueous Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 1483, 111–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6403-1_7
- Komsta, L., Heyden, Y. V., & Sherma, J. (2018). *Chemometrics in chromatography*. CRC Press. Boca Raton, USA. <https://doi.org/10.1201/9781315154404>
- Kovács, B., Boda, F., Fülöp, I., Székely-Szentmiklósi, I., Kelemen, É. K., Kovács-Deák, B., & Székely-Szentmiklósi, B. (2020). HPLC method development for fampridine using Analytical Quality by Design approach, *Acta Pharmaceutica*, 70(4), 465–482; <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0036>
- Krait, S., Douša, M., & Scriba, G. K. (2016). Quality by design-guided development of a capillary electrophoresis method for the chiral purity determination of ambrisentan. *Chromatographia*, 79, 1343-1350.
- Krait, S., Heuermann, M., & Scriba, G. K. E. (2018). Development of a capillary electrophoresis method for the determination of the chiral purity of dextromethorphan by a dual selector system using quality by design methodology. *Journal of Separation Science*, 41(6), 1405–1413. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701166>
- Krait, S., Konjaria, M. L., & Scriba, G. K. E. (2021). Advances of capillary electrophoresis enantioseparations in pharmaceutical analysis (2017-2020). *Electrophoresis*, 42(17-18), 1709–1725. <https://doi.org/10.1002/elps.202000359>
- Krait, S., & Scriba, G. K. (2018). Quality by design-assisted development of a capillary electrophoresis method for the chiral purity determination of dexmedetomidine. *Electrophoresis*, 39(20), 2575-2580. <https://doi.org/10.1002/elps.201800100>
- Krishna, M. V., Dash, R. N., Reddy, B. J., Venugopal, P., Sandeep, P. & Madhavi, G. (2016). Quality by design (QbD) approach to develop HPLC method for eberconazole nitrate: application oxidative and photolytic degradation kinetics. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(1), 313- 322. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.001>
- Kumar, L., Reddy, M. S., Managuli, R. S., & Pai, G. K. (2015). Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(5), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.02.001>

- Lafossas, C., Benoit-Marquié, F., & Garrigues, J. C. (2019). Analysis of the retention of tetracyclines on reversed-phase columns: Chemometrics, design of experiments and quantitative structure-property relationship (QSPR) study for interpretation and optimization. *Talanta*, 198, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.051>
- Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 652(1-2), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.015>
- Leardi, R. (2013). Experimental design. In: Data Handling in Science and Technology. *Elsevier*, 28, 9-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00002-8>
- Lee, R. (2019). Statistical Design of Experiments for Screening and Optimization. *Chemie Ingenieur Technik*, 91(3), 191-200. <https://doi.org/10.1002/cite.201800100>
- Li, M., Jiang, Z., Guo, X., Di, X., & Yu, J. (2021). Enantioseparation and modelling study of six proton pump inhibitors on a novel 3,5-dichloro-phenylcarbamated β -cyclodextrin chemically bonded chiral stationary phase by high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 166, 106211. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106211>
- Lobrutto, R., & Patel, T. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Hoboken, 1st Edition, p. 455-502. <https://doi.org/10.1002/0470087951>
- Mahrouse, M. A., & Lamie, N. T. (2019). Experimental design methodology for optimization and robustness determination in ion pair RP-HPLC method development: Application for the simultaneous determination of metformin hydrochloride, alogliptin benzoate and repaglinide in tablets. *Microchemical Journal*, 147, 691-706. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.038>
- Maksić, J., Tumpa, A., Stajić, A., Jovanović, M., Rakić, T., & Jančić-Stojanović, B. (2016). Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron HCl and its related substances. Retention mechanisms and method development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.010>

Maljurić, N., Otašević, B., Golubović, J., Krmar, J., Zečević, M., & Protić, A. (2020). A new strategy for development of eco-friendly RP-HPLC method using corona charged aerosol detector and its application for simultaneous analysis of risperidone and its related impurities. *Microchemical Journal*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104394>

Mannemala, S. S., & Kannappan, V. (2015). Statistical design in optimization and robustness testing of a RP-HPLC method for determination of warfarin and its process-related impurities. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 12, 1325–1332. <https://doi.org/10.1007/s13738-015-0597-9>

Mannemala, S. S., & Kannappan, V. (2016). Multiple response optimization of a liquid chromatographic method for determination of fluoroquinolone and nitroimidazole antimicrobials in serum and urine. *Clinical Biochemistry*, 49(7-8), 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.12.013>

Mattrey, F. T., Makarov, A. A., Regalado, E. L., Bernardoni, F., Figus, M., Hicks, M. B., Zheng, J., Wang, L., Schafer, W., Antonucci, V., Hamilton, S. E., Zawatzky, K., & Welch, C. J. (2017). Current challenges and future prospects in chromatographic method development for pharmaceutical research. *Trends in Analytical Chemistry*, 95, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.021>

Megahed, S., Habib, A., Hammad, S., & Kamal, A. (2021). Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*, 3(2), 70-78. <https://doi.org/10.51435/turkjac.963652>

Meng, R., & Kang, J. (2017). Determination of the stereoisomeric impurities of sitafloxacin by capillary electrophoresis with dual chiral additives. *Journal of Chromatography A*, 1506, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.010>

Milan, A., Hancu, G., Lupu, D., Budău, M., Garaj, V., & Kelemen, H. (2020). Venlafaxine chiral separation by capillary electrophoresis using cyclodextrin derivatives as chiral selector and experimental design method optimization. *Symmetry*, 12(5), 1-11. <https://doi.org/10.3390/sym12050849>

- Milošević, N., Vemić, A., Čolović, J., Kostić, N., & Malenović, A. (2017). Design of Experiments-Design space approach for development of chaotropic chromatography method for determination of trimetazidinedihydrochloride and two impurities. *Chromatographia*, 80(4), 585–592. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3275-5>
- Mitrović, M., Protić, A., Malenović, A., Otašević, B., & Zečević, M. (2020). Analytical quality by design development of an ecologically acceptable enantioselective HPLC method for timolol maleate enantiomeric purity testing on ovomucoid chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 180, 113034. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113034>
- Mohammad, M. A., Elkady, E. F., Fouad, M. A., & Salem, W. A. (2021). Analysis of Aspirin, Prasugrel and Clopidogrel in Counterfeit Pharmaceutical and Herbal Products: Plackett-Burman Screening and Box-Behnken Optimization. *Journal of Chromatographic Science*, 59(8), 730–747. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaal13>
- Mokhtar, H. I., Abdel-Salam, R. A., & Haddad, G. M. (2015). Development of a fast high performance liquid chromatographic screening system for eight antidiabetic drugs by an improved methodology of in-silico robustness simulation. *Journal of Chromatography A*, 1399, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.038>
- Montemurro, M., De Zan, M. M., & Robles, J. C. (2016). Optimized high performance liquid chromatography-ultraviolet detection method using core-shell particles for the therapeutic monitoring of methotrexate. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.12.001>
- Montgomery, D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 4th Edition.
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 5th Edition.

Moussa, B. A., Hashem, H. M. A., Mahrouse, M. A., & Mahmoud, S. T. (2018). Experimental design approach in HPLC method development: application for the simultaneous determination of sacubitril and valsartan in presence of their impurities and investigation of degradation kinetics. *Chromatographia*, 81, 139–156. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3425-9>

Murthy, M. V., Krishnaiah, C., Srinivas, K., Rao, K. S., Kumar, N. R. & Mukkanti, K. (2013). Development and validation of RP-UPLC method for the determination of darifenacin hydrobromide, its related compounds and its degradation products using design of experiments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.09.013>

Nascimento M. M., Santos, H. M., Coutinho, J. P., Lobo, I. P., da Silva Junior, A. L. S., Santos, A.G., & de Jesus, R. M. (2020). Optimization of chromatographic separation and classification of artisanal and fine chocolate based on its bioactive compound content through multivariate statistical techniques. *Microchemical Journal*, 152, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104342>

Niedermeier, S., & Scriba, G. K. E. (2017). A quality by design-based approach to a capillary electrokinetic assay for the determination of dextromepromazine and levomepromazine sulfoxide as impurities of levomepromazine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 146, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.003>

Niedermeier, S., & Scriba, G.K.E. (2020a). Quality by Design-Based Development of a Chiral Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Dextropropizine and 1-Phenylpiperazine as Impurities of Levodropropizine. *Chromatographia*, 83, 123–129. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03817-7>

Niedermeier, S., & Scriba, G. K. E. (2020b). Chiral separation of four phenothiazines by nonaqueous capillary electrophoresis and quality by design-based method development for quantification of dextromepromazine as chiral impurity of levomepromazine. *Journal of Chromatography A*, 1624, 461232. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461232>

Oliva, A., Monzón, C., Santoveña, A., Fariña, J. B., & Llabrés, M. (2016). Development of an ultra high performance liquid chromatography method for determining triamcinolone acetone in hydrogels using the design of experiments/design space strategy in

combination with process capability index. *Journal of Separation Science*, 39(14), 2689–2701. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600273>

Orlandini, S., Pasquini, B., Caprini, C., Del Bubba, M., Douša, M., Pinzauti, S., & Furlanetto, S. (2016). Enantioseparation and impurity determination of ambrisentan using cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography: Visualizing the design space within quality by design framework. *Journal of Chromatography A*, 1467, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.082>

Orlandini, S., Pasquini, B., Del Bubba, M., Pinzauti, S., & Furlanetto, S. (2015). Quality by design in the chiral separation strategy for the determination of enantiomeric impurities: development of a capillary electrophoresis method based on dual cyclodextrin systems for the analysis of levosulpiride. *Journal of Chromatography A*, 1380, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.065>

Orlandini, S., Pinzauti, S., & Furlanetto, S. (2013). Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 443–50. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6302-2>

Otto, M. (2017). *Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry*. Weinheim, Germany, Wiley-VCH, 3rd Edition. Ανακτήθηκε από http://www.ciando.com/img/books/extract/3527699368_lp.pdf

Panda, S. S., Ravi Kumar, V. V., Beg, S., Sahu, S. K., & Muni, S. (2016). Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Estimating Vilazodone Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form Using Quality by Design. *Journal of Chromatographic Science*, 54(10), 1713–1722. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw127>

Pantović, J., Malenović, A., Vemić, A., Kostić, N., & Medenica, M. (2015). Development of liquid chromatographic method for the analysis of dabigatran etexilate mesilate and its ten impurities supported by quality-by-design methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.009>

Papp, L. A., Hancu, G., Gyéresi, Á., Kelemen, H., Szabó, Z. I., Noszál, B., Dubský, P., & Tóth, G. (2019). Chiral separation of lansoprazole and rabeprazole by capillary

electrophoresis using dual cyclodextrin systems. *Electrophoresis*, 40(21), 2799–2805.

<https://doi.org/10.1002/elps.201900107>

Park, G., Kim, M. K., Go, S. H., Choi, M., & Jang, Y. P. (2022). Analytical Quality by Design (AQbD) Approach to the Development of Analytical Procedures for Medicinal Plants. *Plants*, 11(21), 1-20. <https://doi.org/10.3390/plants11212960>

Pasquini, B., Orlandini, S., Villar-Navarro, M., Caprini, C., Del Bubba, M., Douša, M., Giuffrida, A., Gotti, R., & Furlanetto, S. (2018). Chiral capillary zone electrophoresis in enantioseparation and analysis of cinacalcet impurities: Use of Quality by Design principles in method development. *Journal of Chromatography A*, 1568, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.021>

Patel, P. N., Karakam, V. S., Samanthula, G., & Ragampeta, S. (2015). Quality-by-design-based ultra high performance liquid chromatography related substances method development by establishing the proficient design space for sumatriptan and naproxen combination. *Journal of Separation Science*, 38(19), 3354–3362. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500343>

Patel, K. G., Patel, A. T., Shah, P. A., & Gandhi, T. R. (2017). Multivariate optimization for simultaneous determination of aspirin and simvastatin by reverse phase liquid chromatographic method using AQbD approach. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(2), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.08.003>

Patel, K. G., Shah, P. S., & Gandhi, T. R. (2016). Stability-indicating high-performance thin-layer chromatographic method for the estimation of ambroxol hydrochloride and doxofylline in a pharmaceutical formulation using experimental design in robustness study. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 29(2), 132-139. <http://dx.doi.org/10.1556/1006.2016.29.2.7>

Patel, K. G., Shah, P. M., Shah, P. A., & Gandhi, T. R. (2016). Validated high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) method for simultaneous determination of nadifloxacin, mometasone furoate, and miconazole nitrate cream using fractional factorial design. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.02.011>

- Pedroso, T. M., Medeiros, A. C. D., & Salgado, H. R. N. (2016). RP-HPLC×HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. *Talanta*, 160, 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.016>
- Peraman, R., Bhadraya, K., & Padmanabha Reddy, Y. (2015). Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/868727>
- Pham, T-V., Mai, X-L., Le, T-A-T., Lee, J-Y., Lee, G., Kim, D-J., Han, S-B., & Kim, K. H. (2019). Development and validation of an HPLC method using a less hazardous mobile phase for the determination of some β -lactams. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 40(9), 863–871. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11836>
- Politis, S. N., Colombo, P, Colombo, G, & Rekkas D. M. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(6), 889-901. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>
- Qi, F., Zhao, L., Zhou, A., Zhang, B., Li, A., Wang, Z., & Han, J. (2015). The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *BioScience Trends*, 9(1), 16-34. <https://doi.org/10.5582/bst.2015.01019>
- Ranade, S. S., & Thiagarajan, P. (2017). Selection of a design for response surface. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(2), 1-14. <http://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022043>
- Roshdy, A., Elmansi, H., Shalan, S., & El-Brashy, A. (2021). Factorial design-assisted reversed phase-high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of fluconazole, itraconazole and terbinafine. *Royal Society Open Science*, 8(2), 1-15. <https://doi.org/10.1098/rsos.202130>
- Saha, C., Gupta, N. V., & Chandan, R. S. (2020). Development and validation of a UPLC-MS method for determination of atazanavir sulfate by the “analytical quality by design” approach, *Acta Pharmaceutica*, 70(1), 17–33. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0008>

Sahoo, D. K., & Sahu, P. K. (2015). Chemometric Approach for RPHPLC Determination of Azithromycin, Secnidazole, and Fluconazole Using Response Surface Methodology. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(6), 750–758. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.968664>

Salem, W. A., Elkady, E. F., Fouad, M. A., & Abdul-Azim Mohammad, M. (2021). Analysis of Metformin and Five Gliptins in Counterfeit Herbal Products: Designs of Experiment Screening and Optimization. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists International*, 104(6), 1667–1680. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab106>

Sandhu, P. S., Beg, S., Katare, O. P., & Singh, B. (2016). QbD-Driven Development and Validation of a HPLC Method for Estimation of Tamoxifen Citrate with Improved Performance. *Journal of Chromatographic Science*, 54(8), 1373–1384. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw090>

Sarkany, A., Hancu, G., Cârje, A. Drăgu?, C., & Papp, L.A. (2019). Chiral separation of tramadol enantiomers by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors and experimental design method optimization. *Chemical Papers*, 73(9), 2363–2370. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00789-8>

Saroj, S., Jairaj, V., & Rathod, R. (2017). Applying green analytical chemistry for development and validation of RP-HPLC stability indicating assay method for estimation of fenoverine in bulk and dosage form using quality by design approach. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(7), 340–352. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1304414>

Schlueter, A., & Geyer, P. (2018). Linking BIM and Design of Experiments to balance architectural and technical design factors for energy performance. *Automation in Construction*, 86, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.autcon.2017.10.021>

Shao, J., Cao, W., Qu, H., Pan, J., & X. Gong, X. (2018). A novel quality by design approach for developing an HPLC method to analyze herbal extracts: A case study of sugar content analysis, *PLoS One* 13(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198515>

Sharma, N., Singh, S., Behl, T., Gupta, N., Gulia, R., & Kanojia, N. (2022). Explicating the Applications of Quality by Design Tools in Optimization of Microparticles and Nanotechnology Based Drug Delivery Systems. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), 4317-4336. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.43174336>

Schmidt, A. H., Stanic, M., & Molnár, I. (2014). In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling-Case study pramipexole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.12.023>

Silva, B. D., Valdomiro Gonzaga, L., Fett, R., & Oliveira Costa, A. C. (2019). Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from Mimosa scabrella Benth honeydew honeys by HPLC/DAD. *Journal of Chromatography. A*, 1585, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.072>

Singh, B., Raza, K., & Beg, S. (2013). Developing “Optimized” drug product employing “Designed” Experiment. *Chemical Industry Digest*, 12, 70-76. https://www.researchgate.net/profile/Bhupinder-Singh/publication/242653046_Developing_Optimized_Drug_Products_Employing_Design_Experiments/links/0deec52d7cd43328a9000000/Developing-Optimized-Drug-Products-Employing-Designed-Experiments.pdf

Sivertsen, E., Bjerke, F., Almøy, T., Segtan, V., & Næs, T. (2007). Multivariate optimization by visual inspection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 85(1), 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.05.005>

Skartland, L K., Mjøs, S. A., & Grung, B. (2011). Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(38), 6823-6831. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.077>

Sousa, J. P., Nogueira, E. F., Ferreira, L. S., Lopes, N. P., & Lopes, J. L. (2016). Validation of analytical procedures using HPLC-ELSD to determine six sesquiterpene lactones in Eremanthus species. *Biomedical Chromatography*, 30(3), 484–493. <https://doi.org/10.1002/bmc.3576>

Stojanović, J., Krmar, J., Protić, A., Svrkota, B., Đajić, N., & Otašević, B. (2021). Experimental design in HPLC separation of pharmaceuticals. *Arhiv za farmaciju*, 71(4), 279-301. <https://doi.org/10.5937/arhfarm71-32480>

Supare, V., Wadher, K., & Umekar, M. (2021). Experimental Design: Approaches and Applications in Development of Pharmaceutical Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(4-S), 154-161. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i4-S.4908>

Swain, S., Sahu, P. K., Prasad, G. V. S., Panda, J., & Murthy, Y. L. N. (2015). RP-HPLC Method for determination of Metaxalone using Box-Behnken Experimental Design. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 2(2), 40-49. <https://doi.org/10.14205/2309-4435.2014.02.02.1>

Sylvester, B., Tefas, L., Vlase, L., Tomuță, I., & Porfire, A. (2018). A Quality by Design (QbD) approach to the development of a gradient high-performance liquid chromatography for the simultaneous assay of curcuminoids and doxorubicin from long-circulating liposomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 158, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.018>

Szabó, Z.-I., Foroughbakhshfasaei, M., Gál, R., Horváth, P., Komjáti, B., Noszál, B., & Tóth, G. (2018). Chiral separation of lenalidomide by liquid chromatography on polysaccharide-type stationary phases and by capillary electrophoresis using cyclodextrin selectors. *Journal of Separation Science*, 41(6), 1414–1423. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701211>

Szabó, Z. I., Szócs, L., Muntean, D. L., Noszál, B., & Tóth, G. (2016). Chiral Separation of Uncharged Pomalidomide Enantiomers Using Carboxymethyl- β -Cyclodextrin: A Validated Capillary Electrophoretic Method. *Chirality*, 28(3), 199–203. <https://doi.org/10.1002/chir.22563>

Szabó, Z. I., Tóth, G., Völgyi, G., Komjáti, B., Hancu, G., Szente, L., Sohajda, T., Béni, S., Muntean, D. L., & Noszál, B. (2016). Chiral separation of asenapine enantiomers by capillary electrophoresis and characterization of cyclodextrin complexes by NMR spectroscopy, mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.022>

Szerkus, O., Jacyna, J., Wiczling, P., Gibas, A., Sieczkowski, M., Siluk, D., Matuszewski, M., Kaliszan, R., & Markuszewski, M. J. (2016). Ultra-high performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and prostate tissue with use of experimental design optimization procedures. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1029-1030, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.051>

Taraji, M., Haddad, P. R., Amos, R. I. J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J. W., Pohl, C. A. (2017). Rapid method development in hydrophilic interaction liquid chromatography for pharmaceutical analysis using a combination of quantitative structure-retention relationships and design of experiments. *Analytical Chemistry*, 89(3), 1870–1878. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04282>

Terzić, J., Popović, I., Stajić, A., Tumpa, A., & Jančić-Stojanović, B. (2016). Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.022>

Thakur, D., Jain, A., Ghoshal, G., Shivhare, U. S., & Katare, O. P. (2017). RP-HPLC method development using analytical QbD approach for estimation of cyanidin-3-O-glucoside in natural biopolymer based microcapsules and tablet dosage form. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47, 413–427. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0269-5>

Thakur, D., Kaur, A., & Sharma, S. (2017). Application of QbD based approach in method development of RP-HPLC for simultaneous estimation of antidiabetic drugs in pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47, 229–239. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0256-x>

Tol, T., Kadam, N., Raotole, N., Desai, A., & Samanta, G. (2016). A simultaneous determination of related substances by high performance liquid chromatography in a drug product using quality by design approach. *Journal of Chromatography A*, 1432, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.080>

Van Dam, D., Vermeiren, Y., Aerts, T., & De Deyn, P. P. (2014). Novel and sensitive reversed-phase high-pressure liquid chromatography method with electrochemical detection for the simultaneous and fast determination of eight biogenic amines and metabolites in human brain tissue. *Journal of Chromatography A*, 1353, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.004>

Vargas-Martínez, M. G., & Ramírez-Galicia, G. (2018). Molecular modeling and chiral separation of benzodiazepines by capillary electrophoresis using highly sulfated cyclodextrins. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(2), 358–370. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.413>

Vogt, F. G., & Kord, A. S. (2011). Development of quality-by-design analytical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(3), 797–812. <https://doi.org/10.1002/jps.22325>

Waghulde, M., & Naik, J. (2018) Development and validation of analytical method for vildagliptin encapsulated poly-ε-caprolactone microparticles. *Materials Today: Proceedings*, 5(1), 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.11.171>

Wahl, J., & Holzgrabe, U. (2018). Capillary electrophoresis separation of phenethylamine enantiomers using amino acid based ionic liquids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.010>

Wahl, O., & Holzgrabe, U. (2015). Evaluation of enantiomeric purity of magnesium-L-aspartate dihydrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.013>

Watson, D. (2020). *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 5th Edition, p. 480.

Wingert, N. R., Ellwanger, J. B., Bueno, L. M., Gobetti, C., Garcia, C. V., Steppe, M., & Schapoval, E. E. S. (2018). Application of Quality by Design to optimize a stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.029>

Yu, P., Low, M. Y., & Zhou, W. (2018). Design of experiments and regression modelling in food flavour and sensory analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 202-215. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.013>

Yu, R. B., & Quirino, J. P. (2019). Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis: Trends During 2017-2018. *Molecules*, 24(6), 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules24061135>

Zacharis, C. K., & Vastardi, E. (2018). Application of analytical quality by design principles for the determination of alkyl p-toluenesulfonates impurities in Aprepitant by HPLC. Validation using total-error concept. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.009>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.