

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

ΚΑΛΟΓΡΗΑ ΕΛΕΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc
ΑΘΗΝΑ 2017

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

(Ν.5343/1932, άρθρο 202)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	Επιβλέπουσα Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Ε. ΓΚΙΚΑΣ	ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Α. ΤΣΑΝΤΙΛΗ	ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Ι. ΛΟΥΚΑΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Ν. ΘΩΜΑΪΔΗΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	
Α. ΒΑΡΒΑΡΕΣΟΥ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑ ΑΙΣΘΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ	

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά την περίοδο Μάιος 2010- Απρίλιος 2017. Φτάνοντας στο τέλος μιας επίπονης, αλλά και εποικοδομητικής διαδικασίας, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην περατωσή της, σε όλους όσους συνάντησα σε αυτό το εργαστήριο που για πολλά χρόνια είχε γίνει δεύτερο σπίτι μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της διατριβής Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Παντερή για την ανάθεση και την επίβλεψη του θέματος. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τις πολύτιμες συμβουλές και το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η πολλαπλή βοήθεια που μου προσέφερε ήταν καθοριστική για την περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Κουμπάρη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα, για την πολύπλευρη βοήθεια, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης, αλλά και κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στην Αναπλ. Καθηγήτρια του Τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας και μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Αθανασία Βαρβαρέσου για τη συνεργασία μας και τις πολύτιμες υποδείξεις κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους που αφορούσε στον προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιδρωτικές κρέμες, αλλά και για τη συμβολή της στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ επίσης όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες στο πρόγραμμα «Αντιδρωτικά και Αργίλιο» στο οποίο συμμετείχα, την Καθηγήτρια του Τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας κ. Ευαγγελία Πρωτόπαπα, τον Καθηγητή του Τμήματος Χημεία Τροφίμων και Διατροφής κ. Ιωάννη Τσάκνη, το Λέκτορα Εφαρμογών του Τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας κ. Σπύρο Παπαγεωργίου, και τον ιατρό του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης Δρ. Αλέξιο Ματίκα.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπλ. Καθηγητή Ιωάννη Λουκά, τον Αναπλ. Καθηγητή Νικόλαο Θωμαΐδη και την Ομότιμη Καθηγήτρια Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου, μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Πενσυλβάνια κ. Κωνσταντίνο Πίστο για τις σημαντικές συμβουλές του και τη συνεργασία μας κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους που αφορούσε στον προσδιορισμό της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της σε ανθρώπινο πλάσμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται στους συναδέλφους που γνώρισα στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης για τη βοήθεια, αλλά και την ηθική συμπαράσταση που αφειδώς μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ τον καθένα ξεχωριστά τη Σοφία Γεωργακάκου, την Ελένη Λαδοπούλου, τον Παναγιώτη Κουφοπαντελή, τον Μάριο Χρυσανθακόπουλο, τον Αλέξη Ματράλη, το Δημήτρη Καρβέλη, τον Στέφανο Μεϊμάρογλου και τον Γιάννη Μαλάμο, η παρουσία τους στο εργαστήριο ήταν σημαντική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές αυτού για την ευγένεια και τη φιλική διάθεση με την οποία με περιέβαλλαν.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους μου για την αγάπη, την ενθάρρυνση, την κατανόηση και την ανεκτίμητη καθημερινή βοήθειά τους. Χωρίς την αγάπη των δικών μου ανθρώπων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας διατριβής και για αυτό το λόγο τους αφιερώνω την εργασία.

Απρίλιος 2017

“Στους γονείς μου.....”

Περιεχόμενα

Σκοπός της εργασίας	xv
Aims and objectives	xvii

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- Φαρμακολογικά στοιχεία και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών: I. Αγχώδεις διαταραχές και αλπραζολάμη, II. Αντιυπερτασικά, III. Αντιδρωτικά προϊόντα και αργίλιο

1.1 Αγχώδεις διαταραχές και αλπραζολάμη	1
1.1.1 Αγχώδεις διαταραχές	1
1.1.2 Θεραπεία του άγχους	2
1.1.3 Βενζοδιαζεπίνες	3
1.1.3.1 Αλπραζολάμη-Ιστορική αναδρομή	4
1.1.3.2 Μηχανισμός δράσης	6
1.1.3.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα και μεταβολισμός	8
1.1.3.4 Θεραπευτική δράση και παρενέργειες	10
1.1.3.5 Ανεπιθύμητες ενέργειες – Αλληλεπιδράσεις	12
1.2 Αντιυπερτασικά	15
1.2.1 Υπέρταση	15
1.2.2 Μηχανισμός ελέγχου της αρτηριακής πίεσης	17
1.2.2.2 Αντανεκλαστικό των τασεοϋποδοχέων και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα	17
1.2.2.3 Σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης – αλδοστερόνης	17

1.2.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση	19
1.2.4 Αλίσκιρηνη – μηχανισμός δράσης	21
1.2.4.2 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά	22
1.2.5 Υδροχλωροθειαζίδιο-μηχανισμός δράσης	25
1.2.5.1 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά	26
1.2.5.2 Ενδείξεις – Δοσολογία	27
1.3 Αντιδρωτικά και Αργίλιο	28
1.3.1 Δομή του δέρματος	28
1.3.2 Διαδερμική απορρόφηση	29
1.3.3 Ιδρωτοποιοί αδένες	31
1.3.4 Μηχανισμός δράσης των αντιδρωτικών και των αποσμητικών προϊόντων	32
1.3.5 Αντιδρωτικά και αποσμητικά σκευάσματα	33
1.3.6 Άλατα του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα	35
1.3.7 Τοξικότητα του αργιλίου	38
Κεφάλαιο 2- Υγροχρωματογραφία - φασματομετρία μαζών	
2.1 Εισαγωγή	43
2.2 Ιστορική αναδρομή	44
2.3 Οργανολογία	45
2.4 Πηγές ιοντισμού	46
2.4.1 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης	47
2.4.2 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό	47
2.4.2.1 Πλεονεκτήματα ιοντισμού ESI	52
2.4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία της τεχνικής ESI	54

2.5 Αναλυτές μαζών	58
2.5.1 Γενικά	58
2.5.2 Χαρακτηριστικά Ποιότητας	59
2.5.3 Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole Analyzer)	60
2.6 Ανιχνευτές Ιόντων	62
2.6.1 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής	62
Κεφάλαιο 3- Υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)	
3.1 Εισαγωγή	64
3.2 Ιστορική αναδρομή	64
3.3 Γιατί να επιλεχθεί η HILIC;	67
3.4 Μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC	69
3.5 Στατικές φάσεις χρωματογραφίας HILIC	72
3.5.1 Χαρακτηριστικές στατικές φάσεις σε χρωματογραφία HILIC	73
3.5.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία HILIC	78
3.5.2.1 Οργανικοί τροποποιητές	78
3.5.2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα	78
3.5.2.3 Επίδραση της τιμής του pH της κινητής φάσης	79
3.6 Εφαρμογές	79
Κεφάλαιο 4- Μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικών ενώσεων	
4.1 Τι είναι η ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας	83
4.2 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου για μελέτες σταθερότητας	84
4.2.1 Διαχωρισμός εναντιομερών	84
4.3 Γενική επισκόπηση της πορείας ανάπτυξης μεθόδου για μελέτες	85
σταθερότητας	

4.4 Μελέτες σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης	87
4.4.1 Επιλογή και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	90
4.5 Μελέτη της κινητικής χημικών αντιδράσεων	92
4.5.1 Ταχύτητα και τάξη της αντίδρασης	92
4.6 Τύποι αντιδράσεων	94
4.6.1 Αντιδράσεις μηδενικής τάξης	94
4.6.2 Αντιδράσεις πρώτης τάξης	96
4.6.3 Αντιδράσεις δεύτερης τάξης	97
4.6.4 Ψευδοταξικές αντιδράσεις	100
4.7 Προσδιορισμός της σταθεράς ταχύτητας μίας αντίδρασης	100
4.8 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά ταχύτητας αντιδράσεων	102

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5- Ποσοτικός προσδιορισμός της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ-αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης- φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS)

5.1 Εισαγωγή	104
5.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία	104
5.2.1 Σύστημα LC/ESI-MS	109
5.2.2 Σύστημα υγροχρωματογραφίας	110
5.2.3 Φασματόμετρο Μαζών	110
5.2.4 Προκατεργασία Δείγματος	110
5.3 Αντιδραστήρια - Διαλύτες	111
5.4 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας	111
5.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης	111

5.4.2 Διαλύματα εργασίας	112
5.5 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC	114
5.5.1 Επιλογή στατικής φάσης	114
5.5.2 Επιλογή κινητής φάσης	115
5.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών	122
5.7 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC-ESI/MS	124
5.8 Εφαρμογή της μεθόδου HILIC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών σε ανθρώπινο πλάσμα.	127
5.8.1 Ανθρώπινο πλάσμα	127
5.8.2 Προετοιμασία βιολογικού δείγματος	127
5.9 Αξιολόγηση της μεθόδου	124
5.9.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας	124
5.9.1.2 Θεωρητική προσέγγιση	124
5.9.1.3 Εφαρμογή γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης και επιλογή του βέλτιστου παράγοντα ζύγισης	131
5.9.1.4 Καμπύλες βαθμονόμησης	132
5.10 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας	138
5.10.1 Ορθότητα	140
5.10.2 Πιστότητα	142
5.11 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης	145
5.12 Επίδραση υποστρώματος	145
5.13 Ανάκτηση της μεθόδου HILIC-ESI/MS	146
5.14 Έλεγχος ειδικότητας	147
5.15 Μελέτη σταθερότητας	151

5.16 Εφαρμογή της μεθόδου για μέτρηση των αναλυτών σε δείγμα πλάσματος ασθενούς	154
---	-----

5.17 Συμπεράσματα	156
-------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6- Μελέτες αποικοδόμησης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης

6.1 Εισαγωγή	157
--------------	-----

6.2 Σκοπός της εργασίας	159
-------------------------	-----

6.3 Εξοπλισμός-Οργανολογία	160
----------------------------	-----

6.4 Αντιδραστήρια	161
-------------------	-----

6.5 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας	162
--	-----

6.6 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	163
--	-----

6.7 Μερική επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου	165
---	-----

6.7.1 Έλεγχος γραμμικότητας	165
-----------------------------	-----

6.8 Μελέτες χημικής κινητικής	171
-------------------------------	-----

6.8.1 Πορεία εργασίας	172
-----------------------	-----

6.8.2 Μελέτης σταθερότητας της αλισκιρένης	172
--	-----

6.8.2.1 Χημική κινητική της όξινης αποικοδόμησης της αλισκιρένης	173
--	-----

6.8.2.2 Χημική κινητική της οξειδωτικής αποικοδόμησης της αλισκιρένης	177
---	-----

6.8.2.3 Χημική κινητική της αλκαλικής αποικοδόμησης της αλισκιρένης	179
---	-----

6.8.3 Μελέτη σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου	184
---	-----

6.8.3.1 Χημική κινητική της όξινης αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου	184
--	-----

6.8.3.2 Χημική κινητική της οξειδωτικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου	188
---	-----

6.8.3.3 Χημική κινητική της αλκαλικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου	190
---	-----

υδροχλωροθειαζιδίου

6.8.4 Συμπεράσματα 196

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7- Ποσοτικός προσδιορισμός του υδροξυχλωριούχου
αργιλίου σε αντιϋδρωτική κρέμα με αντίδραση συμπλοκοποίησης του
αργιλίου με κερκετίνη πριν από την ανάλυση στο σύστημα HPLC-UV**

7.1 Εισαγωγή 197

7.2 Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης 203

7.2.1 Αρχή της μεθόδου 203

7.2.2 Εξοπλισμός-οργανολογία 203

7.3 Αντιδραστήρια 204

7.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας 205

7.4.1 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης 205

7.4.2 Διαλύματα εργασίας 206

7.5 Αντίδραση συμπλοκοποίησης του αργιλίου με χρωματομετρικό
αντιδραστήριο 206

7.5.1 Αντίδραση συμπλοκοποίησης με κερκετίνη 209

7.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης συμπλοκοποίησης 210

7.6.1. Μελέτη της επίδρασης της περίσσειας του συμπλεκτικού
αντιδραστηρίου 211

7.6.2. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος
οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος 214

7.6.3. Μελέτη της επίδρασης της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος
οξικού οξέος- οξικού αμμωνίου 215

7.6.4 Βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης συμπλοκοποίησης 217

7.7 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC	217
7.7.1 Επιλογή στατικής φάσης	217
7.7.2 Επιλογή κινητής φάσης	220
7.8 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	231
7.9 Ανάπτυξη μεθόδου προεργασίας της αντιδρωτικής κρέμας	233
7.9.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου προεργασίας	233
7.9.2 Βέλτιστες συνθήκες προεργασίας δείγματος	234
7.10 Μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης	236
7.11 Αξιολόγηση της μεθόδου	240
7.11.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας	240
7.11.2 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης	245
7.11.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας	245
7.11.4 Έλεγχος ανάκτησης	248
7.11.5 Έλεγχος ειδικότητας	249
7.11.6 Ανθεκτικότητα μεθόδου	251
7.12 Εφαρμογή της μεθόδου στη μέτρηση αντιδρωτικών προϊόντων που περιέχουν υδροξυχλωριούχο αργίλιο	253
7.5 Συμπεράσματα	256
Περίληψη	258
Summary	261
Βιβλιογραφία	264

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων διαχωριστικών τεχνικών ανάλυσης στον προσδιορισμό ενώσεων με φαρμακευτική δράση. Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί τη διαχωριστική τεχνική επιλογής για την ανάλυση μίγματος αναλυτών παρέχοντας άμεσα τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε αναλύτη χωριστά. Η εξέλιξη της τεχνικής HPLC στηρίχθηκε κυρίως στην ανάπτυξη πληρωτικών υλικών μεγάλης αποτελεσματικότητας αλλά και στη διασύνδεση της με ανιχνευτές υψηλής εκλεκτικότητας όπως το φασματόμετρο μαζών που είχε ως αποτέλεσμα η τεχνική HPLC να κατακτήσει την πρώτη θέση στις ενόργανες τεχνικές ανάλυσης.

Το πρώτο μέρος της διατριβής περιλαμβάνει την ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα. Η τεχνική HILIC που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αποκτά τα τελευταία χρόνια συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ιδανική επιλογή σε περιπτώσεις πολικών, υδρόφιλων αναλυτών ή/και ιδιαίτερα λιπόφιλων αναλυτών που με την RP-HPLC εκλούονταν είτε κοντά στο νεκρό χρόνο είτε παρουσίαζαν μεγάλους χρόνους κατακράτησης, αντίστοιχα. Σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών, η HILIC οδηγεί σε εντυπωσιακή αύξηση του σήματος γεγονός που καθιστά αυτή την τεχνική ιδανική επιλογή για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της και εφαρμόστηκε σε δείγματα πλάσματος ασθενών που ελάμβαναν αλπραζολάμη για την αντιμετώπιση των κρίσεων πανικού, του άγχους και της κατάθλιψης. Επιπλέον ελέγχθηκε η ειδικότητα της μεθόδου με ανάλυση δειγμάτων ελέγχου, QC, τα οποία τα οποία περιείχαν τους αναλύτες και εμβολιάστηκαν με 27 φαρμακευτικές ενώσεις.

Το δεύτερο μέρος της διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη της σταθερότητας της αλπισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνθήκες επιταχυνόμενης

αποικοδόμησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε αναλυτική στήλη Phenyl που είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο, η μέθοδος αξιολογήθηκε μερικά χρησιμοποιώντας τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών και διερευνήθηκαν διεξοδικά οι κινητικές παράμετροι του κάθε αναλύτη σε διάφορες συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης. Απώτερος στόχος ήταν η διασφάλιση της εκλεκτικότητας της μεθόδου έναντι πιθανόν προϊόντων αποικοδόμησης.

Το τρίτο και τελευταίο μέρος της παρούσας διατριβής αναφέρεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιδρωτικές κρέμες. Οι ενώσεις του αργιλίου μειώνουν την ποσότητα του ιδρώτα που φτάνει στην επιφάνεια του δέρματος προκαλώντας μηχανική παρεμπόδιση του εκφορητικού πόρου του εκκριτικού ιδρωτοποιού αδένα. Τα τελευταία χρόνια αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό η ενσωμάτωση του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα λόγω της αποδεδειγμένης διαδερμικής απορρόφησης του και της οιστρογονικής δράσης του (μεταλλο-οιστρογόνο). Στις Η.Π.Α. πλέον τα αποσμητικά θεωρούνται καλλυντικά προϊόντα ενώ τα αντιδρωτικά σκευάσματα κατηγοριοποιούνται ως φάρμακα OTC και η περιεκτικότητά τους σε υδροξυχλωριούχο αργίλιο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 25%. Με σκοπό τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του υδροξυχλωριούχου αργιλίου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της παραγωγοποίησης του αργιλίου πριν τη χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας κερκετίνη ως συμπλεκτικό αντιδραστήριο. Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης από την περίσσεια της κερκετίνης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος αντιστρόφου φάσης υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) σε αναλυτική στήλη XTerraMS C18 με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού.

Aims and objectives

The purpose of the present thesis is the development and validation of novel separation techniques for the quantification of pharmaceutical compounds. High performance liquid chromatography, HPLC, is a separation technique which is frequently used in the field of analytical chemistry to separate, identify and quantify each component in a mixture. HPLC evolution was based in improvements in packing material design, bonded phase chemistry and column design and geometry. The interconnection of HPLC with highly selective detectors such as mass spectrometers resulted in the HPLC technique to become the separation technique of choice in the field of pharmaceutical analysis.

In the first part of this thesis a hydrophilic interaction liquid chromatography /positive ion electrospray-mass spectrometry (HILIC-ESI/MS) method has been developed and fully validated for the quantification of alprazolam and its main metabolite, a-hydroxy-alprazolam, in human plasma. HILIC in combination with mass spectrometry has been steadily gaining acceptance in the analysis of polar or highly non-polar compounds in complex biological matrices. This hyphenated technique offers the advantages of improved sensitivity by employing high organic modifier fraction in the mobile phase, shortened sample preparation time and the potential shorter analytical run time. The HILIC-ESI/MS method developed in this work has been successfully validated and applied to the analysis of real samples and proved to be suitable to support a variety of clinical studies such as therapeutic drug monitoring.

In the second part of this thesis a reversed-phase HPLC method was used for the kinetic investigation of the degradation of aliskiren and hydrochlorothiazide under various stressed conditions. For this purpose, a silica based-phenyl analytical column was used and operated under reversed-phase conditions. The method was partially validated using the areas of the analytes. Both compounds proved to follow pseudo-first order reaction kinetics under acidic, basic and oxidative conditions and the main kinetic parameters have been quantified.

In the final part of this thesis a selective HPLC method that allows, after liquid-liquid extraction and pre-column derivatization reaction with quercetin, the

quantification of aluminium chlorohydrate in antiperspirant creams has been developed and fully validated. Aluminium salts, such as aluminium chlorohydrate that has been introduced in the market since 1947, are the active ingredients of antiperspirant in underarm and bodycare cosmetics applied to the underarm and breast area. Although much research has been undertaken into the antiperspirant properties of a number of aluminium salts, very little of this work is focused upon the quantification of these products in cosmetic formulations. Given that the toxicity of aluminium has been widely recognized reducing the concentration of this metal in antiperspirants is a matter of urgency and there is a real need to set up analytical methods in order to quantitate aluminium salts in underarm cosmetics. Thus, the principal aim of this work was to optimize and validate an analytical procedure for the quantitative determination of aluminium chlorohydrate in antiperspirant cream samples based on a pre-column derivatization procedure using quercetin, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one, as the derivatization reagent. The method is the first reported application and could be used for routine analysis of antiperspirant creams containing aluminium chlorohydrate, as it complies well with the validation requirements in the cosmetic industries

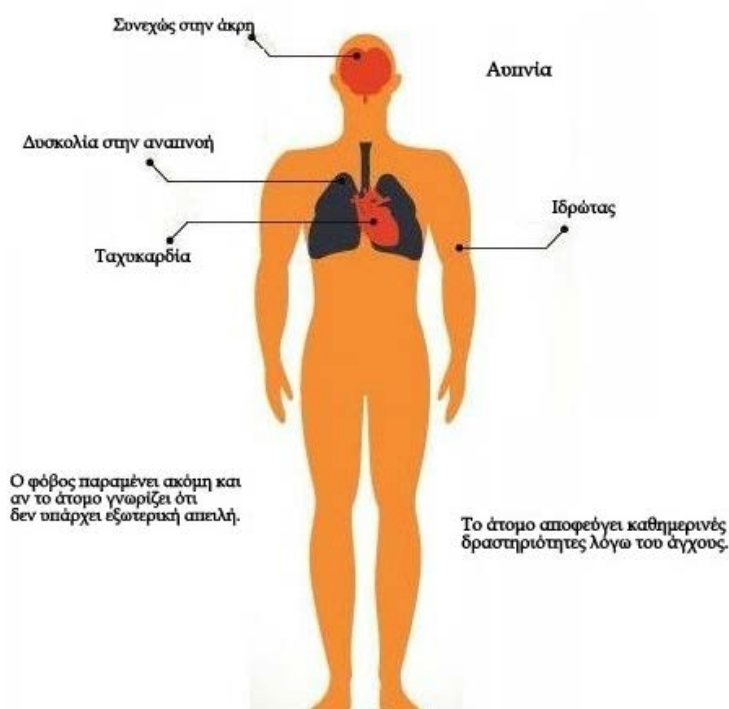
Κεφάλαιο 1:

Φαρμακολογικά στοιχεία και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών: I. Αγχώδεις διαταραχές και αλπραζολάμη, II. Αντιυπερτασικά, III. Αντιδρωτικά προϊόντα και αργίλιο

1.1 Αγχώδεις διαταραχές και αλπραζολάμη

1.1.1 Αγχώδεις διαταραχές

Η φυσιολογική απάντηση φόβου σε απειλητικά ερεθίσματα περιλαμβάνει συμπεριφορές άμυνας, αντανakλαστικές αντιδράσεις από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, έκκριση κορτικοστεροειδών και πληθώρα αρνητικών συναισθημάτων. Σε καταστάσεις άγχους οι αντιδράσεις αυτές συμβαίνουν συχνά σε αναμονή και μόνο του ερεθίσματος και ανεξάρτητα από εξωτερικά γεγονότα. Το όριο διάκρισης ανάμεσα σε μία «παθολογική» κατάσταση άγχους και σε μία «φυσιολογική» κατάσταση άγχους είναι το σημείο μετά το οποίο τα συμπτώματα αυτά εμποδίζουν τις φυσιολογικές παραγωγικές δραστηριότητες του ατόμου (σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Συμπτώματα αγχώδους διαταραχής

Οι διαταραχές που σχετίζονται με το άγχος είναι οι πιο συνηθισμένες ψυχικές διαταραχές. Η διαίρεση των αγχώδων διαταραχών ανάλογα με τη βαρύτητά τους είναι χρήσιμη και μπορεί να εξηγήσει γιατί διαφορετικές μορφές άγχους αποκρίνονται καλύτερα σε διαφορετικά φάρμακα. Με βάση αυτή τη διαίρεση οι αγχώδεις διαταραχές διακρίνονται σε διαταραχές που περιλαμβάνουν φόβο όπως είναι οι «προσβολές πανικού/φοβίες» και σε διαταραχές που περιλαμβάνουν ένα γενικευμένο αίσθημα άγχους και ονομάζονται «γενικευμένες αγχώδεις διαταραχές».

Στις κλινικά αναγνωρισμένες αγχώδεις διαταραχές περιλαμβάνονται οι ακόλουθες:

- ✓ Γενικευμένη αγχώδης διαταραχή, η οποία είναι μια διαρκή κατάσταση υπερβολικού άγχους χωρίς κάποια σαφή αιτία
- ✓ Διαταραχή κοινωνικού άγχους, φόβος σχετικός με τη συνύπαρξη ή αλληλεπίδραση με άλλους ανθρώπους
- ✓ Διαταραχή πανικού η οποία είναι αιφνίδια προσβολή κατακλυσμιαίου φόβου και εμφανίζεται σε συνδιασμό με έντονα σωματικά συμπτώματα.
- ✓ Φοβίες
- ✓ Διαταραχή μετατραυματικού στρες
- ✓ Ψυχαναγκαστική-καταναγκαστική διαταραχή

1.1.2 Θεραπεία του άγχους

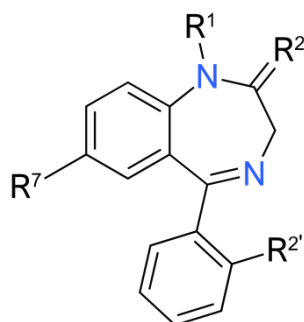
Τα συμπτώματα του χρόνιου, σοβαρού, εξουθενωτικού άγχους μπορούν να αντιμετωπιστούν με αγχολυτικά φάρμακα (μερικές φορές ονομάζονται και ελάσσονα ηρεμιστικά) ή/και με κάποιας μορφής ψυχοθεραπεία ή θεραπεία συμπεριφοράς. Τα τελευταία χρόνια η φαρμακολογική θεραπεία του άγχους περιλαμβάνει τη χρήση φαρμάκων που χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία άλλων διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε αυτά τα φάρμακα περιλαμβάνονται αντικαταθλιπτικά, αντιεπιληπτικά, και αντιψυχωσικά φάρμακα. Επίσης χρησιμοποιούνται φάρμακα που δεν έχουν κατασταλτική δράση όπως είναι οι αγωνιστές των υποδοχέων της 5-υδροξυτρυπταμίνης (π.χ. βουσπιρόνη).

Οι κυριότερες κατηγορίες αγχολυτικών και υπνωτικών φαρμάκων είναι οι εξής :

- ✓ Βενζοδιαζεπίνες: αλπραζολάμη, πραζεπάμη, διαζεπάμη, χλωροδιαζεποξείδιο, κλοραζεπάτη, λοραζεπάμη, φλουραζεπάμη και άλλες.
- ✓ Βαρβιτουρικά: φαινοβαρβιτάλη, αμοβαρβιτάλη, πεντοβαρβιτάλη, σεκοβαρβιτάλη, θειοπεντάλη και άλλα.
- ✓ Ανταγωνιστές των βενζοδιαζεπινών : φλουμαζενίλη.
- ✓ Μη βαρβιτουρικά κατασταλτικά : αιθανόλη, αντιϊσταμινικά, ένυδρη χλωράλη.
- ✓ Άλλα αγχολυτικά φάρμακα : βουσπιρόνη, ζολπιδέμη, υδροξίνη.

1.1.3 Βενζοδιαζεπίνες

Η βασική χημική δομή των βενζοδιαζεπινών περιλαμβάνει έναν 7μελή δακτύλιο ενωμένο με έναν αρωματικό δακτύλιο με τέσσερις κύριους υποκαταστάτες (σχήμα 1.2).



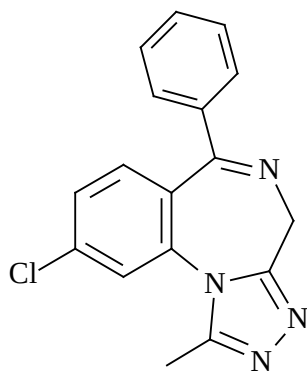
Σχήμα 1.2: Βασικός σκελετός βενζοδιαζεπινών.

Η παραγωγή των βενζοδιαζεπινών άρχισε το 1960 από την ανάγκη ανεύρεσης αγχολυτικών φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες και μικρότερη τοξικότητα από τα αντίστοιχα των βαρβιτουρικών. Η πρώτη βενζοδιαζεπίνη παρασκευάστηκε κυριολεκτικά “κατά λάθος” το 1961 και ήταν το χλωροδιαζεποξείδιο. Ο ασυνήθης επταμελής δακτύλιος του χλωροδιαζεποξειδίου παράχθηκε ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης που πήγε λάθος από τους Hoffman-La Roche. Η απρόσμενη φαρμακολογική δράση αυτής της ένωσης αναγνωρίστηκε σε μια καθιερωμένη διαδικασία σάρωσης των φαρμάκων και αρκετά σύντομα οι βενζοδιαζεπίνες έγιναν από τα ευρύτερα συνταγογραφούμενα φάρμακα.

Οι βενζοδιαζεπίνες χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του άγχους αλλά και ως υπνωτικά φάρμακα. Εκείνες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του άγχους έχουν μακρό χρόνο ημιζωής. Αν και είναι αποτελεσματικά αγχολυτικά φάρμακα εντούτοις δεν είναι αποτελεσματικές, με εξαίρεση την αλπραζολάμη, στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης που μπορεί να συνυπάρχει με το άγχος και επιπλέον προκαλούν αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Συνήθως χρησιμοποιούνται ώστε να βοηθήσουν ασθενείς που χρήζουν άμεση αντιμετώπιση καθώς μειώνουν το άγχος μέσα σε 30 λεπτά από τη λήψη τους και επιπλέον μπορούν να λαμβάνονται ανάλογα με την ανάγκη του ασθενούς. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη φάση σταθεροποίησης σε ασθενή που τίθεται σε θεραπεία με κάποιον εκλεκτικό αναστολέα της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης. Έχει διαπιστωθεί ότι σε διαταραχές πανικού ο συνδυασμός μιας βενζοδιαζεπίνης με κάποιον εκλεκτικό αναστολέα της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης είναι περισσότερο αποτελεσματικός από τη μονοθεραπεία. Οι βενζοδιαζεπίνες με βραχύ χρόνο ημιζωής χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της αϋπνίας χωρίς να προκαλούν hangover την επόμενη ημέρα από τη λήψη τους.

1.1.3.1 Αλπραζολάμη-Ιστορική αναδρομή

Η χημική ανακάλυψη της αλπραζολάμης ήρθε ως αποτέλεσμα μιας προσπάθειας για την τροποποίηση της δομής των 1,4 βενζοδιαζεπινών με την προσθήκη διαφόρων ετεροκυκλικών δακτυλίων [1]. Στην περίπτωση της αλπραζολάμης, αυτό περιλαμβάνει την προσθήκη ενός τριαζολοδακτυλίου.



Σχήμα 1.3: Χημική δομή της αλπραζολάμης

Η πορεία που οδήγησε στη σύνθεση της αλπραζολάμης περιελάμβανε τη σύνθεση σειράς παραγώγων των τριαζολοβενζοδιαζεπινών. Στα παράγωγα

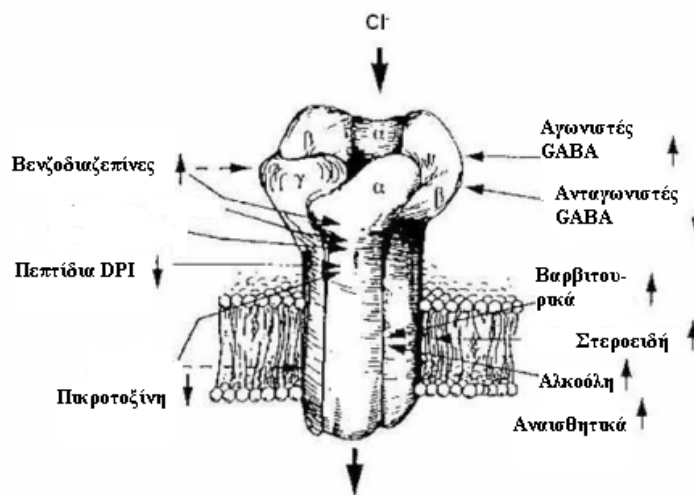
αυτά ελέγχθηκε η φαρμακευτική και βιολογική τους δράση και διαπιστώθηκε ότι οι μη υποκατεστημένες τριαζολοβενζοδιαζεπίνες έχουν μειωμένη κατασταλτική και ηρεμιστική δράση. Αντίθετα η φαρμακολογική δράση αυξήθηκε με την προσθήκη ενός μεθυλίου στη θέση 1 και ενός χλωρίου στη θέση 2 οδηγώντας στη σύνθεση της αλπραζολάμης (σχήμα 1.3).

Η αλπραζολάμη διατίθεται εμπορικά στην αγορά από το 1981 με την εμπορική ονομασία Xanax® από την εταιρία Upjohn (τώρα μέλος της Pfizer), για τη θεραπεία των κρίσεων πανικού. Μέσα σε δύο χρόνια το Xanax γίνεται το πιο διαδεδομένο φάρμακο των Η.Π.Α. για την αντιμετώπιση ψυχικών διαταραχών. Περίπου 3 εκατομμύρια Αμερικάνοι (1,6% του πληθυσμού) έχουν πάρει Xanax® τουλάχιστον για ένα έτος. Σύντομα η αλπραζολάμη εντάσσεται στην κατηγορία των ψυχιατρικών φαρμάκων που αναφέρονται συχνά στη μουσική ροκ [2]. Υπάρχουν περιπτώσεις που η αναφορά στην αλπραζολάμη, Xanax®, γίνεται με σκοπό την αρνητική κριτική στη χορήγηση της, όπως οι Duran Duran στο τραγούδι “Lady Xanax”, που περιγράφουν τα στερητικά συμπτώματα μιας γυναίκας που οφείλονται στον εθισμό του Xanax®. Στο τραγούδι των U2 “Xanax and wine” έχουμε την περιγραφή ενός άνδρα με κατάθλιψη ο οποίος βλέπει απεγνωσμένα τηλεόραση προσπαθώντας να ξεφύγει, και ο οποίος τελικά, εντελώς μεταφορικά, αποδίδει τη λογική και την ύπαρξη του στη χρήση Xanax® με κρασί. Παρά το γεγονός ότι οι βενζοδιαζεπίνες, άρα και η αλπραζολάμη, προκαλούν εθισμό και σύντομα πρέπει να αυξηθεί η δόση ώστε να επιτευχθεί το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα, οι 41 εκατομμύρια συνταγογραφήσεις Xanax® στην Αμερική το 2011 αποδεικνύουν ότι είναι ακόμη και στις μέρες μας το πιο διαδεδομένο φάρμακο για την αντιμετώπιση των αγχωδών διαταραχών. Αυτό συμβαίνει εν μέρει επειδή το Xanax® χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος αγχωδών διαταραχών και διαταραχών πανικού, ενώ η κατασταλτική δράση του στο κεντρικό νευρικό σύστημα το καθιστά φάρμακο επιλογής και για άλλες παθήσεις όπως είναι οι διαταραχές του ύπνου και το άγχος. Δυστυχώς αυτά οδήγησαν και στην κατάχρηση της λήψης Xanax από ασθενείς που απεγνωσμένα επιθυμούν την ανακούφιση από τα συμπτώματα μίας ψυχικής ασθένειας, αλλά και αύξησαν τη χρήση του από άλλους χρήστες για «ψυχαγωγικούς λόγους».

1.1.3.2 Μηχανισμός δράσης

Είναι γνωστό ότι ο ερεθισμός των ανασταλτικών νευρώνων απελευθερώνει μόρια νευροδιαβιβαστών, όπως το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) ή η γλυκίνη τα οποία προσδένονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς της μεμβράνης του μετασυναπτικού κυττάρου. Αυτό προκαλεί μια παροδική αύξηση της διαπερατότητας ορισμένων ιόντων, όπως των ιόντων καλίου και χλωρίου [3]. Η πρόσδεση του GABA στον υποδοχέα του στην κυτταρική μεμβράνη προκαλεί τη διάνοιξη του διαύλου χλωρίου, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της αγωγιμότητας για τα ιόντα χλωρίου. Η εισροή των ιόντων χλωρίου προκαλεί μια μικρή υπερπόλωση ή ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό (IPSP) που έχει ως αποτέλεσμα να απομακρύνεται το μετασυναπτικό δυναμικό και να αναστέλλεται ο σχηματισμός των δυναμικών ενεργείας.

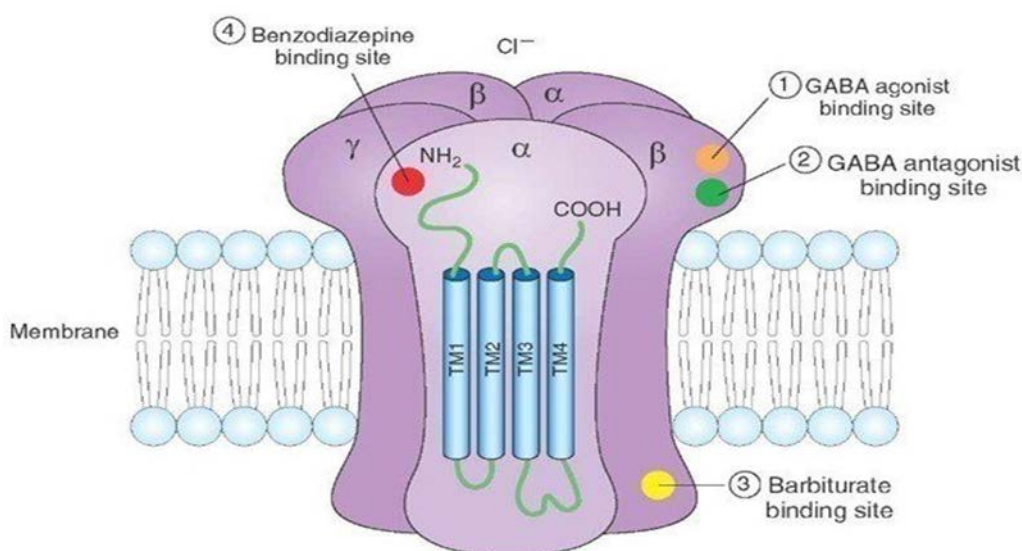
Οι υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και η κατανομή τους είναι παράλληλη με αυτή των νευρώνων του GABA. Στο σχήμα 1.4 βλέπουμε συνολικά τον υποδοχέα GABA καθώς και τις θέσεις πρόσδεσης σε αυτόν κάποιων φαρμάκων.



Σχήμα 1.4: Υποδοχέας GABA και θέσεις πρόσδεσης σε αυτόν κάποιων φαρμάκων

Οι βενζοδιαζεπίνες, άρα και η αλπραζολάμη, εμφανίζουν εκλεκτική δράση επί των A υποδοχέων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA_A) οι οποίοι διαμεσολαβούν στην ανασταλτική συναπτική νευροδιαβίβαση κατά μήκος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο υποδοχέας του GABA_A είναι ένα εξαρτώμενο

από πρόσδεμα ιοντικό κανάλι που αποτελείται από ένα πενταμερές σύνολο διαφορετικών υπομονάδων, οι κύριες από τις οποίες είναι η α , β και η γ [4]. Ουσιαστικά ο υποδοχέας GABA_A είναι μία ομάδα υποδοχέων, καθώς υπάρχουν σε αυτόν έξι διαφορετικές ισομορφές για την α υποομάδα, τρεις ισομορφές τύπου β και τρεις τύπου γ . Οι βενζοδιαζεπίνες συνδέονται κατά μήκος της διεπαφής ανάμεσα στην α και στη γ υποομάδα, αλλά μόνο σε υποδοχείς που περιέχουν γ_2 και $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ ή α_5 υποομάδες. Η θέση σύνδεσης των βενζοδιαζεπινών είναι διαφορετική από αυτήν στην οποία συνδέεται το ίδιο το GABA και δρουν με αλλοστερικό τρόπο αυξάνοντας τη συγγένεια του GABA με τον υποδοχέα του. Με αυτό τον τρόπο ενισχύουν την απόκριση στο GABA διευκολύνοντας τη διάνοιξη των καναλιών χλωρίου που ενεργοποιούνται από αυτό (σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5. Τρισδιάστατη μορφή του συμπλέγματος βενζοδιαζεπινών-GABA-διαύλου ιόντων χλωρίου

Μετά την επίδραση μιας βενζοδιαζεπίνης, οι καταγραφές της δραστηριότητας σε ένα κανάλι δείχνουν αύξηση της συχνότητας διάνοιξης του καναλιού για δεδομένη συγκέντρωση GABA, αλλά δε φαίνεται καμία μεταβολή στην αγωγιμότητα ή στο μέσο χρόνο κατά τον οποίο το κανάλι παραμένει ανοικτό. Αυτό το εύρημα είναι συμβατό με την επίδραση των βενζοδιαζεπινών στη σύνδεση του GABA παρά στον μηχανισμό διάνοιξης ή σύγκλεισης του καναλιού. Οι βενζοδιαζεπίνες δεν επηρεάζουν τους υποδοχείς άλλων αμινοξέων, όπως είναι η γλυκίνη ή το γλουταμινικό. Περιφερικές θέσεις σύνδεσης των

βενζοδιαζεπινών, που δεν σχετίζονται με τους υποδοχείς του GABA, είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε πολλούς ιστούς και αυτές βρίσκονται κυρίως στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων.

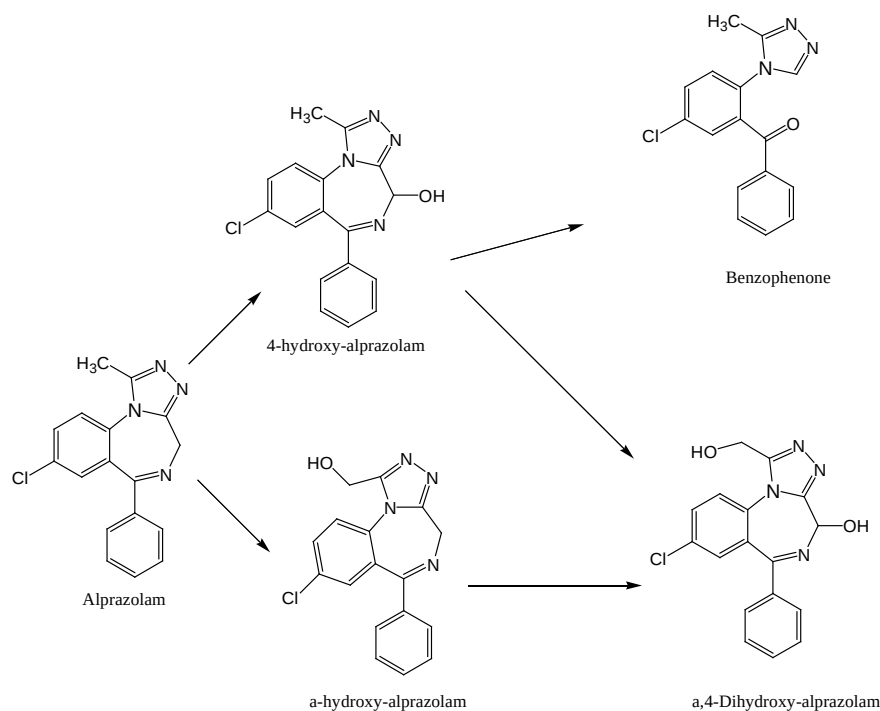
1.1.3.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα και μεταβολισμός

Οι περισσότερες βενζοδιαζεπίνες είναι λιπόφιλα μόρια και απορροφώνται γρήγορα και πλήρως μετά από χορήγηση από το στόμα, επιτυγχάνοντας συνήθως, μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα εντός μίας ώρας. Στο μεγαλύτερο ποσοστό τους κατανέμονται γρήγορα στους ιστούς και συνδέονται σε μεγάλο ποσοστό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (85-99%) Η λιποφιλία του μορίου τους έχει ως αποτέλεσμα να αθροίζονται προοδευτικά στο λιπώδη ιστό [5] Μεταβολίζονται μέσω του ηπατικού μικροσωμικού ενζυμικού συστήματος, μέσω δύο κυρίως μεταβολικών οδών, την απομεθυλίωση ή το σχηματισμό γλυκουρονιδίων. Περίπου το 70% της δόσης απεκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή μεταβολιτών συζευγμένων με γλυκουρονικό οξύ ή οξειδωμένων μεταβολιτών. Ένα πολύ μικρό ποσοστό απεκκρίνεται αναλλοίωτο στα ούρα, ενώ ένα άλλο εξίσου μικρό ποσοστό, μέχρι 10% απεκκρίνεται με τα κόπρανα. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες είναι ιδιαίτερα δραστικοί.

Η διάρκεια δράσης τους ποικίλει σημαντικά και ανάλογα με το χρόνο ημίσειας ζωής τους και κατ' επέκταση το χρόνο δράσης τους οι βενζοδιαζεπίνες διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες :

- ✓ Υπερβραχείας δράσης (< 6 ώρες), π.χ. μιδαζολάμη, τριαζολάμη.
- ✓ Βραχείας δράσης (12-18 ώρες), π.χ. λοραζεπάμη, οξαζεπάμη, τεμαζεπάμη, λορμεταζεπάμη .
- ✓ Μεσαίας δράσης (< 24 ώρες), αλπραζολάμη, νιτραζεπάμη.
- ✓ Μακράς δράσης (24-48 ώρες), π.χ. διαζεπάμη και ο μεταβολίτης της νορδιαζεπάμη, κλοναζεπάμη, φλουραζεπάμη (μέσω του μεταβολίτη της διμεθυλοφλουραζεπάμη ~ 60 ώρες), πραζεπάμη

Στο σχήμα 1.6 παρουσιάζεται ο μεταβολισμός της αλπραζολάμης.



Σχήμα 1.6: Μηχανισμός μεταβολισμού της αλπραζολάμης

Η αλπραζολάμη μεταβολίζεται μέσω του ηπατικού μικροσωμικού ενζυμικού συστήματος και οι κύριοι μεταβολίτες είναι η α-υδροξυ-αλπραζολάμη (17%), η 4-υδροξυ-αλπραζολάμη (0,3%), η α-4-διυδροξυ-αλπραζολάμη (0,2%) και η βενζοφαινόνη (17%) [6,7]. Η αλπραζολάμη ανήκει στις βενζοδιαζεπίνες μεσαίας διάρκειας δράσης, ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 6-12 ώρες, ενώ ο δραστηκός μεταβολίτης της η α-υδροξυ αλπραζολάμη έχει χρόνο ημιζωής 6 ώρες [8].

Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι η αλπραζολάμη, μετά από *per os* χορήγηση, εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη κινητική. Σε εθελοντές που χορηγήθηκαν 3mg/ημέρα, 6mg/ημέρα και 9 mg/ημέρα η μέγιστη συγκέντρωση της αλπραζολάμης στο πλάσμα βρέθηκε ίση με 29, 61 και 102 μg/L, αντίστοιχα. Μετά από εφάπαξ χορήγηση 1 mg αλπραζολάμης σε 6 εθελοντές η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_{max}) κυμάνθηκε από 12 έως 26 μg/L και ο χρόνος ημιζωής από 9 έως 16 ώρες [9]. Σε ασθενείς που έπαιρναν καθημερινά 1,5 έως 6 mg αλπραζολάμης επιτυγχάνονται σταθερά επίπεδα συγκεντρώσεων στο πλάσμα σε εύρος 25 έως 55 μg/L. Η α-υδροξυ-αλπραζολάμη και η 4-υδροξυ-αλπραζολάμη είναι δραστηκοί μεταβολίτες και εμφανίζουν περίπου 66% και 19%, αντίστοιχα από τη δραστηκότητα του φαρμάκου, ωστόσο ακόμη και κατά

την μακροχρόνια χορήγηση του φαρμάκου δεν εμφανίζονται στο πλάσμα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 10% της συγκέντρωσης του φαρμάκου.

1.1.3.4 Θεραπευτική δράση και παρενέργειες

Η διάρκεια δράσης των βενζοδιαζεπινών επηρεάζει τη χρήση τους έτσι οι βενζοδιαζεπίνες βραχείας δράσης είναι υπνωτικά φάρμακα, ενώ αυτές με μακρά διάρκεια δράσης είναι χρήσιμες ως αγχωλυτικά και αντισπασμωδικά φάρμακα [10]. Οι βενζοδιαζεπίνες δεν έχουν αντιψυχωσική, ούτε αναλγητική δράση και δεν επηρεάζουν το αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Η αλπραζολάμη όπως όλες οι βενζοδιαζεπίνες παρουσιάζουν τις παρακάτω δράσεις σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό:

- ✓ Μείωση του άγχους : Θεωρείται ότι μειώνουν το άγχος αναστέλλοντας με εκλεκτικό τρόπο νευρωνικά κυκλώματα στο μεταίχμιακό σύστημα του εγκεφάλου. Οι βενζοδιαζεπίνες εμφανίζουν αγχολυτικές δράσεις σε δοκιμές σε πειραματόζωα, ενώ ασκούν, επίσης, και “εξημερωτική” δράση, καθιστώντας ευκολότερο το χειρισμό των πειραματόζωων. Αν χορηγηθούν στο κυρίαρχο μέλος ενός ζεύγους πειραματοζώων (π.χ. ποντικών ή πηθίκων) που διαβιούν στο ίδιο κελί, τότε οι βενζοδιαζεπίνες μειώνουν τον αριθμό των επιθέσεων που δέχεται. Με πιθανή εξαίρεση την αλπραζολάμη, οι βενζοδιαζεπίνες δεν εμφανίζουν αντικαταθλιπτική δράση. Επίσης, ενδέχεται, κατά παράδοξο τρόπο να προκαλέσουν αύξηση της ευρεθιστότητας και της επιθετικότητας σε κάποια άτομα που πιθανόν οφείλεται στο σύνδρομο αποστέρησης των βενζοδιαζεπινών και που είναι οξύτερο σε φάρμακα των οποίων η δράση αποσβένεται ταχέως. Οι βενζοδιαζεπίνες σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία των οξείων αγχωδών καταστάσεων.
- ✓ Κατασταλτική και υπνωτική δράση: Όσες βενζοδιαζεπίνες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του άγχους έχουν κάποιες κατασταλτικές ιδιότητες. Οι βενζοδιαζεπίνες μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται για την έλευση του ύπνου και αυξάνουν τη συνολική διάρκεια αυτού, αν και η τελευταία αυτή δράση τους συμβαίνει μόνο σε άτομα που συνήθως κοιμούνται λιγότερο από 6 ώρες κάθε νύχτα. Οι βενζοδιαζεπίνες, ωστόσο, χορηγούνται σήμερα μόνο για τη βραχύχρονη

θεραπεία της αϋπνίας. Η ανοχή σε αυτές αναπτύσσεται εντός 1-2 εβδομάδων συνεχούς χρήσης και με τη διακοπή τους μπορεί να εμφανιστεί αϋπνία και σύνδρομο αποστέρησης. Οι βενζοδιαζεπίνες χρησιμοποιούνται επίσης στο πλαίσιο της προεγχειρητικής αγωγής (τόσο σε οδοντιατρικές όσο και σε άλλες ιατρικές χειρουργικές επεμβάσεις). Η ενδοφλέβια χορήγηση μιδαζολάμης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαγωγή της αναισθησίας.

- ✓ Αντιεπιληπτική δράση: Πολλές βενζοδιαζεπίνες έχουν αντιεπιληπτική δράση και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της επιληψίας και άλλων νοσηρών καταστάσεων. Είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματικές έναντι των χημικών σπασμών που προκαλούνται από φάρμακα που δρουν αποκλείοντας τους υποδοχείς GABA_A αλλά λιγότερο αποτελεσματικές έναντι σπασμών που προκαλούνται από το ηλεκτρικό ρεύμα. Η κλοναζεπάμη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της επιληψίας όπως και η διαζεπάμη, η οποία χορηγείται διορθικώς στα παιδιά την ώρα των κρίσεων και ενδοφλέβια για τον έλεγχο των επικίνδυνων για τη ζωή επιληπτικών κρίσεων. Έναντι της αντιεπιληπτικής δράσης των βενζοδιαζεπινών αναπτύσσεται, ωστόσο, ανοχή.
- ✓ Μυοχαλαρωτική δράση: Οι βενζοδιαζεπίνες χαλαρώνουν τη σπαστικότητα των σκελετικών μυών. Αυτό πιθανά οφείλεται στο ότι αυξάνουν την προσυναπτική αναστολή στο νωτιαίο μυελό. Η μείωση του μυϊκού τόνου φαίνεται να είναι εφικτή χωρίς αξιοσημείωτη απώλεια της συνέργειας των κινήσεων. Ωστόσο, κατά την ενδοφλέβια χορήγηση βενζοδιαζεπινών, όπως στην περίπτωση της επαγωγής της αναισθησίας και σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας τους όταν τα φάρμακα αυτά γίνονται αντικείμενο κατάχρησης μπορεί επισυμβεί απόφραξη των αεροφόρων οδών.
- ✓ Πρόδρομη αμνησία: Οι βενζοδιαζεπίνες εμποδίζουν την εγχάραξη στη μνήμη γεγονότων που βιώθηκαν ενώ το άτομο βρισκόταν υπό την επίδραση των ουσιών αυτών, με αποτέλεσμα μικροχειρουργικές επεμβάσεις ή παρεμβατικές διαδικασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν χωρίς να αφήνουν δυσάρεστες αναμνήσεις. Η *φθοριονιτραζεπάμη* έχει αποκτήσει αρνητική φήμη ως το “φάρμακο του βιασμού”, καθώς

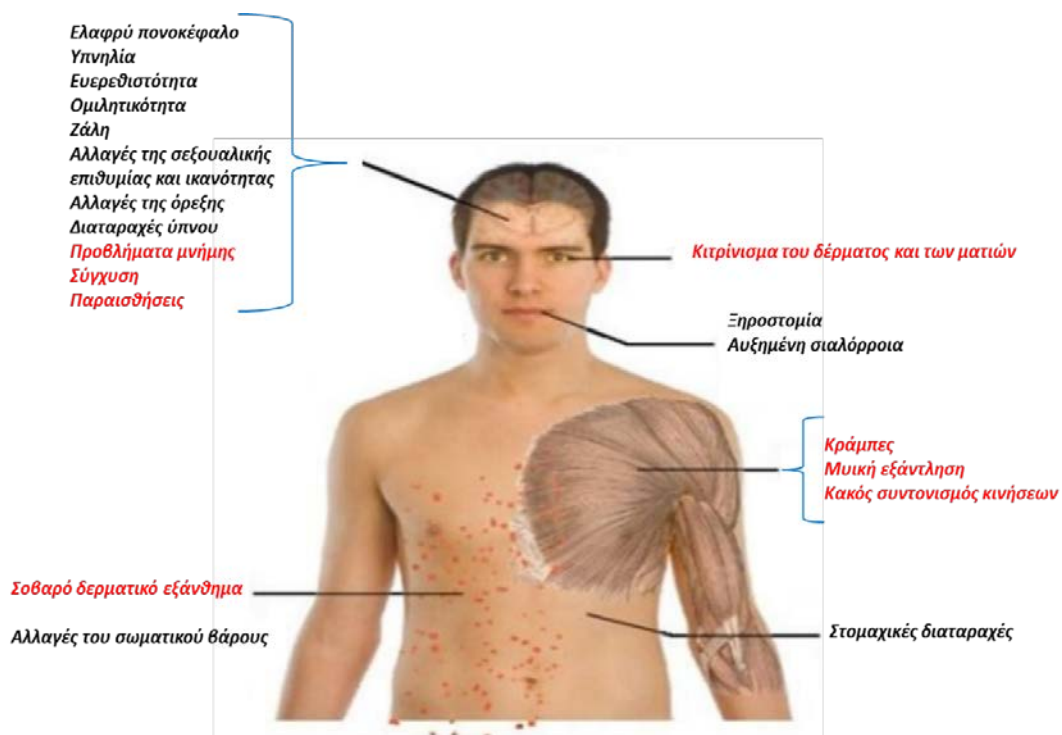
συνδέεται και με τη δυσκολία που συχνά εμφανίζουν τα θύματα να θυμηθούν τί ακριβώς συνέβη καθώς δέχθηκαν επίθεση.

Η αλπραζολάμη είναι η μόνη από τις βενζοδιαζεπίνες με αντικαταθλιπτική δράση, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για τη θεραπεία του άγχους και των κρίσεων πανικού με ή χωρίς αγοραφοβία. Η θεραπευτική δράση της είναι άμεση, όμως με διακοπή της χορήγησης είναι πιθανό να παρατηρηθεί στερητικό σύνδρομο και επανεμφάνιση των συμπτωμάτων [11]. Πρόσφατες μελέτες διερεύνησαν την πιθανή αποτελεσματικότητα της αλπραζολάμης σε χρήστες διεγερτικών ναρκωτικών όπως είναι η κοκαΐνη και η μεθαμφεταμίνη [12,13]. Ενώ σε άλλες μελέτες διαπιστώθηκε ότι αλπραζολάμη μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση της αιμοσφαιρίνης όπως και να δράσει ως παράγοντας παρεμβολής στο DNA [14,15]. Ο συνδυασμός της αλπραζολάμης με καφεΐνη ενισχύει την κυτταροτοξική δράση της αλπραζολάμης [16]. Υπάρχουν κλινικές μελέτες που διερευνούν τη θεραπευτική δράση της αλπραζολάμης σε ασθενείς με διανοητικές και κινητικές διαταραχές. Η χορήγηση αλπραζολάμης ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες όπως υπνηλία και καταστολή (νάρκωση), ενώ μπορεί να επηρεάσει την απόδοση σε καθημερινές δραστηριότητες όπως είναι η οδήγηση.

1.1.3.5 Ανεπιθύμητες ενέργειες – Αλληλεπιδράσεις

Οι βενζοδιαζεπίνες παρουσιάζουν συνέργεια με οποιοδήποτε άλλο φάρμακο ή χημική ουσία έχει κατασταλτική δράση. Αυτό σημαίνει ότι έχουν ενίσχυση του φαρμακολογικού αποτελέσματος στον οργανισμό, αν χορηγηθούν μαζί με οποιοδήποτε άλλο αγχολυτικό/υπνωτικό φάρμακο (π.χ. βαρβιτουρικά), με αντιεπιληπτικά ή και αντικαταθλιπτικά. Αυτές μπορούν να διακριθούν σε:

- ✓ τοξικές δράσεις απότοκες οξείας υπέρδοσολογίας
- ✓ ανεπιθύμητες ενέργειες που επισυμβαίνουν κατά τη συνήθη θεραπευτική δράση
- ✓ ανοχή και εξάρτηση



Σχήμα 1.7: Παρενέργειες από τη χορήγηση αλπραζολάμης, με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι σοβαρότερες.

Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν από τη χορήγηση αλπραζολάμης είναι η υπνηλία και η σύγχυση. Λόγω της ευρείας χρήσης της αλπραζολάμης, πολλές κλινικές μελέτες διερευνούν την επιδρασή της σε διανοητικές και κινητικές λειτουργίες. Η αταξία εμφανίζεται σε υψηλές δόσεις και αποκλείει δραστηριότητες που απαιτούν λεπτό κινητικό συντονισμό, όπως είναι η οδήγηση αυτοκινήτου. Επίσης είναι δυνατό να εμφανιστούν διαταραχές των γνωστικών λειτουργιών (μείωση της ικανότητας μνήμης) [17]. Στις σοβαρές παρενέργειες από τη χορήγηση αλπραζολάμης περιλαμβάνονται επίσης το κιτρίνισμα του δέρματος και το λευκού στο βολβό του οφθαλμού, κράμπες και γενικότερη μυϊκή εξάντληση, η εμφάνιση σοβαρών δερματικών εξανθημάτων και η διαταραχή των διανοητικών και κινητικών λειτουργιών που ήδη αναφέρθηκαν και στις οποίες περιλαμβάνονται η σύγχυση, προβλήματα μνήμης και παραισθήσεις (σχήμα 1.7).

Η ανοχή, δηλαδή η σταδιακή αύξηση της δόσης που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, εμφανίζεται σε όλες τις βενζοδιαζεπίνες, όπως και η εξάρτηση, η οποία αποτελεί και το κύριο μειονεκτημά τους. Οι

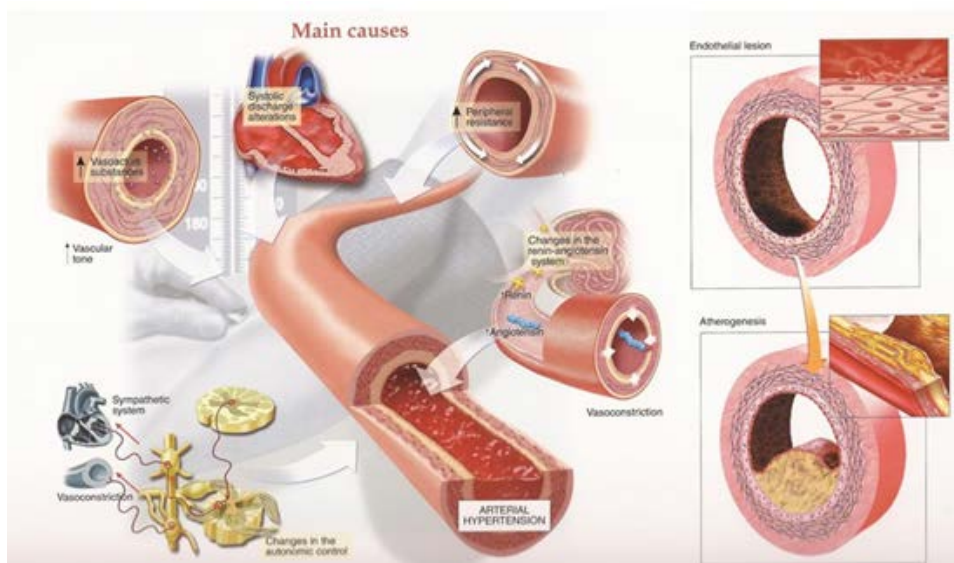
ιδιότητες αυτές χαρακτηρίζουν και άλλα κατασταλτικά. Η ανοχή φαίνεται να αντανακλά μία μεταβολή στο επίπεδο του υποδοχέα τους, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός.

Σε επίπεδο υποδοχέα, ο βαθμός της ανοχής καθορίζεται τόσο από τον αριθμό των υποδοχέων που έχουν καταληφθεί, δηλαδή από την δόση, όσο και από τη διάρκεια της κατάληψης του υποδοχέα που μπορεί να ποικίλλει αναλόγως με τη θεραπευτική χρήση. Επομένως, αξιοσημείωτη ανοχή αναπτύσσεται όταν οι βενζοδιαζεπίνες χρησιμοποιούνται συνεχώς για τη θεραπεία της επιληψίας, ενώ μικρότερου βαθμού ανοχή απέναντι στην δράση επαγωγής του ύπνου αναπτύσσεται όταν το άτομο απέχει από τη λήψη του φαρμάκου κατά τη διάρκεια της ημέρας. Δεν είναι σαφές σε ποιον βαθμό αναπτύσσεται ανοχή έναντι της αγχολυτικής δράσης των βενζοδιαζεπινών.

1.2 Αντιυπερτασικά

1.2.1 Υπέρταση

Αρτηριακή πίεση είναι η δύναμη με την οποία το αίμα πιέζει τα τοιχώματα των αρτηριών μέσα στις οποίες κυκλοφορεί. Όταν οι τιμές της αρτηριακής πίεσης παραμένουν υψηλές για μεγάλο χρονικό διάστημα σημαίνει ότι ο οργανισμός πάσχει από υψηλή αρτηριακή πίεση. Η αρτηριακή πίεση καταγράφεται με δύο αριθμούς που αντιστοιχούν στη συστολική πίεση (κατά τη διάρκεια της συστολής της καρδιάς) και στη διαστολική πίεση (κατά τη διαστολή της καρδιάς) [18]. Η υπέρταση είναι μία κατάσταση, στην οποία η αρτηριακή πίεση είναι αυξημένη. Συνήθως δεν έχει συμπτώματα και την ανακαλύπτουμε συχνά μετά από τυχαίες μετρήσεις. Η συστηματική υπέρταση είναι μία συχνή διαταραχή που αν δεν αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα στεφανιαίας θρόμβωσης, εγκεφαλικών επεισοδίων και νεφρικής ανεπάρκειας (σχήμα 1.8).



Σχήμα 1.7: Συστηματική αρτηριακή υπέρταση. Πηγή: Qsota medical, <http://qsota.com/hypertension/>

Η αυξημένη αρτηριακή πίεση μπορεί να δρα ύπουλα για 15-20 χρόνια, χωρίς κάποια συμπτώματα που να προδίδουν την ύπαρξή της, επιβαρύνοντας το καρδιαγγειακό σύστημα και οδηγώντας το άτομο ολοένα και πιο κοντά στο έμφραγμα ή το εγκεφαλικό επεισόδιο. Όταν εμφανίζονται ενοχλήματα, οφείλονται στις επιπλοκές της. Τα ενοχλήματα αυτά μπορεί να εμφανιστούν

αρκετά χρόνια αργότερα από την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Για το λόγο αυτό η υπέρταση είναι γνωστή ως σιωπηλός δολοφόνος και κλέφτης της ζωής.

Η πρωτοπαθής (ιδιοπαθής) υπέρταση, συναντάται περίπου στο 90% των ασθενών και είναι μια, άγνωστης προέλευσης, διαταραχή που προσβάλλει το μηχανισμό ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης. Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται η υπέρταση άγνωστης ουσιαστικά αιτίας που σχετίζεται κυρίως με την κληρονομικότητα, αλλά και με παράγοντες όπως είναι η παχυσαρκία, η μακροχρόνια πρόσληψη αλατιού και η καθιστική ζωή. Αντίθετα, η δευτεροπαθής υπέρταση εμφανίζεται εξαιτίας διαφόρων παθολογικών καταστάσεων και είναι 4 φορές πιο συχνή σε έγχρωμους σε σχέση με λευκούς ανθρώπους και συχνότερα σε άντρες παρά σε γυναίκες. Τα κυριότερα νοσήματα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δευτεροπαθή υπέρταση είναι η χρόνια νεφροπάθεια, η άπνοια κατά τον ύπνο και η στένωση των νεφρικών αρτηριών. Ο παράγοντας της κληρονομικότητας είναι πολύ καθοριστικός για την εμφάνιση ή όχι υπέρτασης. Η πιθανότητα εμφάνισης υπέρτασης σε άτομα με υπερτασικούς και τους δύο γονείς ξεπερνά το 70%.

Μέχρι περίπου το 1950 δεν υπήρχε αποτελεσματική θεραπεία, και η ανάπτυξη των αντιυπερτασικών φαρμάκων ήταν μεγάλη επιτυχία της φαρμακευτικής επιστήμης. Η συστηματική αρτηριακή πίεση είναι ένας άριστος δείκτης της αύξησης του καρδιαγγειακού κινδύνου. Η διαγνωστική αντιμετώπιση του ασθενούς πρέπει να στοχεύει στην επιβεβαίωση αυξημένων επιπέδων αρτηριακής πίεσεως σε επανειλημμένες μετρήσεις και στην εκτίμηση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου συνύπαρξη δηλαδή και άλλων προδιαθεσικών παραγόντων όπως καπνίσματος, υπερλιπιδαιμίας, παχυσαρκίας, υπερβολικού stress, κληρονομικότητας και έλλειψη σωματικής άσκησης. Είναι επίσης απαραίτητη η εκτίμηση της πιθανής βλάβης σε όργανα στόχους που προκαλεί η παρατεταμένη αύξηση της αρτηριακής πίεσης και η ανεύρεση της πιθανής αιτίας που προκαλεί την υπέρταση.

1.2.2 Μηχανισμός ελέγχου της αρτηριακής πίεσης

Η αρτηριακή πίεση είναι ανάλογη του γινομένου της καρδιακής παροχής και των περιφερικών αντιστάσεων. Η καρδιακή παροχή και οι περιφερικές αντιστάσεις,

τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και στα άτομα με υπέρταση, ελέγχονται κυρίως από δύο αλληλεπικαλυπτόμενους μηχανισμούς, το αντανακλαστικό των τασεοϋποδοχέων και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και από το σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης – αλδοστερόνης.

1.2.2.2 Αντανακλαστικό των τασεοϋποδοχέων και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα

Η πτώση της αρτηριακής πίεσης αποτελεί ερέθισμα για τους τασεοϋποδοχείς να στείλουν λιγότερες νευρικές ώσεις στα καρδιαγγειακά κέντρα. Αυτό οδηγεί αντανακλαστικά σε αύξηση των συμπαθητικών και μείωση των παρασυμπαθητικών ώσεων προς την καρδιά και τα αγγεία, με αποτελέσματα την πιθανή αγγειοσύσπαση των φλεβών και αρτηριδίων του περιφερικού νευρικού συστήματος και την αύξηση της καρδιακής συχνότητας και της έντασης της συστολής. Οι τασεοϋποδοχείς ανταποκρίνονται εξαιρετικά γρήγορα στις μεταβολές της αρτηριακής πίεσης. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αντιρροπιστική αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

1.2.2.3 Σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης – αλδοστερόνης

Η ρενίνη είναι ένα πρωτεϊνικό ένζυμο που απελευθερώνεται από τους νεφρούς σε περίπτωση μεγάλης πτώσης της αρτηριακής πίεσης. Συντίθεται και αποθηκεύεται σε αδρανή μορφή, την προρενίνη, στα παρασπειραματικά κύτταρα των νεφρών. Σε στιγμές πτώσης της τιμής της αρτηριακής πίεσης ενδογενείς αντιδράσεις στους νεφρούς οδηγούν σε διάσπαση πολλών μορίων προρενίνης με απελευθέρωση ρενίνης, που κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της εισέρχεται στο κυκλοφορικό, ενώ ένα μικρό μέρος αυτής παραμένει στα υγρά των νεφρών. Η ρενίνη διασπά το αγγειοτασινογόνο (πρωτεΐνη του πλάσματος) και ελευθερώνει την αγγειοτασίνη I, ένα πεπτίδιο δέκα αμινοξέων με ελαφρά αγγειοσυσπαστική δράση. Λίγα δευτερόλεπτα μετά το σχηματισμό της, η αγγειοτασίνη I μετατρέπεται με απόσπαση δύο αμινοξέων στο οκταπεπτίδιο αγγειοτασίνη II. Η μετατροπή αυτή καταλύεται από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (MEA) (σχήμα 1.9).



Σχήμα 1.9: Το σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης- αλδοστερόνης και οι κυριότεροι τρόποι αναστολής του

Η αγγειοτασίνη II συμβάλλει ενεργά στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Πρόκειται για μια ενδογενή, αγγειοσυσπαστική ουσία που δρα διεγείροντας επταδιαμεμβρανικούς υποδοχείς, τόσο άμεσα, μέσω των AT_1 υποδοχέων, όσο κι έμμεσα, μέσω της απελευθέρωσης κατεχολαμινών και ενδοθελίνης. Επίσης, μέσω των ιδίων υποδοχέων, κινητοποιεί βιοχημικούς δρόμους και δρα ως αυξητικός παράγοντας, προάγοντας την πάχυνση του αγγειακού τοιχώματος κι ως πηγή παραγωγής οξειδωτικών ριζών. Επιπλέον η αγγειοτασίνη II διεγείρει την απελευθέρωση της αλδοστερόνης, η οποία προκαλεί κατακράτηση ύδατος και νατρίου.

Από το σύνολο των προσεγγίσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί για να ρυθμιστεί η πίεση μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης, τρεις διαφορετικοί τρόποι έχουν ξεχωρίσει. Ο πρώτος τρόπος είναι να εμποδιστεί ο σχηματισμός της αγγειοτασίνης I από το αγγειοτασινογόνο. Σε αυτήν την περίπτωση αναστέλλεται το ενζύμο της ρενίνης (χρήση αναστολέων ρενίνης). Ένας δεύτερος τρόπος είναι η αναστολή του σχηματισμού της αγγειοτασίνης II (χρήση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης). Τέλος ένας τρίτος τρόπος είναι η παρεμπόδιση της σύνδεσης της αγγειοτασίνης II με τους AT_1 υποδοχείς.

1.2.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η υπέρταση είναι ένα πολυσήμαντο πρόβλημα που ανάγεται τόσο σε κοινωνικό όσο και σε ατομικό επίπεδο [19]. Στο κοινωνικό επίπεδο, σημαντικό ρόλο παίζει η ενημέρωση του πληθυσμού, με παράλληλη προτροπή για αλλαγή του τρόπου ζωής και των συνηθειών της καθημερινότητας και ώθηση σε προληπτική αντιμετώπιση με τη βοήθεια και καλή εκπαίδευση του κατάλληλου υγειονομικού προσωπικού. Σε ατομικό επίπεδο η αντιμετώπιση της υπέρτασης διακρίνεται σε φαρμακευτική και μη φαρμακευτική.

Η απόφαση για την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής πρέπει να στηρίζεται στο επίπεδο της διακύμανσης της συστολικής και της διαστολικής πίεσης και στην εκτίμηση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου [20]. Σε περίπτωση μέτριας και σοβαρής υπέρτασης όπως έχουν ταξινομηθεί από την Παγκόσμια Επιτροπή Υπέρτασης υπάρχει ομοφωνία για την άμεση έναρξη φαρμακευτικής αγωγής ακόμα και σε απουσία άλλων παραγόντων κινδύνου.

Στην πρώτη γραμμή της φαρμακευτικής αντιμετώπισης της υπέρτασης βρίσκονται φάρμακα που ανήκουν στις εξής κατηγορίες:

1. Διουρητικές ενώσεις όπως το υδροχλωροθειαζίδιο, η χλωροθαλιδόνη, η φουροσεμίδη, η σπιρονολακτόνη, η τριαμτερένη.
2. Αδρενολυτικές (συμπαθολυτικές) ενώσεις
 - ✓ ενώσεις που προκαλούν αποκλεισμό των α-αδρενεργικών υποδοχέων (α-ανταγωνιστές) όπως η φεντολαμίνη, η πραζοσίνη, η τεραζοσίνη και η δοξαζοσίνη,
 - ✓ ενώσεις που προκαλούν αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων (β-ανταγωνιστές) όπως η ατενολόλη, η προπρανολόλη, η μετοπρολόλη, η ναδολόλη, η λαβεταλόλη και η τιμολόλη,
 - ✓ ενώσεις που προκαλούν αποκλεισμό των αδρενεργικών νευρώνων, όπως η ρεζερπίνη και η δεσερπιδίνη.
3. Αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (αναστολείς MEA) όπως η βεναζεπρίλη, η καπτοπρίλη, η εναλαπρίλη, η λισινοπρίλη, η φοσινοπρίλη, η ραμιπρίλη και η περιντοπρίλη.

4. Αναστολείς της ρενίνης όπως η αλίσκιρηνη και μη-πεπτιδικοί αναστολείς της ρενίνης [21].
5. Κεντρικώς δρώντα αδρενεργικά φάρμακα, όπως η κλονιδίνη και η α-μεθυλντόπα.
6. Ανταγωνιστές των υποδοχέων AT1: λοσαρτάνη, βαλσαρτάνη, ιρμπεσαρτάνη, καντεσαρτάνη, τελμισαρτάνη, επροσαρτάνη, ολμεσαρτάνη, αζιλσαρτάνη.
7. Ενώσεις που προκαλούν αναστολή των διαύλων ασβεστίου, δηλαδή η αμλοδιπίνη, η βεραπαμίλη, η διλτιαζέμη, η νικαρνιδιπίνη, η λεκαρνιδιπίνη, η νισολδιπίνη και η φελοδιπίνη.
8. Ενώσεις που προκαλούν απευθείας αγγειοδιαστολή όπως η μινοξιδίλη, η διαζοξίδη, η υδραλαζίνη και το νιτροπρωσσικό νάτριο.

Άλλες ομάδες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην υπέρταση είναι τα περιφερικώς δρώντα συμπαθητικολυτικά, με κύριο εκπρόσωπο τη ρεζερπίνη.

Κατά την εφαρμογή της φαρμακευτικής αγωγής θα πρέπει να δοθεί έμφαση στη χρονιότητα της νόσου και, επομένως, στη συνέπεια της δια βίου λήψης των φαρμάκων από την πλευρά του ασθενούς. Ο προβληματισμός που δημιουργείται αφορά τη φαρμακευτική ή μη αντιμετώπιση ενός μεγάλου ποσοστού πληθυσμού με ήπια υπέρταση. Και ο προβληματισμός αυτός έχει τόσο ατομικές όσο και κοινωνικοοικονομικές προεκτάσεις. Στις Η.Π.Α. ακολουθούν συνήθως επιθετική αντιμετώπιση με χρόνια χορήγηση φαρμάκων, ακόμα και για την ήπια υπέρταση αυτό οδήγησε στην αύξηση του αριθμού των ασυμπτωματικών ασθενών με αποτέλεσμα η υπέρταση να αναδειχθεί ως η πιο πολυέξοδη ασθένεια. Μελέτες καταδεικνύουν ότι η υπερκατανάλωση φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες ή σοβαρές επιπλοκές (όπως η αλόγιστη χρήση διουρητικών μπορεί να οδηγήσει σε θανατηφόρες καρδιακές αρρυθμίες), με αποτέλεσμα να ανατραπεί το όφελος της μείωσης του καρδιαγγειακού θανάτου. Οι επικριτές αυτής της επιθετικής πολιτικής για την ήπια υπέρταση, στηριζόμενοι στα προβλήματα που αναφέρθηκαν, θεωρούν ότι το όριο της διάγνωσης δε σηματοδοτεί κατ' ανάγκη και το όριο για τη θεραπεία, ούτε είναι φρόνιμο να καταστέλουμε ό,τι αποκλίνει ελαφρά από τα φυσιολογικά όρια. Αντί των φαρμάκων, προτείνουν μια μη φαρμακευτική αντιμετώπιση που

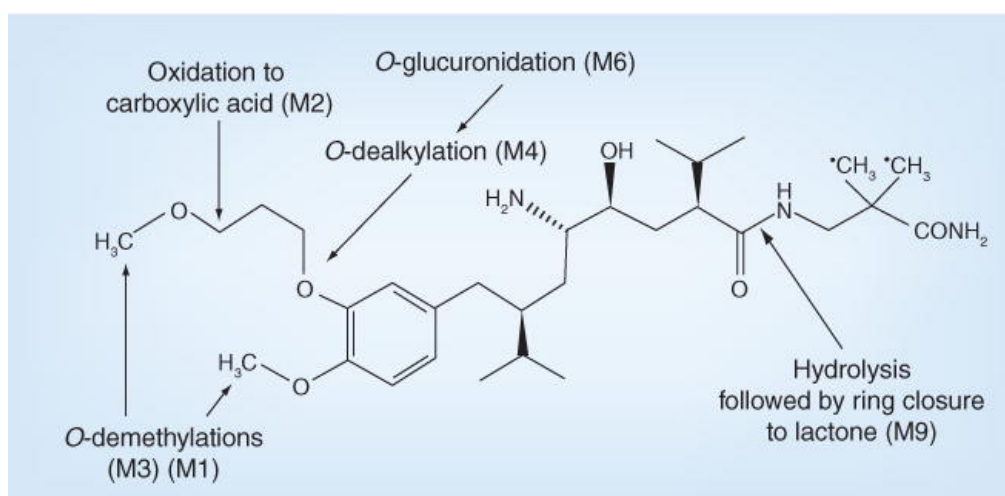
στοχεύει στην ώθηση του ατόμου για καλύτερες συνθήκες ζωής, στη μείωση του σωματικού βάρους σε συνδυασμό με άσκηση, στον περιορισμό της λήψης αλατιού, στην αλλαγή διαιτητικών συνηθειών στην κατανάλωση τροφών απαλλαγμένων από συντηρητικά, λίπη, καθώς και στον τρόπο παρασκευής τους, στη μείωση του άγχους και στην αποφυγή συνεχούς και μεγάλης κατανάλωσης αλκόολ. Ευνοϊκή επίδραση μπορεί να έχουν τα φυτικά παρασκευάσματα καλίου, μαγνησίου, το λάδι ψαριών και το σκόρδο.

Η πολιτική αυτή της μη φαρμακευτικής αγωγής έχει το πλεονέκτημα:

- Να μην αισθάνεται το άτομο ότι νοσεί
- Να στρέψει την προσοχή του ατόμου στην υγιεινή φροντίδα του εαυτού του ενάντια στις αρνητικές για την υγεία του συνθήκες της εποχής του
- Τέλος, έχει το πλεονέκτημα μιας πιο οικολογικής απάντησης σε μια νόσο, η οποία έχει συντηρήσει τεράστιες φαρμακευτικές βιομηχανίες με συνέπεια την επιβάρυνση σε οικονομικό κόστος και σε ρύπανση του περιβάλλοντος.

1.2.4 Αλισκιρένη – μηχανισμός δράσης

Η αλισκιρένη (σχήμα 1.10) είναι ένας από του στόματος δραστικός, ισχυρός και άμεσος αναστολέας της ρενίνης [22,23]. Η αλισκιρένη κυκλοφόρησε στην αγορά το 2007 με ένδειξη τη θεραπεία της αρτηριακής υπέρτασης και χορηγείται μόνη ή σε συνδυασμό με άλλα αντιυπερτασικά όπως το υδροχλωροθειαζίδιο [24].



Σχήμα 1.8: Χημική δομή και μεταβολισμός της αλισκιρένης

Η αλισκιρένη είναι ένας άμεσος αναστολέας της ρενίνης και επομένως αναστέλλει το σύστημα ρενίνης - αγγειοτασίνης στο σημείο ενεργοποίησης, εμποδίζοντας τη μετατροπή του αγγειοτασινογόνου σε αγγειοτασίνη I και μειώνοντας τα επίπεδα της αγγειοτασίνης I και II [25,26]. Ενώ άλλα φάρμακα που αναστέλλουν το σύστημα ρενίνης - αγγειοτασίνης (αναστολείς MEA και αποκλειστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II), προκαλούν ταυτόχρονο αντισταθμιστική αύξηση στη δραστηριότητα της ρενίνης στο πλάσμα, η αλισκιρένη μειώνει τα επίπεδα της ρενίνης του πλάσματος (PRA) σε υπερτασικούς ασθενείς περίπου κατά 50 με 80%. Παρόμοιες μειώσεις παρατηρήθηκαν όταν η αλισκιρένη συνδιάστηκε με άλλα αντιυπερτασικά [27, 28]. Η αλισκιρένη έχει πιθανή συνεργική δράση όταν συνδυαστεί με θειαζιδικά διουρητικά, αναστολείς του MEA ή ανταγωνιστές του ασβεστίου.

1.2.4. 2 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά

Απορρόφηση

Μετά απ' τη λήψη του φαρμάκου, οι μέγιστες συγκεντρώσεις (C_{max}) της αλισκιρένης στο πλάσμα επιτυγχάνονται σε διάστημα από 1 έως 3 ώρες [29]. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητά της αλισκιρένης είναι περίπου 2 έως 3%. Γεύματα με υψηλά λιπαρά μειώνουν τη C_{max} κατά 85% και τη AUC κατά 70%, ενώ γεύματα με χαμηλή περιεκτικότητα λιπαρών μειώνουν την C_{max} κατά 76% και AUC0-tau κατά 67% σε υπερτασικούς ασθενείς. Σταθερά επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα επιτυγχάνονται μέσα σε 5 έως 7 ημέρες με ημερήσια χορήγηση.

Κατανομή

Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, ο μέσος όγκος κατανομής σε σταθερή κατάσταση είναι περίπου 135 λίτρα, αποκαλύπτοντας ότι η αλισκιρένη κατανέμεται εκτεταμένα στον εξωαγγειακό χώρο. Ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση, η πρόσδεση της αλισκιρένης στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μέτρια (47 - 51%).

Μεταβολισμός

Περίπου το 1,4% της συνολικής δόσης από το στόμα μεταβολίζεται στο ήπαρ, μέσω του ηπατικού μικροσωμικού συστήματος. Το ένζυμο το οποίο ευθύνεται για το μεταβολισμό αυτό είναι το CYP3A4.

Απέκκριση

Η αλισκιρένη απεκκρίνεται κυρίως ως αμετάβλητη ουσία στα κόπρανα (78%). Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου 40 ώρες με εύρος από 34 έως 41 ώρες. Περίπου το 0,6% της δόσης ανακτάται στα ούρα μετά τη χορήγηση από το στόμα, ενώ μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, η μέση κάθαρση στο πλάσμα είναι περίπου 9 l/h.

Αλληλεπιδράσεις - Αντενδείξεις

Μια εφάπαξ δόσης μελέτη αλληλεπίδρασης σε υγιείς εθελοντές έδειξε ότι η κυκλοσπορίνη (200 και 600 mg) αυξάνει την C_{max} της αλισκιρένης 75 mg κατά 2,5 φορές περίπου και την AUC κατά 5 φορές περίπου. Η αύξηση μπορεί να είναι μεγαλύτερη με υψηλότερες δόσεις αλισκιρένης. Σε υγιή άτομα, η ιτρακοναζόλη (100 mg) αυξάνει την AUC και την C_{max} της αλισκιρένης (150 mg) μέχρι 6,5 και 5,8 φορές, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η ταυτόχρονη χρήση ισχυρών αναστολέων αλισκιρένης και P-gr αντενδείκνυται. Η χορήγηση χυμού φρούτων με αλισκιρένη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της AUC και C_{max} της αλισκιρένης. Η συγχορήγηση χυμού γκρέιπφρουτ με αλισκιρένη 150 mg οδήγησε σε μείωση 61% στην AUC της αλισκιρένης και η συγχορήγηση με αλισκιρένη 300 mg οδήγησε σε μείωση 38% στην AUC της αλισκιρένης. Η συγχορήγηση του πορτοκαλιού ή χυμού μήλου με αλισκιρένη 150 mg οδήγησε σε μείωση 62% στην AUC της αλισκιρένης ή σε μείωση 63% στην AUC της αλισκιρένης, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, τα ποτά που περιέχουν φυτικά εκχυλίσματα συμπεριλαμβάνων του φυτικού τσαγιού, δεν πρέπει να λαμβάνονται μαζί με αλισκιρένη.

Η ριφαμπικίνη, επαγωγέας της P-gr, μείωσε τη βιοδιαθεσιμότητα της αλισκιρένης κατά περίπου 50% σε μία κλινική μελέτη. Άλλοι επαγωγείς της P-gr (βαλσαμόχορτο) μπορεί να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα της αλισκιρένης. Οι αναστολείς της P-gr μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα του φαρμάκου στους ιστούς περισσότερο από ότι τα επίπεδα στο πλάσμα. Οι πιθανότητες για αλληλεπιδράσεις με το φάρμακο στο P-gr σημείο φαίνεται να εξαρτώνται από το βαθμό αναστολής αυτού του μεταφορέα.

Η συγχορήγηση κετοκοναζόλης ή βεραπαμίλης με αλισκιρένη είχε ως αποτέλεσμα 76% ή 97% αύξηση στην AUC της αλισκιρένης, αντίστοιχα. Η αλλαγή στα επίπεδα της αλισκιρένης στο πλάσμα παρουσία κετοκοναζόλης ή βεραπαμίλης αναμένεται να είναι εντός της περιοχής που θα μπορούσαν να επιτευχθούν εάν η δόση της αλισκιρένης διπλασιαστεί. Δόσεις της αλισκιρένης μέχρι 600 mg ή διπλάσιες της υψηλότερης συνιστώμενης θεραπευτικής δόσης έχει φανεί να είναι καλά ανεκτές σε ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές. Προκλινικές μελέτες δείχνουν ότι η συγχορήγηση αλισκιρένης και κετοκοναζόλης ενισχύει την απορρόφηση της αλισκιρένης από το γαστρεντερικό σύστημα και μειώνει την χολική απέκκριση. Ως εκ τούτου, πρέπει να δίνεται προσοχή όταν η αλισκιρένη χορηγείται με κετοκοναζόλη, βεραπαμίλη ή με άλλους ήπιους αναστολείς της P-gp (κλαριθρομυκίνη, τελιθρομυκίνη, ερυθρομυκίνη, αμιοδαρόνη).

Ανεπιθύμητες ενέργειες

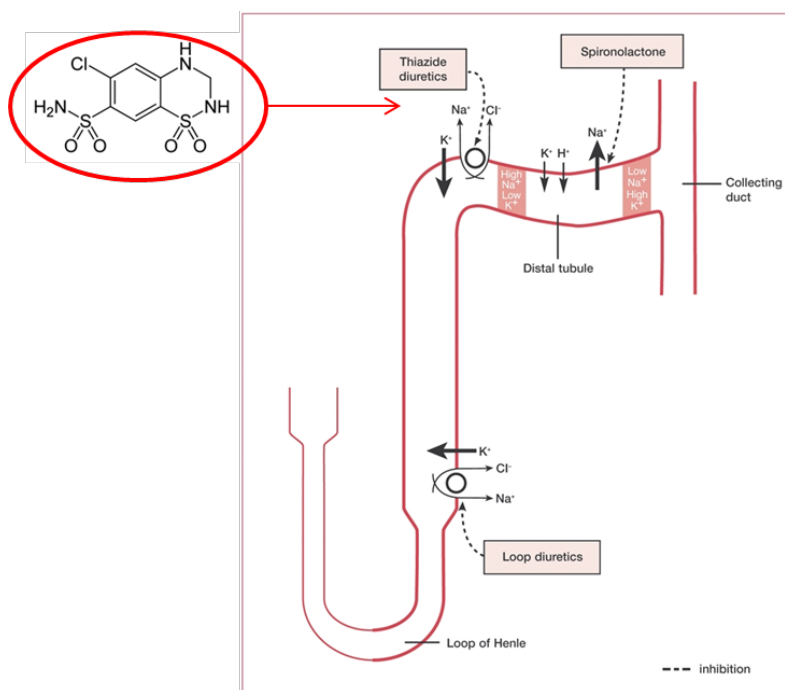
Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χορήγηση αλισκιρένης είναι γενικά ήπιες και παροδικές. Η πιθανότερη ανεπιθύμητη ενέργεια του φαρμάκου είναι η διάρροια. Σε περιπτώσεις που παρατηρούνται σημεία που υποδηλώνουν αντίδραση υπερευαισθησίας, όπως δύσπνοια ή δυσκολία στην κατάποση, εξάνθημα, κνησμός, κνίδωση ή οίδημα στο πρόσωπο και στα άκρα, αλλά και αίσθημα ζάλης ή λιγκού οι ασθενείς θα πρέπει να διακόψουν τη θεραπεία και να επικοινωνήσουν με τον θεράποντα ιατρό τους. Εμπειρικά, μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου έχει παρατηρηθεί αρθραλγία, ως συνέπεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

1.2.5 Υδροχλωροθειαζίδιο-μηχανισμός δράσης

Το υδροχλωροθειαζίδιο (σχήμα 1.11), υπάγεται στην κατηγορία των θειαζιδικών διουρητικών. Κυκλοφόρησε στην αγορά το 1957, και είναι ακόμη και στις μέρες μας από τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα διουρητικά φάρμακα.

Η χρήση του υδροχλωροθειαζιδίου μειώνει την επαναπορρόφηση των ηλεκτρολυτών από τα νεφρικά σωληνάκια. Το υδροχλωροθειαζίδιο δρα κυρίως στο άπω εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο, όπου αναστέλλει ένα συμμεταφορέα ιόντων Na^+/Cl^- της ενδοαυλικής μεμβράνης ελαττώνοντας έτσι την

επαναρρόφηση των ιόντων νατρίου. Το υδροχλωροθειαζίδιο προκαλεί με αυτόν τον τρόπο διούρηση με αυξημένη απέκκριση ιόντων νατρίου και χλωρίου. Η μείωση του όγκου του αίματος λόγω της διουρητικής δράσης οδηγεί σε ελάττωση της αρτηριακής πίεσης [30].



Σχήμα 1.11: Χημική δομή και μηχανισμός δράσης του υδροχλωροθειαζιδίου

Έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων οίδημα, υπέρταση, άποιος διαβήτης και υποπαραθυροειδισμός. Χορηγείται μόνο του αλλά και σε συνδυασμό με άλλα αντιυπερτασικά φάρμακα, όπως β-ανταγωνιστές, αναστολείς MEA και αποκλειστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II [31]. Η μελέτη του μηχανισμού δράσης του υδροχλωροθειαζιδίου οδήγησε στη μείωση της δόσης του φαρμάκου από 50-200 mg σε 6,25 -12 mg με μέγιστη δόση τα 25mg στη μονοθεραπεία αλλά και στη συνδυασμένη θεραπεία. Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης σε ασθενείς των οποίων η αρτηριακή πίεση δεν ρυθμίζεται επαρκώς όταν τα φάρμακα αυτά λαμβάνονται ως μονοθεραπεία.

1.2.5.1 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά

Απορρόφηση

Η απορρόφηση του υδροχλωροθειαζιδίου, όπως και γενικά των θειαζιδικών διουρητικών, μειώνεται από τη χολεστυραμίνη ή την κολεστιπόλη. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη θεραπευτική επίδραση των θειαζιδικών διουρητικών. Ωστόσο, κλιμάκωση της δοσολογίας του υδροχλωροθειαζιδίου και της ρητίνης, δηλαδή να χορηγείται τουλάχιστον 4 ώρες πριν ή 4 - 6 ώρες μετά τη χορήγηση των ρητινών, θα μπορούσε δυνητικά να ελαχιστοποιήσει την αλληλεπίδραση.

Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του υδροχλωροθειαζιδίου είναι 70% μετά από χορήγηση από το στόμα. Η απορρόφηση του υδροχλωροθειαζιδίου, έπειτα από μία δόση από το στόμα, είναι ταχεία, με το t_{max} να είναι περίπου 2 ώρες. Η αύξηση της μέσης AUC είναι γραμμική και ανάλογη της δόσης στο θεραπευτικό εύρος.

Κατανομή

Ο φαινομενικός όγκος κατανομής είναι 4 έως 8 L/kg για λήψη από το στόμα. Συνδέεται με τις πρωτεΐνες του ορού σε ποσοστό 40 έως 70%, κυρίως λευκωματίνη ορού. Το υδροχλωροθειαζίδιο συσσωρεύεται, επίσης, στα ερυθροκύτταρα σε επίπεδα περίπου 1,8 φορές το επίπεδο στο πλάσμα.

Απέκκριση

Αποβάλλεται κυρίως ως αμετάβλητο φάρμακο από το πλάσμα με τελικό χρόνο ημίσειας από 6 έως 15 ώρες. Δεν υπάρχει καμία μεταβολή της κινητικής του υδροχλωροθειαζιδίου με την επαναληπτική δοσολογία και η συσσώρευση είναι ελάχιστη όταν η δόση χορηγείται άπαξ ημερησίως. Περισσότερο από το 95% της απορροφούμενης δόσης αποβάλλεται αναλλοίωτη στα ούρα. Η νεφρική κάθαρση συνίσταται από παθητική διήθηση και ενεργή απέκκριση στο νεφρικό σωληνάριο.

1.2.5.2 Ενδείξεις – Δοσολογία

Η αντιυπερτασική δράση εκδηλώνεται σε μεγάλο βαθμό μέσα σε μια εβδομάδα και το μέγιστο αποτέλεσμα διαπιστώνεται μέσα σε 4 εβδομάδες. Η δόση θα πρέπει να εξατομικεύεται και να προσαρμόζεται σύμφωνα με την κλινική

ανταπόκριση του ασθενούς. Ενδέχεται να συνίσταται η εξατομικευμένη τιτλοποίηση της δόσης με κάθε μία από τις δύο ουσίες πριν την μετάβαση στο σταθερό συνδυασμό. Όταν ενδείκνυται κλινικά, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο της απευθείας μετάβασης από τη μονοθεραπεία στο σταθερό συνδυασμό.

Σε περιπτώσεις ασθενών με ήπια έως μέτρια νεφρική δυσλειτουργία δεν απαιτείται προσαρμογή της αρχικής δόσης. Ο συνδυασμός της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο αντενδείκνυται σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία, ενώ πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή σε ασθενείς με διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Δεν απαιτείται προσαρμογή της αρχικής δόσης για ασθενείς με ήπια έως μέτρια ηπατική δυσλειτουργία.

1.3. Αντιδρωτικά και Αργίλιο

1.3.1 Δομή του δέρματος

Το δέρμα καλύπτει όλη την εξωτερική επιφάνεια του σώματος και εμφανίζει πολλαπλές λειτουργίες. Είναι όργανο προασπιστικό των υποκείμενων ιστών από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος, την αποξήρανση και την είσοδο ξένων οργανισμών [32]. Είναι επίσης αισθητήριο όργανο γιατί περικλείει τις ελεύθερες περιφερικές απολήξεις των αισθητικών νεύρων. Επιπρόσθετα ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος και είναι όργανο αποβολής άχρηστων ουσιών με τον ιδρώτα. Το δέρμα αποτελείται από τρεις στιβάδες: την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό.

Η επιδερμίδα από εξωτερικά προς το χόριο αποτελείται από 5 υποστιβάδες, την κεράτινη στιβάδα (*stratum corneum*), τη διαυγή στιβάδα (*stratum lucidum*), την κοκκιώδη στιβάδα (*stratum granulosum*), την ακανθωτή στιβάδα (*stratum spinosum*) και τη βλαστική στιβάδα (*stratum basale*). Η κεράτινη στιβάδα βρίσκεται εντελώς επιφανειακά και συνεχώς νεκρώνεται, αποπίπτει και ανανεώνεται. Στη στιβάδα αυτή τα κύτταρα έχουν χάσει τους πυρήνες τους και σχεδόν όλα τα κυτταροπλασματικά όργανα και στοιχεία, ακόμη και τα κοκκία κερατινοϋαλίνης. Τα κύτταρα είναι επίπεδα και γεμάτα με κερατίνη, με τη μορφή δεσμίδων από ίνες, ενσωματωμένα σε ένα αδιαφανές νηματοειδές συστατικό [33]. Η κεράτινη στιβάδα κατέχει το 10%-15% της συνολικής ποσότητας νερού που είναι αποθηκευμένο στην επιδερμίδα. Η βλαστική στιβάδα είναι το όριο ανάμεσα στο χόριο και την επιδερμίδα και αποτελείται από λεπτότερες στιβάδες που περιέχουν και τη μελανίνη (χρωστική του δέρματος) και μέσω των οποίων πραγματοποιείται η αναγέννηση του δέρματος. Στη διαφορετική ποσότητα μελανίνης οφείλεται η διαφορετική χροιά του δέρματος μεταξύ των διαφόρων φυλών, αλλά και μεταξύ ατόμων της ίδιας φυλής. Η βλαστική στιβάδα κατέχει περίπου το 8% του νερού που βρίσκεται αποθηκευμένο στην επιδερμίδα γίνεται όλο και λεπτότερη με τη γήρανση και χάνει την ικανότητά της να συγκρατεί νερό.

Το χόριο αποτελείται από συνδετικό ιστό με ελαστικές ίνες και άφθονα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία και νεύρα. Είναι συμπαγές και ελαστικό και

διαφέρει κατά πάχος στις διάφορες περιοχές του σώματος. Είναι περισσότερο παχύ στα πέλματα και στις παλάμες, στη ραχιαία επιφάνεια του σώματος και στα άκρα. Το πάχος του χορίου είναι ελάχιστο στα βλέφαρα, στο όσχεο και το πέος. Στην επιφάνεια του χορίου δημιουργούνται αισθητικές και αγγειακές θηλές. Μέσα στο χορίο ή από κάτω υπάρχουν οι ιδρωτοποιοί αδένες, οι σμηγματογόνοι αδένες και ο βολβός των τριχών.

Ο υποδόριος ιστός συνδέει το χόριο με τα υποκείμενα και στα διάκενα του υπάρχει το υποδόριο λίπος.

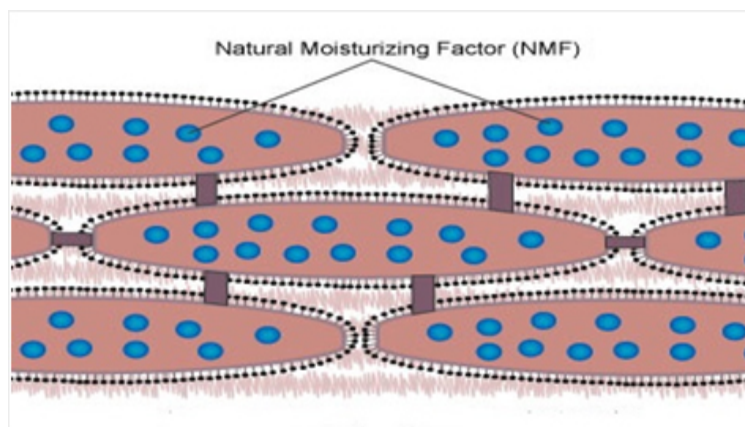
1.3.2 Διαδερμική απορρόφηση

Το δέρμα αποτελεί φυσιολογικό φραγμό που παρεμποδίζει την είσοδο βλαβερών ουσιών στο σώμα, συμπεριλαμβανομένου και του νερού. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη διαδερμική απορρόφηση των ουσιών που διαπερνούν το φραγμό του δέρματος είναι:

- ✓ Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων
- ✓ Το μέσο με το οποίο εφαρμόζονται στο δέρμα
- ✓ Διάφοροι άλλοι φυσιολογικοί παράγοντες

Η ακεραιότητα του φραγμού του δέρματος εξαρτάται από το βαθμό ενυδάτωσης της κερατίνης στιβάδας. Η κερατίνη στιβάδα η οποία έχει πάχος 8-15μm αποτελεί και τον κυριότερο φραγμό της διαδερμικής απορρόφησης ουσιών. Αποτελείται από αρκετά στρώματα επίπεδων κερατινοκυττάρων τα οποία περιβάλλονται από λιπίδια και παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της υγρασίας του δέρματος χάρη στο φυσικό παράγοντα ενυδάτωσης (NMF, Natural Moisturizing Factor), σχήμα 1.12. Τα κερατινοκύτταρα είναι φτιαγμένα από μία άμορφη μήτρα από λιπίδια και πρωτεΐνες μέσα στην οποία βρίσκονται τα ινίδια κερατίνης. Ο μεσοκυττάριος χώρος αποτελείται από ουδέτερα λιπίδια, υψηλά ποσοστά χοληστερόλης και κορεσμένα λιπαρά οξέα τα οποία σχηματίζουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Στο μεσοκυττάριο χώρο οφείλεται και η δυσκολία διόδου ουσιών μέσω του δέρματος. Τα σύμπλοκα των φωσφολιπιδίων με τις πρωτεΐνες της λιπιδικής διπλοστιβάδας σχηματίζουν

υδρόφοβες και υδρόφιλες θύρες [34]. Τα μόρια διαφόρων χημικών ενώσεων μπορεί να διαχέονται τόσο μέσω των κερατινοκυττάρων όσο και μέσω του μεσοκυττάρου χώρου.

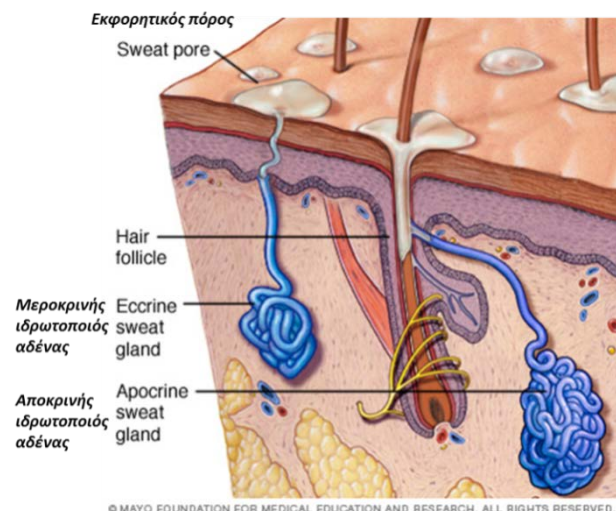


Σχήμα 1.12: Φυσικός παράγοντας ενυδάτωσης (NMF) του δέρματος

Η κερατίνη στιβάδα προβάλλει τη μεγαλύτερη αντίσταση στη διαδερμική διαπερατότητα ενός μορίου και με τον τρόπο αυτό ελέγχει τη διαπερατότητα από το δέρμα. Στο εσωτερικό της κερατίνης στιβάδας είναι εγκλωβισμένο το νερό που δημιουργεί την κύρια αντίσταση. Τα υδατοδιαλυτά μόρια διέρχονται μέσω των κερατινοκυττάρων, ενώ τα λιποδιαλυτά μόρια διέρχονται πιθανώς μέσω των λιπιδικών περιοχών, ενδοκυτταρικών και μεσοκυτταρικών. Μετά την κερατίνη στιβάδα, κατά βάση λιπιδικής φύσεως, τα μόρια πρέπει να διέλθουν από τα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας και το κυρίως δέρμα και να φτάσουν τελικά στα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία του περιφερικού κυκλοφορικού συστήματος και να απορροφηθούν. Η διαπερατότητα του δέρματος αυξάνεται με αύξηση της ενυδάτωσης του, ενώ ταχύτερη διαδερμική απορρόφηση εμφανίζουν ενώσεις που είναι αμφολύτες. Το ενδιαφέρον της κοσμητολογίας εστιάζεται στην εύρεση συνθηκών για την αύξηση της διαπερατότητας θεραπευτικών συστατικών και της μείωσης της διαπερατότητας άλλων συστατικών των καλλυντικών προϊόντων των οποίων η απορρόφηση από το δέρμα δεν είναι επιθυμητή. Στην τελευταία κατηγορία υπάγονται και ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των αντιδρωτικών προϊόντων.

1.3.3 Ιδρωτοποιοί αδένες

Οι ιδρωτοποιοί αδένες διακρίνονται σε μικρούς και σε μεγάλους ή οσμηγόνους αδένες (σχήμα 1.13). Οι μικροί ιδρωτοποιοί αδένες είναι μεροκρινείς και εκκρίνουν κατευθείαν στο δέρμα και βρίσκονται στις πιο πολλές περιοχές του σώματος. Ο άνθρωπος έχει περίπου τρία εκατομμύρια μικρούς ιδρωτοποιούς αδένες, και είναι πολυπληθείς ειδικά στις παλάμες των άκρων χειρών και στα πέλματα. Οι αδένες αυτοί παράγουν τον ιδρώτα, μέσω του οποίου αποβάλλονται από τον οργανισμό διάφορες άχρηστες ουσίες και νερό με αποτέλεσμα να ρυθμίζεται η θερμοκρασία του σώματος. Αποτελούνται από το εκκριτικό μέρος που βρίσκεται μέσα στο χόριο και από έναν εκφορητικό πόρο, ο οποίος εκβάλλει με υποστρόγγυλο στόμιο στην επιφάνεια του δέρματος. Το εκκριτικό μέρος του αδένος είναι περιελιγμένο και ακολουθεί μια ευθεία ή λοξή πορεία μέσα στο χόριο, αλλά καθίσταται σπειροειδής, καθώς διέρχεται από την επιδερμίδα ως το στόμιο του, έναν εκφορητικό πόρο.



Σχήμα 1.13: Ιδρωτοποιοί αδένες Πηγή: May foundation for medical education and Research

Οι μεγάλοι αδένες ή αλλιώς οσμηγόνιοι αδένες είναι συγκεντρωμένοι κυρίως στη μασχάλη, στην άλω του μαστού, στην περιοχή των έξω γεννητικών οργάνων και στην περιοχή του πρωκτού. Οι αδένες αυτοί είναι αποκρινείς και εκκρίνουν μέσα στα θυλάκια των τριχών μετά την εφηβεία έκκριμα ιδιάζουσας και χαρακτηριστικής οσμής. Οι οσμηγόνιοι αδένες είναι περισσότεροι στις γυναίκες.

Οι αποκρινείς αδένες ανάλογα με τη θέση που βρίσκονται από την εφηβεία και μετά, αρχικά βγάζουν έναν άοσμο στείρο από μικρόβια ιδρώτα. Συμπαράσφουρουν όμως λιπίδια από το σμήγμα που διασπώνται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα που δυσοσμούν. Η λειτουργία τους σταματά στην κλιμακτήριο και γίνεται πιο έντονη κατά την κύηση και την έμμηνο ρύση. Οι μεροκρινείς (εξωκρινείς) αδένες ρυθμίζουν τη θερμοκρασία του σώματος με την έκκριση του ιδρώτα ο οποίος εξατμιζόμενος προκαλεί ψύξη του δέρματος. Οι μεροκρινείς αδένες αρχικά εκκρίνουν ένα διαυγές, αραιό υδατικό διάλυμα στην επιφάνεια του δέρματος. Η τελικά δυσάρεστη οσμή του ιδρώτα οφείλεται τόσο στην αποσύνθεση του πλούσιου σε οργανικές ουσίες εκκρίματος των αποκρινών αδένων από τα βακτήρια του δέρματος όσο και στην αποβολή μέσω του ιδρώτα συστατικών των τροφών που μυρίζουν. Η δυσάρεστη οσμή προέρχεται κυρίως από λιπαρά οξέα (βουτυρικό, καπρυλικό) και από προϊόντα διάσπασης πρωτεϊνών. Το pH του ιδρώτα από όξινο αρχικά μετατρέπεται σταδιακά σε ουδέτερο pH~7.

1.3.4 Μηχανισμός δράσης των αντιδρωτικών και των αποσμητικών προϊόντων

Τα αντιδρωτικά σκευάσματα έχουν σκοπό την παρεμπόδιση ή μείωση της υπερβολικής έκκρισης ιδρώτα, τα αποσμητικά έχουν ως σκοπό τη μείωση ή κάλυψη της οσμής και μπορεί να περιέχουν αντιδρωτικές ουσίες, αρώματα και αντιβακτηριακές ουσίες για τη μείωση της αποσύνθεσης των ουσιών του ιδρώτα από βακτήρια.

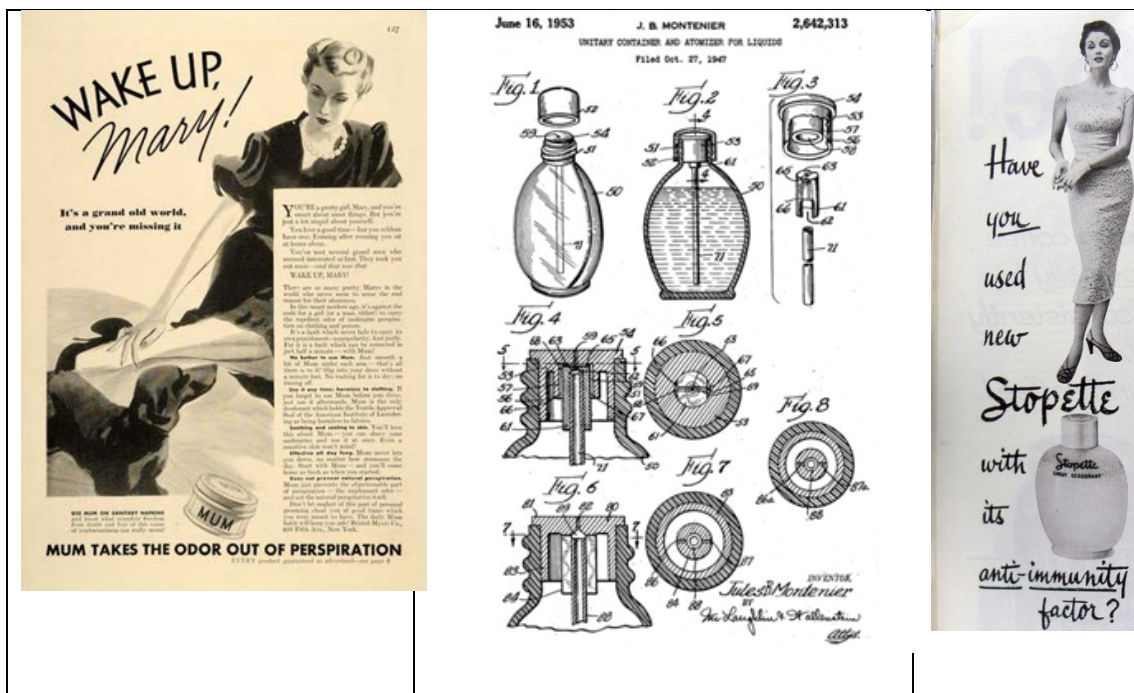
Τα **αποσμητικά προϊόντα** έχουν σκοπό τη μείωση της οσμής του παραγόμενου ιδρώτα. Περιέχουν αντιμικροβιακές ουσίες, αρώματα, ουσίες που δεσμεύουν τα δύσοσμα προϊόντα της αποσύνθεσης του ιδρώτα και πολλές φορές και αντιδρωτικές ουσίες. Οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες πρέπει να έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι ευρέως φάσματος βακτηρίων, να μην είναι τοξικές ή ερεθιστικές για το δέρμα, να μην είναι φωτοευαίσθητες, να είναι σταθερές και συμβατές με τα υπόλοιπα συστατικά του προϊόντος και να μην καταστρέφουν τα ρούχα.

Τα **αντιδρωτικά προϊόντα** δρουν με εντελώς διαφορετικό τρόπο αναστέλλοντας την έκκριση του ιδρώτα. Τα αντιδρωτικά αποτελούνται από

άλατα μετάλλων (αργιλίου) που φράζουν τον πόρο του ιδρωτοποιού αδένος λόγω της καταβύθισης των πρωτεϊνών που προκαλούν (ενώνονται με τα ινίδια κερατίνης του πόρου), σχηματίζουν ένα είδος γέλης που εμποδίζει τη ροή του ιδρώτα προς τα έξω. Η αντιδρωτική δράση των αντιδρωτικών σκευασμάτων αξιολογείται με σύγκριση του ρυθμού παραγωγής ιδρώτα από την μασχάλη εθελοντών μετά την εφαρμογή του σκευάσματος με τον ρυθμό παραγωγής ιδρώτα χωρίς την εφαρμογή σκευάσματος. Ο έλεγχος διεξάγεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας. Μετά από 40 λεπτά γίνεται η συλλογή του ιδρώτα σε δύο διαδοχικές περιόδους διάρκειας 20 λεπτών. Ο προσδιορισμός της ποσότητας του ιδρώτα γίνεται με ζύγιση και συνήθως με χρήση ηλεκτρονικού υγρόμετρου. Η αντιδρωτική δράση εκφράζεται ποσοτικά με την εκατοστιαία ελάττωση του ρυθμού εφίδρωσης η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 20% [35].

1.3.5 Αντιδρωτικά και αποσμητικά σκευάσματα

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα κυκλοφόρησε στην αγορά το πρώτο εμπορικό αποσμητικό με την ονομασία MUM® από έναν εφευρέτη στη Φιλαδέλφεια των Η.Π.Α. το όνομα του οποίου έχει χαθεί στην ιστορία. Το πρώτο αντιδρωτικό προϊόν κυκλοφόρησε το 1941 στις Η.Π.Α. με την ονομασία Stopette® [36] και κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον Jules Bernard Montenier. Ο Montenier αρχικά έλυσε το πρόβλημα της αυξημένης οξύτητας των διαλυμάτων του χλωριούχου αργιλίου αλλά με μία ακόμη πατέντα το 1952 κατοχύρωσε την ειδική συσκευασία του προϊόντος [37] (σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14: Συσκευασία του πρώτου αντιδρωτικού προϊόντος που κυκλοφόρησε με την ονομασία Stopette®-US D168109 S

Τα roll-ons ανακαλύφθηκαν γύρω στο 1950 και λίγο αργότερα ανακαλύφθηκαν τα αερολύματα, τα οποία έγιναν αμέσως δημοφιλή γιατί επιτρέπουν στο χρήστη να αποφεύγεται η επαφή του προϊόντος με τη μασχάλη αλλά και λόγω της ανάλαφρης αίσθησης που προσφέρουν. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '60 τα μισά από τα αποσμητικά που πωλούνταν στις Η.Π.Α. ήταν αερολύματα. Στις αρχές της δεκαετίας του '70 η δημοτικότητα των αερολυμάτων μειώθηκε λόγω της απαγόρευσης της χρήσης των προωθητικών χλωροφθορανθράκων, αλλά και της απαγόρευσης από τον FDA το 1977 της χρήσης αερολυμάτων που περιέχουν ενώσεις του αργιλίου και του ζirkονίου λόγω των ανησυχιών για τη μακροχρόνια εισπνοή. Σταδιακά τα αντιδρωτικά ραβδία γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλή.

Στη σημερινή εποχή τα αντιδρωτικά και τα αποσμητικά προϊόντα κυκλοφορούν στην αγορά ως αερολύματα (aerosols), σκευάσματα περιστρεφόμενης σφαίρας (roll-ons), ραβδία (sticks), κρέμες και σκόνες. Στις Η.Π.Α. πλέον τα αποσμητικά θεωρούνται καλλυντικά προϊόντα ενώ τα αντιδρωτικά σκευάσματα κατηγοριοποιούνται ως φάρμακα OTC.

- ✓ Σκευάσματα περιστρεφόμενης σφαίρας (roll on): Είναι συνήθως γαλακτώματα ή υδατοαλκοολικά διαλύματα στα οποία το ιξώδες

αυξάνεται με ακρυλικά πολυμερή. Εφαρμόζονται στο δέρμα με τη βοήθεια ειδικής σφαίρα που είναι τοποθετημένη στο άκρο της συσκευασίας και η οποία σύρεται πάνω στο δέρμα και αποθέτει ομοιόμορφα το σκεύασμα.

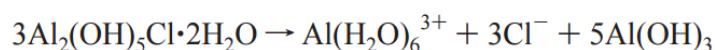
- ✓ *Αερολύματα (spray)*: Το αερόλυμα αποτελείται συνήθως από 7-10% αντιδρωτικό εναιώρημα και 90-93% μίγμα προωθητικών αερίων. Το αντιδρωτικό εναιώρημα περιέχει συνήθως άλατα αργιλίου διεσπαρμένα σε κάποιον ελαιώδη φορέα και ουσίες που υποβοηθούν τη διασπορά των αλάτων του αργιλίου. Τα αποσμητικά αερολύματα βασίζονται σε αλκοολικά διαλύματα του αντιμικροβιακού παράγοντα.
- ✓ *Ραβδία (sticks)*: Τα αποσμητικά ραβδία βασίζονται στην αντίδραση στεατικού οξέος με καυστικό νάτριο σε αιθανόλη οπότε σχηματίζεται στεατικό νάτριο που διασπείρεται στην αιθανόλη. Η αιθανόλη μπορεί να αντικατασταθεί από λιγότερο πτητικές αλκοόλες, όπως η προπυλενογλυκόλη και η 1,3 βουτυλενογλυκόλη. Στα σκευάσματα αυτά δεν πρέπει να προστίθενται ουσίες με όξινη αντίδραση διότι προκαλούν υδρόλυση του στεατικού νατρίου.
- ✓ *Αντιδρωτικές κρέμες*: Οι αντιδρωτικές κρέμες περιέχουν άλατα του αργιλίου όπως το υδροξυχλωριούχο αργίλιο, αντισηπτικές ουσίες όπως τρικοναζόλη, γαλακτωματοποιητές και διυγρυντικές ενώσεις όπως γλυκερίνη, προπυλενογλυκόλη, σορβιτόλη και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-400) σε συγκεντρώσεις 3-10%.
- ✓ *Αντιδρωτικές σκόνες*: Οι αντιδρωτικές σκόνες είναι οι λιγότερες δραστικές από όλα τα αντιδρωτικά προϊόντα και ως αντιδρωτικό παράγοντα περιέχουν συνήθως σκόνη υδροξυχλωριούχου αργιλίου που επικαλύπτεται με πολυαιθυλενογλυκόλη μεγάλου μοριακού βάρους. Ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται και κατάλληλες ενώσεις ως απορροφητικά υγρασίας όπως καολίνη σε ποσοστό μέχρι 40%.

1.3.6 Άλατα του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα

Το **τριχλωριούχο αργίλιο** εμφανίσθηκε ως αντιδρωτική ουσία στην αγορά για πρώτη φορά το 1916. Είναι η πιο αποτελεσματική αντιδρωτική ουσία αλλά είναι ερεθιστική και προκαλεί και μεγάλη φθορά στα ρούχα. Πλέον η χρήση

σκέτου τριχλωριούχου αργιλίου έχει εγκαταληφθεί, υδρολύεται εύκολα και ελευθερώνει HCl.

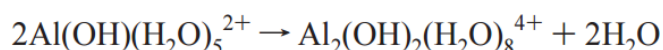
Το 1947 εισήχθη στην αγορά καλλυντικών το **υδροξυχλωριούχο αργίλιο** ($\text{Al}_2(\text{OH})_5\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και από τότε χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την παρασκευή αντιδρωτικών προϊόντων [38]. Το σύμπλοκο αυτό του αργιλίου είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το τριχλωριούχο αργίλιο αλλά και λιγότερο ερεθιστικό για το δέρμα. Σε υδατικό διάλυμα, το υδροξυχλωριούχο αργίλιο πολυμερίζεται, σχηματίζοντας έναν αριθμό πολυμερών, μερικά από τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντιδρωτική δράση του [39]. Για την καλύτερη κατανόηση της χημείας πίσω από την αντιδρωτική δράση του υδροξυχλωριούχου αργιλίου, απαιτούνται δομικές πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο σχετικά με τα πολυμερή που εμπλέκονται σε αυτή τη δράση. Ο μηχανισμός πολυμερισμού του υδροξυχλωριούχου αργιλίου κατά την αραίωση και τη γήρανση των υδατικών διαλυμάτων του αποτελείται από διάφορα βήματα. Τα οκταεδρικά μονομερή, $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6\text{Cl}_3$, που σχηματίζονται με την ακόλουθη αντίδραση αραίωσης σε νερό:



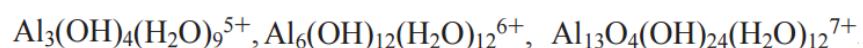
υποβάλλονται σε αποπρωτονίωση:



και στη συνέχεια σχηματίζουν διμερή ως εξής:

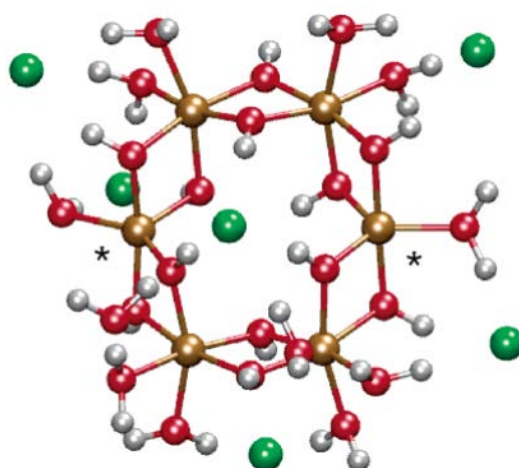


Η αποπρωτονίωση των διμερών προκαλεί περαιτέρω πολυμερισμό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγαλύτερων πολυμερών, όπως τα είδη:



και τελικά τα είδη Al_{14} - Al_{200} . Η σύσταση των διαλυμάτων του υδροξυχλωριούχου αργιλίου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH του διαλύματος, και ο χρόνος από την παρασκευή του.

Λόγω της πολυπλοκότητας του συμπλόκου του υδροξυχλωριούχου αργιλίου είναι δύσκολο να ληφθούν λεπτομερές δομικές πληροφορίες με πειραματικές μεθόδους. Η ύπαρξη των μονομερών, διμερών, και Al_{13} -πολυμερών έχει αποδειχθεί με μεγάλο αριθμό πειραμάτων που περιλαμβάνουν τη χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών όπως η τεχνική ακτίνων-X [40], η φασματοσκοπία NMR [41], η φασματοσκοπία Raman [42] και η φασματοσκοπία IR [43]. Άλλα είδη όπως τριμερή και εξαμερή έχουν προταθεί με ποτενσιομετρικές τεχνικές [44]. Σε πειράματα μοριακού μοντελισμού, που πραγματοποιήθηκαν μελετώντας τη γενική οκταεδρική δομή των μονομερών και τις δομές διμερών, τριμερών και εξαμερών του υδροξυχλωριούχου αργιλίου αποδείχθηκε ότι τα ιόντα χλωρίου διαδραματίζουν αναμφισβήτητα σημαντικό ρόλο στη δομή του κάθε πολυμερούς (σχήμα 1.5) [45].



Σχήμα 1.15: Βελτιστοποιημένη δομή του εξαμερούς του υδροξυχλωριούχου αργιλίου. Με αστέρι σημειώνονται κοιλότητες που σχηματίζονται από μόρια νερού, Cl^- πράσινο χρώμα, άτομα οξυγόνου κόκκινο χρώμα, άτομα αργιλίου χρυσό χρώμα και τα άτομα υδρογόνου συμβολίζονται με γκρι χρώμα. Πηγή: J. Phys. Chem. A 2004, 108, 113-120

Μελετήθηκαν πολυμερή με $n=2-6$ και βρέθηκε ότι αποτελούνται από οκταεδρικές μονάδες που συνδέονται μέσω γεφυρών OH , με μόρια H_2O ενώ τα ιόντα Al^{3+} τοποθετούνται σε περιφερικές θέσεις. Σε μικρότερα είδη, όπως στο μονομερές και στο διμερές τα ιόντα Cl^- βρέθηκε να συμμετέχουν στην οκταεδρική δομή. Αυτό είναι σε συμφωνία με ευρήματα άλλων ερευνητικών ομάδων που αναφέρουν ότι δε βρίσκονται όλα τα ιόντα χλωρίου στην ελεύθερη ιοντισμένη τους μορφή. Σύμφωνα με τον οργανισμό φαρμάκων και τροφίμων FDA η συγκέντρωση του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα

δε θα πρέπει να υπερβαίνει το ποσοστό 25% w/v. Τόσο οι αμερικάνικες όσο και οι ευρωπαϊκές αρχές δηλώνουν ότι τα παραπάνω προϊόντα δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται σε ερεθισμένη επιδερμίδα.

Άλλες ενώσεις του αργιλίου όπως το τριχλωριούχο αργίλιο σε σύμπλοκο με την προπυλενογλυκόλη ή με πολυαιθυλενογλυκόλη καθώς και σύμπλοκα αργιλίου με γλυκίνη χρησιμοποιούνται επίσης ως αντιδρωτικά [46,47].

Οι ενώσεις του αργιλίου μειώνουν την ποσότητα του ιδρώτα που φτάνει στην επιφάνεια του δέρματος προκαλώντας μηχανική παρεμπόδιση του εκφορητικού πόρου του εκκριτικού ιδρωτοποιού αδένα. Θεωρείται ότι τα μέταλλα αυτά με την εφαρμογή τους κατακρημνίζονται στους ιδρωτοποιούς αδένες καθώς σχηματίζονται τα αδιάλυτα υδροξείδιο του αργιλίου τα οποία στη συνέχεια μπλοκάρουν τον εκφορητικό πόρο του αδένα και εμποδίζουν την έκκριση του ιδρώτα στην επιφάνεια του δέρματος [48]. Η εκκριτική μοίρα του αδένα δεν επηρεάζεται από τα μέταλλα αυτά αν και η μακροχρόνια παρεμπόδιση του εκφορητικού πόρου οδηγεί σε δομική και λειτουργική εκφύλιση του αδένα με συνέπεια την απώλεια της εκκριτικής λειτουργίας.

1.3.7 Τοξικότητα του αργιλίου

Το αργίλιο είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και η κύρια πηγή πρόσληψης του από τον άνθρωπο είναι μέσω της διατροφής. Αντιδρωτικά προϊόντα, εμβόλια, αντιόξινα φάρμακα, υγρά παρεντερικής διατροφής και σωματίδια λόγω επαγγελματικής έκθεσης αποτελούν σημαντικές πηγές έκθεσης στο αργίλιο. Το σκελετικό σύστημα, οι πνεύμονες, οι μύες, το ήπαρ, ο εγκέφαλος και το αίμα περιέχουν 60, 25, 10, 3, και 1% αντίστοιχα του σωματικού “φορτίου” υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στους πνεύμονες συναντάται η μεγαλύτερη συγκέντρωση του αργιλίου και ακολουθούν τα οστά, το ήπαρ, η σπλήν, η καρδιά, τα νεφρά, ο εγκέφαλος και οι μύες.

Το αργίλιο θεωρείται γενικά ασφαλές, ωστόσο οι βιολογικές του επιπτώσεις από την αλληλεπίδραση του με τα βιολογικά συστήματα είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Έχει συνδεθεί με πολλές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και νευρολογικών διαταραχών. Έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί τοξικότητα σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία καθώς οι νεφροί αποτελούν το κύριο όργανο

για την απομάκρυνση του αργιλίου. Οξεία τοξικότητα από το αργίλιο είναι πιθανόν να συμβεί στην περίπτωση της έκπλυσης της ουροδόχου κύστης με διάλυμα 1% αργιλίου για τη θεραπεία αιμορραγίας. Έχει παρατηρηθεί χρόνια τοξικότητα με αργίλιο σε περιπτώσεις ασθενών με εγκεφαλοπάθεια όπου η συγκέντρωση του αργιλίου εμφανίζεται κατά 10 φορές αυξημένη σε διάφορα όργανα εκτός από τους πνεύμονες όπου η αύξηση της είναι λιγότερη. Επιπλέον έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πιθανή συσχέτιση της απορρόφησης του αργιλίου των αντιδρωτικών προϊόντων με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer.

Τα τελευταία χρόνια αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό η ενσωμάτωση του αργιλίου στα καλλυντικά προϊόντα λόγω της αποδεδειγμένης διαδερμικής απορρόφησης του και της οιστρογονικής δράσης του (μέταλλο-οιστρογόνο) [49]. Έχει διατυπωθεί από ορισμένους ερευνητές η υπόνοια ότι η απορρόφηση του αργιλίου από την περιοχή της μασχάλης που εφαρμόζονται τα αντιδρωτικά καλλυντικά προϊόντα μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού [50,51]. Σε αρκετές μελέτες ανιχνεύεται αργίλιο σε σημεία του μαστού όπου γίνεται τοπική εφαρμογή ενώσεων του αργιλίου που χρησιμοποιούνται σε αντιδρωτικά προϊόντα [52,53,54]. Ο καρκίνος του μαστού δεν είναι μια νέα ασθένεια, έχει καταγραφεί στην αρχαία Αίγυπτο και στην κλασσική Ελλάδα [55], αλλά τις τελευταίες δεκαετίες είναι άνευ προηγουμένου η αύξηση των κρουσμάτων του παγκοσμίως [56]. Ο καρκίνος του μαστού έχει μια περιβαλλοντική συνιστώσα, και παρόλο που έχουν επιβεβαιωθεί οι παράγοντες κινδύνου που οδηγούν σε αυτή την ασθένεια, δεν θα είναι εφικτή η πρόληψη μέχρι να αναγνωριστούν σημαντικές περιβαλλοντικές αιτίες. Παράλληλα με την αύξηση των κρουσμάτων, υπάρχουν αναφορές ότι και η βιολογία του καρκίνου του μαστού έχει αλλάξει [57,58] και ότι η διεισδυτικότητα των γονιδίων ευπάθειας στον καρκίνο του μαστού μπορεί να αντανάκλα περιβαλλοντικές επιρροές. Κληρονομούμενα χαρακτηριστικά σχετικά με την απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να αυξήσει την προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, αλλά αυτό αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων και εξακολουθεί να αφήνει ανοιχτό το ερώτημα ως προς την προέλευση της βλάβης του DNA. Ως κυριώτερος αναγνωρισμένος παράγοντας κινδύνου παραμένει η εφάπαξ έκθεση σε οιστρογόνα, τα οποία

μπορεί να αυξηθούν μέσω μεταβολών λόγω ηλικίας π.χ. έναρξη της εμμηνου ρήσης, εμμηνόπαυση, έλλειψη τεκνοποίησης, θηλασμός, peros λήψη αντισυλληπτικών και ορμονοθεραπείας. Η έκταση της συμμετοχής των οιστρογόνων στην ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου του μαστού αποτέλεσε τη βάση για την επιτυχή χρήση της ενδοκρινικής θεραπείας ως στοχευμένης θεραπείας για αυτού του είδους τον καρκίνο [59]. Με βάση αυτά τα δεδομένα σχετικά με τη συμμετοχή των οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να επιλυθεί το ζήτημα ως προς το κατά πόσον αρκετές από τις περιβαλλοντικές ενώσεις που μπορεί να μετρηθούν στον ανθρώπινο μαστό και που έχουν οιστρογονική δράση μπορούν να συμβάλουν ως περιβαλλοντικοί πλέον παράγοντες στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Η αναζήτηση περιβαλλοντικών παραγόντων που ευθύνονται για τον καρκίνο του μαστού, η έκθεση του μαστού σε χημικές ουσίες από το περιβάλλον με βλαβερές ιδιότητες για το DNA και οι οποίες είναι μιμητές των οιστρογόνων πρέπει να διερευνηθεί. Σε αυτό το πλαίσιο το αργίλιο που όπως ήδη αναφέρθηκε είναι ένα μέταλλο-οιστρογόνο και έχει γονοτοξικές ιδιότητες καθώς μπορεί να βλάψει την ακεραιότητα της δομής του DNA, να επιφέρει επιγενετικές αλλαγές και να αλλοιώσει την έκφραση των γονιδίων πρέπει επίσης να εξεταστεί ως ένας επιπλέον περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού. Υπάρχουν ωστόσο αρκετά αναπάντητα ερωτήματα που σχετίζονται με το κατά πόσο η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων αργιλίου μπορεί να οδηγήσει σε τυχόν αρνητικές επιπτώσεις στο μαστό, όπως στην ανάπτυξη καρκίνου, αλλά και με το από όπου προήλθε το αργίλιο που έχει βρεθεί συγκεντρωμένο στο μαστικό αδένα. Ωστόσο, η τροποποίηση της έκφρασης των mRNAs για τις S100 δεσμευτικές του ασβεστίου πρωτεΐνες μετά από μακροχρόνια έκθεση σε αργίλιο των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων MCF-7 χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [60,61]. Οι S100 είναι πολυλειτουργικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι λειτουργούν ενδοκυτταρικά για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου. Φωσφορυλίωση και τροποποιημένη έκφραση των πρωτεϊνών S100 έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα [62,63]. Αν και οι λόγοι για την αναφερόμενη αύξηση της έκφρασης των S100 πρωτεϊνών στην περίπτωση καρκίνου του μαστού δεν έχουν επακριβώς καθοριστεί, η οποιαδήποτε

συσχέτιση με τα αυξημένα επίπεδα αργιλίου στο μαστό αξίζει περαιτέρω διερεύνησης [64]. Τα σύμπλοκα του αργιλίου ως συστατικά αντιδρωτικών παρασκευασμάτων μπορούν και συνδέονται με τους κυτταρικούς υποδοχείς οιστρογόνων άλλοτε δεσμεύοντας τους, άλλοτε μιμούμενες την οιστρογονική δράση και άλλοτε διαμορφώνοντας τη δράση τους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ικανότητα ορισμένων μεταλλο-ιόντων να συνδέονται με τους υποδοχείς των οιστρογόνων [65]. Έγινε συνεπώς εμφανές ότι ακόμη και ανόργανες ουσίες μπορούν να δράσουν ως «ξενοοιστρογόνα». Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται «μεταλλοοιστρογόνα». Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού καθώς έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ των οιστρογόνων και της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού [66]. Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει ομοιότητες με τον καρκίνο του προστάτη. Ο ρόλος των ορμονών, όπως είναι η τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα στην καρκινογένεση έχει επιβεβαιωθεί. Παρά τις προσπάθειες σε παγκόσμια κλίμακα από πολλά ερευνητικά εργαστήρια για την εύρεση της παθογένειας αυτών των ασθενειών είμαστε ακόμη μακριά από το τελικό αποτέλεσμα. Προϊόντα προσωπικής φροντίδας τα οποία περιέχουν οιστρογόνα ή μέταλλο-οιστρογόνα αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό σχετικά με τον αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, ειδικά σε νέες γυναίκες. Στις Η.Π.Α. υπάρχει μία παράλληλη αύξηση των περιστατικών καρκίνου του μαστού και καρκίνου του προστάτη σε σχέση με μη ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους. Έχει διαπιστωθεί ότι προκαλείται ακούσια και μακροχρόνια διαδερμική απορρόφηση των οιστρογόνων και των ανδρογόνων από το μπλοκάρισμα των αποκρινών ιδρωτοποιών αδένων που προκαλείται από αντιδρωτικά προϊόντα που περιέχουν ενώσεις του αργιλίου. Το γεγονός ότι η παγκόσμια αύξηση της χρήσης αντιδρωτικών προϊόντων είναι παράλληλη με την αύξηση των θανάτων από καρκίνο του μαστού και του προστάτη εγείρει έντονη ανησυχία. Πρόσφατα παρουσιάστηκε μελέτη που βασίζεται σε διεπιστημονική βιβλιογραφία με βάση αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με το πως μια τέτοια σύνδεση σχετική με τη χρήση αντιδρωτικών προϊόντων μπορεί να προκαλέσει τη διεξαγωγή επιβεβαιωτικής έρευνας με στόχο την αναζήτηση της αιτιολογίας και την ανεύρεση τρόπων πρόληψης των καρκίνου του μαστού και του προστάτη.⁶⁷ Σε πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι μακροχρόνια έκθεση σε αργίλιο (AlCl₃), σε όμοιες

συγκεντρώσεις με αυτές που έχουν μετρηθεί στον ανθρώπινο μαστό, διαφοροποιεί καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα από φυσιολογικό μαστικό αδένιο ποντικού (NMuMG) στα οποία εφαρμόστηκε *in vitro* η δοκιμασία soft agar. Υποδόριες ενέσεις αυτών των κυττάρων σε τρία διαφορετικά είδη ποντικών με μειωμένη ανοσοανεπάρκεια έδειξαν ότι τα τυφλά δείγματα από επιθηλιακά κύτταρα NMuMG σχηματίζουν καρκινικούς όγκους και μεταστάσεις σε μικρότερο βαθμό από τα κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί σε αργίλιο και μόνο σε δύο είδη ποντικών. Αντίθετα τα κανονικά δείγματα από καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα NMuMG τα οποία είχαν εκτεθεί σε αργίλιο σχηματίζονται καρκινικοί όγκοι και μεταστάσεις σε όλα τα είδη των ποντικών που μελετήθηκαν. Αυτό το αποτέλεσμα συνηγορεί με την μεταλλαξιογόνο δράση του $AlCl_3$. Τα ευρήματά αυτά αποδεικνύουν ότι συγκεντρώσεις αργιλίου όμοιες με εκείνες που έχουν μετρηθεί στον ανθρώπινο μαστό μεταλλάσσουν καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα μαστού, έτσι ώστε να μπορούν να σχηματίσουν καρκινικούς όγκους και να προκαλέσουν μεταστάσεις σε καθιερωμένα μοντέλα καρκίνου ποντικών. Οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν πειραματική απόδειξη ότι τα άλατα του αργιλίου θα μπορούσαν να είναι καρκινογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες για το μαστό [68].

Κεφάλαιο 2: Υγροχρωματογραφία - φασματομετρία μαζών

2.1 Εισαγωγή

Η Φασματομετρία Μαζών είναι μία αναλυτική τεχνική κατά την οποία παράγονται ιόντα σε αέρια φάση από ένα δείγμα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Οι σύγχρονες εξελίξεις τοποθετούν αυτή την τεχνική στην πρώτη γραμμή των ερευνητικών δυνατοτήτων.

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (1912), οπότε έγινε η εφεύρεση του πρώτου φασματόμετρου μαζών από τον J. J. Thompson, μέχρι σήμερα τόσο οι εφαρμογές όσο και οι τεχνολογικές εξελίξεις στο αντικείμενο της φασματομετρίας μαζών παρουσιάζουν σημαντική διεύρυνση [69,70]. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί έμφαση σε νέες τεχνικές ιοντισμού και φασματόμετρα μαζών που επιτρέπουν την ταυτοποίηση ενώσεων πολικών, ιοντικών ή μεγάλου μοριακού βάρους [71,72].

Ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με τη φασματομετρία μαζών με πηγή ιοντισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού οδήγησε στη συνδυαστική τεχνική LC-ESI/MS η οποία δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης τόσο μικρών [73] όσο και μεγάλων μορίων διαφορετικής πολικότητας σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα [74]. Επιπλέον, η συζευγμένη τεχνική της υδροχρωματογραφίας δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MSⁿ) [75] έδωσε επιπλέον διαχωριστικές δυνατότητες απλοποιώντας πολύπλοκες διαδικασίες που αφορούν τον καθαρισμό και την παραγωγωποίηση των αναλυτών οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στη συνδυαστική τεχνική της αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική LC-MS για τον ποσοστικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της σε ανθρώπινο πλάσμα. Για την εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών με γραμμικό τετραπολικό αναλυτή, πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) σε συνδυασμό με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC-ESI/MS) [76].

2.2 Ιστορική αναδρομή

Τα πρώτα φασματόμετρα μαζών βασίστηκαν στη διαφορική εκτροπή, πρώτα πειράματα από τον Thompson, υπό την επίδραση στατικών ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Το 1946 ο W.G. Stephens περιέγραψε την ανάλυση ιόντων με μία νέα τεχνική η οποία μετρά το χρόνο πτήσης τους (Time Of Flight, TOF). Το 1952 ο γερμανός φυσικός Wolfgang Paul ανακαλύπτει τον τετραπολικό αναλυτή μαζών και την τετραπολική παγίδα ιόντων (ion-trap), στου αναλυτές αυτούς τα ιόντα διαχωρίζονται με τη χρήση ενός ταλαντούμενου ηλεκτρικού πεδίου [77,78]. Σε αυτά τα όργανα, αξιοποιείται το φαινόμενο του παραμετρικού συντονισμού των τροχιών των ιόντων σε ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο έτσι ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των ιόντων που έχουν διαφορετικό λόγο m/z . Το 1956 οι Golhke, Mclafferty, Willey και Harrigton συνδυάζουν επιτυχώς την αεριοχρωματογραφία με τη φασματομετρία μαζών, με αποτέλεσμα τον επιτυχή συνδυασμό της διαχωριστικής ικανότητας της χρωματογραφίας με την υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα που παρέχει το φασματόμετρο μαζών.

Ως αποτέλεσμα όλων αυτών των εξελίξεων η φασματομετρία μαζών ήταν εκείνη την εποχή μία από τις πιο ευαίσθητες αναλυτικές μεθόδους για την ταυτοποίηση των αναλυτών, δεν μπορούσε όμως να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεγαλομορίων. Ουσιαστικά, πριν από την ανακάλυψη της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό υπήρχαν διάφορες τεχνικές ιοντισμού, όπως η τεχνική του ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI), η τεχνική του χημικού ιοντισμού (CI) κ.ά. οι οποίες προκαλούσαν έντονη θραυσματοποίηση των αναλυτών. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες είναι πολικά, μη-πτητικά και θερμοευαίσθητα μόρια με αποτέλεσμα ο ιοντισμός τους με τις τεχνικές αυτές να καταστρέφει τη δομή τους. Η μόνη ήπια τεχνική ιοντισμού ήταν η τεχνική ιοντισμού με ταχέως κινούμενα σωματίδια (FAB) που όμως έδινε καλά αποτελέσματα μόνο σε μόρια με $M.B. < 1000$ Da. Ο μόνος τρόπος να αναλυθούν πρωτεϊνικά μόρια εκείνη την εποχή ήταν η επώαση τους με θρυψίνη η οποία διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρότερα ολιγοπεπτίδια και η ανάλυση με FAB-MS. Όλα αυτά τα προβλήματα ξεπεράστηκαν με την ανακάλυψη του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό από το Fenn το 1989 [79]. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι μία ήπια τεχνική ιοντισμού που λειτουργεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και προκαλεί το

σχηματισμό πολλαπλά φορτισμένων ιόντων στα μεγαλομόρια και έτσι ήταν εύκολο πλέον να ευρεθεί το μοριακό τους βάρος. Επιπλέον, η ανακάλυψη των τεχνικών ιοντισμού σε συνθήκες ατομσφαιρικής πίεσης έδωσε τη δυνατότητα συνδυασμού της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών [80,81]. Το 1970 οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών έγιναν ιδιαίτερα δημοφιλείς σε επιστημονικές αλλά και βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους, της μέτριας διακριτικής ικανότητάς τους, του μικρού τους μεγέθους, της σχετικά απλής κατασκευής τους, του χαμηλού τους βάρους, της γραμμικότητάς τους σε μαζική κλίμακα, της δυνατότητάς τους για υψηλής ταχύτητας ηλεκτρονική σάρωση [82]. Ακόμη κατέστη δυνατόν να συμπεριληφθούν αναλυτές μαζών και σε πειράματα στο διάστημα.

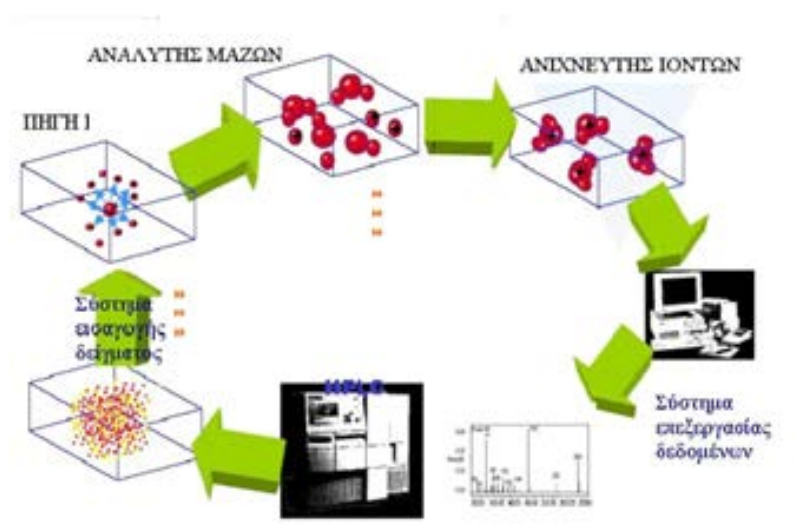
Στις μέρες μας οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών χρησιμοποιούνται ευρέως στην αναλυτική χημεία, στις βιομηχανίες πετροχημικών, σε φαρμακευτικές βιομηχανίες, σε περιβαλλοντικές μελέτες (ατμοσφαιρική ρύπανση) κ.α., ιδιαίτερα σε συνδυασμό με αεριοχρωματογραφία ή υγροχρωματογραφία.

2.3 Οργανολογία

Η φασματομετρία μαζών περιλαμβάνει την παραγωγή αέριων ιόντων, το διαχωρισμό τους σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) και την ανίχνευση τους [83, 84].

Κάθε φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής ακόλουθα βασικά τμήματα (σχήμα 2.1):

1. το σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. την πηγή ιοντισμού
3. τον αναλυτή μαζών
4. τον ανιχνευτή



Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός φασματομέτρου μαζών

Εκτός από τα τμήματα αυτά τα φασματοφωτόμετρα μαζών διαθέτουν και άλλες μονάδες απαραίτητες για την λειτουργία τους, όπως αντλίες παροχής υψηλού κενού και συστήματα παρουσίασης και καταγραφής των λαμβανόμενων φασμάτων όπως είναι οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές, εξοπλισμένοι με εξειδικευμένα λογισμικά προγράμματα, με τα οποία πραγματοποιείται τόσο ο έλεγχος της λειτουργίας του οργάνου, όσο και η καταγραφή, επεξεργασία και παρουσίαση των λαμβανόμενων αναλυτικών αποτελεσμάτων.

2.4 Πηγές ιοντισμού

Στη φασματοφωτομετρία μαζών χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών ιοντισμού [85]. Στις περισσότερες από αυτές τα ουδέτερα μόρια του αναλύτη διεγείρονται και με την αποβολή ενός ηλεκτρονίου μετατρέπονται στην κατιονική ρίζα $[M^+]$, ενώ σε άλλες τεχνικές ιοντισμού λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις ιόντων - μορίων που οδηγούν στο σχηματισμό ιόντων προσθήκης $[MH^+]$. Οι τεχνικές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες:

1. Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact Ionization, EI)
2. Χημικός ιοντισμός (Chemical Impact Ionization, CI)
3. Ιοντισμός με εκρόφηση (Desorption Ionization, DI)

4. Ιοντισμός με εκνέφωση (Nebulization Ionization)
5. Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API)

2.4.1 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

Κατά τον ιοντισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιείται απευθείας στην υγρή φάση έτσι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η ανάλυση θερμοευαίσθητων αναλυτών [86,87]. Ο σχηματισμός των ιόντων πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, γεγονός που καθιστά αυτές τις πηγές ιοντισμού αποτελεσματικότερες κατά 10^3 έως 10^4 φορές, σε σύγκριση με τις πηγές ιοντισμού στις οποίες ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) [88,89].

Οι σημαντικότερες τεχνικές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης είναι :

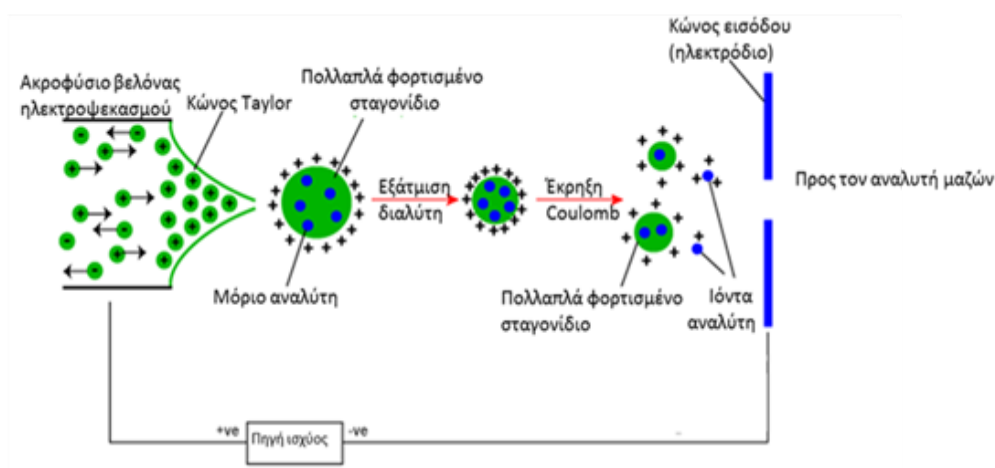
1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)
2. Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)
3. Ιοντισμός με δέσμη φωτονίων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) [90,91].

2.4.2 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία ένα υγρό, το οποίο ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων Volts, διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα εισάγεται στο σύστημα μέσω ενός γειωμένου τριχοειδούς σωλήνα, παράλληλα και εξωτερικά του οποίου βρίσκεται σωλήνας, μέσα στον οποίο διαδιβάζεται το αέριο εκνέφωσης (N_2) για τη δημιουργία σταγονιδίων στην άκρη του τριχοειδούς. Ανάμεσα στη βελόνα του ηλεκτροψεκασμού και το αντιηλεκτρόδιο (κώνος εισόδου) σε απόσταση 1-2 cm αναπτύσσεται τάση 2,5-5 kV. Από το ανοικτό άκρο της

βελόνας ηλεκτροψεκασμού το υγρό εκτίθεται σε ισχυρό ηλεκτροστατικό πεδίο, το οποίο οδηγεί στο διαχωρισμό και τη συσσώρευση των θετικών ή των αρνητικών ιόντων στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα.

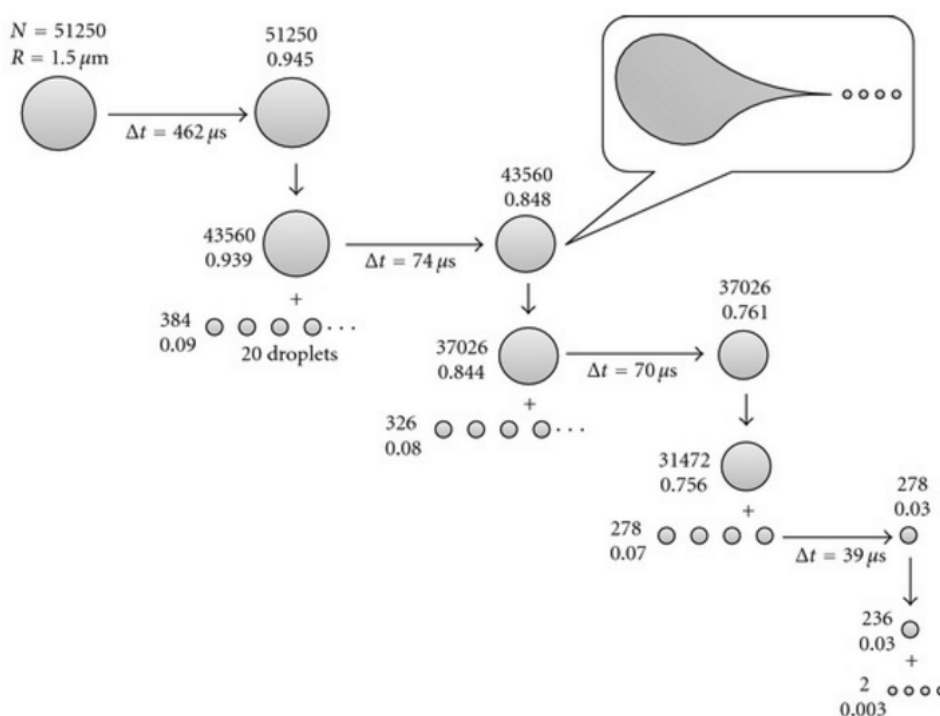
Σε περίπτωση που αναλύονται κατιόντα αναλύτη, εφαρμόζεται θετικό δυναμικό οπότε τα αρνητικά ιόντα αποφορτίζονται καθώς προσελκύονται από τη βελόνα ηλεκτροψεκασμού και με αυτό τον τρόπο ψεκάζονται μόνο τα θετικά ιόντα των αναλυτών.



Σχήμα 2.2: Σχηματισμός ιόντων με την τεχνική ESI

Τελικά το υγρό μέτωπο θα σχηματίσει στο άκρο της βελόνας ηλεκτροψεκασμού τον επονομαζόμενο κώνο του Taylor στον οποίο τα κατιόντα θα οδεύουν προς την επιφάνεια του κώνου (σχήμα 2.2). Όταν οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις ανάμεσα στα φορτισμένα ιόντα ξεπεράσουν την τάση επιφάνειας στο άκρο του κώνου του Taylor τότε απελευθερώνονται υγρά φορτισμένα μικροσταγονίδια, τα οποία εξαιτίας του φορτίου τους απομακρύνονται συνεχώς μεταξύ τους με απωστικές δυνάμεις Coulomb. Τα αρχικά μικροσταγονίδια μόλις σχηματιστούν, θα κατευθυνθούν προς το αντιηλεκτρόδιο και κατά τη διάρκεια της «πτήσης» τους, η διάμετρος τους θα μειώνεται σταδιακά με τη βοήθεια του ηλεκτρικού πεδίου, του αερίου αζώτου και της θέρμανσης. Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια συρρικνώνονται με τη θέρμανση, η ηλεκτρονιακή τους πυκνότητα αυξάνεται, λόγω της εξάτμισης του διαλύτη. Στο σημείο που οι ηλεκτροαπωστικές δυνάμεις υπερβούν την τάση επιφάνειας το αρχικό σταγονίδιο θα διαιρεθεί σε μικρότερα υποσταγονίδια. Το όριο αυτό ονομάζεται

όριο *Rayleigh*. Αρχικά είχε προταθεί πως στο σταγονίδιο παρατηρείται η λεγόμενη έκρηξη *Coulomb* και πως η διαδικασία αυτή θα συνεχιζόταν επ'άοριστον μέχρι το μέγεθος του παραγόμενου σταγονιδίου να είναι ικανό να παράγει αέρια ιόντα. Πρόσφατες μελέτες, υποστηρίζουν πως τα διαρκώς παραγόμενα μικροσταγονίδια δεν εκρύνονται, αλλά αποβάλλουν μια σειρά από μικρότερα σταγονίδια από ένα πεπλατυσμένο άκρο (σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Ιδεαλιστική απεικόνιση της συνεχούς δημιουργίας σταγονιδίων από μεγαλύτερα αρχικά. Στο σχήμα εμφανίζονται η διάμετρος και ο αριθμός των φορτίων στα σταγονίδια, όπως και η χρονική κλίμακα των γεγονότων

Οι παρατηρήσεις αυτές βασίζονται στην υπόθεση ότι τα σταγονίδια δεν είναι απόλυτα σφαιρικά και έτσι η ηλεκτρονική πυκνότητα στην επιφάνεια τους δεν είναι ομογενής, αλλά μεγαλύτερη στα σημεία με πιο αιχμηρή καμπή. Τα υποσταγονίδια κάθε φορά αποτελούνται από το 1-2% της αρχικής μάζας και μεταφέρουν 10-18% του αρχικού φορτίου. Η διαδικασία θυμίζει την αποβολή μικροσταγονιδίων από τον κώνο του *Taylor*, ενώ η συνολική πορεία από το αρχικό σταγονίδιο μέχρι το απομονωμένο αέριο ιόν δεν διαρκεί παραπάνω από 1ms.

Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για τη δημιουργία ιόντων στην αέρια φάση από τα μικροσταγονίδια από τις οποίες δύο είναι αυτές που κυριαρχούν:

- ✓ Θεωρία υπολειπόμενου φορτίου: (charge residue model, CRM): Καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται, αυξάνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην επιφάνειά τους. Οι απωστικές δυνάμεις Coulomb υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους σε ολοένα και μικρότερα σταγονίδια από τα οποία τελικά εκροφώνται τα ιόντα.
- ✓ Θεωρία εξάτμισης ιόντος (ion evaporation model, IEM). Σταδιακή, συνεχόμενη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων, με αποβολή συνεχώς μικρότερων σε μέγεθος σταγονιδίων από ένα πεπλατυσμένο άκρο [92].

Θεωρία υπολειπόμενου φορτίου (CRM): η θεωρία αυτή προτάθηκε από τον Dole⁹³ και υποστηρίζει ότι μετά από συνεχείς *εκρήξεις Coulomb* δημιουργούνται τα τελικά σταγονίδια τα οποία είναι τόσο μικρά, ώστε να περιέχουν ένα ή περισσότερα φορτία αλλά μόνο ένα μόριο του αναλύτη. Όταν εξατμιστούν και τα τελευταία μόρια του διαλύτη από το σταγονίδιο τότε το φορτίο μεταφέρεται στο μόριο του αναλύτη σε θέσεις που ευνοούν το σχηματισμό του σταθερότερου αερίου ιόντος. Ο Dole και οι συνεργάτες του κατέληξαν πως αν η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος είναι μικρή τότε τα τελικά σταγονίδια είναι δυνατό να περιέχουν ένα μόνο μόριο αναλύτη στο οποίο θα μεταφερθεί το «υπολοιπόμενο» φορτίο του σταγονιδίου καθώς θα εξατμίζονται και τα τελευταία μόρια του διαλύτη.

Θεωρία εξάτμισης ιόντος (IRM): περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Iribarne και Thomson [94 ,95]. Σύμφωνα με αυτή τα επιδιαλυτωμένα ιόντα μπορούν να απελευθερωθούν απ'ευθείας από το φορτισμένο σταγονίδιο όταν η ακτίνα του τελευταίου μειωθεί στο κατάλληλο μέγεθος [96]. Στο κρίσιμο σημείο πριν το όριο Rayleigh (π.χ. ακτίνα 10 nm) το ηλεκτρικό πεδίο στην επιφάνεια του σταγονιδίου είναι υψηλό και επιτρέπει τη μεταφορά στην αέρια φάση. Το IEM ανταποκρίνεται καλύτερα στην παρατήρηση πως ο αριθμός των φορτίων που μεταφέρονται τελικά στο ιόν εξαρτάται από το κλάσμα της επιφάνειας του

σταγονιδίου που καταλαμβάνει το μόριο του αναλύτη. Για το λόγο αυτό επίπεδα μόρια εμφανίζονται πολλαπλά φορτισμένα ενώ τα σφαιρικά συνήθως με ένα φορτίο.

Η αντιπαράθεση για την επικρατούσα θεωρία συνεχίζεται μέχρι σήμερα, όμως είναι δυνατό να γίνει η υπόθεση πως το CRM ανταποκρίνεται καλύτερα σε ογκώδη μόρια, ενώ η δημιουργία ιόντων από μικρότερα μόρια εξηγείται με το IRM [97,98]. Βασική προϋπόθεση και για τα δύο μοντέλα είναι οι αναλύτες να είναι ιοντισμένοι στο αρχικό διάλυμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι επιτυγχάνεται ικανοποιητική παραγωγή αερίων ιόντων ακόμη και όταν ο αναλύτης είναι αρχικά ουδέτερος [99]. Αυτό πραγματοποιείται με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων στην αέρια φάση. Με τον ιοντισμό ESI δεν παράγονται μόνο φορτισμένα ιόντα αναλυτών αλλά και ιόντα από διαλύτες και πρόσθετους ρυθμιστικούς παράγοντες. Αυτά τα ιόντα είναι ικανά να αντιδράσουν με τα μελετούμενα μόρια σε αέρια φάση και να τα ιοντίσουν. Η συνολική πορεία εξαρτάται άμεσα από την τιμή του παράγοντα συγγένειας πρωτονίου (PA) που εμφανίζει κάθε ουσία. Κατά το θετικό ιοντισμό αν η τιμή PA του αναλύτη είναι μεγαλύτερη της τιμής του διαλύτη, τότε θα υπάρξει μεταφορά πρωτονίων με αποτέλεσμα τον θετικό ιοντισμό του αναλύτη. Αντίστοιχα, κατά τον αρνητικό ιοντισμό ESI αν η τιμή PA του αποπρωτονιομένου διαλύτη είναι μεγαλύτερη από αυτή του αναλύτη, τότε ο αναλύτης στην αέρια φάση θα φορτιστεί αρνητικά. Γενικά ουδέτεροι αναλύτες με τιμές PA μεγαλύτερες από αυτή της αμμωνίας, μπορούν εύκολα να ιοντιστούν με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίου στην αέρια φάση. Πρέπει βέβαια να αναφερθεί ότι ουσίες με μεγάλη τιμή PA μπορούν να καταστείλουν τον ιοντισμό ουσιών με μικρό PA. Για αυτό το λόγο πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν κατά τον ιοντισμό ESI.

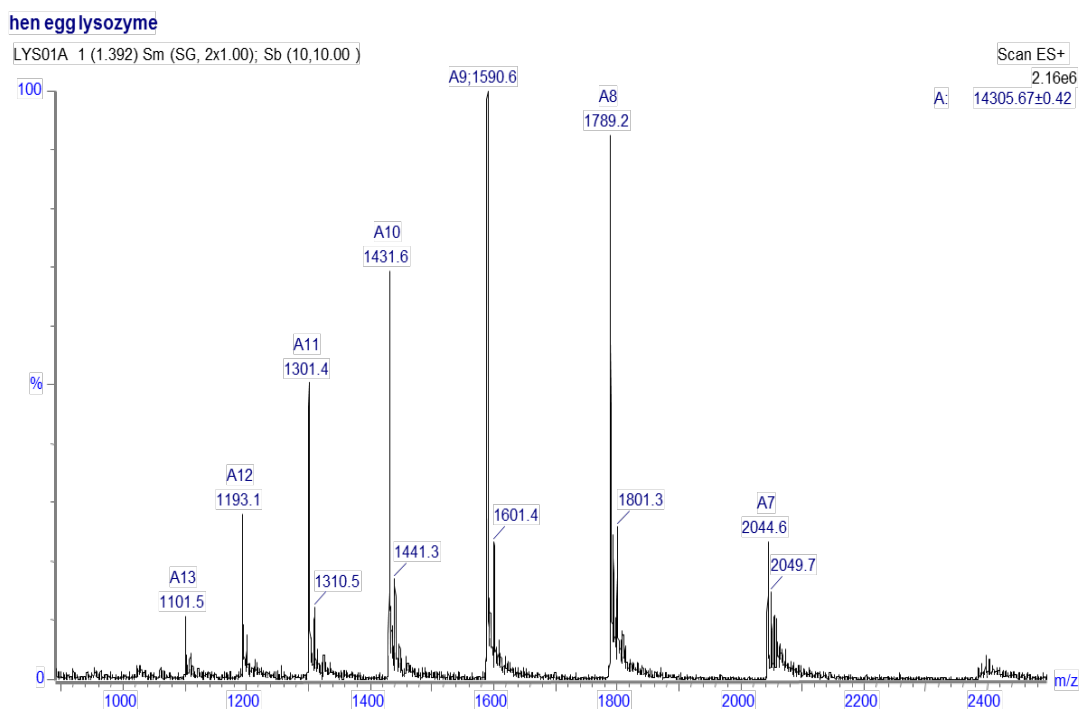
Ο ιοντισμός ESI προκαλεί το σχηματισμό μεμονωμένων φορτισμένων μικρών μορίων, όπως επίσης και το σχηματισμό πολλαπλά φορτισμένων ιόντων σε μεγαλομόρια. Στη δεύτερη περίπτωση το φάσμα μαζών αντιστοιχεί σε στατιστική κατανομή διαδοχικών κορυφών χαρακτηριστικών των πολλαπλά φορτισμένων μοριακών ιόντων που λαμβάνονται από πρωτονίωση $[M+zH]^{z+}$, χωρίς να συμμετέχουν διαστάσεις και θραυσματοποιήσεις. Λαμβάνοντας

πολλαπλά φορτισμένα ιόντα βελτιώνεται η ευαισθησία της τεχνικής και καθίσταται εφικτή η ανάλυση μορίων υψηλού μοριακού βάρους με αναλυτές μικρού εύρους μαζών, δεδομένου ότι το φασματομέτρο μετρά όχι τη μάζα (m), αλλά το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z).

2.4.2.1 Πλεονεκτήματα ιοντισμού ESI

Είναι σχετικά ήπια τεχνική ιοντισμού. Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς [100]. Συνδυάζεται εύκολα τόσο με την υγροχρωματογραφία, όσο και με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Ο ιοντισμός ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση πολικών μορίων μικρού μοριακού βάρους και μεγαλομορίων με ιοντισμένες ομάδες [101]. Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του μοριακού βάρους ενώσεων χωρίς περιορισμό στην τιμή και την ανάλυση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων (σχήμα 2.4) [102].



Σχήμα 2.4: Φάσμα μαζών (ESI-MS) διαλύματος λυσοζύμης αυγού σε ακετονιτρίλιο: υδατικό διάλυμα HCOOH 0.1% = 50:50, v/v

Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4 το φάσμα μαζών της λυσοζύμης αποτελείται από μια σειρά κορυφών που οφείλονται στην παρουσία πολλαπλά φορτισμένων ιόντων και ακολουθούν μια κανονική κατανομή κατά Gauss. Το μεγάλο εύρος των κορυφών οφείλεται στον ελλειπή διαχωρισμό των ισοτόπων που σχετίζονται με τα πολλαπλά φορτισμένα ιόντα. Η απόσταση μεταξύ των κορυφών είναι μικρότερη σε μικρότερες τιμές του λόγου m/z . Καθώς το μοριακό βάρος είναι το ίδιο για όλες τις κορυφές, οι κορυφές που αντιστοιχούν σε ιόντα με μεγαλύτερο φορτίο εμφανίζονται σε μικρότερες τιμές m/z σε σχέση με τις κορυφές που οφείλονται σε ιόντα με μικρότερο φορτίο.

Η σχέση που συνδέει το λόγο m/z με το μοριακό βάρος δίνεται από την εξίσωση:

$$m/z = (M.B. + nH^+)/n$$

όπου m/z είναι ο λόγος μάζας προς φορτίο, M.B. είναι το μοριακό βάρος, n είναι ο ακέραιος αριθμός των φορτίων στα ιόντα και H^+ είναι η μάζα του πρωτονίου (1008 Da). Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους είναι εύκολος αν γνωρίζουμε το φορτίο του ιόντος. Συνήθως, ο αριθμός των φορτίων δεν είναι γνωστός αλλά μπορεί εύκολα να υπολογισθεί σύμφωνα με την υπόθεση ότι δύο διαδοχικές κορυφές μιας σειράς πολλαπλά φορτισμένων ιόντων διαφέρουν κατά ένα φορτίο.

Σε περιπτώσεις που κατά τον ιοντισμό ESI η ανάλυση πραγματοποιείται παρουσία ιόντων Na^+ , NH_4^+ , K^+ , τότε εμφανίζονται τα αντίστοιχα ιόντα προσθήκης, οπότε στο φάσμα μαζών εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε τιμές m/z $[M+23]^+$, $[M+18]^+$ και $[M+19]^+$, αντίστοιχα.

Μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί η απαραίτητα χαμηλή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και η ασυμβατότητα της με κλασικές χρωματογραφικές στήλες και ταχύτητα ροής μεγαλύτερη από 0,5 mL/min.

Τροποποίηση της τεχνικής αυτής αποτελεί η τεχνική nanoESI, στην οποία η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι της τάξεως nL/min. Στην περίπτωση αυτή η βελόνα του ηλεκτροψεκασμού είναι πολύ μικρή και τοποθετείται πολύ κοντά στην οπή εισόδου στον αναλυτή μαζών. Πλεονεκτήματα της τεχνικής

αυτής είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης πολύ μικρών ποσοτήτων δείγματος και η εξαιρετικά αυξημένη ευαισθησία.

2.4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία της τεχνικής ESI

Η συνολική διαδικασία στον ιοντισμό ESI είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, με αποτέλεσμα τον ιοντισμό και κατ'επέκταση το σήμα στο φασματόμετρο μαζών να επηρεάζονται από πολυάριθμα χαρακτηριστικά των διαλυτών και των πρόσθετων ουσιών όπως η πτητικότητα, η επιφανειακή τάση, η αγωγιμότητα, η ιοντική ισχύς, η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη, το pH, το ιξώδες και αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων στην αέρια φάση. Η ευαισθησία επηρεάζεται επίσης από αστάθεια της ροής, συνυπάρχουσες ουσίες στο δείγμα, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη όπως το pK_a , η υδροφιλία, η επιφανειακή τάση και η συγγένεια πρωτονίου. Οι περιορισμοί κάνουν την απρόσκοπτη επιλογή των διαλυτών αδύνατη. Οι επιλογές πρέπει κάθε φορά να εξατομικεύονται ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης. Οι ιδανικές συνθήκες επιτυγχάνονται αν κατανοηθούν πλήρως οι επιδράσεις των παραπάνω παραγόντων στη διαδικασία ιοντισμού.

1. Επιλογή της κινητής φάσης στο σύστημα LC-ESI/MS

Η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και γίνεται με σκοπό την ενίσχυση του σήματος και την ταυτόχρονη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών σε περίπτωση συνδυασμού LC-MS. Επομένως η κινητή φάση σε αναλύσεις LC-ESI/MS αποτελεί συμβιβασμό μεταξύ της χρωματογραφικής απόδοσης και της ευαισθησίας του ιοντισμού ESI. Οι κατάλληλοι διαλύτες για το ESI ποικίλλουν από πολικούς σε μέτρια πολικούς με πιο δημοφιλείς το νερό, τη μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Στις συνήθεις αναλυτικές στήλες (C_8 ή C_{18}) οι αναλύτες εκλούονται με σειρά μειωμένης πολικότητας και χρησιμοποιούνται κινητές φάσεις που αποτελούνται από μίγματα νερού και οργανικού τροποποιητή με το % ποσοστό του νερού να είναι σε μεγαλύτερη αναλογία, γεγονός που μειώνει το σήμα. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο συνδυασμό υψηλής επιφανειακής τάσης, μικρής πτητικότητας και αυξημένης διαλυτοποίησης των ιόντων στο νερό. Κατά

συνέπεια κινητές φάσεις 100% υδατικές δεν προτιμώνται στην τεχνική LC-ESI/MS καθώς το νερό εξαιτίας της επιφανειακής τάσης σχηματίζει μεγαλύτερα αρχικά σταγονίδια. Η εξάτμιση του ύδατος από τα σταγονίδια συγκρινόμενη με τους πολύ πτητικούς οργανικούς διαλύτες είναι πιο αργή με αποτέλεσμα την ανεπαρκή μείωση του μεγέθους τους και την επακόλουθη μείωση των αερίων ιόντων που παράγονται. Ο επαρκής ψεκασμός διευκολύνεται με την αύξηση της τάσης του ηλεκτρικού πεδίου στο άκρο του τριχοειδούς, αλλά απαιτείται προσοχή καθώς σε πολύ μεγάλες τιμές παρατηρείται ηλεκτρική αποφόρτιση. Κάτι τέτοιο είναι καταστρεπτικό, καθώς οδηγεί σε ανεπαρκή παραγωγή ιόντων και μείωση της ευαισθησίας. Έχει αποδειχθεί ότι είναι δυσκολότερο να παραχθεί σταθερός ηλεκτροψεκασμός σε αρνητικό ιοντισμό από ότι σε θετικό, καθώς η ηλεκτρική αποφόρτιση παρατηρείται σε χαμηλότερες τιμές ηλεκτρικού πεδίου. Η χαμηλότερη τιμή τάσης στην οποία παρατηρείται αποφόρτιση, εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Η μεθανόλη και η ισοπροπανόλη εμφανίζουν καλύτερη ευαισθησία σε αρνητικό ιοντισμό από το ακετονιτρίλιο και την αιθανόλη. Ως οργανικοί τροποποιητές χρησιμοποιούνται συνήθως πρωτικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο σε κατάλληλη αναλογία με υπερκάθαρο νερό. Απρωτικοί διαλύτες όπως, διμεθυλοσουλφοξείδιο ή τετραϋδροφουράνιο σε νερό χρησιμοποιούνται σε μικρό ποσοστό και μόνο για να βελτιώσουν τη διαλυτότητα ορισμένων αναλυτών. Στις περισσότερες LC-ESI/MS εφαρμογές προτιμάται το ακετονιτρίλιο ως οργανικός τροποποιητής, καθώς προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και καλύτερο σχήμα χρωματογραφικών κορυφών. Συνήθως χρησιμοποιούνται κινητές φάσεις με το οργανικό κλάσμα σε υψηλότερο ποσοστό και έτσι μεγιστοποιείται η ευαισθησία της ανάλυσης. Στην κινητή φάση χρησιμοποιούνται απαραίτητα μόνο πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα ($\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$, $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$) με σκοπό τη βελτίωση του σήματος και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών.

Ταχύτητα ροής

Η ευαισθησία της μεθόδου βελτιώνεται με τη χρήση μικρών ταχυτήτων ροής ($\mu\text{L}/\text{min}$ ή/και nL/min) [103,104]. Μεγάλες ταχύτητες ροής (mL/min) αν και είναι εφικτές πρέπει να αποφεύγονται.

2. Ρύθμιση της τιμής του pH της κινητής φάσης

Η τιμή του pH της κινητής φάσης πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε ο αναλύτης να είναι ιοντισμένος. Όξινες κινητές φάσεις ($\text{pH} < \text{pK}_a - 2$) είναι κατάλληλες για τη ανάλυση βασικών αναλυτών, ενώ κινητές φάσεις σε αλκαλικές τιμές pH είναι κατάλληλες για την ανάλυση όξινων μορίων ($\text{pH} > \text{pK}_a + 2$). Είναι επίσης απαραίτητη η χρησιμοποίηση μικρών συγκεντρώσεων πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για τη ρύθμιση του pH της κινητής φάσης.

3. Καταστολή του σήματος (Ion suppression)

Προκαλείται καταστολή του σήματος στο φασματόμετρο μαζών όταν:

A) Το αναλυόμενο δείγμα περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων ή άλλων αναλυτών, που υπό τις παρούσες συνθήκες ιοντίζονται. Η καταστολή του σήματος προκαλείται λόγω ανταγωνισμού στον ιοντισμό.

B) Η κινητή φάση περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων.

Σε αυτή την περίπτωση τα ιόντα των ρυθμιστικών διαλυμάτων ανταγωνίζονται τα ιόντα του αναλύτη στη μετατροπή τους σε ιόντα αερίου φάσης με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόκριση του οργάνου για τον αναλύτη.

Ο ανταγωνισμός στον ιοντισμό ερμηνεύεται με βάση το γεγονός ότι οποιοδήποτε ιόν βρεθεί σε περίσσεια κατά τη διαδικασία σχηματισμού των φορτισμένων σταγονιδίων εμποδίζει άλλα ιόντα να φτάσουν στην επιφάνεια του σταγονιδίου και να εξατμιστούν (ανταγωνισμός επιφάνειας - Surface competition). Επιπλέον το ιόν που βρίσκεται σε περίσσεια δεσμεύει όλα τα διαθέσιμα φορτία και εμποδίζει τον ιοντισμό των μορίων του αναλύτη που βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση (ανταγωνισμός φορτίου - Charge competition).

Αντιθέτου φορτίου ιόντα που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία ζεύγους-ιόντων πρέπει να αποφεύγονται καθώς είναι επιφανειοδραστικές ουσίες που εμποδίζουν το σχηματισμό και την εξάτμιση των φορτισμένων μικροσταγονιδίων και προκαλούν μείωση του σήματος.

1. Υλικό μήτρας – διαδικασία προετοιμασίας δείγματος

Η απόκριση ενός αναλύτη εξαρτάται από τη σύνθεση του υλικού μήτρας στο οποίο βρίσκεται. Τα τελευταία χρόνια είναι πλέον επιτακτική η ανάγκη προσδιορισμού αναλυτών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε βιολογικά δείγματα. Τα βιολογικά δείγματα όπως αυτά των ούρων και του πλάσματος χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και πολυπλοκότητα. Πολυάριθμοι υδρόφιλοι μεταβολίτες, πρωτεΐνες (λευκωματίνες, ινωδογόνο, σφαιρίνες), ορμόνες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, θρεπτικές ουσίες περιέχονται σε τέτοια δείγματα και εν δυνάμει είναι πιθανό να επηρεάσουν δυσμενώς την ανάλυση. Απ'ευθείας ένεση των δειγμάτων αυτών στο φασματόμετρο μαζών επιφέρει μια σειρά από αποτρεπτικά μειονεκτήματα όπως είναι η σημαντική μείωση του χρόνου ζωής της στήλης, η μόλυνση της πηγής ιοντισμού και η μικρή πιστότητα και ακρίβεια σε ποσοτικοποιήσεις με όρια σε επίπεδο ng/mL και κάτω.

Για τους παραπάνω λόγους, η σωστή επιλογή της διαδικασίας προεργασίας του δείγματος από τα συνυπάρχοντα συστατικά είναι ιδιαίτερα σημαντική. Οι συνήθεις τεχνικές που επιλέγονται για το σκοπό αυτό είναι η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και η εκχύλιση στερεάς φάσης. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών επιτελείται με την προσθήκη οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη) στο δείγμα σε διάφορες αναλογίες και στη συνέχεια φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και ενίεται στο αναλυτικό σύστημα. Με τη συγκεκριμένη διαδικασία παρατηρείται σημαντική καταστολή του σήματος (ion suppression) στο φασματόμετρο μαζών. Στην πραγματικότητα το υπερκείμενο υγρό περιέχει ακόμη μεγάλες ποσότητες αλάτων (Na, K κτλ.), μικρά μόρια όπως πεπτίδια, αμινοξέα και νουκλεοτίδια, λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια. Έχουν δοκιμαστεί αρκετές παραλλαγές της τεχνικής για καλυτέρευση των αποτελεσμάτων με πιο σημαντική τη μεταβολή του ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Με αναλογία διαλύτη-δείγματος 1:1, v:v, νουκλεοτίδια, λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια παραμένουν στο υγρό. Η διαλυτότητα των ουσιών αυτών μπορεί να μειωθεί αυξάνοντας την αναλογία του οργανικού διαλύτη πχ. 5:1, v/v.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προεργασία βιολογικών δειγμάτων πριν την ανάλυση στο σύστημα LC/MS. Μετά την εφαρμογή του δείγματος στη μικροστήλη SPE ακολουθεί η έκπλυση της με κατάλληλο διαλύτη ώστε να απομακρυνθούν συνυπάρχοντα συστατικά.

Ο αποτελεσματικός καθαρισμός του δείγματος απαιτεί συνήθως την προσθήκη επιπλέον σταδίων όπως έκπλυση με αραιό υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος και δοκιμές που πρέπει να πραγματοποιηθούν, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση του και να μην επηρεαστεί σημαντικά το σήμα στο φασματόμετρο μαζών.

2.5 Αναλυτές μαζών

2.5.1 Γενικά

Τα ιόντα μετά το σχηματισμό τους στην πηγή ιοντισμού επιταχύνονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, ευθυγραμμίζονται και κατευθύνονται (με τη βοήθεια εξαπόλου, οκταπόλου ή συστήματος φακών) προς τον αναλυτή μαζών. Ο αναλυτής μαζών είναι το τμήμα του οργάνου στο οποίο τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

Συνεχείς Αναλυτές Μαζών: Το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση του αναλυτή, έτσι ώστε ιόντα με διαφορετική τιμή λόγου m/z να ανιχνεύονται κάθε χρονική στιγμή. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ο γραμμικός τετραπολικός αναλυτής και ο αναλυτής μαγνητικής εκτροπής.

Παλμικοί Αναλυτές Μαζών: Συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα μαζών από παλμό ιόντων. Εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης, ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού και η τετραπολική παγίδα ιόντων.

Οι κυριότεροι αναλυτές μαζών είναι:

- ✓ Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)
- ✓ Παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion-trap)
- ✓ Χρόνου πτήσης (Time Of Flight, TOF)
- ✓ Orbitrap [105]
- ✓ Αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR)
- ✓ Αναλυτής μαγνητικής εκτροπής (Ion magnetic resonance)

Από αυτούς οι τέσσερις πρώτοι χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική ανάλυση και σε ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς φαρμακομορίων μικρού μοριακού βάρους.

2.5.2 Χαρακτηριστικά Ποιότητας

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός αναλυτή μαζών είναι:

1. Η διακρισιμότητα, R , εκφράζει την ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διακρίνει δύο ιόντα με σχεδόν ίσες μάζες:

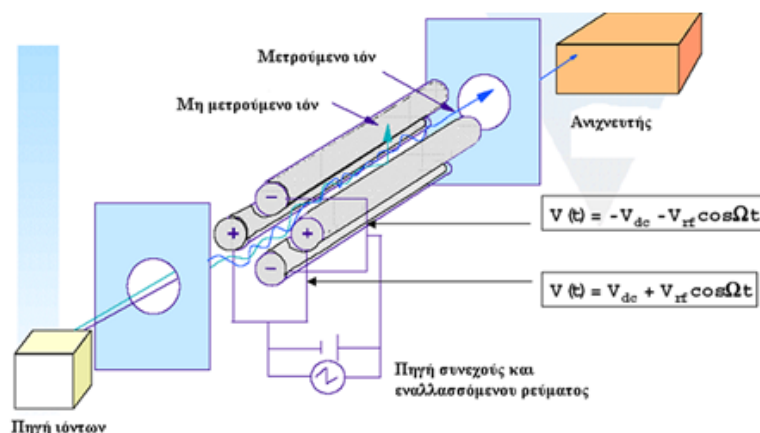
$$R = m/\Delta m$$

όπου m και $m+\Delta m$ αντιστοιχούν σε λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Για παράδειγμα διακρισιμότητα $R=1000$ σε μάζα 100 σημαίνει ότι ο αναλυτής μπορεί να διαχωρίσει τη μάζα 100,0 από τη μάζα 100,1. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται όταν ισοϋψείς περίπου κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 1/10 του ύψους των κορυφών. Στα φασματομέτρα υψηλής διακρισιμότητας (HRMS) η τιμή R είναι 10^4 - 10^5 , έτσι μπορούν να διαχωρίσουν με βάση της τιμές ακριβούς μάζας που μπορεί να διαφέρουν στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.

2. Το όριο μάζας αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή μαζών που μπορεί να μετρηθεί. Η τιμή μαζών εκφράζεται σε Daltons ή σε Thomson.
3. Η ταχύτητα σάρωσης, αναφέρεται στο ρυθμό με τον οποίο ένα φασματομέτρο σαρώνει ένα φάσμα μαζών. Εκφράζεται σε scan/sec και είναι ιδιαίτερα σημαντική σε χρωματογραφικές εφαρμογές όπου ολόκληρο το φάσμα μαζών σαρώνεται σε μικρό χρονικό διάστημα. Απαιτούνται τουλάχιστον 10 φάσματα μαζών για μια χρωματογραφική κορυφή.
4. Η απόδοση εκπομπής ισούται με το λόγο του αριθμού των ιόντων που φτάνουν στον ανιχνευτή προς τον αριθμό των ιόντων που παράγονται από την πηγή αποτελεί σημαντική εκτίμηση για την ευαισθησία του φασματομέτρου μαζών.

2.5.3 Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole Analyzer)

Ο τετραπολικός αναλυτής αποτελεί σήμερα τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αναλυτή μαζών (σχήμα 2.5). Διαχωρίζει τα παραγόμενα ιόντα ανάλογα με το λόγο m/z στηριζόμενος στη σταθερότητα της τροχιάς τους.

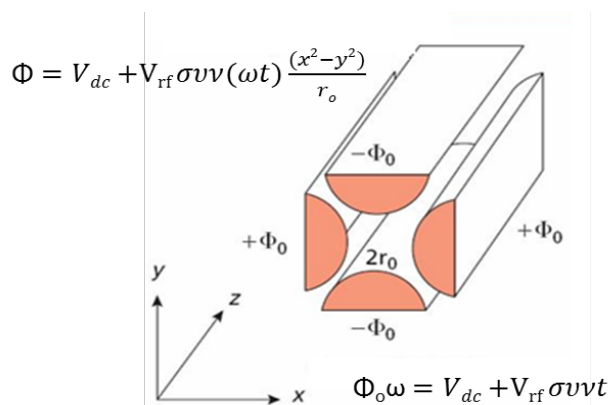


Σχήμα 2.5: Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους κυκλικής ή ιδανικά υπερβολικής, διατομής που είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη δέσμη των διερχόμενων ιόντων και συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους διαγωνίως. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσης που παρέχει μια συνεχή (V_{dc}) και μια εναλλασσόμενη (V_{rf} συνωτ) υψίσυχνη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων συνιστώσα.

Αρχή λειτουργίας:

Η αρχή λειτουργίας του τετραπολικού αναλυτή φαίνεται στο σχήμα 2.6 [106]



Σχήμα 2.6: Αρχή λειτουργίας τετραπολικού αναλυτή μαζών, Πηγή: LC-GC, Guide to LC-MS, December 2001.

Η σταθερότητα της τροχιάς των ιόντων προσδιορίζεται από τις τιμές των παραμέτρων A και Q ως εξής:

Η παράμετρος A εξαρτάται από τη συνεχή τάση, V_{dc} και δίνεται από τη σχέση:

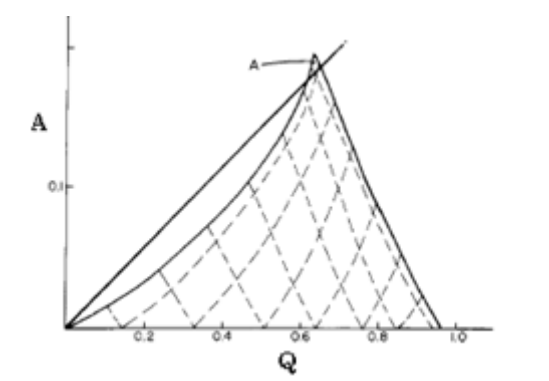
$$A = \frac{8zV_{dc}}{mr_o^2\omega^2}$$

Η παράμετρος Q εξαρτάται από το εναλλασσόμενο δυναμικό, V_{rf} και δίνεται από τη σχέση:

$$Q = \frac{4zV_{rf}}{mr_o^2\omega^2}$$

όπου r_o είναι η εσωτερική ακτίνα του τετραπολικού αναλυτή.

Το διάγραμμα της παραμέτρου A σε συνάρτηση με το Q ονομάζεται διάγραμμα σταθερότητας, καθώς δείχνει για ποιές τιμές των A και Q μπορούν να επιτευχθούν σταθερές τροχιές.



Σχήμα 2.7: Διάγραμμα σταθερότητας τετραπολικού αναλυτή για μια τιμή m/z

Η μεταβολή των τιμών m/z γίνεται μεταβάλλοντας τη συχνότητα του εναλλασσόμενου ρεύματος και διατηρώντας σταθερές τις τιμές των δυναμικών V_{dc} και V_{rf} , είτε διατηρώντας σταθερή τη συχνότητα και μεταβάλλοντας τις τιμές των δυναμικών V_{dc} και V_{rf} , με τέτοιο τρόπο ώστε ο λόγος V_{dc}/V_{rf} να παραμένει σταθερός. Ιόντα με άλλες τιμές m/z έχουν ασταθείς τροχιές και δεν μπορούν να περάσουν το φίλτρο μαζών, προσκρούουν στις ράβδους και χάνουν το φορτίο τους. Με τον τρόπο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ως φίλτρο μαζών.

Ο χρόνος ζωής ενός ιόντος από το σχηματισμό μέχρι την ανίχνευσή του είναι 50-100 μsec .

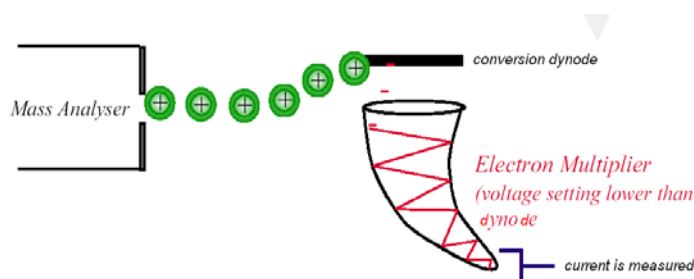
2.6 Ανιχνευτές Ιόντων

Το τελευταίο τμήμα ενός φασματομέτρου μαζών, μετά τον αναλυτή, είναι ο ανιχνευτής ιόντων. Ο ανιχνευτής παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού και του φορτίου των ιόντων που δέχεται στην είσοδό του ανά χρονική μονάδα.

Χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή ιόντων είναι η ταχύτητα, η δυναμική περιοχή, η ενίσχυση και η γεωμετρία του. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών που ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η φωτογραφική πλάκα και το φαρανταϊκό κύπελλο [107], που επιτρέπουν την άμεση μέτρηση των φορτίων που φτάνουν στον ανιχνευτή, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και ο φωτοπολλαπλασιαστής που αυξάνουν την ένταση του σήματος. Από τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής

2.6.1 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής

Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier), [108] βασίζεται στην αρχή του φαρανταϊκού κυπέλλου. Όμως, το φαρανταϊκό κύπελλο αποτελείται από μία δύνοδο, ενώ ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής είναι κατασκευασμένος από σειρά δυνόδων στις οποίες εφαρμόζονται αυξανόμενα δυναμικά.



Σχήμα 2.8: Απεικόνιση λειτουργίας ενός ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή

Συνήθως τα ιοντικά ρεύματα είναι πολύ μικρής εντάσεως και είναι αναγκαία η ενίσχυση του σήματος. Στο Σχήμα 2.8 παρουσιάζεται η τυπική διάταξη ενός ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή. Τα προς ανίχνευση ιόντα επιταχύνονται περαιτέρω σε μερικά keV και μετά προσκρούουν πάνω σε διόδους. Η δέσμη των ιόντων προσπίπτει αρχικά σε δύνοδο μετατροπής οπότε εκπέμπονται δευτερογενή ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά προσπίπτουν στην επόμενη δύνοδο προκαλώντας εκπομπή και άλλων ηλεκτρονίων κ.ο.κ., δημιουργώντας έναν «καταρράκτη» ηλεκτρονίων, που τελικά καταλήγει σε μετρήσιμο ρεύμα στο τέλος του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή.

Κεφάλαιο 3:

Υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)

3.1 Εισαγωγή

Η υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης αποτελεί μία σχετικά νέα τεχνική ανάλυσης και διαχωρισμού πολικών ουσιών οι οποίες εμφανίζουν μικρή ή και ελάχιστη κατακράτηση στις ευρύτερα διαδεδομένες στήλες αντιστρόφου φάσεως. Η HILIC ως αναλυτικό εργαλείο προσφέρει πολλές δυνατότητες στα χέρια των αναλυτών καθώς είναι εφικτό να αναλυθούν και να διαχωριστούν πολικά συστατικά χρησιμοποιώντας υδρόφιλες στατικές φάσεις, ενώ η κινητή φάση αποτελεί μίγμα νερού και οργανικού διαλύτη με το οργανικό κλάσμα να βρίσκεται σε υψηλότερο ποσοστό. Παρά το γεγονός ότι η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού, ωστόσο η ανάλυση πολικών και υδρόφιλων ενώσεων είναι δύσκολη και απαιτεί συχνά τη χρήση ειδικών στηλών (κατιονανταλλακτικές ή ανιονανταλλακτικές ρητίνες) ή την προσθήκη αντιδραστηρίων σχηματισμού ζευγών ιόντων. Ουσιαστικά η χρωματογραφία HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ των κυριότερων χρωματογραφικών μεθόδων, αλλά ταυτόχρονα συμπίπτει μερικώς με κάθε μία από αυτές.

Συνήθως οι κινητές φάσεις της χρωματογραφίας HILIC περιέχουν 40-97% ακετονιτρίλιο σε υδατικό διάλυμα ρυθμιστικού όπως μυρμηκικό αμμώνιο, οξικό αμμώνιο ή αντίστοιχα οξέα ή βάσεις. Μπορεί να συνδυαστεί με πληθώρα ανιχνευτών HPLC, αλλά όταν συνδυάζεται με φασματομέτρο μαζών (ESI/MS) ή ανιχνευτή σκεδασμού ακτινοβολίας βελτιώνεται εντυπωσιακά η ευαισθησία της μεθόδου.

3.2 Ιστορική αναδρομή

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση μίγματος ουσιών [109,110]. Η ιστορία της ξεκινά από πολύ παλιά όταν το 1906 ο Ρώσος βοτανολόγος Michael Tswett επιτυγχάνει το διαχωρισμό μίγματος

χλωροφυλλών σε στήλη CaCO_3 με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα και χρησιμοποιεί για πρώτη φορά τον όρο **χρωματογραφία** (σχήμα 3.1) [111].

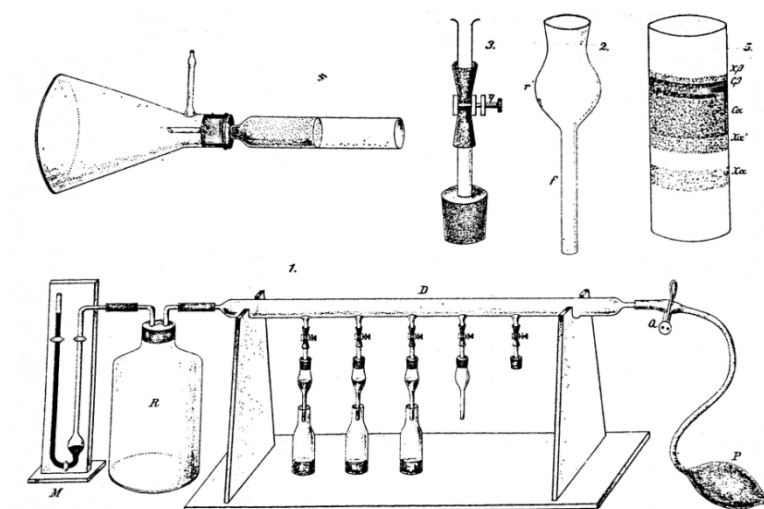


Figure 1. Chromatographic apparatus for use with pressure, 1-3; and suction, 4; with typical chromatogram, 5. For explanation, see the text.

Σχήμα 3.1: Διαγραμματική παρουσίαση του πρώτου χρωματογραφικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκε από τον Tswett. Πηγή: J. Chem. Education 44, 1967, 238-242

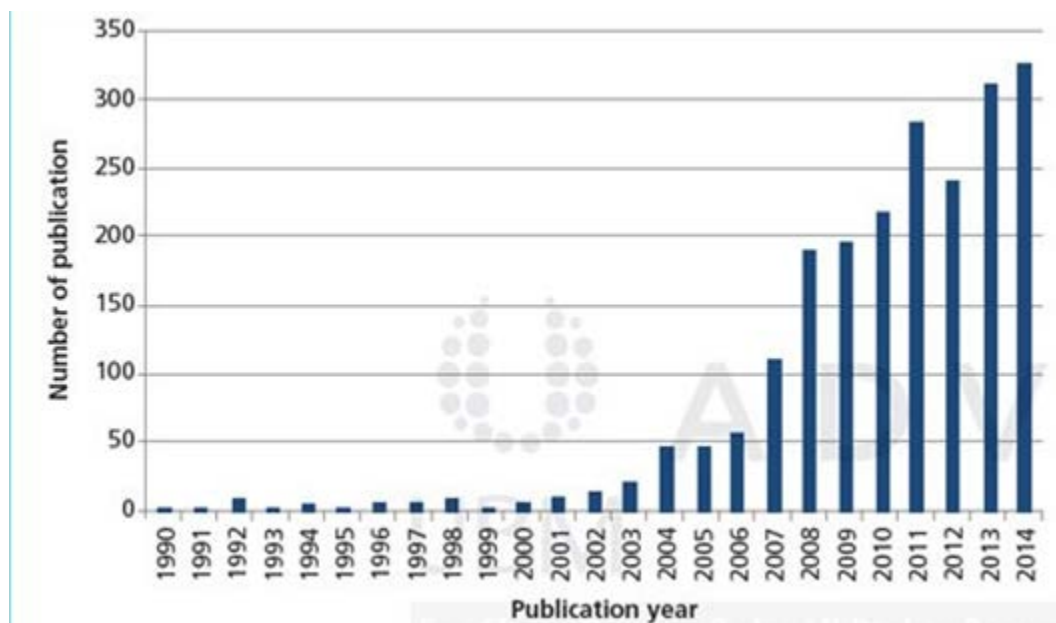
Η ταχύτητα, η απόδοση καθώς και το ευρύ φάσμα εφαρμογής της την καθιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυση. Από το 1937 μέχρι το 1972 έχουν απονεμηθεί συνολικά 12 βραβεία Νόμπελ στα οποία η τεχνική HPLC είχε κυρίαρχο ρόλο. Η εξέλιξη της τεχνικής HPLC στηρίχθηκε κυρίως στην ανάπτυξη πληρωτικών υλικών μεγάλης αποτελεσματικότητας.

Όπως και στα υπόλοιπα είδη χρωματογραφίας έτσι και στην περίπτωση της χρωματογραφίας HILIC χρειάστηκαν αρκετές δεκαετίες για την εξέλιξη της. Οι πρώτες εργασίες σε χρωματογραφία HILIC περιελάμβαναν τη χρήση *ιοντοανταλλακτικών αναλυτικών στηλών*. Το 1952 οι Samuelson και Sjöström περιέγραψαν το διαχωρισμό της φρουκτόζης, της γλυκόζης και της μαλτόζης σε αναλυτική στήλη Amberlite IRA-400 (ιοντοανταλλακτική ρητίνη) με χρωματογραφία βαθμιδωτής έκλουσης ξεκινώντας από 99,5% αιθανόλη και καταλήγοντας σε νερό. Η χρωματογραφία HILIC είχε επίσης χρησιμοποιηθεί από τον Rabel και τους συνεργάτες του για τον προσδιορισμό κοκαΐνης σε ορό αίματος με αναλυτική στήλη ιοντοανταλλακτική ρητίνη η οποία περιείχε στην επιφάνεια της ένα πλούσιο «ακίνητοποιημένο στρώμα» νερού. Το «ακίνητοποιημένο στρώμα» νερού περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον

Gregor και σύμφωνα με τους Rückert και Samuelson (1954) αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με την πρόσληψη μη ηλεκτρολυτών μέσω μιας ιοντοανταλλακτικής ρητίνης. Αργότερα οι Havlicek και Samuelson επιτυγχάνουν πολύ καλούς διαχωρισμούς ολιγοσακχαριτών με στατική φάση ιοντοανταλλακτικής ρητίνης τύπου γέλης.

Στα επόμενα βήματα της ανάπτυξης της χρωματογραφίας HILIC χρησιμοποιήθηκαν *χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις με βάση την πηκτή πυριτίας* και πολικούς υποκαταστάτες των οποίων η παραγωγή είχε αρχίσει από τη δεκαετία του '60. Ο σχηματισμός της υδατικής ψευδο-στιβάδας στην επιφάνεια αυτών των πολικών στατικών φάσεων η οποία είναι απαραίτητη για τη χρωματογραφία HILIC περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1960 από τους Wieland και Determan [112]. Ο Linden, το 1975, χρησιμοποίησε στατικές φάσεις με αμινομάδα σε χρωματογραφία HILIC για το διαχωρισμό σακχάρων και υδατανθράκων [113]. Οι παραπάνω πρώτοι διαχωρισμοί είχαν περιορισμένη δυνατότητα εφαρμογής καθώς η ανάλυση ήταν εφικτή μόνο με ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης λόγω της χρήσης ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Το ακρωνύμιο "HILIC" αποδόθηκε για πρώτη φορά από τον Alpert το 1990 ώστε να περιγράψει τη χρωματογραφική τεχνική στην οποία πρωτεΐνες και πεπτίδια αλληλεπιδρούν με την υδρόφιλη στατική φάση και εκλούνται συνήθως από ένα υδρόφοβο δυαδικό μίγμα διαλύτη που το νερό είναι το ισχυρό συστατικό του παραπάνω μίγματος. Παρά τις μελέτες στη χρωματογραφία HILIC μέχρι το τέλος της δεκαετίας του '90 η χρωματογραφία κανονικής φάσης ήταν η πρώτη επιλογή για αναλύσεις ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Χρειάστηκε να περάσουν 15 χρόνια ώστε ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικών με τη χρωματογραφία HILIC να αρχίσει να αυξάνεται εντυπωσιακά [114].

Τα αποτελέσματα αναζήτησης του SciFinder Scholar τεκμηριώνουν την συνεχώς αναπτυσσόμενη περιοχή της έρευνας HILIC, με βάση τον αριθμό των δημοσιεύσεων ανά έτος (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2: Ετήσιος αριθμός επιστημονικών εργασιών που χρησιμοποιούν τη HILIC ως μία από τις χρωματογραφικές τεχνικές για ανάλυση. (ISI Web of Science)

Το 2008 ξέσπασε το σκάνδαλο με το κινεζικό γάλα (γάλα και προϊόντα γάλακτος ήταν νοθευμένα με μελαμίνη) η HILIC ήταν ιδανική τεχνική χρωματογραφίας για την ανάλυση της μελαμίνης. Η μελαμίνη έχει ικανοποιητική συγκράτηση σε αναλυτικές στήλες HILIC και πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούν πλέον αυτή την τεχνική για τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων. Μετά από το 2008 ο αριθμός των δημοσιεύσεων για τη χρωματογραφία HILIC είναι περίπου 200 άρθρα το χρόνο, ενώ τα τελευταία 2 χρόνια δημοσιεύονται περίπου 300 δημοσιεύσεις το χρόνο βασισμένες σε χρωματογραφία HILIC.

3.3 Γιατί να επιλεγθεί η HILIC;

Η HILIC όπως και η χρωματογραφία κανονικής φάσης, χρησιμοποιεί πολικές στατικές φάσεις όμως σε αντίθεση με τη NP-LC η κινητή φάση στη HILIC είναι παρόμοια με αυτή της υδροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-LC). Επιτρέπει επίσης την ανάλυση ιοντισμένων αναλυτών, όπως και η ιοντική χρωματογραφία (IC).

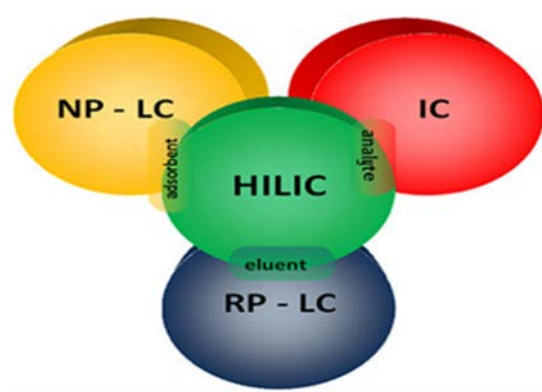
Στο σχήμα 3.3 φαίνεται ότι η HILIC συμπληρώνει διευρύνει το φάσμα των επιλογών στις τεχνικές χρωματογραφικού διαχωρισμού καθώς συνδυάζει τα χαρακτηριστικά των τριών μεγάλων μεθόδων υδροχρωματογραφίας και έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών τεχνικών, NP-LC και RP-LC. Είναι

κατάλληλη για την ανάλυση πολικών ενώσεων σε πολύπλοκα υποστρώματα που με υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης εκλούνται κοντά στο νεκρό χρόνο [115,116,117]. Πολικοί αναλύτες έχουν καλή διαλυτότητα στην υδατική κινητή φάση που χρησιμοποιείται στη HILIC, και έτσι υπερνικά τα μειονεκτήματα της μειωμένης διαλυτότητας που συχνά απαντώνται στην NP-LC.

Η επιλογή κινητών φάσεων στην HILIC, έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει το σήμα στο φασματόμετρο μαζών και αν γίνει αλλαγή από RP-LC σε HILIC η ευαισθησία ενισχύεται κατά 10-1000 φορές στην τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Το γεγονός αυτό εξηγείται αν αναλογιστεί κανείς πως το υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση εκτός από το να αυξάνει την επιδιαλύτωση των αναλυτών, προκαλεί μείωση της τάσης επιφάνειας, με αποτέλεσμα την ευκολότερη παραγωγή σταγονιδίων κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού και το βέλτιστο σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση. Στη HILIC δεν απαιτούνται ακριβά αντιδραστήρια όπως στην περίπτωση της υγροχρωματογραφίας ιοντικών ζευγών για την ανάλυση πολικών ενώσεων, έτσι είναι εύκολη η σύζευξη της HILIC με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών, ιδιαίτερα με χρήση της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (HILIC-ESI/MS). Ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης στη χρωματογραφία HILIC, σε αντίθεση με την RP-LC, ξεκινά με μεγάλο ποσοστό οργανικού διαλύτη χαμηλής πολικότητας και οι πολικοί αναλύτες εκλούνται με αύξηση του % ποσοστού της υδατικής φάσης (αύξηση της πολικότητας) [118].

Τα κύρια οφέλη της HILIC μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Συγκράτηση υδρόφιλων ενώσεων που είναι δύσκολο να συγκρατηθούν στην RPLC χωρίς τη χρήση ενός αντιδραστηρίου για το σχηματισμό ιοντικών ζευγών.



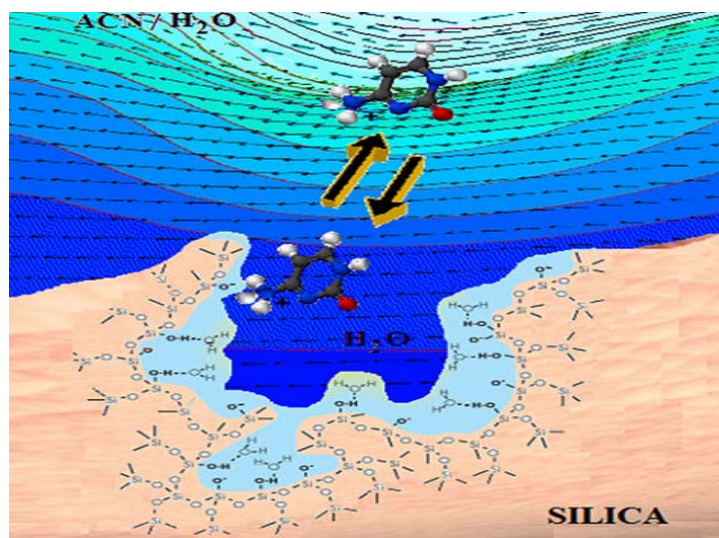
Σχήμα 3.3: Η χρωματογραφία HILIC συνδυάζει τα χαρακτηριστικά τριών από τις κυριότερες μεθόδους υγροχρωματογραφίας

- Οι κινητές φάσεις έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η ευαισθησία στο φασματοόμετρο μαζών.
- Χαμηλή πίεση στην αναλυτική στήλη, λόγω του χαμηλού ιξώδους των οργανικών κινητών φάσεων, κάτι που επιτρέπει τη χρήση υψηλών ρυθμών ροής για γρήγορη ανάλυση [119].
- Μειωμένο tailing κατά την υπερφόρτωση της στήλης [120]
- Συμβατότητα με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης SPE [121]

3.4 Μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC

Ο Alpert με τους συνεργάτες του σε ορισμένες από τις μελέτες που πραγματοποίησαν, προτείνουν ότι ο κυρίαρχος μηχανισμός συγκράτησης της HILIC είναι αυτός της κατανομής. Για να καταλήξουν σε αυτό το συμπέρασμα λήφθηκαν υπόψη μελέτες από άλλους ερευνητές βάσει των οποίων μελετήθηκε η συμπεριφορά διαφόρων υδατανθράκων και του ποσοστού του νερού στην κινητή φάση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ο Alpert είχε προτείνει ότι οι πολικές ομάδες των στατικών φάσεων HILIC ελκύουν μόρια νερού δημιουργώντας έτσι μία υδατική ψευδοστιβάδα στην επιφάνεια της στατικής φάσης που έρχεται σε άμεση επαφή με το μίγμα της κινητής φάσης, το οποίο περιέχει επίσης κάποιο ποσοστό νερού (σχήμα 3.4). Ο ίδιος, τελικά, κατέληξε ότι οι αναλύτες κατανέμονται σε δύο φάσεις λόγω της ύπαρξης και

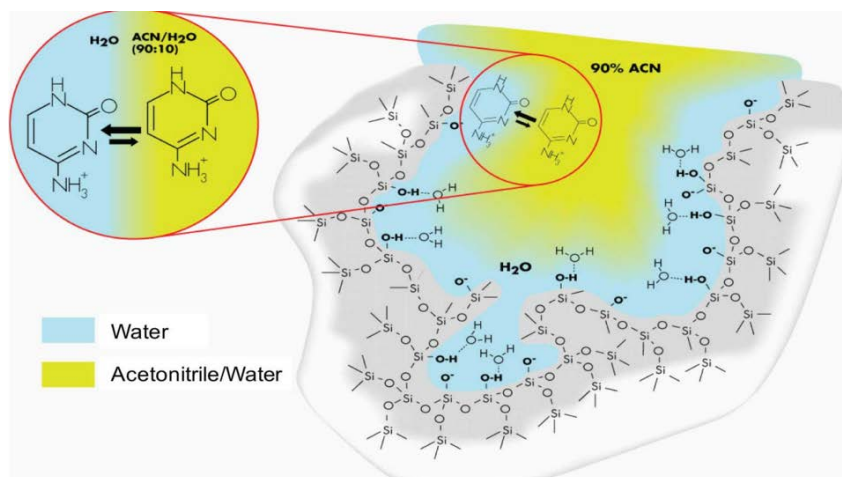
“κάποιων δυνάμεων διπόλου-διπόλου” υποδεικνύοντας παράλληλα ότι ο μηχανισμός χρωματογραφικού διαχωρισμού χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.



Σχήμα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση της υδατικής ψευδο-στιβάδας σε στατική φάση HILIC

Από τότε πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες που υιοθέτησαν τα συμπεράσματα του Alpert, χωρίς όμως να τα στοιχειοθετήσουν περισσότερο από αυτά που είχαν προταθεί [122]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες με στόχο τη διερεύνηση του μηχανισμού συγκράτησης στη HILIC χωρίς όμως να καταλήξουν σε κάποιο συγκεκριμένο μοντέλο μηχανισμού συγκράτησης.

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εξελίξεις, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι στη χρωματογραφία HILIC επικρατεί ένας μικτός μηχανισμός συγκράτησης, που περιλαμβάνει φαινόμενα κατανομής, προσρόφησης, ιοντικής και υδρόφοβης αλληλεπίδρασης κι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες (σχήμα 3.5) [123].



Σχήμα 3.5: Μηχανισμός συγκράτησης HILIC σε στήλες πηκτής πυριτίας

Η έκταση, με την οποία ο κάθε μηχανισμός ελέγχει τη συγκράτηση, εξαρτάται, τόσο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του πληρωτικού υλικού, όσο και από τη σύσταση της κινητής φάσης. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις τύπου διπόλου - διπόλου και οι ηλεκτροστατικές - ιοντικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται να συμβάλλουν στη συγκράτηση. Το μέγεθος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων διαμορφώνεται, ανάλογα με το βαθμό ιοντισμού των αναλυτών και των χημικών ομάδων του πληρωτικού υλικού, στην τιμή του pH της κινητής φάσης.

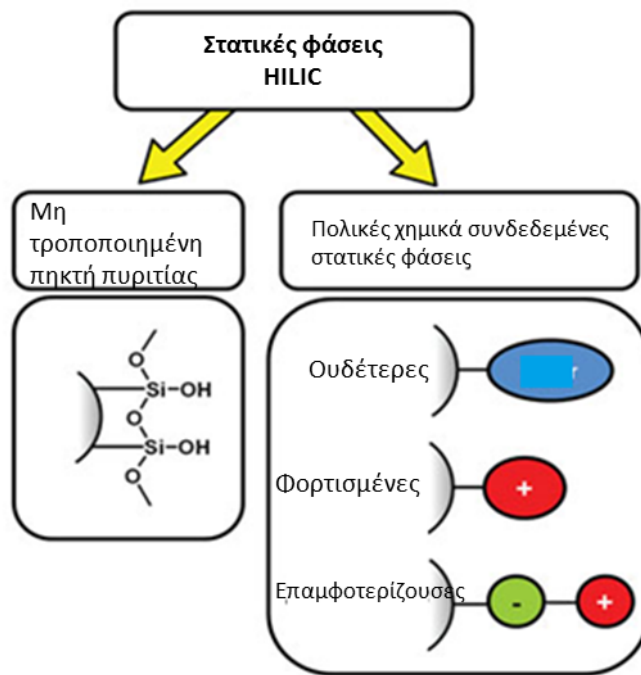
Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επιδιώκεται να περιορίζονται όσο το δυνατόν περισσότερο, καθώς αρκετές φορές εμποδίζουν την ικανοποιητική συγκράτηση στη στήλη HILIC., π.χ. κατά την ανάλυση όξινων ή αρνητικά φορτισμένων αναλυτών, οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες του πληρωτικού υλικού απωθούν τα μόρια αυτά από την επιφάνεια της στατικής φάσης. Αντίθετα, κατά την ανάλυση θετικά φορτισμένων αναλυτών, αυτοί θα συγκρατηθούν στη στήλη, αλλά είναι δυνατόν να μην εκλουστούν κανονικά. Για το λόγο αυτό, οι κατασκευαστές στηλών HILIC συνιστούν, πλέον, τη χρήση αλάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων στην κινητή φάση, ώστε να μειώνονται αυτού του είδους οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα μυρμηκικού αμμωνίου και οξικού αμμωνίου είναι τα περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενα, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, καθώς σε υψηλά επίπεδα επιδρούν αρνητικά στην ανίχνευση στο φασματομέτρο μαζών και στην ευαισθησία της μεθόδου.

3.5 Στατικές φάσεις χρωματογραφίας HILIC

Οι στατικές φάσεις HILIC είναι υδρόφιλες και φορτισμένες σε όλο το εύρος των τιμών pH της κινητής φάσης. Στη χρωματογραφία αυτού του είδους και σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, μέρος της κινητής φάσης δρα ως αναπόσπαστο κομμάτι της στατικής φάσης καθώς σχηματίζει μια υδατική ψευδο-στιβάδα που επικαλύπτει τη στατική φάση. Επομένως θεωρείται κρίσιμο η συγκέντρωση του νερού στην κινητή φάση να διατηρείται σε συγκεκριμένα όρια (περίπου 3-60%). Οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση και συνεπώς όσο πιο υδρόφιλος είναι ένας αναλύτης, τόσο ισχυρότερα κατακρατείται.

Οι στατικές φάσεις, ανάλογα με το φορτίο που φέρουν μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες (σχήμα 3.6):

- ✓ Ουδέτερες, όπως οι τύπου διόλης και αμιδίου, στις οποίες δεν αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τους αναλύτες, είναι ανεξάρτητες από την τιμή του pH της κινητής φάσης, αλλά παρουσιάζουν μικρή εκλεκτικότητα.
- ✓ Φορτισμένες, όπως η μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας και οι αμινοπροπυλο-φάσεις που παρουσιάζουν αυξημένη εκλεκτικότητα, ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις και εξάρτηση από την τιμή του pH της κινητής φάσης.
- ✓ Επαμφοτερίζουσες (τύπου αμφολύτη), π.χ. ZIC- HILIC και ZIC-pHILIC με υψηλή εκλεκτικότητα, ασθενείς ιοντικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές στο χρωματογραφικό διαχωρισμό και επηρεάζονται από τη φύση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται.



Σχήμα 3.6: Κατηγορίες στατικών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC

Σε αυτές τις κατηγορίες εντάσσονται και εκείνες που διαθέτουν και υποστρώματα υβριδικού τύπου, όπως η Xbridge® HILIC-BEH, η ZIC®-Philib και η ZIC®-cHILIC χαρακτηριστικό των οποίων είναι η αυξημένη ανθεκτικότητα τους σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH της κινητής φάσης.

3.5.1 Χαρακτηριστικές στατικές φάσεις σε χρωματογραφία HILIC

Μέχρι σήμερα έχει παρασκευαστεί σημαντικός αριθμός στατικών φάσεων χρωματογραφίας HILIC γεγονός που έχει συμβάλει στη σημαντική αύξηση των εφαρμογών της τεχνικής. Ορισμένες από αυτές τις στατικές φάσεις αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

Μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας

Είναι διαδεδομένη η χρήση στηλών με μη-τροποποιημένη πηκτή πυριτίας ως πληρωτικό υλικό σε χρωματογραφία τύπου HILIC. Στην περίπτωση αυτή υδατική φάση καλύπτει την επιφάνεια της πηκτής πυριτίας σχηματίζοντας μία υδατική ψευδο-στιβάδα που είναι απαραίτητη για τη χρωματογραφία HILIC. Παράλληλα, ανάλογα με την τιμή του pH της υδατικής στιβάδας της κινητής

φάσης, μεταβάλλεται ο βαθμός ιοντισμού των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης της στατικής φάσης καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πληρωτικού υλικού και αναλυτών. Η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια προσελκύει θετικά φορτισμένους αναλύτες αυξάνοντας την εκλεκτικότητα ενώ απωθεί τυχόν αρνητικά φορτισμένα πολικά μόρια. Στις περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή η αποφυγή αυτών των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι υποχρεωτική η προσθήκη ηλεκτρολυτών και η κατάλληλη ρύθμιση της τιμής του pH της κινητής φάσης ιδιαίτερα στις περιπτώσεις βασικών αναλυτών.

Πηκτή αμινοπροπυλο-πυριτίας

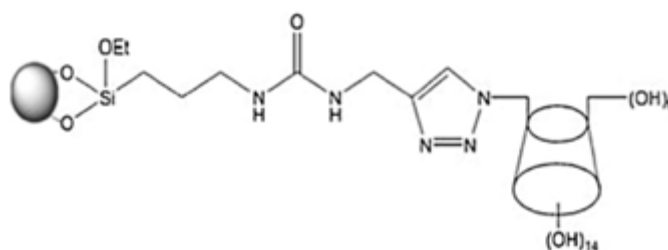
Αυτή η στατική φάση είναι μέτριας πολικότητας και εμφανίζει ομοιότητες με την πηκτή πυριτίας, καθώς το φορτίο της εξαρτάται από την τιμή του pH της υδατικής στιβάδας. Σε τιμές pH όπου η δραστική αμινοπροπυλο-ομάδα είναι θετικά φορτισμένη αναπτύσσονται ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ιοντισμένους αναλύτες οπότε και απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις ρυθμιστικών διαλυμάτων στην κινητή φάση για τη μείωση τους. Πλεονέκτημα αυτής της στατικής φάσης, έναντι της μη τροποποιημένης πηκτής πυριτίας, είναι η δυνατότητα περιστροφής της ομάδας προπυλαμίνης, γεγονός που αποτρέπει το σχηματισμό διπλών κορυφών. Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της στατικής φάσης αποτελεί η δραστηριότητα της αμινοπροπυλο-ομάδας που αρκετές φορές οδηγεί στη μη αναστρέψιμη προσρόφηση των αναλυτών.

Πηκτή πυριτίας με πολυηλεκτρίμιδιο και παραγωγά του

Η πηκτή πυριτίας συνδεδεμένη με πολυηλεκτρίμιδιο είναι ιδιαίτερα πολική στατική φάση από τις πλέον κατάλληλες για χρωματογραφία HILIC. Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικές με αναλύσεις πεπτιδίων, βασικών φαρμάκων, υδατανθρακών, ολιγοσακχαριτών και νουκλεϊνικών οξέων με χρωματογραφία HILIC με αυτό το πληρωτικό υλικό.

Πηκτή πυριτίας με ομάδες κυκλοδεξτρινών

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν στήλες κυκλοδεξτρινών στη χρωματογραφία HILIC με σκοπό να επιτευχθούν χειρόμορφοι διαχωρισμοί (σχήμα 3.7). Σε αυτά τα πληρωτικά υλικά η πηκτή πυριτίας χρησιμοποιείται ως βάση η οποία συνδέεται χημικά με κυκλοδεξτρίνες. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες από πέντε ή περισσότερα μόρια D-γλυκόζης, συνδεδεμένα μεταξύ τους με 1,4 γλυκοσιδικό δεσμό και έχουν τη μορφή κώλου με εκτεθειμένα δευτεροταγή υδροξύλια στο μεγάλο άνοιγμα και πρωτοταγή στο μικρό άνοιγμα της κοιλότητας. Οι πιο κοινές αποτελούνται από έξι, επτά και οκτώ μόρια γλυκόζης (α -, β -, γ -κυκλοδεξτρίνες).

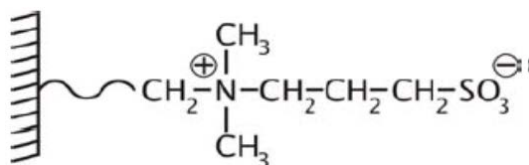


Σχήμα 3.7: Δομική αναπαράσταση πηκτής πυριτίας χημικά συνδεδεμένης με ομάδες β -κυκλοδεξτρίνης

Η κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβη και διευκολύνει το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού, ενώ τα εξωτερικά υδροξύλια είναι πολικά γεγονός που καθιστά τις στατικές φάσεις κυκλοδεξτρινών κατάλληλες για χρωματογραφία HILIC.

Πηκτή πυριτίας με ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης

Το πληρωτικό υλικό των στηλών ZIC®-HILIC και ZIC®-pHILIC είναι πηκτή πυριτίας επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης. Η λειτουργική ομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα (σχήμα 3.8). Πρακτικά, η ταυτόχρονη παρουσία δύο αντίθετα φορτισμένων ομάδων προσδίδει μηδενικό συνολικό φορτίο στη στήλη.

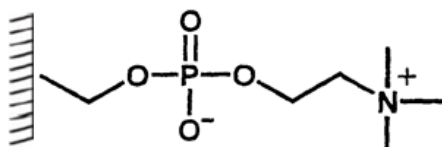


Σχήμα 3.8: Η λειτουργική ομάδα σουλφοβεταΐνης σε στήλες ZIC®-HILIC και ZIC®-pHILIC

Οι σουλφοαλκυλοβεταΐνικοί αμφολύτες διατηρούν την ιδιότητα τους να συγκρατούν ισχυρά το νερό, δημιουργώντας το επιθυμητό για τη HILIC υδατικό στρώμα. Το συγκεκριμένο υλικό διατίθεται εμπορικά από τη Merck SeQuant™ και είναι ανθεκτικό σε εύρος τιμών pH 3 έως 8 για τη στήλη ZIC®-HILIC. Στη στήλη ZIC®-pHILIC η πηκτή πυριτίας έχει αντικατασταθεί από πορώδη σωματίδια πολυμερούς με αποτέλεσμα να είναι ανθεκτική σε εύρος τιμών pH από 2 έως 10. Οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου είναι σχεδιασμένες για διαχωρισμό όξινων, βασικών αλλά και ουδέτερων μορίων.

Πηκτή πυριτίας με ομάδες φωσφορυλο-χολίνης

Το πληρωτικό υλικό των στηλών ZIC®-cHILIC είναι πηκτή πυριτίας επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες φωσφορυλο-χολίνης (σχήμα 3.9). Η λειτουργική ομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορυλομάδα.

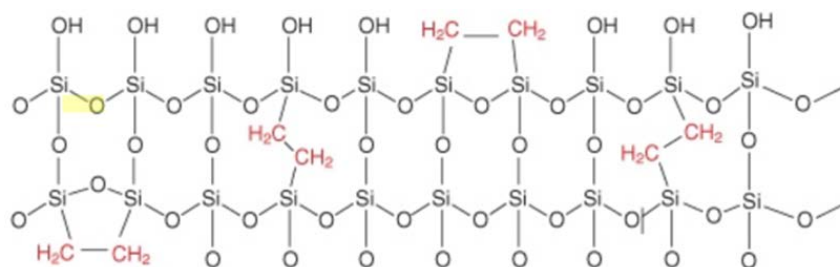


Σχήμα 3.9: Η λειτουργική ομάδα φωσφορυλο-χολίνης σε στήλες ZIC®-cHILIC

Όπως σε όλες τις περιπτώσεις των επαμφοτερίζουσων στατικών φάσεων ο διαχωρισμός των αναλυτών επιτυγχάνεται με μηχανισμό κατανομής σε συνδυασμό με ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Οι περισσότερες προσβάσιμες θετικές ομάδες του πληρωτικού υλικού ευνοούν την εκλεκτικότητα με τη μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Πηκτή πυριτίας με σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας (BEH)

Η στήλη BEH XBridge®-HILIC αποτελείται από σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας που φέρουν ομάδες bis-triethoxysilyl ethane (BEH-particles). Οι εσωτερικές γέφυρες αιθυλενίου που συνδέουν τα μονομερή bis (triethoxysilyl) ethane στα σωματίδια BEH, καθιστούν αυτό το πληρωτικό υλικό ανθεκτικό σε κινητές φάσεις με ακραίες τιμές pH, επιπλέον οι γέφυρες αιθυλενίου μειώνουν την οξύτητα των ομάδων σιλανόλης βελτιώνοντας την έκλυση βασικών αναλυτών (σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10: Σχηματικό διάγραμμα του πληρωτικού υλικού της στήλης BEH- XBridge®- HILIC

Ο χρωματογραφικός μηχανισμός συγκράτησης των στηλών BEH XBridge®-HILIC περιλαμβάνει φαινόμενα προσρόφησης, κατανομής και δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις ανάλογες με αυτές που λαμβάνουν χώρα σε στήλες πηκτής πυριτίας. Μεγαλύτερη συγκράτηση επιτυγχάνεται όταν στην κινητή φάση χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης (π.χ. ακετονιτρίλιο) σε ποσοστό μεγαλύτερο 80%. Εναλλακτικοί οργανικοί διαλύτες μπορούν, επίσης, να ενισχύσουν τη συγκράτηση και να μεταβάλλουν την επιλεκτικότητα, σε συνδυασμό με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης. Το pH της κινητής φάσης μπορεί, επίσης, να μεταβάλλει τη συγκράτηση, ανάλογα με το φορτίο των αναλυτών ή/και των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης. Αυτή η στατική φάση έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τις στήλες HILIC με βάση την πηκτή πυριτίας, ενώ έχει αυξημένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία.

3.5.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία HILIC

3.5.2.1 Οργανικοί τροποποιητές

Διάφοροι πολικοί, ευδιάλυτοι στο νερό οργανικοί διαλύτες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στη HILIC, ωστόσο το ακετονιτρίλιο αποτελεί μέχρι σήμερα την πρώτη επιλογή καθώς διαλύει τους περισσότερους αναλύτες και προσφέρει ικανοποιητική συγκράτηση. Η εκλουστική ισχύς των διαλυτών είναι γενικά αντίστροφη από την RP-HPLC και παριστάνεται ως εξής: ακετόνη < ακετονιτρίλιο < ισοπροπανόλη < αιθανόλη < μεθανόλη < νερό. Το ακετονιτρίλιο εμφανίζει μετά την ακετόνη τη μικρότερη εκλουστική ισχύ. Η μεθανόλη αποτελεί τη δεύτερη επιλογή ως οργανικός διαλύτης συνήθως όταν οι αναλύτες δεν διαλύονται καλά στο ακετονιτρίλιο.

Στην περίπτωση ισοκρατικής έκλουσης η συνηθισμένη αναλογία διαλυτών αποτελείται από 40 - 97% οργανικού τροποποιητή σε νερό ή σε ρυθμιστικό διάλυμα. Για την εξαγωγή επαναλήψιμων αποτελεσμάτων απαιτείται το ποσοστό ύδατος να διατηρείται τουλάχιστον στο 3% της σύνθεσης του μίγματος για να υπάρχει επαρκής ενυδάτωση των μορίων της στατικής φάσης. Σε αντίθεση με την RP-HPLC, όσο υψηλότερο είναι το κλάσμα του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση τόσο περισσότερο αυξάνεται η συγκράτηση των αναλυτών. Σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα, καθώς η HILIC απαιτεί μεγαλύτερα διαστήματα εξισορρόπησης της στήλης στις διαφορετικές συνθέσεις της κινητής φάσης σε σχέση με την RP-HPLC. Αυτό συμβαίνει γιατί το υδατικό στρώμα προέρχεται από την κινητή φάση με αποτέλεσμα να εξαρτάται άμεσα από τη σύσταση της. Για τον ίδιο λόγο δεν πρέπει να γίνεται απότομη αλλαγή από 100% οργανική σε 100% υδατική κινητή φάση.

3.5.2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

Για τους περισσότερους αναλύτες ιοντικής ισχύς ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300mM ανάλογα με την διαλυτότητα των αλάτων στην κινητή φάση. Η ιοντικής ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, ώστε να μην παρεμποδίζει τη διαδικασία της ανίχνευσης. Οι αρνητικά ή θετικά φορτισμένες

στατικές φάσεις τυπικά απαιτούν μεγαλύτερη ιοντική ισχύς ρυθμιστικού διαλύματος από τις ουδέτερες ενώσεις ή τους αμφολύτες.

3.5.2.3 Επίδραση της τιμής του pH της κινητής φάσης

Η επιλογή της τιμής του pH της κινητής φάσης είναι ιδιαίτερα σημαντική και εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη και από τις ιδιότητες της στατικής φάσης. Στις περιπτώσεις που ο αναλύτης είναι αδιάστατος σε μια ορισμένη τιμή pH της κινητής φάσης, η κατακράτηση του από τη στήλη μπορεί να αυξηθεί με αλλαγή της τιμής του pH της κινητής φάσης ώστε να μετατραπεί στην ιοντισμένη του μορφή. Το κατάλληλο εύρος των τιμών του pH της κινητής φάσης στις στήλες HILIC με βάση την πηκτή πυριτίας είναι 3 έως 7,5 ενώ στις στήλες HILIC με πολυμερικό πληρωτικό υλικό το εύρος των τιμών του pH της κινητής φάσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 2 έως 10.

3.6 Εφαρμογές

Η χρωματογραφία HILIC βρίσκει σήμερα ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση διαφόρων πολικών αναλυτών, που παρουσιάζουν ιδιαίτερη ετερογένεια ως προς τη δομή τους¹²⁴. Μέχρι στιγμής έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμα επιστημονικά άρθρα που αφορούν σε μεγάλου εύρους αναλύσεις από μικρά πολικά μόρια μέχρι ογκώδη οργανικά πολυμερή και βιολογικά μεγαλομόρια. Μετά το 2005 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των εφαρμογών HILIC, με σκοπό να καλύψει το κενό ανάμεσα στη χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης. Θεωρείται ιδανική για τον προσδιορισμό μικρών, βασικών μορίων όπως τα φαρμακευτικά μόρια, γι' αυτό και έτυχε μεγάλης ανταπόκριση στην φαρμακευτική επιστήμη. Κατέχει σημαντική θέση στον τομέα ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών, όπου οι πιθανές ενώσεις αναλύονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε βιοαναλυτικές εφαρμογές.

Πολλές από τις νέες θεραπευτικές ενώσεις αποτελούν μόρια υψηλής πολικότητας και η RP-LC αν και χρησιμοποιείται επιτυχώς σε βιολογικούς προσδιορισμούς, δεν μπορεί να ανταπεξέλθει. Ανάμεσα στις διάφορες εφαρμογές είναι και ο προσδιορισμός φολικών σε ανθρώπινο πλάσμα. Δοκιμάστηκαν διάφοροι τύποι στηλών, ανάμεσά τους και αντιστρόφου φάσεως, με πιο κατάλληλη τελικά την πολυ(2-υδροξυαιθυλασπαρταμιδο) πηκτή πυριτίας

[125]. Επίσης η HILIC σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών (MS/MS) με μη τροποποιημένη σίλικα εφαρμόστηκε για την ανάλυση ομεπραζόλης και 5-OH ομεπραζόλης σε πλάσμα [126], αλλά και της ακυκλοβίρης σε πλάσμα, αμνιακό υγρό και πλακούντα [127]. Επιπρόσθετα έχουν αναλυθεί με HILIC το ισονιαζίδιο που δεν κατακρατείται εύκολα σε συνθήκες RP-LC, αλλά και το νικοτινικό οξύ με τους μεταβολίτες του [128].

Μια άλλη κατηγορία φαρμακευτικών μορίων με μεγάλη υδροφιλία είναι τα αντιβιοτικά [129]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της HILIC είναι ο προσδιορισμός τριών τετρακυκλινών [130] σε προπυλαμινο-πηκτή πυριτίας και μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας. Η τελευταία κρίθηκε ακατάλληλη λόγω της “ουράς” (tailing) που παρατηρήθηκε στις χρωματογραφικές κορυφές. Το γεγονός αποδόθηκε στις ισχυρές σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις με το τεταρτοταγές άζωτο των τετρακυκλινών. Η ZIC-HILIC σε συνδυασμό με ESI-MS χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση αμινογλυκοσιδικών αντιβιοτικών παρόμοιας δομής (drug monitoring) σε ανθρώπινο πλάσμα [131]. Τα επίσης αρκετά υδρόφιλα αντικαρκινικά φάρμακα θεωρούνται κατάλληλα για την HILIC. Ο προσδιορισμός του αντιμεταβολίτη φθοροουρακίλη [132] και του χημειοθεραπευτικού παράγοντα επιρουβικίνη [133] αποτελούν δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα. Η τεχνική εφαρμόστηκε και σε αναλύσεις ναρκωτικών ουσιών, για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κοκαΐνης και των μεταβολιτών της σε βιολογικά υγρά και ιστό [134]. Στην περίπτωση αυτή μετά το στάδιο της υγρό-υγρό εκχύλισης ακολούθησε διαχωρισμός σε απλή πηκτή πυριτίας και βαθμιδωτή έκλουση με ακετονιτρίλιο (80-56%) σε οξικό αμμώνιο 2mM. Χαρακτηριστικές είναι επίσης οι εφαρμογές της HILIC σε αναλύσεις για τον έλεγχο ντόπινγκ σε συνδυασμό με LC-TOF/MS [135]. Έχει επίσης εφαρμοστεί σε αναλύσεις αντιυπερτασικών φαρμάκων σε ανθρώπινο πλάσμα [136,137] και στην ανάλυση της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της σε πλάσμα με στήλη Xbridge HILIC BEH με την τεχνική LC-ESI/MS και του φαρμάκου deferasirox σε αναλύσεις δειγμάτων πλάσματος ασθενών που πάσχουν από θαλασσαιμία [138].

Τα τελευταία χρόνια εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν εφαρμογές της χρωματογραφίας HILIC σε αναλύσεις προσμίξεων φαρμακευτικών ενώσεων, διότι δίνουν τη δυνατότητα χρωματογραφικού διαχωρισμού ενώσεων με

παραπλήσια χημική δομή με ισοκρατική έκλυση και χαμηλά όρια αποσοτικοποίησης ειδικά αν συνδυαστεί με την τεχνολογία UPLC [139].

Πολύ ενδιαφέρουσες αποδεικνύονται και οι εφαρμογές της HILIC για την ανάλυση πόσιμου[140] και απόβλητου νερού[141]. Στην πρώτη περίπτωση αναλύθηκε το διχλωροοξικό οξύ σε δείγματα πόσιμου νερού με στήλη προπυλαμινοσίλικας και κινητή φάση ακετονιτριλίου/40mM μυρμηκικού αμμωνίου 60:40. Η στατική φάση επιλέχθηκε καθώς μετά από πολλές δοκιμές σε διαφορετικές στήλες αντιστρόφου φάσεως οι κορυφές εμφανίζονταν συνεχώς μετακινούμενες και χωρίς σταθερό σχήμα. Στη δεύτερη περίπτωση οι ερευνητές ποσοτικοποίησαν κυτταροστατικά και μεταβολίτες τους στον οργανισμό με HILIC/MS-MS σε συνδυασμό με εκχύλιση στερεάς φάσης. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως μηχανισμοί κατανομής και προσρόφησης εμπλέκονται στη συγκράτηση των αναλυτών και πως η προσφορά του καθενός διαφέρει ανάλογα με το ποσοστό νερού στην κινητή φάση από 1,6 μέχρι 40%. Η προσρόφηση των ουσιών από τη στήλη γίνεται πιο έντονη καθώς το % ποσοστό του νερού πέφτει κάτω από 16%.

Χημικά τροποποιημένη πηκτή πυριτίας με αμίδιο επιλέχθηκε για τον διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού τοξινών από κυανοβακτήρια συμπεριλαμβανομένων και αναλόγων της σαξιτοξίνης και α-ανατοξίνης σε δείγματα από φύκια [142]. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών, ενώ τα δείγματα εισαγάγονταν στο όργανο χωρίς προκατεργασία. Στον τομέα ανάλυσης και διαχωρισμού συνθετικών πολυμερών και ολογομερών μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνταν τεχνικές όπως η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Σε αυτές προστίθεται πλέον και η HILIC μετά τον διαχωρισμό πολυμερών βινυλοπυρρολιδινόνης μοριακού βάρους μέχρι 360 kDa. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα σίλικα με διολομάδες και βαθμιδωτή έκλυση 0-50% νερού σε ακετόνη.

Όσον αφορά στον διαχωρισμό υδατανθράκων η διαδικασία είναι ιδιαίτερα επίπονη καθώς χαρακτηρίζονται από ιδιότητες που δυσκολεύουν την επιλογή της τεχνικής. Ως παράδειγμα αναφέρεται η έλλειψη θερμικής σταθερότητας απαραίτητη στην αεριοχρωματογραφία και η μεγάλη πολικότητα εξαιτίας των υδροξυλίων και των άλλων πολικών ομάδων που οδηγεί σε μειωμένη κατακράτηση στην RPLC. Γι'αυτούς τους λόγους η HILIC χρησιμοποιήθηκε πολύ

νωρίς σε ευρύ πεδίο ανάλυσης των ενώσεων αυτών όπως κατα τον διαχωρισμό υδατανθράκων σε φαγητά και αναψυκτικά, γλυκοαλκαλοειδή και των προϊόντων υδρόλυσης τους σε φυτά της οικογένειας Solanaceae, γλυκοαμινογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες.

Μέχρι στιγμής δεν έχει δημοσιευθεί μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών που αφορούν στο διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση τη HILIC, κυρίως εξαιτίας θεμάτων διαλυτότητας αλλά και επειδή οι πρωτεΐνες αναλύονται ικανοποιητικά με τις υπάρχουσες τεχνικές χωρίς την ανάγκη χρησιμοποίησης μιγμάτων οργανικών διαλυτών. Ο τομέας των ιστονών είναι ο μόνος στον οποίο η HILIC εφαρμόζεται εντατικά. Οι ιστόνες συμβάλλουν στη σύνθεση της κυτταρικής χρωματίνης, χρησιμεύοντας ως πυρήνας γύρω από τον οποίο τυλίγεται το DNA.¹⁴³

Η HILIC έχει πλέον αναγνωριστεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο στον απαιτητικό τομέα της μεταβολομικής. Σκοπός του κλάδου αυτού είναι η απρόσκοπτη ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος. Οι μεταβολίτες, όντας τις περισσότερες φορές ενώσεις υψηλής πολικότητας, αναλύονται ικανοποιητικά σε συνθήκες HILIC. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο προσδιορισμός ολιγοσακχαριτών και σακχαριδικών νουκλεοτιδίων σε φυτά με HILIC-ESI-MS [144].

Κεφάλαιο 4:

Μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικών ενώσεων

4.1 Τι είναι η ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας

Σύμφωνα με τον τυπικό ορισμό της έννοιας, μία ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας είναι ένας αριθμός ποσοτικών αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στη χαρακτηριστική δομή, τις χημικές ή βιολογικές ιδιότητες κάθε δραστικού συστατικού του φαρμακευτικού προϊόντος και οι οποίες διακρίνουν κάθε ενεργό συστατικό από τα προϊόντα αποικοδόμησης έτσι ώστε κάθε δραστικό συστατικό να μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια. Επομένως, μία ενδεικτική μέθοδος σταθερότητας είναι μία αναλυτική διαδικασία η οποία είναι ικανή να διακρίνει μεταξύ του κύριου δραστικού φαρμακευτικού συστατικού από κάθε προϊόν διάσπασης (αποικοδόμησης) που σχηματίζεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης κατά την διάρκεια της αξιολόγησης της μεθόδου σταθερότητας. Επιπλέον, η μέθοδος πρέπει να είναι ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί ένα ή περισσότερα από τα προϊόντα διάσπασης και να είναι ικανή να διαχωρίζει κάθε άλλη πιθανή κορυφή όπως είναι εκείνη του εσωτερικού προτύπου.

Με τα παραπάνω κριτήρια, η ‘διαγνωστική’ φύση της μεθόδου υποδεικνύει ότι η μέθοδος πρέπει να είναι ειδική για μελέτες σταθερότητας (stability-specific). Ακραίοι έλεγχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιτάχυνση της διαδικασίας αποσύνθεσης και την παραγωγή των προϊόντων διάσπασης της δραστικής ουσίας. Ωστόσο, στους ακραίους έλεγχους διάσπασης οι οποίοι πραγματοποιούνται σε έντονες συνθήκες οξείδωσης, φωτόλυσης ή υδρόλυσης σε ακραίες τιμές pH μπορεί να σχηματιστούν κάποια προϊόντα διάσπασης τα οποία είναι απίθανο να σχηματιστούν σε συνθήκες επιταχυνόμενες ή σε μακράς διάρκειας μελέτες σταθερότητας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των φαρμακευτικών προϊόντων. Τα παραγόμενα προϊόντα διάσπασης είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη και την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποιοτικό έλεγχο η οποία να είναι ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας (stability-indicating) διευρύνοντας έτσι τη χρησιμότητα της αναλυτικής μεθόδου.

Μια μέθοδο ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας πρέπει να είναι σύμφωνη με την επιδιωκόμενη εφαρμογή της, επομένως πρέπει να επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική ώστε να προσδιορίζει τις απαιτήσεις των δραστικών ουσιών που σχετίζονται με τη μελέτη σταθερότητας. Προφανώς, η σκοπούμενη εφαρμογή της ενδεικτικής μεθόδου σταθερότητας αφορά την παρακολούθηση της σταθερότητας μιας συγκεκριμένης ουσίας- σε τελικό προϊόν- και απαιτεί αξιολόγηση της μεθόδου. Ωστόσο, όταν τίθεται θέμα αναμονής χρόνου, όπως συμβαίνει κατά την διάρκεια της διαλυτοποίησης ή κατά τη διαδικασία της παραγωγής, προτείνεται να αξιολογείται η μέθοδος ως προς τα χαρακτηριστικά της μεθόδου σταθερότητας πριν την σκοπούμενη εφαρμογή της

4.2 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου για μελέτες σταθερότητας

Η περισσότερο διαδεδομένη τεχνική για μελέτες σταθερότητας είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στην τεχνική αυτή βασίζεται πάνω από το 85% των φαρμακευτικών εφαρμογών. Στις περιπτώσεις αναλυτών με MB>1000 Da, είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν άλλες χρωματογραφικές μέθοδοι για το διαχωρισμό τους.

Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού, όπως είναι η χρωματογραφία εναντιομερών ενώσεων (CC), η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η αεριοχρωματογραφία (GC), και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη ενδεικτικών ή και ειδικών μεθόδων για μελέτες σταθερότητας. Μη χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές όπως είναι η τιτλομετρία, η ατομική απορρόφηση, η φασματοφωτομετρία, και η φασματοσκοπία IR, αν και ακριβής δε θεωρούνται κατάλληλες για ανάπτυξη μεθόδων ενδεικτικών για μελέτες σταθερότητας.

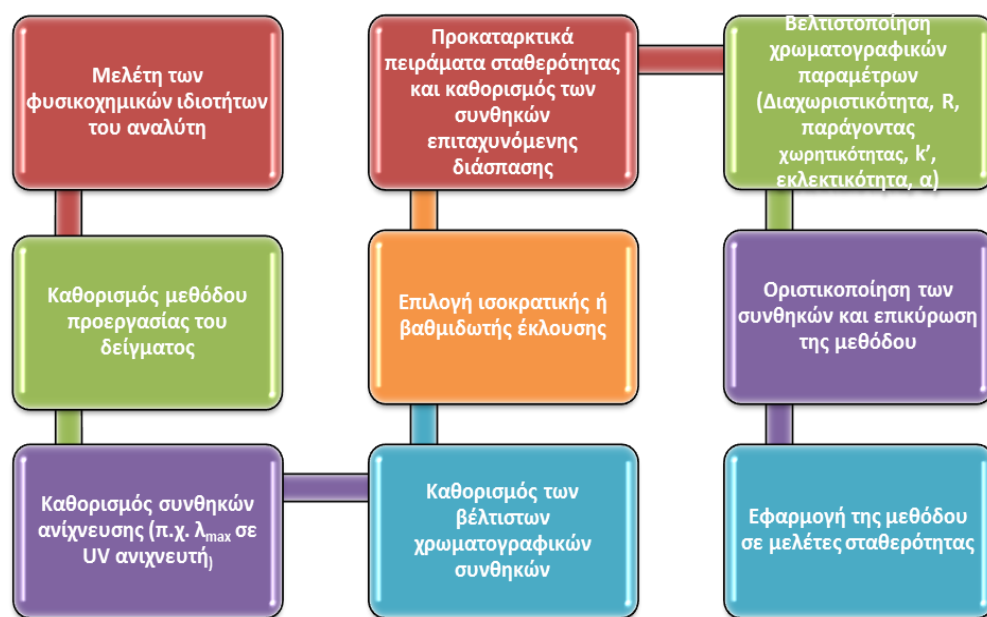
4.2.1 Διαχωρισμός εναντιομερών

Από τις αρχές της δεκαετίας του '90, ο οργανισμός FDA εκδίδει ένα έγγραφο σχετικά με την ανάπτυξη νέων εναντιομερών φαρμάκων, μέχρι τότε η πλειοψηφία των εναντιομερών συνθετικών ενώσεων χορηγείτο ως ρακεμικά μίγματα. Ωστόσο, επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εναντιομερή

επιδεικνύουν διαφορετικές θεραπευτικές ιδιότητες. Σύμφωνα με τις οδηγίες του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), οι χημικές ενώσεις που διαθέτουν κέντρα ασυμμετρίας πρέπει να διαχωρίζονται στα αντίστοιχα εναντιομερή και τα φαρμακευτικά προϊόντα που περιέχουν εναντιομερείς δραστικές ουσίες χορηγούνται με τη μορφή του δραστικού εναντιομερούς και όχι ως ρακεμικά μίγματα.

4.3 Γενική επισκόπηση της πορείας ανάπτυξης μεθόδου για μελέτες σταθερότητας

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη μεθόδου για μελέτες σταθερότητας μπορεί να απεικονιστεί με ένα γενικό πλαίσιο ώστε να προσδιοριστούν τα βήματα που απαιτούνται μέχρι το τελικό προϊόν. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην προτεινόμενη μέθοδο σταθερότητας, σχήμα 4.1



Σχήμα 4.1: Διάγραμμα ροής για την ανάπτυξη μεθόδου υγροχρωματογραφίας για μελέτη σταθερότητας

Μία φαρμακευτική ένωση έχει συνήθως μοριακό βάρος μικρότερο από 1000 Da και είναι διαλυτή είτε στο νερό είτε σε κάποιο οργανικό διαλύτη. Τα υδατοδιαλυτά φάρμακα είναι ιοντικές ή μη ιοντικές ενώσεις, ενώ τα φάρμακα

που διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες είναι πολικές ή μη πολικές ενώσεις. Η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δραστικών συστατικών των φαρμακευτικών προϊόντων είναι ανεκτίμητης σημασίας κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης της μεθόδου.

Πληροφορίες για τις διάφορες ιδιότητες μπορεί να συλλεχθούν είτε μέσω ειδικού προγράμματος που παράγει τις κατάλληλες πληροφορίες κατά την ανάπτυξη του φαρμάκου-σύνθεση του φαρμάκου-ή μέσω βιβλιογραφικής έρευνας ή από το προφίλ των φαρμάκων από την εταιρεία παραγωγής, από βιβλιοθήκες φασμάτων ή αναφορές. Πληροφορίες σχετικές με τις σταθερές διάστασης, τους συντελεστές κατανομής, τον ενδογενή φθορισμό (αν υπάρχει), τη χρωματογραφική συμπεριφορά, τις φασματοφωτομετρικές ιδιότητες, τα δυναμικά οξειδοαναγωγής, τη διαλυτότητα και τις μελέτες σταθερότητας σκευάσματος, είναι χρήσιμες και μπορούν να επισπεύσουν την πορεία της ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου. Η σταθερά διάστασης και οι συντελεστές κατανομής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αποδοτικών διαδικασιών υγρής/υγρής εκχύλισης, ενώ οι πληροφορίες σχετικές με φθορίζουσες, φασματοφωτομετρικές, χρωματογραφικές, και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή της καλύτερης μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Μελέτες σταθερότητας πραγματοποιούνται στη φαρμακευτική ουσία, σε διάλυμα και σε μίγμα με φαρμακευτικά έκδοχα ως μέρος των μελετών συμβατότητας. Δραστικές ομάδες ταυτοποιούνται και διερευνάται η ευαισθησία του φαρμάκου στην υδρόλυση, την οξείδωση, τη θερμική διάσπαση και σε άλλες συνθήκες. Οι μελέτες συμβατότητας πραγματοποιούνται για την αξιολόγηση της σταθερότητας των δραστικών συστατικών όταν αναμιγνύονται με κοινά έκδοχα καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό πιθανόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φαρμάκου και των πρώτων υλών.

Οι διαλυτότητες θα πρέπει να προσδιορίζονται σε έναν αριθμό διαλυτών που καλύπτουν μία κλίμακα πολικότητας και είναι οι πιο συνήθεις κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Οι διαλυτότητες πρέπει να προσδιορίζονται τόσο σε υδατικούς και όσο και σε οργανικούς διαλύτες.

Βιβλιοθήκες φασμάτων έχουν καθιερωθεί από τις οποίες μπορούν να σταχυολογηθούν χρήσιμες πληροφορίες για τις αρχικές συνθήκες σε έναν διαχωρισμό HPLC. Ωστόσο, οι πληροφορίες αυτές μπορεί να μην είναι γνωστές ή διαθέσιμες, οπότε ο αρχικός διαχωρισμός πρέπει να βασίζεται σε προηγούμενη εμπειρία ώστε να προσδιοριστεί το σύνολο των ενεργειών που απαιτούνται για την πειραματική πορεία που θα πρέπει να ακολουθηθεί.

Ιδανικά, η γνώση της φύσης των δραστικών συστατικών που σχετίζονται με τη σύνθεση και άλλες ιδιότητες θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη. Για παράδειγμα, πληροφορίες που αφορούν τη συνθετική πορεία της ένωσης, θα μπορούσαν να βοηθήσουν την αναζήτηση συγγενών ουσιών, πιθανών προϊόντων διάσπασης και προσμίξεων. Η γνώση της χημικής δομής της ένωσης θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανά στερεοϊσομερή τα οποία με τη σειρά τους να απαιτούν μία διαφορετική στρατηγική διαχωρισμού.

4.4 Μελέτες σταθερότητας σε συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης

Στις κατευθυντήριες οδηγίες του FDA που αφορούν μελέτες σταθερότητας ορίζεται σαφώς ότι τα φάρμακα πρέπει να υποβάλλονται σε έναν αριθμό έντονων συνθηκών αποικοδόμησης συμπεριλαμβανομένου όξινων, βασικών και οξειδωτικών συνθηκών. Σε αυτό το πρωτόκολλο ανάλυσης περιλαμβάνονται και κυκλικές σειρές μετρήσεων ελέγχοντας την επίδραση της θερμοκρασίας και του φωτός (φωτοσταθερότητα). Οι πρόσφατες οδηγίες του οργανισμού ICH (Q2A και Q2B) δεν προσδιορίζουν τον τρόπο διεξαγωγής των μελετών σταθερότητας αλλά αφήνεται στην κρίση των υπεύθυνων εταιριών. Η μελέτη των προϊόντων διάσπασης πρέπει να πραγματοποιείται κατά τα πρώτα στάδια της πορείας ανάπτυξης του φαρμακευτικού προϊόντος.

Στα έγγραφα των οδηγιών δεν αναφέρονται λεπτομερώς οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων. Οι προτεινόμενες συνθήκες διάσπασης συνοψίζονται στον πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Προτεινόμενο σχεδιάγραμμα για την πραγματοποίηση μελετών σταθερότητας							
Προϊόν	Διάσπαση	Συνθήκες Διάσπασης					
		Οξύ	Βάση	H ₂ O ₂	Όξινο θειώδες νάτριο	Φωτοσταθερό τητα	T (°C)
Προϊόν	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Εικονικό φάρμακο	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Πρώτες ύλες	ναι	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Εσωτερικό πρότυπο	όχι	-	-	-	-	-	-
Έλεγχοι							
Προϊόν	όχι	-	-	-	-	-	-
Πρώτες ύλες	όχι	-	-	-	-	-	-
Τυφλό διάλυμα	όχι	-	-	-	-	-	-

Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν κάποια προκαταρκτικά πειράματα για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού συγκέντρωσης αντιδραστηρίου και χρόνου που επιδρά για την επίτευξη αποικοδόμησης σε ποσοστό κατά προτίμηση της τάξης 20-30%. Ανάλογα με τη δραστική ουσία του φαρμακευτικού προϊόντος, δεν προκαλούν όλα τα αντιδραστήρια αποικοδόμησης διάσπαση της ουσίας, ωστόσο, κάθε αντιδραστήριο θα πρέπει να αξιολογηθεί ώστε να προσδιοριστεί το αποτέλεσμα της διάσπασης που προκαλεί.

Μελετώνται οι εξής παράμετροι:

Ικανοποιητικός παράγοντας χωρητικότητας k' . Κατά την αρχική ανάπτυξη της μεθόδου θα πρέπει να επιτυγχάνεται κατάλληλα διαχωρισμένη κορυφή, με k' να κυμαίνεται μεταξύ της περιοχής 4 έως 10. Αυτή η κλίμακα επιτρέπει κατάλληλο διάστημα χρόνου στο χρωματογράφημα ώστε τα προϊόντα

διάσπασης να εκλούνται πριν ή μετά την κύρια κορυφή του δραστικού προϊόντος. Καθώς η πολικότητα των προϊόντων αποικοδόμησης συγκρινόμενη με εκείνη της κύρια κορυφής δεν είναι γνωστή, η τιμή του k' της κύριας κορυφής στο μέσον του χρωματογραφήματος προσθέτει κάποια ασφάλεια ότι τα προϊόντα διάσπασης θα διαχωριστούν ικανοποιητικά.

Συνθήκες Αποικοδόμησης. Τυπικές συνθήκες διάσπασης περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδρόλυσης, φωτόλυσης, διάσπαση σε όξινες και βασικές συνθήκες, μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας. Στόχος είναι η επίτευξη διάσπασης σε ποσοστό 20-30% και όχι η πλήρης αποικοδόμηση της δραστικής ουσίας καθώς μια τέτοια διαδικασία θα προκαλούσε δευτερογενής αντιδράσεις διάσπασης των προϊόντων διάσπασης που είναι απίθανο να συμβούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αποθήκευσης. Αναλόγως της φύσης του δραστικού φαρμακευτικού συστατικού, μεταβάλλονται και οι συνθήκες που οδηγούν στη διάσπαση της.

Εσωτερικό Πρότυπο. Εάν η αναλυτική μέθοδος απαιτεί την χρήση εσωτερικού προτύπου, ενδείκνυται να μην διασπάται και η τιμή του k' να μην επηρεάζει καμία από τις πιθανά εκλούόμενες κορυφές.

Η αξιολόγηση του μίγματος που προκύπτει από τις μελέτες διάσπασης επιτυγχάνεται με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA). Ο προσδιορισμός της καθαρότητας της κύριας κορυφής είναι πολύ σημαντικός και σχετίζεται με την πιθανή παρουσία ανομοιογενούς κορυφής μετά από τη διαδικασία της διάσπασης. Είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει καμία κορυφή αποικοδόμησης 'κρυμμένη' ή ατελώς διαχωρισμένη από την κύρια κορυφή. Η χρησιμότητα ενός ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων έγκειται στο γεγονός ότι ο αναλυτής μπορεί να επιλέξει όλη την κλίμακα των μηκών κύματος δηλαδή από τα 200 έως τα 350 nm με εύρος σάρωσης περίπου 80 nm. Αντίθετα με ότι συμβαίνει σε ένα κλασσικό ανιχνευτή UV, όπου ανιχνεύονται μόνο οι ενώσεις που απορροφούν στο μήκος κύματος ανίχνευσης, με τον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων υπάρχει η δυνατότητα να ανιχνευτούν όλες οι ενώσεις που απορροφούν σε όλη την περιοχή σάρωσης που έχει επιλεγεί για τη χρωματογραφική ανάλυση.

4.4.1 Επιλογή και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Δύο επιλογές υπάρχουν πριν την έναρξη των πειραμάτων με στόχο την ανάπτυξη της επιθυμητής μεθοδολογίας για μια μελέτη σταθερότητας. Αρχικά μπορεί να σταχυολογηθούν αρκετές πληροφορίες από άλλες μεθόδους ανάλυσης που είτε μπορεί να υπάρχουν στο εργαστήριο είτε έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν τη δραστική ουσία. Αρκετές φορές απαιτείται η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας νέας μεθόδου για τις μελέτες σταθερότητας. Το επόμενο βήμα είναι η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του δραστικού συστατικού. Επιδιωκόμενοι στόχοι κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου ανάλυσης κατάλληλης για μελέτες σταθερότητας είναι να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός των αναλυτών και ο χρόνος ανάλυσης να μην είναι ιδιαίτερα μεγάλος.

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η διαδικασία προσδιορισμού της καταλληλότητας μιας συγκεκριμένης μεθοδολογίας ώστε η υπό διερεύνηση μέθοδος να ικανοποιεί τις απαιτήσεις για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Η επικύρωση μιας μεθόδου δεν είναι απλά μία διαδικασία μετρήσεων αλλά μέτρηση της απόδοσης ολόκληρου του αναλυτικού συστήματος. Οι αναλυτικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν χρωματογραφικές και μη-χρωματογραφικές τεχνικές συνήθως παράγουν αξιόπιστες και ακριβείς πληροφορίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός φαρμάκου και της προέγκρισης ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Στην Αμερικανική Φαρμακοποιία (USP23/NF18), υπάρχει ειδικό κεφάλαιο που αναφέρεται στην επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων για μελέτες σταθερότητας. Το κεφάλαιο αυτό περιγράφει λεπτομερώς πως πρέπει να γίνεται η αξιολόγηση συγκεκριμένων παραμέτρων απόδοσης. Γενικά, θεωρείται ότι το κεφάλαιο εφαρμόζεται κυρίως σε χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης και για τις μη χρωματογραφικές διαδικασίες συνήθως χρησιμοποιούνται τροποποιημένες οδηγίες. Οι μέθοδοι που περιγράφονται στην USP δεν είναι μέθοδοι εκ φύσεως προτεινόμενης σταθερότητας (stability indicating) και πρέπει να δίνεται προσοχή στην επιλογή των παραμέτρων απόδοσης.

Πριν την έναρξη μιας μελέτης επικύρωσης απαιτείται ένα καλά σχεδιασμένο πρωτόκολλο επικύρωσης. Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιλαμβάνει τη διαδικασία ελέγχου, το βασικό πειραματικό σχεδιασμό, τα στοιχεία για επικύρωση, τα οριοθετημένα κριτήρια αποδοχής, τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικών μεθόδων και τη διευθυντική έγκριση.

Πριν από τη σχεδίαση του πειραματικού πρωτοκόλλου, είναι σημαντικό να γίνονται μερικές βασικές υποθέσεις όπως προτείνεται από τους Swartz και Krull. Αυτές οι υποθέσεις περιλαμβάνουν τα εξής:

- Έχει αποδειχθεί η ειδικότητα ή εκλεκτικότητα της υπό ανάπτυξης μεθόδου; (δηλαδή η διάσπαση σε ακραίες συνθήκες έχουν ήδη πραγματοποιηθεί)
- Έχει βελτιστοποιηθεί η υπό ανάπτυξη αναλυτική μέθοδος μέχρι το σημείο όπου η επένδυση χρόνου και προσπάθειας στην επικύρωση είναι δικαιολογημένη και εφικτή;
- Πραγματοποιείται η αξιολόγηση των παραγόμενων πληροφοριών από την αναλυτική μέθοδο μέσω έγκυρων στατιστικών προσεγγίσεων έτσι ώστε να εξαλείφεται κάθε υποκειμενικότητα της επικύρωσης της μεθόδου;

Έχοντας υπόψη τις παραπάνω υποθέσεις, τις οδηγίες της παρούσας ICH μεθοδολογίας και τις απαιτήσεις για την επικύρωση που εξαρτώνται από τον τύπο της αναλυτικής μεθόδου μπορεί να σχεδιαστεί ένα βήμα προς βήμα πρωτόκολλο. Η πρώτη παράμετρος που αξιολογείται είναι η ανεκτικότητα της μεθόδου. Αυτή η παράμετρος συνήθως αξιολογείται κατά το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου, όταν μελετώνται διαφορετικές παράμετροι στην εκλεκτικότητα της μεθόδου. Η ανθεκτικότητα της μεθόδου μπορεί να αξιολογηθεί με μια σταδιακή μονοπαραμετρική προσέγγιση ή ως τμήμα ενός πειραματικού σχεδιασμού ενσωματώνοντας πολυπαραμετρικές παραμέτρους. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος της γραμμικότητας σε πέντε επιπέδα συγκεντρώσεων για την δραστική ουσία και για το φαρμακευτικό προϊόν. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μετρήσεων πραγματώνει τις απαιτήσεις για την ακρίβεια. Ένα ελάχιστο τριών μετρήσεων σε κάθε επίπεδο θα πρέπει να γίνεται. Στο τέλος της πρώτης ημέρας, θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον- έξι επαναλήψεις στο 100% της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας για τους ελέγχους ορθότητας και πιστότητας. Το όριο ανίχνευσης (LOD)

και το όριο ποσοτικοποίησης (LOD) μπορούν να προσδιοριστούν εάν απαιτείται. Για τους υπολογισμούς των παραπάνω χαρακτηριστικών απόδοσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν κριτήρια σύμφωνα με την USP ή τις οδηγίες ICH (Q2B).

4.5 Μελέτη της κινητικής χημικών αντιδράσεων

Η μελέτη της κινητικής των αντιδράσεων αποικοδόμησης φαρμακευτικών ενώσεων παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη διάρκεια δράσης τους, αλλά και για τη σταθερότητα τους.

Σε μία χημική αντίδραση και στη μελέτη της κινητικής της ενδιαφέρουν τα ακόλουθα:

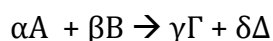
- Η στοιχειομετρία της αντίδρασης
- Η τάξη και η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης
- Ο μηχανισμός της αντίδρασης

Συνήθως η κινητική μελέτη των αντιδράσεων βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας της αντίδρασης και της εξάρτησης αυτής από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων.

4.5.1 Ταχύτητα και τάξη της αντίδρασης

Ως ταχύτητα μίας αντίδρασης ορίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης ενός από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα που συμμετέχουν στην αντίδραση στη μονάδα του χρόνου.

Για μία αντίδραση της μορφής:



όπου A και B είναι τα αντιδρώντα και Γ και Δ τα προϊόντα της αντίδρασης, η ταχύτητα ν της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{1}{\gamma} \frac{d[\Gamma]}{dt} = \frac{1}{\delta} \frac{d[\Delta]}{dt} = -\frac{1}{\alpha} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{\beta} \frac{d[B]}{dt} \quad (4.1)$$

Το αρνητικό πρόσημο δηλώνει ότι οι ενώσεις A και B καταναλώνονται, η ταχύτητα εκφράζεται σε συγκέντρωση ως προς το χρόνο δηλαδή $\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$

Με βάση το νόμο των μαζών η ταχύτητα για την παραπάνω αντίδραση μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$v = k[A]^x[B]^y \quad (4.2)$$

Όπου [A] και [B] είναι οι ενεργότητες των αντιδρώντων και k η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης, η οποία είναι ίση με την ταχύτητα της αντίδρασης όταν οι ενεργότητες των αντιδρώντων είναι ίσες με τη μονάδα. Οι εκθέτες x και y είναι άλλοτε ίσοι με τους συντελεστές τις αντιδράσεις α και β, αντίστοιχα, και άλλοτε όχι, ενώ το άθροισμα $x+y$ δίνει την τάξη της αντίδρασης και παίρνει ακέραιες τιμές, 0, 1, 2 και σπάνια 3, ενώ είναι σπάνιες οι περιπτώσεις που παίρνει κλασματικές τιμές. Η σταθερά ταχύτητας είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις των συστατικών και από την τάξη της αντίδρασης, εξαρτάται όμως από τη θερμοκρασία, και το μέσο στο οποίο γίνεται η αντίδραση.

Ο νόμος της ταχύτητας μίας αντίδρασης καθορίζεται από πειραματικά δεδομένα και όχι από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης και στην περίπτωση αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε περισσότερα από ένα στάδια τότε η ταχύτητα της αντίδρασης καθορίζεται από το πιο αργό στάδιο.

Από τις σπουδαιότερες παραμέτρους στη μελέτη μίας χημικής αντίδρασης είναι η τάξη της αντίδρασης.

Για μία απλή αντίδραση για τον υπολογισμό της κινητικής της και τον προσδιορισμό της τάξης της αντίδρασης ισχύει:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \quad (4.3)$$

λογαριθμώντας τη σχέση (1) προκύπτει η σχέση:

$$\ln\left(-\frac{dC}{dt}\right) = \ln k + n \ln C \quad (4.4)$$

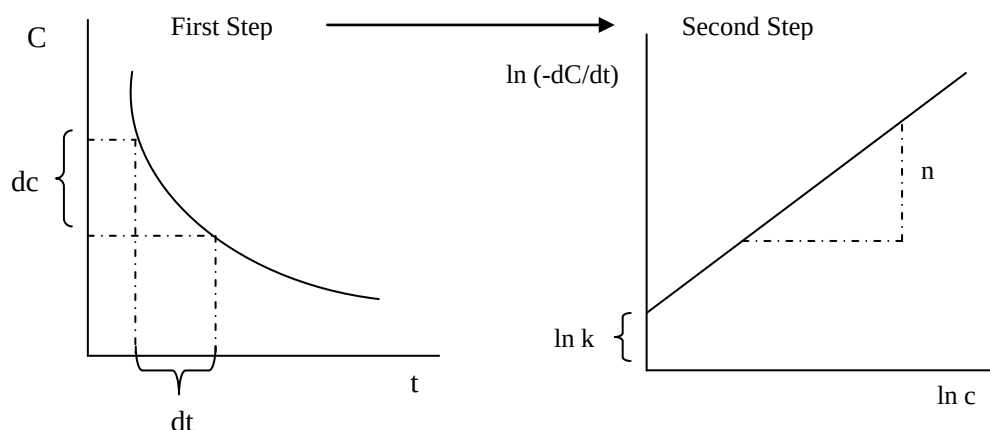
Όπου:

C είναι η συγκέντρωση του μελετούμενου αντιδρώντος συστατικού σε χρόνο t

k είναι η σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης

n είναι η τάξη της αντίδρασης

Μετρώντας πειραματικά τη συγκέντρωση C και τη μεταβολή της ως προς το χρόνο μπορούν να γίνουν τα διαγράμματα της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο ή με βάση τη σχέση (4.4) μπορεί να γίνει ένα διάγραμμα του $\ln(-dC/dt)$ έναντι του $\ln C$ (σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2: Γραφική παράσταση για τον προσδιορισμό της τάξης μίας αντίδρασης (n)

Η τομή στον y -άξονα δίνει τη σταθερά $\ln k$, ενώ η κλίση αντιστοιχεί στην τάξη της αντίδρασης n . Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να υπολογιστεί μόνο η τάξη της αντίδρασης, η σταθερά της αντίδρασης υπολογίζεται από την εφαρμογή της εξίσωσης για τη συγκεκριμένη τάξη της αντίδρασης.

4.6 Τύποι αντιδράσεων

4.6.1 Αντιδράσεις μηδενικής τάξης

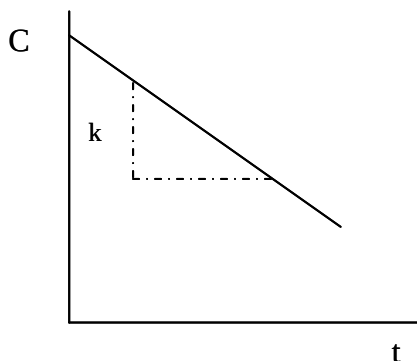
Στις αντιδράσεις μηδενικής τάξης η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των αντιδρώντων συστατικών [145].

Αυτό μπορεί να συμβεί σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις:

- ✓ Όταν εξ ορισμού η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των αντιδρώντων συστατικών.
- ✓ Όταν η συγκέντρωση ενός αντιδρώντος συστατικού είναι τόσο μεγάλη, ώστε ο συνολικός ρυθμός της αντίδρασης να εμφανίζεται ότι είναι πρακτικά ανεξάρτητος της συγκέντρωσης αυτού του συστατικού.

Πολλές καταλυτικές αντιδράσεις εμφανίζονται να ακολουθούν κινητική μηδενικής τάξης, σε ό,τι αφορά στα αντιδρώντα, μπορεί όμως να ακολουθούν

κινητική διαφορετικής τάξης αναφορικά με την παρουσία καταλύτη ή την παρουσία άλλων συστατικών που δεν συμμετέχουν άμεσα στη στοιχειομετρία της αντίδρασης.



Σχήμα 4.3: Γραφική παράσταση για τον προσδιορισμό της σταθεράς της αντίδρασης που ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης (k_0)

Για μία αντίδραση που ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης ισχύει:

$$-\frac{dC}{dt} = k \quad (4.5)$$

Και δείχνει ότι ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης του αντιδρώντος είναι σταθερός και ισούται με τη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης. Αν για χρόνο $t_0=0$ η αρχική συγκέντρωση του αντιδρώντος είναι C_0 τότε ολοκληρώνοντας τη σχέση 4.5 προκύπτει:

$$\int_{C_0}^C dC = -k \int_0^t dt \Rightarrow C - C_0 = -kt \quad (4.6)$$

όπου είναι k η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης μηδενικής τάξης

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο είναι ευθεία γραμμή με κλίση $-k$. Ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$ για τις αντιδράσεις μηδενικής τάξης δίνεται από τη σχέση:

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k} \quad (4.7)$$

Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι φανερό ότι στις αντιδράσεις μηδενικής τάξης ο χρόνος ημιζωής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του αντιδρώντος. Οι μονάδες της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης είναι $M s^{-1}$. Στις περιπτώσεις φαρμακευτικών ενώσεων δεν παρατηρούνται συχνά αντιδράσεις μηδενοταξικής κινητικής [146].

4.6.2 Αντιδράσεις πρώτης τάξης

Στις αντιδράσεις πρώτης τάξεως η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιδρώντος. Πάρα πολλές αντιδράσεις αποικοδόμησης φαρμακευτικών ενώσεων ακολουθούν αυτή την κινητική.

Για μία αντίδραση που ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης ισχύει η ακόλουθη μαθηματική έκφραση, όπου φαίνεται ότι η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιδρώντος κάθε χρονικής στιγμής:

$$-\frac{dC}{dt} = kC \quad (4.8)$$

Ολοκληρώνοντας προκύπτει:

$$\int_{C_0}^C dC = \int_0^t k dt \Rightarrow \ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = kt \quad (4.9)$$

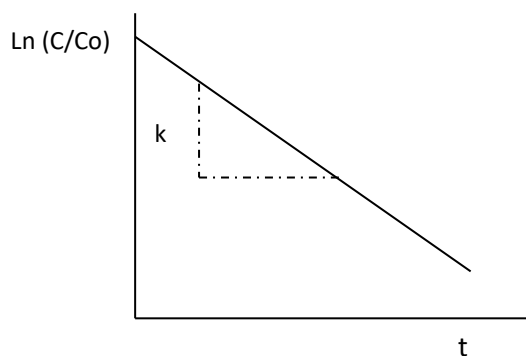
$$\text{ή } \ln(C) = \ln(C_0) - k \cdot t \quad \text{ή } C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (4.10)$$

C: η συγκέντρωση του αντιδρώντος σε χρόνο t

C₀: η αρχική συγκέντρωση του αντιδρώντος

k: η σταθερά της αντίδρασης πρώτης τάξης

Η γραφική παράσταση του lnC σε σχέση με το χρόνο δίνει ευθεία γραμμή με κλίση -k (σχήμα 4.4). Οι μονάδες της σταθεράς ταχύτητας στην περίπτωση πρωτοταξικής κινητικής είναι s⁻¹.



Σχήμα 4.4: Γραφική παράσταση για τον προσδιορισμό της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης που ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως (k_1)

Σημαντικό χαρακτηριστικό μιας πρωτοταξικής αντίδρασης δίνεται από το χρόνο ημιζωής, $t_{1/2}$, ο οποίος υπολογίζεται ως εξής:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4.11)$$

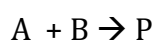
Σύμφωνα με την εξίσωση 4.11 είναι ευνόητο ότι σε μία αντίδραση πρώτης τάξης ο χρόνος ημιζωής είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του αντιδρώντος. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο χρόνο αυτό η συγκέντρωση του αντιδρώντος είναι η μισή της αρχικής συγκέντρωσης σε χρόνο t_0 , στην περίπτωση πρωτοταξικής κινητικής ο χρόνος ημίσειας ζωής αποτελεί έναν εύκολο τρόπο υπολογισμού της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης

4.6.3 Αντιδράσεις δεύτερης τάξης

Σε δύο σημαντικούς τύπους αντιδράσεων της μορφής:



ή της μορφής:



Ο ρυθμός κατανάλωσης ενός αντιδρώντος μπορεί να ακολουθεί κινητική δευτέρας τάξης. Στις αντιδράσεις δευτέρας τάξης η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη είτε του τετραγώνου της συγκέντρωσης του αντιδρώντος (για την πρώτη αντίδραση) ή ανάλογη των συγκεντρώσεων και των δύο αντιδρώντων (για τη δεύτερη αντίδραση).

Για μία αντίδραση που ακολουθεί κινητική δευτέρας τάξης ισχύει η ακόλουθη σχέση:

$$-\frac{dC}{dt} = kC_A^2 \quad (4.12)$$

ή

$$-\frac{dC}{dt} = kC_A C_B \quad (4.13)$$

όπου φαίνεται ότι ο ρυθμός της κατανάλωσης ενός αντιδρώντος είναι ανάλογος του τετραγώνου της συγκέντρωσης του αντιδρώντος κάθε χρονικής στιγμής.

Ολοκληρώνοντας τη σχέση (4.13) προκύπτει η σχέση:

$$\frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_0} = kt \quad (4.14)$$

όπου C_A η συγκέντρωση του αντιδρώντος συστατικού Α σε χρόνο t

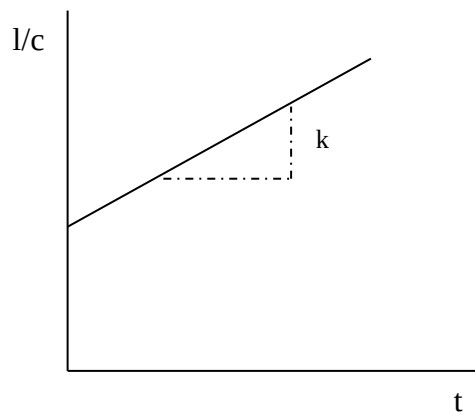
C_0 η αρχική συγκέντρωση του αντιδρώντος συστατικού Α

k η σταθερά της αντίδρασης δευτέρας τάξεως

Για αντίδραση αυτής της μορφής το αντίστροφο της συγκέντρωσης του αντιδρώντος είναι ανάλογο του χρόνου, η δε κλίση της ευθείας ισούται με k (σχήμα 4.5). Οι μονάδες της σταθεράς ταχύτητας σε αυτή την περίπτωση είναι $M^{-1}s^{-1}$. Επίσης ο χρόνος ημιζωής υπολογίζεται από τη σχέση:

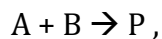
$$t_{1/2} = \frac{1}{kC_{A0}} \quad (4.15)$$

Ο χρόνος ημιζωής είναι αντιστρόφος ανάλογος της αρχικής συγκέντρωσης του αντιδρώντος και αυτό αποτελεί έναν απλό τρόπο διαχωρισμού μίας πρωτοταξικής κινητικής από μία κινητική δευτέρας τάξης.



Σχήμα 4.5: Γραφική παράσταση για τον προσδιορισμό της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης που ακολουθεί κινητική δεύτερης τάξης (k)

Για την περίπτωση της αντίδρασης της μορφής:



Στην περίπτωση που οι συγκεντρώσεις των A και B είναι ίδιες τότε ισχύουν οι εξισώσεις (4.14) και (4.15) για τον υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης και του χρόνου ημιζωής, αντίστοιχα. Στην περίπτωση όμως που οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων A και B είναι διαφορετικές τότε ισχύουν εντελώς διαφορετικές εξισώσεις.

Η εξίσωση (4.13) δε μπορεί να ολοκληρωθεί απευθείας και είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί ως μεταβλητή της αντίδρασης, η ελάττωση x, στη συγκέντρωση ενός από τα αντιδρώντα. Θεωρώντας επομένως ότι τα αντιδρώντα καταναλώνονται σε ποσότητες $C_A = C_{A0} - x$ και $C_B = C_{B0} - x$, η εξίσωση 4.13 μετατρέπεται ως εξής:

$$-\frac{dc}{dt} = k(C_{A0} - x)(C_{B0} - x) \quad (4.16)$$

η σχέση (4.16) καταλήγει με κατάλληλες μετατροπές ως εξής:

$$kt = \frac{1}{C_{A0} - C_{B0}} \times \ln \left[\frac{C_{B0}C_A}{C_{A0}C_B} \right] \quad (4.17)$$

Όπου:

C_A, C_B : οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων συστατικών A και B σε χρόνο t

C_{A0}, C_{B0} : οι αρχικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων συστατικών A και B (t=0)

k: η σταθερά της ταχύτητας αντίδρασης δευτέρας τάξεως

Πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι απαραίτητο να ακολουθείται κινητική δεύτερης τάξης, αν, για παράδειγμα, η συγκέντρωση του B είναι πολύ μεγάλη. Τότε ακολουθείται κινητική πρώτης τάξεως μόνο ως προς τη συγκέντρωση του A. Γενικά αντιδράσεις μεγαλύτερης τάξης είναι σπάνιο να παρατηρηθούν.

4.6.4 Ψευδοταξικές αντιδράσεις

Καθώς η τάξη μίας αντίδρασης αυξάνει, η ολοκληρωμένη μορφή της εξίσωσης γίνεται όλο και πιο πολύπλοκη. Υπάρχουν εντούτοις αρκετές περιπτώσεις όπου οι συνθήκες της αντίδρασης είναι τέτοιες ώστε οι συγκεντρώσεις ενός ή περισσότερων συστατικών να συμπεριλαμβάνονται στη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης και έτσι η αντίδραση να εμφανίζεται μικρότερης τάξης από αυτή που είναι πραγματικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου είδους αντίδρασης είναι η υδρόλυση ενός εστέρα σε αλκαλικές συνθήκες σε υδατικό διάλυμα οπότε στην περίπτωση που η συγκέντρωση των ιόντων υδροξυλίου έχει σταθεροποιηθεί με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να ενσωματωθεί στη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης οπότε η νέα σταθερά k' είναι ψευδοσταθερά και η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως αντίδραση πρώτης τάξης. Η νέα αυτή σταθερά δίνεται από τη σχέση:

$$-\frac{d[RCOOR']}{dt} = k'[RCOOR'] \quad (4.18)$$

4.7 Προσδιορισμός της σταθεράς ταχύτητας μίας αντίδρασης

Ο προσδιορισμός της σταθεράς ταχύτητας μίας αντίδρασης μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους:

1. Μέθοδος κινητικών εξισώσεων: Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα πειραματικά δεδομένα εφαρμόζονται στις εξισώσεις που αναφέρθηκαν

στο πεδίο 4.5 και υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης. Τελικά επιλέγεται αυτή η τάξη της αντίδρασης που δίνει την καλύτερη συσχέτιση και σταθερές τιμές k μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος.

2. *Μέθοδος γραφικής παράστασης:* Καταρτίζεται τα διαγράμματα της συγκέντρωσης του αναλύτη σε συνάρτηση με το χρόνο η αντίδραση είναι:

- ✓ Μηδενικής τάξης αν η σχέση είναι γραμμική
- ✓ Πρώτης τάξης αν η συσχέτιση του λογάριθμου της συγκέντρωσης του αναλύτη σε συνάρτηση με το χρόνο είναι γραμμική
- ✓ Δεύτερης τάξης αν η συσχέτιση του αντίστροφου της συγκέντρωσης του αναλύτη σε συνάρτηση με το χρόνο είναι γραμμική
- ✓ Τρίτης τάξης αν το αντίστροφο του τετραγώνου της συγκέντρωσης του αναλύτη είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου

3. *Μέθοδος των χρόνων ημιζωής:* Υπολογίζεται ο χρόνος ημιζωής σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις αντιδρώντων. Ο χρόνος ημιζωής είναι ανάλογος του $1/\alpha^{n-1}$, όπου α η εκάστοτε αρχική συγκέντρωση του αναλύτη και n η τάξη της αντίδρασης. Για δυο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις η σχέση που τις συνδέει είναι:

$$\frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}} = \left[\frac{a_2}{a_1} \right]^{n-1} \quad (4.19)$$

Λογαριθμώντας τη σχέση (4.19) προκύπτει η :

$$n = \frac{\log \left[\frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}} \right]}{\log \left[\frac{a_2}{a_1} \right]} + 1 \quad (4.20)$$

Με βάση την εξίσωση (4.20) υπολογίζουμε την τάξη, στην περίπτωση επιλογής αυτού του τρόπου υπολογισμού οι χρόνοι ημιζωής υπολογίζονται γραφικά από το διάγραμμα της συγκέντρωσης ως προς το χρόνο.

4. *Μέθοδος αρχικών ταχυτήτων:* σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται η αρχική ταχύτητα, v , της αντίδρασης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του αντιδρώντος διατηρώντας σταθερες όλες τις άλλες

συγκεντρώσεις των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης. Η τάξη της αντίδρασης προκύπτει από την εξίσωση:

$$\log \frac{v_1}{v_2} = x \log \frac{A_1}{A_2}, \quad (4.21)$$

όπου A_1 και A_2 είναι διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιδρώντος A. Η τάξη προκύπτει από την κλίση του αντίστοιχου διαγράμματος.

4.8 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά ταχύτητας αντιδράσεων

Οι ρυθμοί πραγματοποίησης των αντιδράσεων επηρεάζονται από μεγάλο αριθμό παραμέτρων, μεταξύ των οποίων η πίεση, η ιοντική ισχύς και η θερμοκρασία. Η θερμοκρασία επηρεάζει τη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης k σύμφωνα με την ημι-εμπειρική εξίσωση Arrhenius:

$$k = a \cdot e^{-E_a/RT} \quad (4.22)$$

ή

$$\ln k = \ln a - \frac{E_a}{RT} \quad \text{ή} \quad \log k = \log a - \frac{E_a}{2,303RT} \quad (4.23)$$

k : σταθερά της αντίδρασης

a : παράγων συχνότητας ή συντελεστής συγκρούσεων

E_a : ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης (J/mol)

R : 8,314 J/mol·K (1,987 cal/mol·K)

T : απόλυτη θερμοκρασία, K ($K = ^\circ\text{C} + 273,15$)

Η εξίσωση Arrhenius ισχύει για θερμοκρασίες 0 έως 80°C, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες δεν ισχύει η γραμμικότητα μεταξύ $\log k$ και θερμοκρασίας T . Η ενέργεια ενεργοποίησης είναι η επιπλέον ενέργεια που χρειάζεται να πάρουν τα μόρια ώστε να μπορέσουν να αντιδράσουν. Η ενέργεια αυτή αναφέρεται σε 1 mole αντιδρώντων. Η ενέργεια ενεργοποίησης είναι πάντα θετική, επομένως η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί πάντα σε αύξηση των χημικών αντιδράσεων.

Από τη σχέση (4.23) προκύπτει ότι αν παρασταθούν διάφορες σταθερές αντιδράσεων (k) που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες T , τότε θα

προκύπτει μία ευθεία με τεταγμένη $\ln k$ και τετμημένη $1/T$. Από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων προκύπτει η ενέργεια ενεργοποίησης E_a .

Η εξίσωση Arrhenius είναι χρήσιμη για τον υπολογισμό της ημερομηνίας λήξης ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Σύμφωνα με τις συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης γίνεται μελέτη της χημικής κινητικής του αντιδρώντος σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και υπολογίζονται οι αντίστοιχες σταθερές της ταχύτητας της αντίδρασης. Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση του $\log k$ σε σχέση με το αντίστροφο της απόλυτης θερμοκρασίας. Από τη σχέση που προκύπτει μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης σε θερμοκρασία 25°C .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ποσοτικός προσδιορισμός της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ-αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης-φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS)

5.1 Εισαγωγή

Η αλπραζολάμη, 8-χλωρο-1-μεθυλ-6-φαινυλ-4^H-[1,2,4]τριαζολο[4,3-α][1,4]βενζοδιαζεπίνη, είναι μία τριαζολοβενζοδιαζεπίνη με αγχολυτική, ηρεμιστική και υπνωτική δράση. Ασκεί τη θεραπευτική της δράση συνδεδεμένη κατά μήκος της διεπαφής ανάμεσα στην α- και γ- υπομονάδα του υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Ο υποδοχέας GABA_A είναι ένα εξαρτώμενο από πρόδεμα ιοντικό κανάλι που αποτελείται από ένα πενταμελές σύνολο διαφορετικών υπομονάδων, οι κύριες από τις οποίες είναι η α-, η β- και η γ- υπομονάδα. Ουσιαστικά ο υποδοχέας GABA_A είναι μία οικογένεια υποδοχέων καθώς υπάρχουν 6 διαφορετικές ισομορφές για την α- υπομονάδα, τρεις για τη β-υπομονάδα και τρεις για τη γ- υπομονάδα. Όπως είναι ευνόητο το πλήθος των δυνητικών συνδυασμών είναι μεγάλο, εντούτις στον εγκέφαλο του ενηλίκου επικρατούν συγκεκριμένοι συνδυασμοί. Οι βενζοδιαζεπίνες, μεταξύ των οποίων και η αλπραζολάμη συνδέονται όπως αναφέρθηκε κατά μήκος της διεπαφής ανάμεσα στην α- και τη γ- υπομονάδα και μόνο με υποδοχείς που περιέχουν γ2 και α1, α2, α3 ή α5- υπομονάδες. Συμπεριφορική ανάλυση σε μεταλλαγμένα ποντίκια υποδεικνύει ότι οι υποδοχείς που περιέχουν την υπομονάδα α1-ευθύνονται για την κατασταλτική δράση αλλά όχι για την αγχολυτική δράση, ενώ υποδοχείς που περιέχουν την υπομονάδα α2- και α3 ευθύνονται για την αγχολυτική δράση των βενζοδιαζεπινών. Περιφερικοί υποδοχείς βενζοδιαζεπινών, που δε σχετίζονται με τους υποδοχείς GABA, υπάρχουν σε πολλούς ιστούς και βρίσκονται κυρίως στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων των κυττάρων [147]. Η αλπραζολάμη είναι η μόνη από τις βενζοδιαζεπίνες με αντικαταθλιπτική δράση, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για τη θεραπεία του άγχους και των κρίσεων πανικού με ή χωρίς αγοραφοβία. Η θεραπευτική δράση της είναι άμεση, όμως με διακοπή της χορήγησης είναι πιθανό να παρατηρηθεί στερητικό σύνδρομο και επανεμφάνιση των συμπτωμάτων. Πρόσφατες μελέτες

διερεύνησαν την πιθανή αποτελεσματικότητα της αλπραζολάμης σε χρήστες διεγερτικών ναρκωτικών όπως είναι η κοκαΐνη και η μεθαμφεταμίνη^{148,149}. Ενώ σε άλλες μελέτες διαπιστώθηκε ότι αλπραζολάμη μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση της αιμοσφαιρίνης όπως και να δράσει ως παράγοντας παρεμβολής στο DNA [150,151]. Ο συνδυασμός της αλπραζολάμης με καφεΐνη ενισχύει την κυτταροτοξική δράση της αλπραζολάμης [152]. Υπάρχουν κλινικές μελέτες που διερευνούν τη θεραπευτική δράση της αλπραζολάμης σε ασθενείς με διανοητικές και κινητικές διαταραχές. Η χορήγηση αλπραζολάμης ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες όπως υπνηλία και καταστολή (νάρκωση), ενώ μπορεί να επηρεάσει την απόδοση σε καθημερινές δραστηριότητες όπως είναι η οδήγηση.

Η αλπραζολάμη μεταβολίζεται μέσω οξείδωσης στο ηπατικό μικροσωμικό σύστημα και οι κυριώτεροι μεταβολίτες της είναι η α-υδροξυ αλπραζολάμη, η 4-υδροξυ αλπραζολάμη και η 4, α-διυδροξυ αλπραζολάμη. Όλοι οι μεταβολίτες έχουν μικρότερη συγγένεια με τον υποδοχέα GABA σε σχέση με το κυρίως φάρμακο και εμφανίζονται στο πλάσμα σε συγκέντρωση μικρότερη από το 10% της συγκέντρωσης της αλπραζολάμης. Κανένας από τους μεταβολίτες δεν έχει φαρμακολογική δράση η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην αλπραζολάμη. Οι συγκεντρώσεις της αλπραζολάμης στο ανθρώπινο πλάσμα είναι δοσοεξαρτώμενες. Για παράδειγμα σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν 3mg αλπραζολάμης/ημέρα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της αλπραζολάμης στο πλάσμα βρέθηκε ίση με 29 ng mL⁻¹, σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν 6 mg αλπραζολάμης/ημέρα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της αλπραζολάμης στο πλάσμα βρέθηκε ίση με 61 ng mL⁻¹, ενώ με χορήγηση 9 mg αλπραζολάμης/ημέρα η μέση τιμή της συγκέντρωσης της στο πλάσμα ήταν 102 ng mL⁻¹ [153,154,155,156].

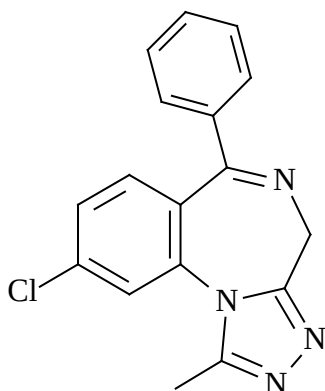
Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει πληθώρα χρωματογραφικών μεθόδων με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης μόνης ή σε συνδυασμό με άλλες βενζοδιαζεπίνες σε βιολογικά υγρά [157,158]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες ποσοτικού προσδιορισμού της αλπραζολάμης με συνδυαστικές τεχνικές ανάλυσης όπως είναι η τεχνική της αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) και της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (LC-MS).

Οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1 που ακολουθεί, όπου παρατίθενται περιληπτικά και κάποια στοιχεία των αναλυτικών πρωτοκόλλων που αναπτύχθηκαν στις αναφερόμενες ερευνητικές εργασίες.

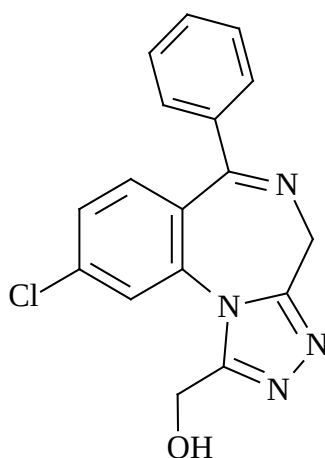
Πίνακας 5.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων αλπραζολάμης και μεταβολίτων		
Αναλύτες	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφία
Αλπραζολάμη	HPLC-UV, αναλυτική στήλη: Zorbax SIL, 25 cm × 4,6mm, κινητή φάση: νερό:ακετονιτρίλιο=6:94, (v/v), ισοκρατική έκλουση, UV ανίχνευση:214 nm	Προσδιορισμός αλπραζολάμης σε δείγματα ανθρώπινου ορού με χρωματογραφία κανονικής φάσης ¹⁵⁹ .
Αλπραζολάμη	HPLC-UV, αναλυτική στήλη: Kontron 10 cm × 4,6mm, μέγεθος σωματιδίων 5μm, , UV ανίχνευση : 230 nm.	Προσδιορισμό της αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα ¹⁶⁰ .
Αλπραζολάμη και μεταβολίτες	HPLC-UV, αναλυτική στήλη: Bio-Rad C8, 100 × 2,1mm I.D., μέγεθος σωματιδίων 3μm, κινητή φάση: ακετονιτρίλιο-0,01 M KH ₂ PO ₄ , 0,01% N,N-dimethyloctylamine (30:70), (pH 6,4), ταχύτητα ροής:0,3 mL/min, UV ανίχνευση : 242nm	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης σε δείγματα αίματος ¹⁶¹
Αλπραζολάμη και μεταβολίτες	HPLC-UV, αναλυτική στήλη:Beckman Ultrasphere C18, 150 cm × 2mm, μέγεθος σωματιδίων 5μm, ισοκρατική έκλουση, κινητή φάση: μεθανόλη:ακετονιτρίλιο:43 mM οξικό νάτριο σε νερό (pH 2,4) (45:8:47, v/v/v), ταχύτητα ροής: 0,3 mL/min, UV ανίχνευση:230	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης και των κύριων μεταβολιτών της σε δείγματα ορού ¹⁶²
9 Βενζοδιαζεπίνες	MECC-UV, Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μυκηλίων (MEKC), Τριχοειδής στήλη: πηκτική πυριτίας 470 mm × 75μm, UV ανίχνευση:254 nm	Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μυκηλίων ¹⁶³
8 Βενζοδιαζεπίνες	MECC-UV, Αναλυτική στήλη: τριχοειδής πηκτής πυριτίας 64,5cm×50μm I., UV ανίχνευση: 214nm,	Διαχωρισμός 1,4-βενζοδιαζεπινών με ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία μυκηλίων (=MECC) ¹⁶⁴
Αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη	GC-NCI/MS, Restek-200 τριχοειδής στήλη	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα ¹⁶⁵
Αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη	LC-MS, Αναλυτική στήλη: Zorbax C18 150mm × 2,1mm, ταχύτητα ροής: 0,25 mL/min, κινητή φάση: μεθανόλη: νερό που περιέχει 0,1% μυρμηκικό οξύ, (60:40).	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα ¹⁶⁶
Αλπραζολάμη, εσταζολάμη, μιδαζολάμη	LC-ESI/MS: Αναλυτική στήλη διαστάσεων 100 × 2,0mm με μέγεθος σωματιδίων 3μm και κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/ νερό που περιέχει 1% οξικό οξύ, βαθμιδωτή έκλουση, ταχύτητα ροής: 0,15mL/min.	Προσδιορισμός υπνωτικών βενζοδιαζεπινών (αλπραζολάμη, εσταζολάμη και μιδαζολάμη) ¹⁶⁷
Αλπραζολάμη, 4-υδροξυ αλπραζολάμη, α-υδροξυ αλπραζολάμη	Αναλυτική στήλη: Luna C18, 100mm × 2,0mm, μέγεθος σωματιδίων 3μm, κινητή φάση A: 25mmole/L, κινητή φάση B: ακετονιτρίλιο, ταχύτητα ροής: 0,3mL/min, κατεργασία δειγμάτων πλάσματος: SPE Oasis HLB	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης και των μεταβολιτών της σε δείγματα πλάσματος ¹⁶⁸
Αλπραζολάμη, φλουνιτραζεπάμη και μεταβολίτες	LC-MS, Αναλυτική στήλη: XBridge Shield 100mm × 2,1mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5μm, κινητή φάση: 20mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH5 /ακετονιτρίλιο=67/33, v/v, ταχύτητα ροής: 0,2mL/min, κατεργασία δειγμάτων πλάσματος: SPE, Oasis HLP 96-well plate	Προσδιορισμός της αλπραζολάμης, της φλουνιτραζεπάμης και των μεταβολιτών τους σε αίμα ¹⁶⁹

Αλπραζολάμη, Κλοναζεπάμη, Νιτραζεπάμη	HPLC-PDA, Αναλυτική στήλη: Novapak C18, 4μm, κινητή φάση: ακετονιτρίλιο-μεθανόλη-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM (pH 3,7) σε αναλογία 30:2:100 (v/v/v), ισοκρατική έκλυση Δείγμα: 1 mL ανθρώπινου πλάσματος, SPE Bond –Elut C18, ροή: 1.5 mL/min, UV ανίχνευση: 240nm, UV: 240nm	Προσδιορισμός της μεθαδόνης, της αλπραζολάμης και του 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine ¹⁷⁰
33 Βενζοδιαζεπίνες	LC-MS, αναλυτική στήλη: Xterra MS, C18, 150mm × 2,1mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5μm, βαθμιδωτή έκλυση, κινητή φάση: μεθανόλη: μυρμηκικό οξύ (~0,006M, pH3), ταχύτητα ροής: 0,2mL/min	Ποσοτικός προσδιορισμός 33 βενζοδιαζεπινών, μεταβολιτών και ουσιών αναλόγων βενζοδιαζεπινών σε δείγμα αίματος ¹⁷¹
30 Βενζοδιαζεπίνες, 5 βαρβιτουρικά, 11 υπνωτικά	LC-MS, αναλυτική στήλη: Symmetry C18, 150mm × 2,1mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5μm, ταχύτητα ροής: 0,2mL/min, βαθμιδωτή έκλυση με κινητή φάση διαλύτης (A): 10mmole/L οξικό αμμώνιο και διαλύτης (B): μεθανόλη, κατεργασία δειγμάτων: SPE Oasis MCX	Μέθοδος ανίχνευσης ηρεμιστικών και υπνωτικών φαρμάκων σε δείγματα ορού ¹⁷²
15 Βενζοδιαζεπίνες	HPLC-UV, αναλυτική στήλη: Xterra C8 RP, 150 × 4,6mm i.d, μέγεθος σωματιδίων 5μm, κινητή φάση: ακετονιτρίλιο (35%) και (65%) 50mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 3,0, ταχύτητα ροής: 1 mL/min, κατεργασία δειγμάτων πλάσματος: SPE C1, UV ανίχνευση: 220nm	Διαχωρισμός και ανάλυση 15 βενζοδιαζεπινών σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος ¹⁷³
22 Βενζοδιαζεπίνες	LC-MS ⁿ , αναλυτική στήλη: Unison UK-C18 150mm × 2mm μέγεθος σωματιδίων 3μm, reversed-phase porous ODS,) με βαθμιδωτή έκλυση και κινητή φάση (A): 10mM υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου που περιέχει 0,1% μυρμηκικό οξύ, (B) μεθανόλη που περιέχει 0.1% μυρμηκικό οξύ, ταχύτητα ροής: 0,25mL/min. Κατεργασία δειγμάτων: SPE, Oasis HLB	Άμεσος προσδιορισμός βενζοδιαζεπινών και των μεταβολιτών τους σε δείγματα ανθρώπινου ορού ¹⁷⁴
43 Βενζοδιαζεπίνες και μεταβολίτες τους	UHPLC-MS, αναλυτική στήλη: UPLC BEH C18 100mm × 2,1mm, μέγεθος σωματιδίων 1,7μm, κινητή φάση: (a) 0,05% υδατικό δ/μα μυρμηκικού οξέος, (b) 0,05% δ/μα μυρμηκικού οξέος σε ακετονιτρίλιο, ταχύτητα ροής: 0,4mL/min, Κατεργασία δειγμάτων: SPE	Ποσοτικοποίηση 43 βενζοδιαζεπινών, ζολπιδέμης και ζοπικλόνης σε δείγμα ανθρώπινου πλάσματος ¹⁷⁵
Βενζοδιαζεπίνες και μεταβολίτες	GC-MS, αναλυτική στήλη: HP-5MS, 30m × 0,25mm, 0,25μm film thickness, Κατεργασία δειγμάτων: LLE με χλωροφόρμιο	Προσδιορισμός βενζοδιαζεπινών και των μεταβολιτών τους σε δείγματα αίματος ¹⁷⁶

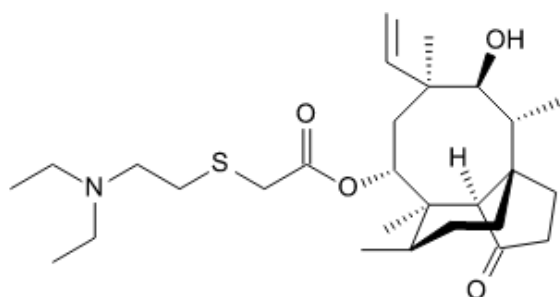
Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ-αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων της αλπραζολάμης σε ασθενείς και τη ρύθμιση της δοσολογίας της. Οι χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στο σχήμα 5.1.



Αλπραζολάμη
Ακριβής μάζα: 308,083 g/mol
Μοριακός τύπος: C₁₇H₁₃ClN₄
Log P= 2,12
pKa: 2,8 ± 1,2



α-υδροξυ αλπραζολάμη
Ακριβής μάζα: 324,768 g/mol
Μοριακός τύπος: C₁₇H₁₄ClN₄O
Log P= 2,12
pKa: 2,8 ± 1,2



Τιαμουλίνη (εσωτερικό πρότυπο)
Ακριβής μάζα: 493,32258 g/mol
Μοριακός τύπος: C₂₈H₄₇NO₄S
Log P= 4,96
pKa: 9,5 ± 0,5

Σχήμα 5.1: Χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (τιαμουλίνη)

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά σχετική με τη χρήση υδροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης για τον προσδιορισμό της αλπραζολάμης σε βιολογικά υγρά. Η τεχνική HILIC αποκτά τα τελευταία χρόνια συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, αποτελεί ιδανική επιλογή σε περιπτώσεις πολικών, υδρόφιλων αναλυτών που με την RP-HPLC εκλούονταν στον νεκρό χρόνο, όπως και στον προσδιορισμό φαρμάκων σε βιολογικά υγρά^{177,178}. Το αυξημένο ποσοστό οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση

δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως ενίσχυση του σήματος και της ευαισθησίας που προσφέρει ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο, με τη μείωση της επιφανειακής τάσης και την αυξημένη διαλυτοποίηση των ουσιών¹⁷⁹, Η χρησιμοποίηση του φασματομέτρου μαζών ως ανιχνευτή προσδίδει, όπως αναφέρθηκε, στη μέθοδο εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα, κάνει εφικτή την ανίχνευση των αναλυτών ακόμα και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις. Καθώς δεν υπήρχαν έως σήμερα κάποιες αναφορές σχετικά με τη συμπεριφορά των αναλυτών σε στήλες τύπου HILIC, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μια ποικιλία κινητών φάσεων.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, γραμμική περιοχή, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ακρίβεια, ειδικότητα), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και παράλληλα μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος. Η μέθοδος θα εφαρμοστεί σε δείγματα πλάσματος ασθενών που λαμβάνουν αλπραζολάμη για την αντιμετώπιση της κρίσεων πανικού, άγχους και κατάθλιψης.

5.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία

5.2.1 Σύστημα LC/ESI-MS

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των αναλυτών είναι της εταιρείας Thermo μοντέλο Finnigan AQA (Manchester, UK). Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης (ESI). Το φασματόμετρο μαζών διαθέτει απλό γραμμικό τετραπολικό αναλυτή μαζών και φωτοπολλαπλασιαστή ως ανιχνευτή των ιόντων. Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρείας SpectraSeries, μοντέλο P100 (SP ThermoSeparation products, UK) και από σύστημα έγχυσης Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής δείγματος 20 μ L. Το άζωτο που χρησιμοποιήθηκε ως αέριο αποδιαλύτωσης και νεφελοποίησης, παράχθηκε από γεννήτρια της εταιρείας Domnick Hunter (Gateshead, England) μοντέλο Nitrox-N2 UHPLC-MS 12E. Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Xcalibur (ver 1.2).

5.2.2 Σύστημα υγροχρωματογραφίας

Η χρωματογραφική στήλη ήταν η XBridge-HILIC, 150 x 2,1 mm, μεγέθους σωματιδίων 3,5μm, 135Å (Water's, Milford, MA, USA). Προστήλη XBridge-HILIC χρησιμοποιήθηκε στο μεγαλύτερο μέρος της εργασίας για να παραταθεί η διάρκεια ζωής της στήλης, διαστάσεων 20mm x 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 3.5μm. Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα 10mM μυρμηκικού αμμωνίου και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 7:93 (v/v). Η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,20 mL min⁻¹. Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και ο χρόνος της ανάλυσης για κάθε ένεση ήταν 10 λεπτά.

5.2.3 Φασματόμετρο Μαζών

Για τον προσδιορισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου επιλέχθηκε η παραγωγή και ανίχνευση των θετικά φορτισμένων μοριακών ιόντων, [M+H]⁺. Οι παράμετροι που αφορούν τη βέλτιστη λειτουργία της πηγής ιοντισμού ήταν οι εξής: τάση τριχοειδούς 3,7kV, θερμοκρασία 230°C, δυναμικό πηγής (AQA max) 20 V. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM).

5.2.4 Προκατεργασία Δείγματος

Ο καθαρισμός των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά του πλάσματος πραγματοποιήθηκε με κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση υδατικού διαλύματος οξικού αμμωνίου 10mM και κατόπιν προσθήκης του tert-βούτυλ-μέθυλ-αιθέρα. Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή φυγοκέντρου της εταιρείας Hettich μοντέλο Universal 32R. Χρησιμοποιήθηκαν μικροφίλτρα GHP Acrodisk® διαστάσεων 13mm και μεγέθους πόρων 0.45μm της εταιρείας Pall life sciences (Ann Arbor, MI, USA) για την διήθηση των δειγμάτων. Η απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό χρησιμοποιώντας φίλτρα νάυλον μεγέθους πόρων 0,45μm.

5.3 Αντιδραστήρια - Διαλύτες

Για την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).
- Μυρμηκικό αμμώνιο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Sigma – Aldrich.
- Νερό καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany)
- Νερό απεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με τη συσκευή Milli-Q Plus (Millipore Ltd.)

Η αλπραζολάμη και ο μεταβολίτης της, ήταν φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Sigma- Aldrich. Το εσωτερικό πρότυπο (τιαμουλίνη) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βαθμού φαρμακευτικής καθαρότητας της εταιρείας Sigma- Aldrich.

5.4 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

5.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Πρότυπα διαλύματα: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 25mg από κάθε δραστική ουσία (αλπραζολάμη και του μεταβολίτη της) μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50mL. Ακολούθησε διάλυση σε λουτρό υπερήχων και αραίωση μέχρι χαραγής με μεθανόλη ώστε να παρασκευαστεί για κάθε αναλύτη διάλυμα συγκέντρωσης 500μg mL⁻¹.

Πρότυπο διάλυμα εσωτερικού προτύπου: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 25 mg τιαμουλίνης (εσωτερικό πρότυπο) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50mL. Ακολούθησε διάλυση σε λουτρό υπερήχων και αραίωση μέχρι χαραγής με μεθανόλη ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα συγκέντρωσης 500μg mL⁻¹, από το οποίο ύστερα από σειρά αραιώσεων, προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 2500 ng mL⁻¹.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αμέσως μετά την παρασκευή τους μεταφέρονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια και φυλάσσονται στους -20°C όπου παραμένουν σταθερά για 2 μήνες τουλάχιστον.

5.4.2 Διαλύματα εργασίας

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL σε νερό παρασκευάστηκαν τα μικτά πρότυπα διαλύματα εργασίας που περιείχαν όλες τις αναλυόμενες ουσίες. Τα μικτά πρότυπα διαλύματα εργασίας που προέκυψαν είχαν τελικές συγκεντρώσεις από 2,5ng mL⁻¹ έως 250ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη και 2,5 ng mL⁻¹ έως 50ng mL⁻¹ για τον μεταβολίτη της, α-υδροξυ-αλπραζολάμη. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν κάθε εβδομάδα και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Οι συγκεντρώσεις των μικτών διαλυμάτων εργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2: Μικτά διαλύματα εργασίας		
α/α	Αλπραζολάμη	α-υδροξυ αλπραζολάμη
	Συγκέντρωση ngmL⁻¹	
1	2,5	2,5
2	5	5
3	10	10
4	50	25
5	100	50
6	150	--
7	250	--

Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας (πίνακας 5-2) δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή των συγκεντρώσεών τους, έτσι ώστε ο εμβολιασμός του πλάσματος να γίνεται σε κάθε περίπτωση με ίση ποσότητα προτύπου διαλύματος, ώστε όλα τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος να περιέχουν το ίδιο ποσοστό διαλύτη, στο οποίο είναι διαλυμένοι οι αναλύτες, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος για τις καμπύλες βαθμονόμησης

Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών και την περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου, χρησιμοποιούνται εμβολιασμένα δείγματα

πλάσματος καθώς και δείγματα ελέγχου. Τα πρότυπα δείγματα για την κάθε καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των αναλυτών να κυμαίνεται από 2,5 έως 250ng mL⁻¹ και από 2,5 έως 50ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη αντίστοιχα. Αυτό επιτυγχάνεται με προσθήκη όγκου 50μL από κατάλληλο διάλυμα εργασίας σε 50 μL πλάσματος. Κάθε ένα από αυτά τα διαλύματα περιέχει τιαμουλίνη (εσωτερικό πρότυπο) σε συγκέντρωση 250ng mL⁻¹. Στον πίνακα 5.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται αναλυτικά ο τρόπος παρασκευής των πρότυπων δειγμάτων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη στα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος.

Εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (Quality Control samples)

Για την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 2,5, 50 και 250ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη και δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 2,5 και 50ng mL⁻¹ για τον μεταβολίτη της. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν από διαφορετικές ζυγίζεις προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών.

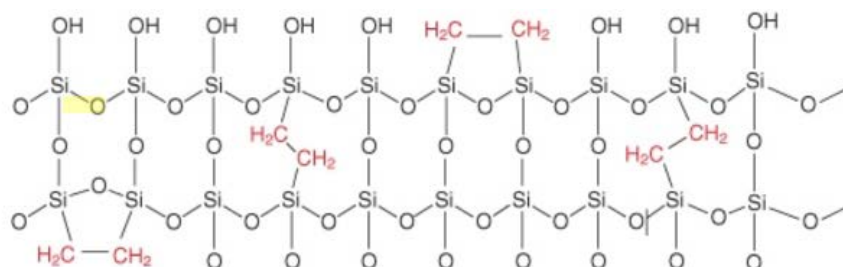
Πίνακας 5.3: Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ-αλπραζολάμης						
Συγκέντρωση δ/τος εργασίας (ng mL ⁻¹)		Όγκος διαλύματος εργασίας (μL)	Όγκος δ/τος IS C=2500 ng mL ⁻¹ (μL)	Όγκος πλάσματος (μL)	Συγκέντρωση Στο πλάσμα (ng mL ⁻¹)	
Αλπραζολάμη	α-υδροξυ-αλπραζολάμη				Αλπραζολάμη	α-υδροξυ αλπραζολάμη
2,5	2,5	50	100	50	2,5	2,5
5	5	50	100	50	5	5
10	10	50	100	50	10	10
50	25	50	100	50	50	25
100	50	50	100	50	100	50
150	--	50	100	50	150	--
250	--	50	100	50	250	--

5.5 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC

5.5.1 Επιλογή στατικής φάσης

Στη χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) χρησιμοποιούνται υδρόφιλες στατικές φάσεις, ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, ενώ ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται δυαδικά συστήματα διαλυτών ο ένας από τους οποίους είναι το ακετονιτρίλιο και ο άλλος διαλύτης το νερό (ισχυρός διαλύτης) σε περιεκτικότητα μέχρι 30% v/v. Ο μηχανισμός χρωματογραφικής συγκράτησης στη HILIC είναι πολύπλοκος και βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι πρόκειται για ένα μηχανισμό συγκράτησης που περιλαμβάνει μηχανισμό κατανομής των αναλυτών ανάμεσα στην κινητή φάση και σε μια υδατική στιβάδα ακινητοποιημένη στη στατική φάση, μηχανισμό προσρόφησης στη στατική και την κινητή φάση, μηχανισμό ιονανταλλαγής στην περίπτωση στατικών φάσεων που φέρουν ιοντισμένες ομάδες αλλά και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Η έκταση με την οποία οι επιμέρους μηχανισμοί ελέγχουν τη συνολική συγκράτηση εξαρτάται από τη φύση της στατικής φάσης, τη χημική δομή των αναλυτών καθώς επίσης και τη σύσταση της κινητής φάσης.

Ένας αξιόλογος αριθμός στατικών φάσεων χρωματογραφίας HILIC έχει παρασκευαστεί μέχρι σήμερα γεγονός που συνέβαλε στη σημαντική αύξηση των εφαρμογών της τεχνικής. Στη συγκεκριμένη εργασία η αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από σωματίδια μεγέθους 3,5μm (σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.2: Σχηματικό διάγραμμα του πληρωτικού υλικού της στήλης BEH - XBridge®- HILIC

Οι εσωτερικές γέφυρες αιθυλενίου που συνδέουν τα μονομερή bis (triethoxysilyl) ethane στα σωματίδια BEH, καθιστούν αυτό το πληρωτικό υλικό

ανθεκτικό σε κινητές φάσεις με ακραίες τιμές pH, επιπλέον οι γέφυρες αιθυλενίου μειώνουν την οξύτητα των ομάδων σιλανόλης. Σχετικά με τις στήλες BEH HILIC ο χρωματογραφικός μηχανισμός συγκράτησης περιλαμβάνει φαινόμενα προσρόφησης, κατανομής και δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις ανάλογες με αυτές που λαμβάνουν χώρα σε στήλες πηκτής πυριτίας.

5.5.2 Επιλογή κινητής φάσης

Με σκοπό να διερευνηθεί η συμπεριφορά των αναλυτών στην αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στη συγκράτηση των αναλυτών και στο μετρούμενο σήμα από το φασματόμετρο μαζών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλοταν ένας παράγοντας ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να προσδιοριστούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Για την ανάπτυξη ανθεκτικών μεθόδων με χρωματογραφία HILIC, είναι σημαντική η κατανόηση του κυρίαρχου μηχανισμού που διέπει το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επομένως για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης ελήφθησαν υπόψη τα ακόλουθα:

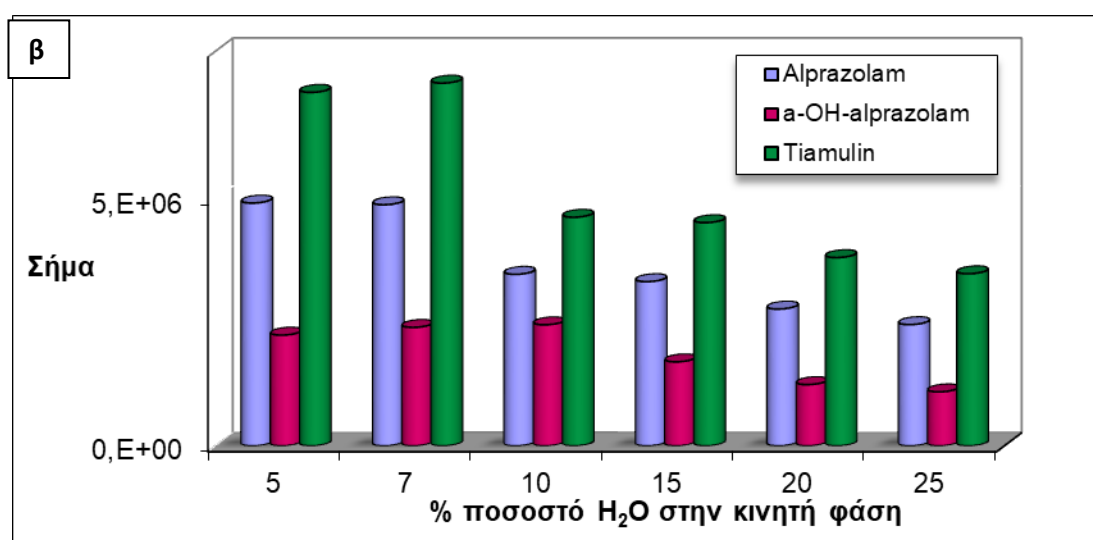
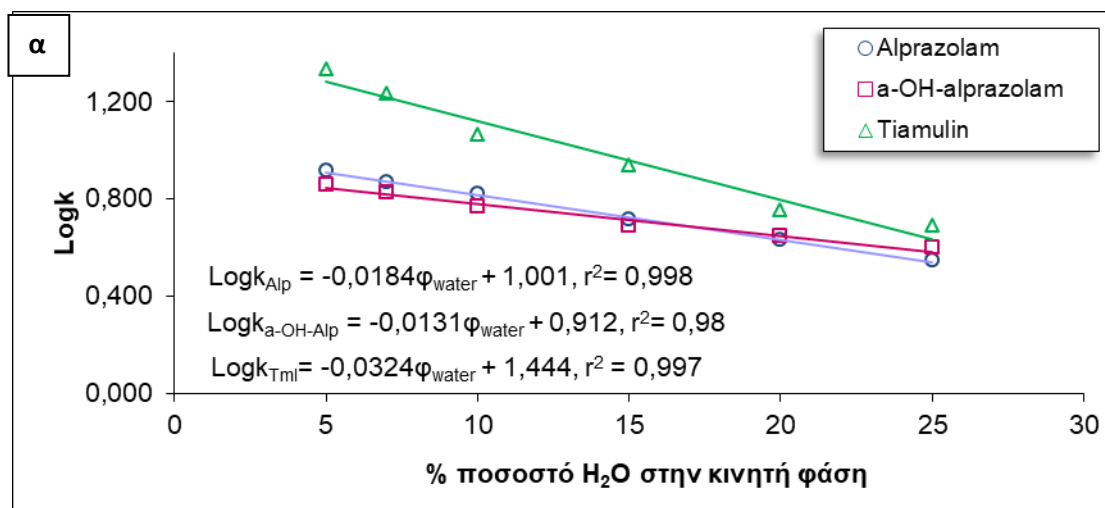
- οι αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο να μην εκκλύονται μαζί με κάποιο από τα συστατικά του πλάσματος που πιθανόν εμφανίζει παρόμοια ιόντα με αυτούς, αλλά και ο χρόνος έκλουσής τους να μην είναι πολύ μεγάλος.
- Η παρουσία νερού, ευνοεί τη διάσταση των ομάδων της στήλης Xbridge HILIC, κρίθηκε επομένως απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος (μυρμηκικού αμμωνίου, οξικού αμμωνίου) στη συγκράτηση των αναλυτών.
- Η χρήση υψηλού ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, λόγω της χρωματογραφίας HILIC, αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του ιοντισμού των αναλυτών με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού

Ως οργανικός διαλύτης για τις μελέτες επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο, που θεωρείται ότι είναι ο οργανικός διαλύτης επιλογής στη χρωματογραφία αυτού του είδους, καθώς στερεί τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δεν ανταγωνίζεται τους αναλύτες για την αλληλεπίδραση τους με το πληρωτικό

υλικό. Επιπλέον η μέτρια τιμή εκλουστικής ισχύος του ακετονιτριλίου δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης και χρωματογραφικού διαχωρισμού μεγάλου αριθμού αναλυτών. Όπως έχει αναφερθεί σε βιβλιογραφίες οι κινητές φάσεις στη HILIC μπορούν να περιέχουν 40-97% ακετονιτρίλιο σε νερό, ή και κάποιο πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το νερό είναι γενικά ο διαλύτης με την ισχυρότερη εκλουστική ισχύ στη HILIC και έτσι μεγαλύτερο ποσοστό του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση αυξάνει τη συγκράτηση των αναλυτών. Για να έχουμε αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στη HILIC πρέπει η κινητή φάση να περιέχει τουλάχιστον 3% ποσοστό υδατικής φάσης (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα σε νερό) ώστε να διασφαλίζεται η επαρκής ενυδάτωση των σωματιδίων της στατικής φάσης.

Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό του νερού, ϕ_{water} , που είναι το ισχυρότερο εκλουστικό μέσο στην υδρόφιλη χρωματογραφία, κυμάνθηκε από 5 έως 25 %, ενώ η ιοντική ισχύς του μυρμηκικού αμμωνίου διατηρήθηκε σταθερή στα 0,07 mmoles μυρμηκικού αμμωνίου (στα 100 mL κινητής φάσης).

Στο σχήμα 5.3(α) παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του $\log k'$ για τους αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο σε σχέση με το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση.



Σχήμα 5.3: α) Γραφική παράσταση $\log k'$ - ποσοστό νερού στην κινητή φάση, **β)** Γραφική παράσταση του σήματος στο φασματομέτρο μαζών σε σχέση με το επί τοις εκατό ποσοστό νερού στην κινητή φάση.

Το νερό αποτελεί το διαλύτη με την ισχυρότερη εκλουστική ισχύ για τη HILIC. Όπως είναι φανερό από το σχήμα 5.3(α), η αύξηση του ποσοστού του νερού επιφέρει μείωση του χρόνου συγκράτησης όλων των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (τιαμουλίνη). Ο βαθμός ιοντισμού των αναλυτών στην τιμή pH 5,5 της κινητής φάσης υπολογίσθηκε μέσω του λογισμικού ADME Boxes (Πίνακας 5.4). Σε όλες τις περιπτώσεις η α-υδροξυ αλπραζολάμη και η αλπραζολάμη που είναι ουδέτερες σε ποσοστό 100% στο pH 5,5 της κινητής φάσης εκλύονται πρώτες, και ακολουθεί η έκλυση της τιαμουλίνης που είναι 100% ιοντισμένη (θετικά φορτισμένη) στις περισσότερες κινητές φάσεις που μελετήθηκαν. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.3α, υπάρχει γραμμική σχέση

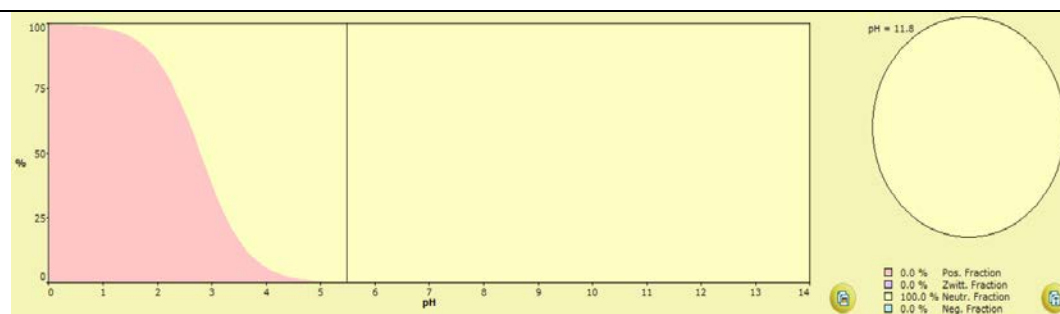
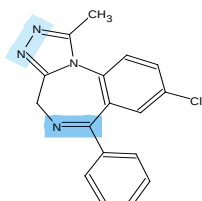
ανάμεσα στις τιμή $\log k'$ των αναλυτών και της τιαμουλίνης σε σχέση με το ποσοστό νερού της κινητής φάσης (φ_{water}). Η γραμμικότητα που παρατηρείται επιβεβαιώνει πειραματικά πως για την κατακράτηση αυτών των δύο αναλυτών στη στήλη παίζουν ρόλο φαινόμενα κατανομής.

Στο σχήμα 5.3β παρουσιάζεται η επίδραση του % ποσοστού του νερού στο σήμα του φασματομέτρου μαζών για κάθε αναλύτη. Αύξηση του % ποσοστού του νερού της κινητής φάσης προκαλεί, όπως ήταν αναμενόμενο, ελάττωση του σήματος των μετρούμενων ιόντων στο φασματομέτρο μαζών. Η βέλτιστη τιμή σήματος επιτυγχάνεται όταν το νερό αποτελεί το 7% σε αναλογία στην κινητή φάση. Στην ίδια τιμή οι αναλύτες εμφανίζουν ικανοποιητική συγκράτηση γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ποσοστό για την υπόλοιπη πορεία της ανάλυσης.

Πίνακας 5.4: Προβλεπόμενες τιμές pK_a και ιοντισμός της αλπραζολάμης, της α -υδροξυ αλπραζολάμης και της τιαμουλίνης από το πρόγραμμα ADME Boxes.

Αλπραζολάμη

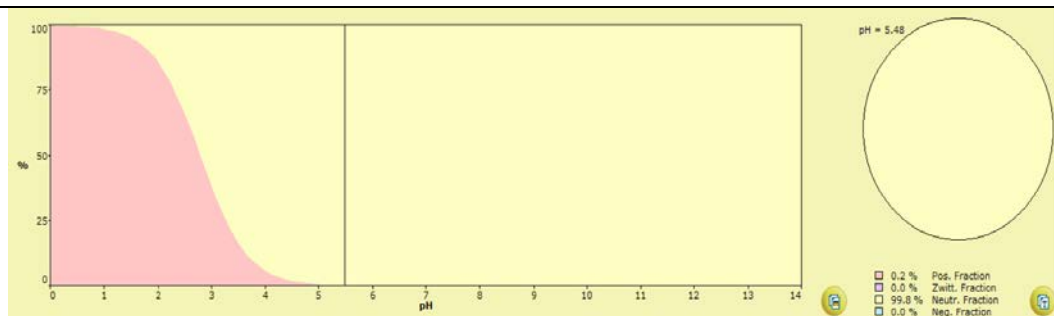
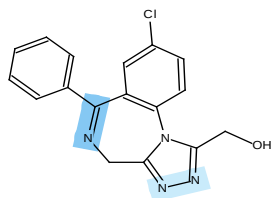
$pK_a(\text{βασικό}) = 2,8 \pm 1,2$, $\text{LogD}_{5.5} = 3,4$



Πίνακας 5.4 (συνέχεια)

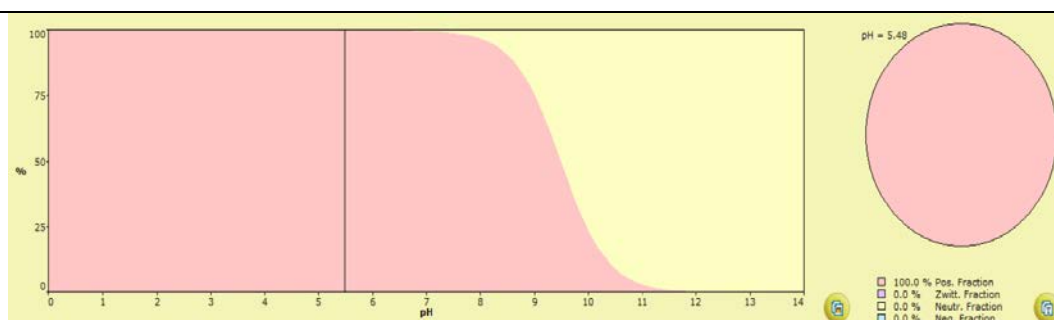
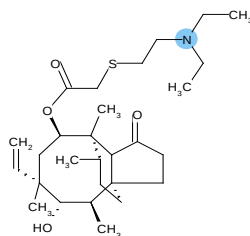
α-υδροξυ αλπραζολάμη

$pK_a(\text{βασικό}) = 2,8 \pm 1,2$, $\text{LogD}_{5.5} = 2,9$



Τιαμουλίνη

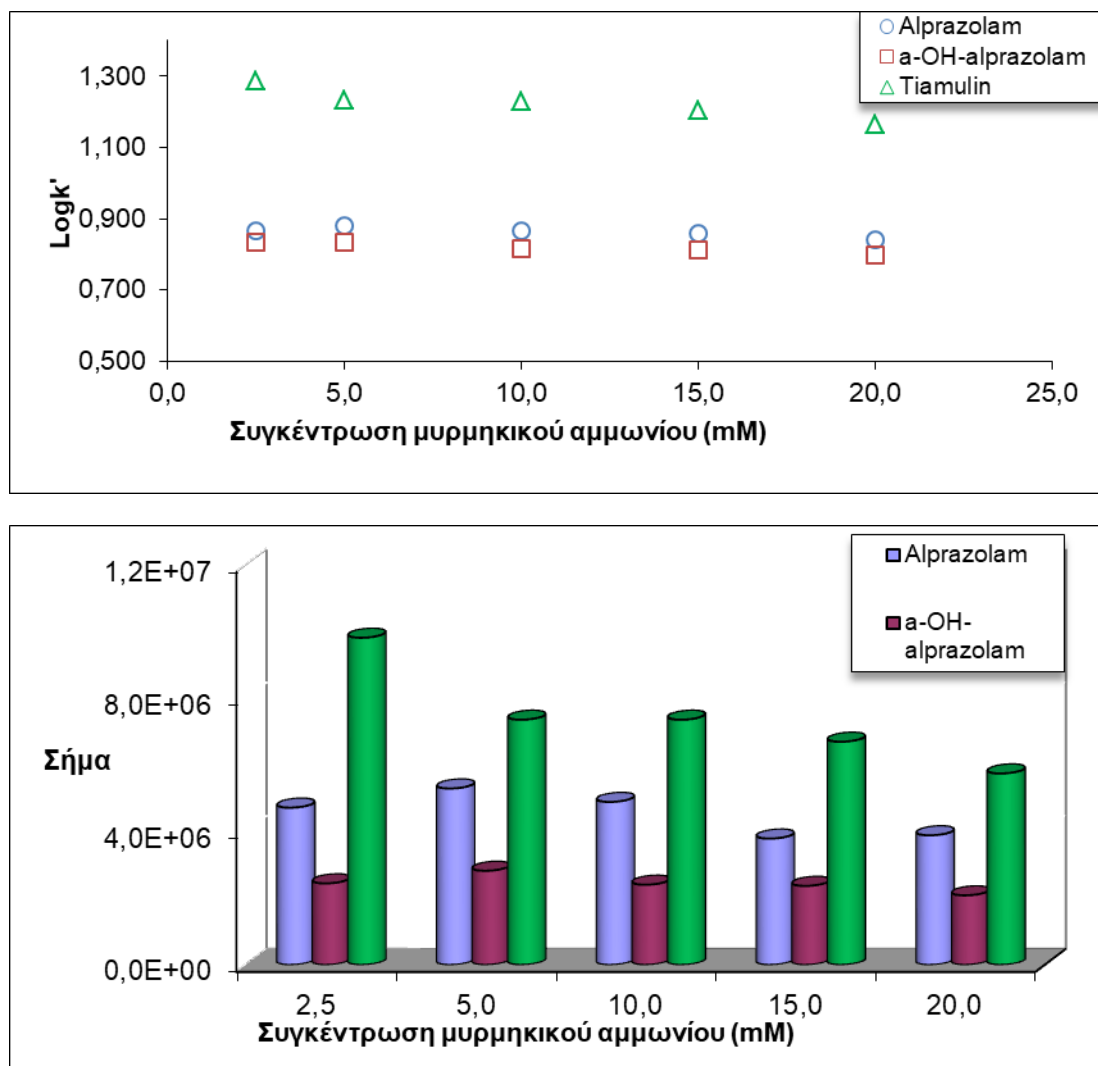
$pK_a(\text{βασικό}) = 9,5 \pm 0,5$, $\text{LogD}_{5.5} = 2,9$



Η συγκράτηση των αναλυτών στη χρωματογραφία HILIC επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ της κινητής φάσης που καθορίζεται από το είδος και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος που. Συνήθως, σε συστήματα HILIC-ESI/MS χρησιμοποιούνται πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα οξικού ή μυρμηκικού αμμωνίου για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος. Η συγκέντρωση αυτών των ρυθμιστικών διαλυμάτων παίζει καθοριστικό ρόλο στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης. Στην περίπτωση ηλεκτροστατικών απώσεων η αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος ενισχύει τη συγκράτηση, ενώ στην περίπτωση ηλεκτροστατικών έλξεων η αύξηση της συγκέντρωσης μειώνει τη συγκράτηση των αναλυτών.

Οι μελέτες της επίδρασης της συγκέντρωσης του άλατος στη συγκράτηση πραγματοποιήθηκε σε ποσοστό νερού 7% v/v. Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση του μυρμηκικού αμμωνίου και του οξικού αμμωνίου στη χρωματογραφία. Επιλέχθηκε τελικά το μυρμηκικό αμμώνιο ως ιδανικό ρυθμιστικό διάλυμα στην κινητή φάση γιατί προκαλούσε σημαντική βελτίωση των χρωματογραφικών κορυφών. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης, σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5 έως 25 mM, ενώ το ποσοστό του νερού παρέμενε σταθερό στο βέλτιστο 7%.

Στο σχήμα 5.4α παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στις τιμές $\log k$ των αναλυτών. Η συγκράτηση των αναλυτών, αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη, δε φαίνεται να επηρεάζεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση. Αντίθετα, η μικρή ελάττωση του παράγοντα χωρητικότητας της τιαμουλίνης (ISTD) με αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου οφείλεται πιθανώς στην ελάττωση των ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του θετικά φορτισμένου εσωτερικού προτύπου και των ιοντισμένων ομάδων σιλανόλης της στατικής φάσης στη στήλη BEH HILIC.



Σχήμα 5.4: α) Γραφική παράσταση $\log k'$ - συγκέντρωσης HCOONH_4 (mM), β) Γραφική παράσταση του σήματος στο φασματόμετρο μαζών σε σχέση με τη συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου (mM)

Στο σχήμα 5.4 β παρατηρείται μικρή μείωση του σήματος στο φασματόμετρο μαζών με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση, πιθανόν λόγω ιοντικής καταστολής. Η βέλτιστη συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου που επιλέχθηκε για την παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι είναι 10mM.

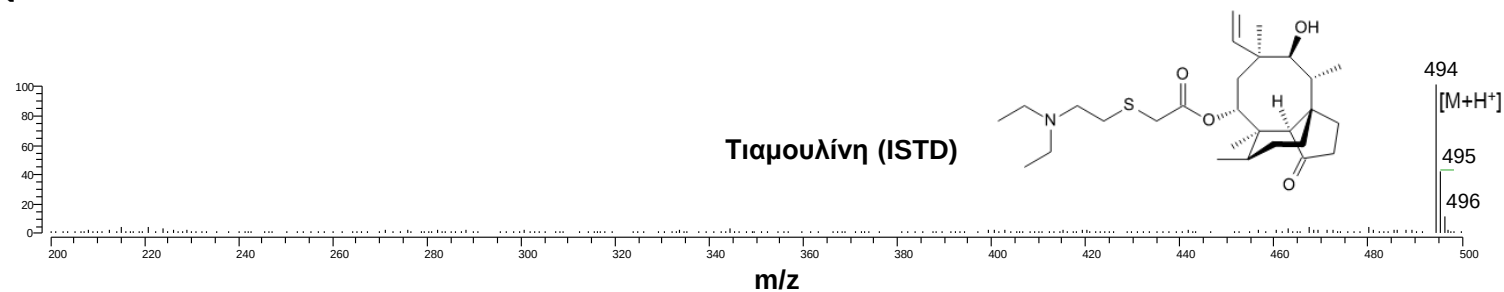
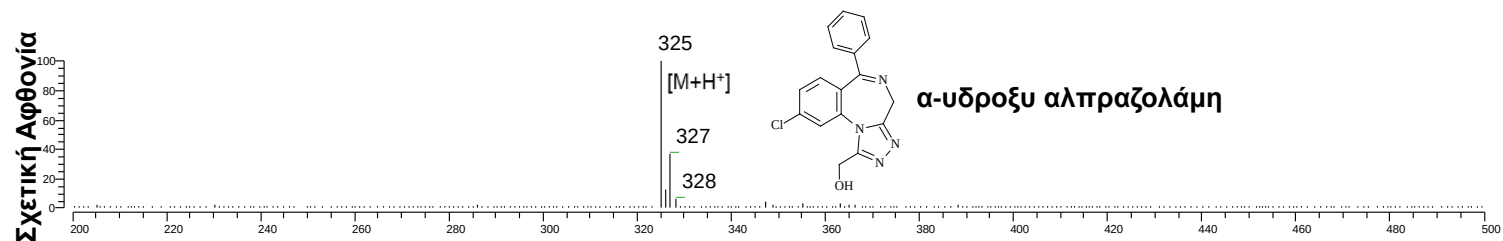
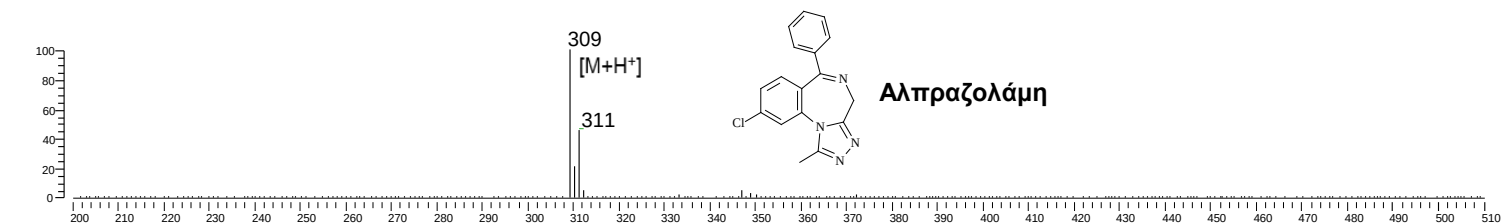
5.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου μαζών. Για τις μελέτες αυτές εισήχθησαν με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών διαλύματα συγκέντρωσης $25\mu\text{g mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και τον μεταβολίτη της, και διάλυμα συγκέντρωσης $10\mu\text{g mL}^{-1}$ για την τιαμουλίνη. Για την απαραίτητη αραιώση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση και η ροή εισαγωγής τους στο φασματόμετρο μαζών ήταν $50\mu\text{L min}^{-1}$. Για τον ιοντισμό των αναλυτών στο φασματόμετρο μαζών επιλέχθηκε η τεχνική του ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης (ESI). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το είδος του ιοντισμού (θετικός ή αρνητικός ιοντισμός), η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού, η τάση του τριχοειδούς (capillary voltage), και το δυναμικό της πηγής ιοντισμού (cone voltage, AQA_{max}).

Η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίστηκε στους 230°C , στη μικρότερη δηλαδή δυνατή τιμή που αντιστοιχεί σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης $0,20\text{mL min}^{-1}$ έτσι, ώστε να αποφευχθεί πιθανή θερμοδιάσπαση των αναλυτών. Βρέθηκε ότι η τάση του τριχοειδούς δεν επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των αναλυτών στο φασματογράφο μαζών και έτσι ρυθμίστηκε στην τιμή $3,7\text{kV}$. Ως τελευταίος παράγοντας μελετήθηκε η συμπεριφορά των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου σε διάφορες τιμές τάσης της πηγής (AQA_{max}) τόσο σε ESI(+) σε ESI(-). Αρχικά δοκιμάστηκαν μετρήσεις με θετικό και αρνητικό ιοντισμό των αναλυτών παρακολουθώντας σε κάθε περίπτωση τα πρωτονιομένα ή αποπρωτονιωμένα μοριακά ιόντα, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ότι ο λόγος σήματος προς θόρυβο ήταν ιδιαίτερα αυξημένος στην περίπτωση του θετικού ιοντισμού των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου. Γι' αυτό το λόγο, ως βέλτιστη τεχνική παρακολούθησης επιλέχθηκε η τεχνική του θετικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για όλους τους αναλύτες.

Με βάση τις παραπάνω συνθήκες, ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των αναλυτών μεταβάλλοντας την τάση της πηγής ιοντισμού. Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη αφθονία των θετικά φορτισμένων ιόντων των αναλυτών εμφανίστηκε

όταν το δυναμικό της πηγής ρυθμίστηκε στα 20V, καθώς προσπάθεια αύξησης της τάσης στα 30V επέφερε αύξηση της θραυσματοποίησης και συνεπακόλουθη μείωση της αφθονίας των μοριακών ιόντων. Ως εκ τούτου, η τάση της πηγής ιοντισμού ρυθμίστηκε στην τιμή 20V, όπου τα μοριακά ιόντα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αφθονία και δεν παρατηρείται σχηματισμός θυγατρικών ιόντων. Τα φάσματα μαζών των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στα σχήματα 5.5.



Σχήμα 5.5: ESI(+) φάσματα μαζών συγκέντρωσης 25μg mL⁻¹ για την αλπραζολάμη και τον μεταβολίτη της και 10μg mL⁻¹ για την τιαμουλίνη, σε κινητή φάση 7% 10mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου pH=5, σε βέλτιστη τάση πηγής 20V. Παράμετροι φασματομέτρου μάζων: θερμοκρασία πηγής 230°C, τάση τριχοειδούς 3,7kV, ροή 50μL min⁻¹

Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζεται η μέθοδος SIM που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση της τεχνικής παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM), η οποία εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

Πίνακας 5.5: Μέθοδος μέτρησης με την τεχνική παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης, της α-OH-αλπραζολάμης και της τιαμουλίνης με LC-ESI/MS				
Αναλύτης	Πολικότητα	Τάση πηγής (V)/τάση τριχοειδούς (kV)	Επιλεγμένα ιόντα (m/z)	Mass Span
Αλπραζολάμη	+ve	20/3,7	[M+H] ⁺ : 309	0,20
α-OH-αλπραζολάμη	+ve	20/3,7	[M+H] ⁺ : 325	0,20
Τιαμουλίνη	+ve	20/3,7	[M+H] ⁺ : 494	0,20

Συγκεκριμένα, η ανίχνευση της αλπραζολάμης γίνεται με παρακολούθηση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος, [M+H]⁺, σε τιμή m/z 309 και της α-OH-αλπραζολάμης με παρακολούθηση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος, [M+H]⁺ σε τιμή m/z 325. Για το εσωτερικό πρότυπο ως ιόν παρακολούθησης επιλέχθηκε το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν [M+H]⁺, σε τιμή m/z 494. Η παρακολούθηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστά παράθυρα επιλεγμένων ιόντων (SIM) σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με την επικρατέστερη κορυφή αυτών με σημαντικά πλεονεκτήματα όπως ενίσχυση του σήματος και της ευαισθησίας.

5.7 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC-ESI/MS

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης τόσο του υγροχρωματογραφικού συστήματος, όσο και του φασματομέτρου μαζών καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών:

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης 10 λεπτά, ο βρόχος εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μL.

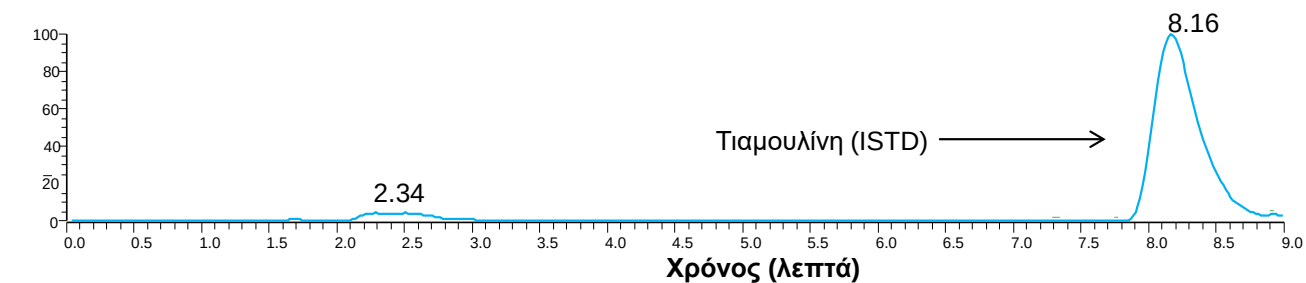
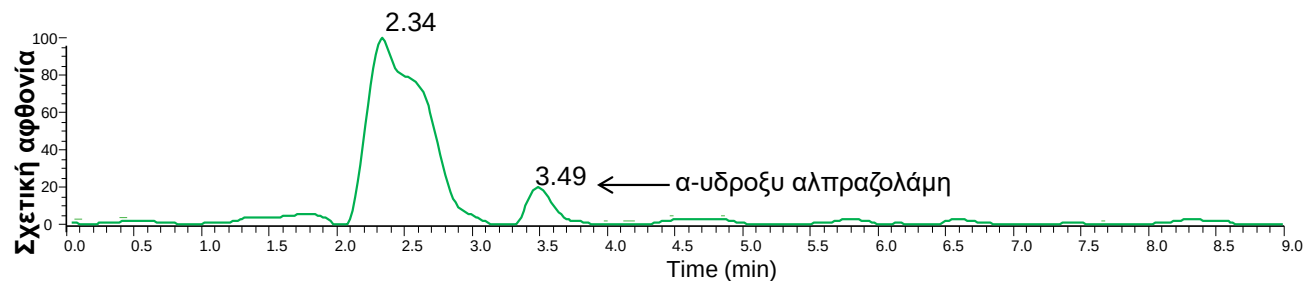
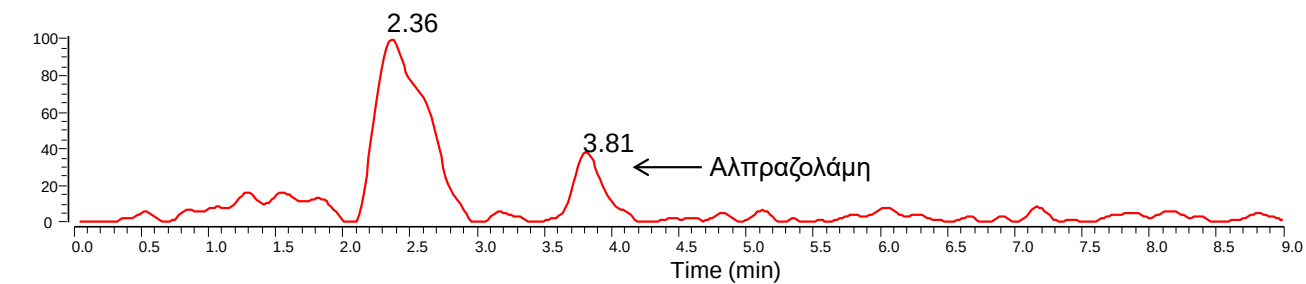
Στατική Φάση: Χρωματογραφική στήλη HILIC-BEH, 150 x 2,1, μεγέθους σωματιδίων 3,5μm.

Κινητή Φάση: Υδατικό διάλυμα 10mM μυρμηκικού αμμωνίου σε ακετονιτρίλιο σε αναλογία 7:93, v/v.

Ταχύτητα ροής: 0,20mL min⁻¹

Ανιχνευτής: Φασματόμετρο μαζών ρυθμισμένο να μετρά με την τεχνική SIM τα μοριακά ιόντα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που παράγονται με θετικό ιονισμό και μηχανισμό ηλεκτροδιάχυσης. Η πηγή ιοντισμού λειτουργούσε σε θερμοκρασία 230°C , η τάση (AQAmx) της πηγής ρυθμίστηκε στα 20V, ενώ το δυναμικό του τριχοειδούς στα 3,7kV.

Στο σχήμα 5.6 απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν υπό της βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC/MS μετά από ανάλυση 2,5ng mL⁻¹ των αναλυτών (LOQ επίπεδο) και 250ng mL⁻¹ εσωτερικού προτύπου. Οι χρόνοι έκλουσης για την αλπραζολάμη, την α-υδροξυ-αλπραζολάμη και την τιαμουλίνη (εσωτερικό πρότυπο) ήταν 3,8, 3,5 και 8,2 λεπτά, αντίστοιχα. Το χρωματογράφημα ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS με την τεχνική Παρακολούθησης Προεπιλεγμένου Ιόντος (SIM).



Σχήμα 5.6: Τυπικό χρωματογράφημα μαζών συγκέντρωσης $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και τον μεταβολίτη της (LOQ level) και 2500ng mL^{-1} για την τιαμουλίνη (ISTD), οι χρόνοι έκλουσης για την α-υδροξυ-αλπραζολάμη, την αλπραζολάμη, και το εσωτερικό πρότυπο είναι 3,5, 3,8, 8,2 λεπτά, αντίστοιχα. Χρωματογραφικές συνθήκες: υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με χρωματογραφική στήλη Xbridge HILIC BEH, κινητή φάση μίγμα ακετονιτριλίου με 7% 10 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου (pH = 5), ταχύτητα ροής $0,2\text{ mL min}^{-1}$.

5.8 Εφαρμογή της μεθόδου HILIC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών σε ανθρώπινο πλάσμα.

5.8.1 Ανθρώπινο πλάσμα

Το αίμα είναι ένα ιξώδες υγρό που αποτελείται από κύτταρα και πλάσμα και είναι ίσο με το 1/13 του βάρους του σώματος. Τα κύτταρα που αποτελούν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, διακρίνονται σε:

- θρομβοκύτταρα, εμπύρηνα κύτταρα, προερχόμενα από λεμφοκύτταρα,
- αιμοπετάλια, ατρακτοειδή θραύσματα κυττάρων του μυελού των οστών που συμβάλουν στην πήξη του αίματος,
- ερυθροκύτταρα, που παράγονται από τον ερυθρό μυελό των οστών και διακινούν την αιμοσφαιρίνη, η οποία με τη σειρά της μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και
- λευκά αιμοσφαίρια, κοκκιώδη και ακοκκιώδη, τα οποία κατά κύριο λόγο προστατεύουν τον οργανισμό από τους μικροοργανισμούς, σχηματίζοντας αντισώματα και ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα.

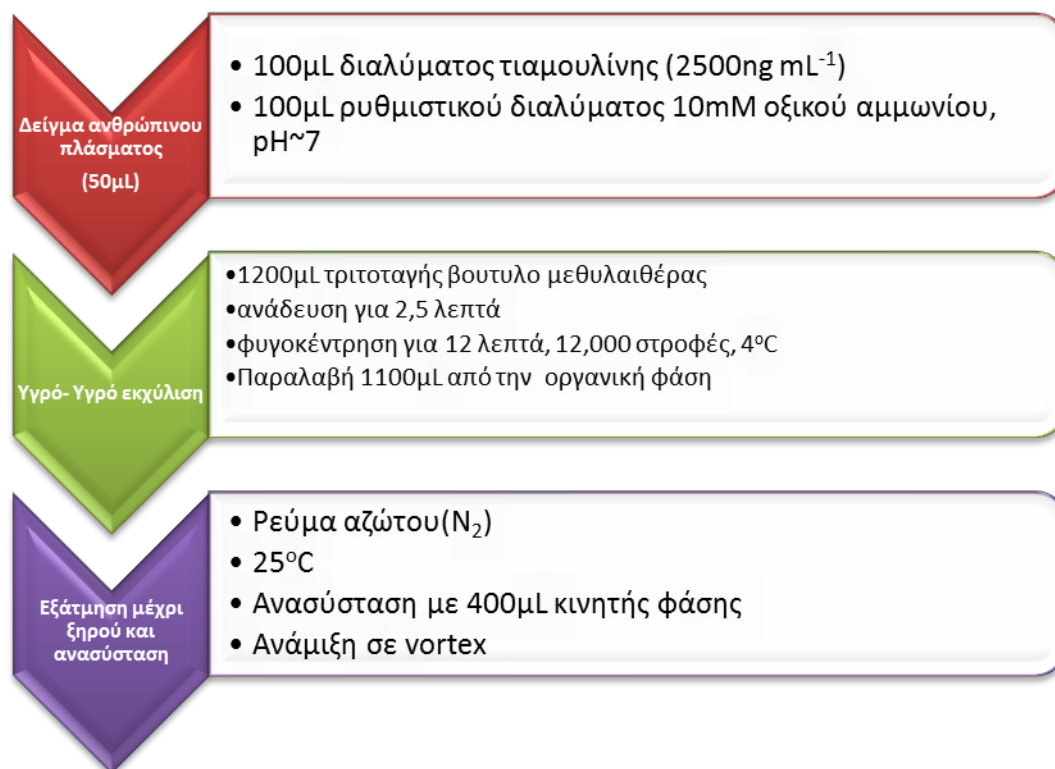
Το πλάσμα αποτελεί μέρος του εξωκυττάριου υγρού του σώματος. Είναι το υπερκείμενο κιτρινωπό υγρό, που λαμβάνεται μετά από προσθήκη αντιπηκτικού και φυγοκέντρηση του αίματος, ώστε να καθιζήσουν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Η ανάγκη εύρεσης συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των αναλυτών στο πλάσμα γίνεται κατανοητή αν αναλογιστεί κανείς την πολυπλοκότητα των συστατικών που το απαρτίζουν. Πολυάριθμες ενώσεις όπως πρωτεΐνες (λευκωματίνες, ινωδογόνο, σφαιρίνες), ορμόνες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, θρεπτικές ουσίες είναι πιθανό να παρεμποδίζουν την αναλυτική διαδικασία. Στην παρούσα έρευνα έγινε επιτυχής προσδιορισμός των ενώσεων παρουσία των υπόλοιπων συστατικών του πλάσματος χωρίς να παρουσιάζονται σημαντικές παρεμποδίσεις.

5.8.2 Προετοιμασία βιολογικού δείγματος

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα για την επιλογή της μεθόδου κατεργασίας δείγματος. Διερευνήθηκαν διάφοροι τρόποι κατεργασίας του βιολογικού δείγματος, όπως η τεχνική της εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), όπου

χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες OASIS HLB 30mg /1mL αλλά δεν έδωσαν ικανοποιητική ανάκτηση για τους περισσότερους αναλύτες. Επίσης επιχειρήθηκε η άμεση ένεση μετά από αραιώση με κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και διήθηση αλλά παρατηρήθηκε μειωμένη ανάκτηση των αναλυτών κυρίως λόγω της επίδρασης του υλικού μήτρας (ion suppression) και ασυμμετρία στη μορφή των χρωματογραφικών κορυφών. Επιλέχθηκε τελικά η τεχνική της εκχύλισης υγρού-υγρού, όπου χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση και μίγματα αυτών μεταξύ των οποίων διαιθυλαιθέρας, οξικός αιθυλεστέρας, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο και τριτοταγής βουτυλο μεθυλαιθέρας.

Στο σχήμα 5.7 απεικονίζεται σχηματικά η πορεία κατεργασίας των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος.



Σχήμα 5.7: Πορεία κατεργασίας εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος για την ανίχνευση της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της στο σύστημα LC-ESI/MS

Αναλυτικά η πορεία της απομόνωσης των αναλυτών από το βιολογικό δείγμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Σε φιαλίδιο erppendorf των 2 mL τοποθετήθηκαν 50μL ανθρώπινου πλάσματος και ακολούθως προστέθηκαν 100μL εσωτερικού προτύπου (2500ng mL^{-1}) και 100μL υδατικού διαλύματος οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10mM. Το μίγμα

αναδεύτηκε και υπεβλήθη σε υγρό-υγρό εκχύλιση με την προσθήκη 1200 μL οργανικού διαλύτη (τριτοταγή βουτυλο-μεθυλαιθέρα). Ακολουθεί ανάδευση για 2,5 λεπτά και φυγοκέντρωση για 12 λεπτά στις 12,000 στροφές και στους 4°C. Ακριβώς 1100 μL από το υπερκείμενο διάλυμα εξατμίζονται μέχρι ξηρού με διοχέτευση ρεύματος αζώτου. Η ανασύσταση του διαλύματος πραγματοποιείται με 400 μL κινητής φάσης και ακολουθεί διήθηση με φίλτρα σύριγγας GHP Acrodisk® διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων 0,45 μm πριν από την ανάλυση στο σύστημα LC-ESI/MS.

5.9 Αξιολόγηση της μεθόδου

5.9.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας

Κατά την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Κάθε καμπύλη βαθμονόμησης αποτελείται από σημεία που προκύπτουν από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος με εύρος συγκεντρώσεων για την αλπραζολάμη από 2,5 έως 250 ng mL^{-1} και για τον μεταβολίτη της αλπραζολάμης από 2,5 έως 250 ng mL^{-1} . Ως απόκριση λαμβάνεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

5.9.1.2 Θεωρητική προσέγγιση

Η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων σε έναν ποσοτικό προσδιορισμό προϋποθέτει τη χρήση μιας ορθής καμπύλης βαθμονόμησης η οποία εκφράζεται από συγκεκριμένη εξίσωση συµμεταβολής και μέσω της οποίας καθορίζεται η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη και της αναλυτικής απόκρισης. Στην απλούστερη περίπτωση η εξίσωση παλινδρόμησης αποτελεί μια γραμμική εξίσωση της μορφής $y = \alpha + \beta x$ η οποία ισχύει για μία δυναμικά ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (γραμμική περιοχή), όπου y : η απόκριση του αναλύτη (ή η σχετική απόκριση του αναλύτη ως προς την απόκριση του εσωτερικού προτύπου), x η συγκέντρωση του αναλύτη, α η τομή στον άξονα των y και β η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν το απλό γραμμικό μοντέλο είναι επαρκές, απαιτείται έλεγχος της ομοσκεδαστικότητας με μελέτη του διαγράμματος των υπολοίπων. Με τον όρο υπόλοιπο εννοείται η διαφορά ανάμεσα στη μετρούμενη απόκριση ($Y_{\text{πειραματική}}$) και στη θεωρητική απόκριση η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση παλινδρόμησης ($Y_{\text{θεωρητική}}$). Όταν τα υπόλοιπα έχουν την ίδια διασπορά σε όλα τα σημεία της καμπύλης βαθμονόμησης τότε χαρακτηρίζεται από ομοσκεδαστικότητα. Παράλληλα με τον έλεγχο στα διαγράμματα των υπολοίπων μπορεί να εφαρμοστεί και η δοκιμασία F (F-test). Η δοκιμασία F πραγματοποιείται υπολογίζοντας το λόγο της διακύμανσης των αποκρίσεων του σημείου υψηλότερης συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (ULOQ) προς αυτή του σημείου χαμηλότερης συγκέντρωσης (LLOQ) που εκφράζει την πειραματική τιμή F ($F_{\text{πειραματική}}$) και συγκρίνοντάς τη με τη θεωρητική τιμή F ($F_{\text{θεωρητική}}$) για n-1 βαθμούς ελευθερίας (n: αριθμός πειραματικών μετρήσεων για κάθε σημείο).

Σε περίπτωση που διαπιστωθεί η ύπαρξη ετεροσκεδαστικότητας ($F_{\text{πειρ}} > F_{\text{θεωρ}}$) χρησιμοποιείται ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, όπου με την εισαγωγή ενός συντελεστή στατιστικού βάρους (w_i) επιδιώκεται να ελαχιστοποιηθεί το άθροισμα των τετραγώνων των ζυγισμένων υπολοίπων (SS) το οποίο δίνεται από τη σχέση:

$$SS = w_i (Y_{\text{πειραματικό}} - Y_{\text{θεωρητικό}})^2 \quad (1)$$

Ως καταλληλότερος συντελεστής βαρύτητας w_i χρησιμοποιείται το πηλίκο $w_i = 1/\sigma_i^2$, όπου σ_i η διακύμανση της απόκρισης κάθε σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης. Επειδή η χρήση αυτού του παράγοντα απαιτεί πολλούς υπολογισμούς, συνήθως για την εύρεση του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης δοκιμάζονται άλλοι παράγοντες που βασίζονται στις παραμέτρους x (συγκέντρωση) και y (απόκριση) από τους οποίους οι πλέον συνήθεις είναι οι λόγοι $1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$.

Ως κριτήριο για την επιλογή του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Er) της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης από την εξίσωση παλινδρόμησης, εφαρμόζοντας τον καθένα παράγοντα ζύγισης w_i ($C_{\text{υπολ}}$) σε σχέση με τη θεωρητική συγκέντρωση ($C_{\text{θεωρ}}$).

$$\% Er = (C_{\text{υπολ}} - C_{\text{θεωρ}}) / C_{\text{θεωρ}} \quad (2)$$

Για κάθε παράγοντα ζύγισης αξιολογείται το διάγραμμα απεικόνισης του σχετικού σφάλματος συναρτήσει της συγκέντρωσης καθώς και το ολικό άθροισμα των απολύτων τιμών σχετικού σφάλματος ($\Sigma \%Er$) και επιλέγεται ο συντελεστής στατιστικού βάρους w_i με τον οποίο παρατηρείται μικρότερη κατανομή σφαλμάτων $\% Er$ γύρω από τον άξονα της συγκέντρωσης και μικρότερη τιμή αθροίσματος $\Sigma \%Er$ σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων.

5.9.1.3 Εφαρμογή γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης και επιλογή του βέλτιστου παράγοντα ζύγισης

Η επιλογή του καταλληλότερου παράγοντα ζύγισης έγινε μετά από δοκιμή των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων παραγόντων ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$ και $1/y^2$) σε όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης.

Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζεται ενδεικτικά η σύγκριση ανάμεσα στο μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο και στο ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο με συντελεστή στατιστικού βάρους $1/y^2$ για τη 2^η σειρά ανάλυσης της αλπραζολάμης.

Πίνακας 5.6: Σύγκριση απλού και ζυγισμένου $1/y^2$ γραμμικού μοντέλου ως προς το $\%$ σχετικό σφάλμα ($\%Er$) των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων για κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης της αλπραζολάμης				
Γραμμικό μοντέλο	Χωρίς ζύγιση		Με ζύγιση $1/y^2$	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση	$\%Er$	Μέση πειραματική συγκέντρωση (N=2) (ng mL⁻¹)	$\%Er$
2,5	4,76	90,5	2,63	5,4
5	7,23	44,7	5,19	3,7
10	11,58	15,8	9,67	-3,3
50	49,20	-1,6	48,45	-3,1
100	92,08	-7,9	92,64	-7,4
150	148,45	-1,0	150,76	0,5
250	254,09	1,6	259,56	3,8

Υπολογίζεται η μέση τιμή της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης για κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης και το $\%$ σχετικό αναλυτικό σφάλμα που προκύπτει συγκρίνοντας τη μέση τιμή με τη θεωρητική συγκέντρωση. Στον

πίνακα 5.7 παρουσιάζεται το μη ζυγισμένο γραμμικό μοντέλο για την ανάλυση της αλπραζολάμης.

Πίνακας 5.7: Απλό γραμμικό μοντέλο ως προς το % σχετικό σφάλμα (%Er) των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων για κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης της α-OH αλπραζολάμης		
Γραμμικό μοντέλο	Χωρίς ζύγιση	
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέση πειραματική συγκέντρωση (N=2) (ngmL⁻¹)	%Er
2,5	2,56	2,4
5	5,04	0,9
10	9,54	-4,6
25	25,55	2,2
50	49,83	-0,3

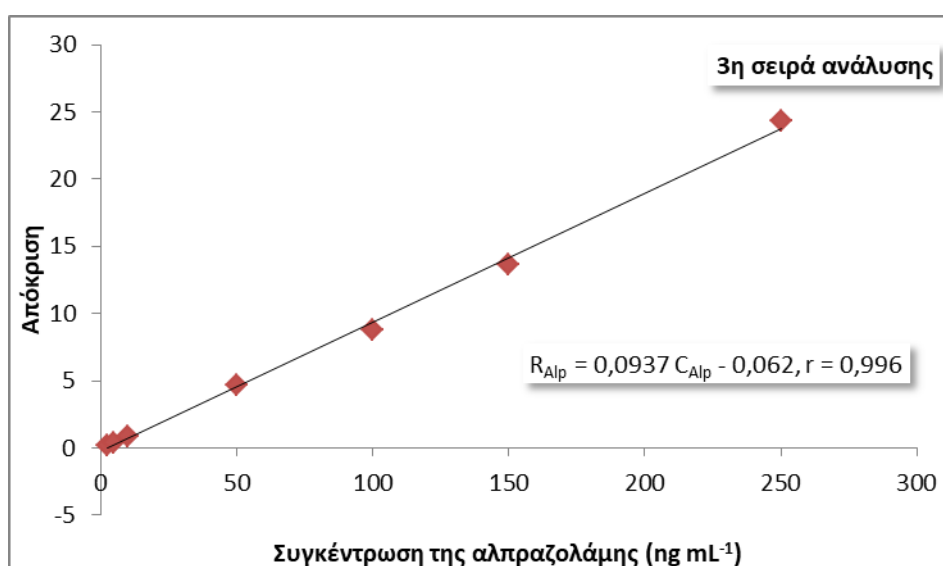
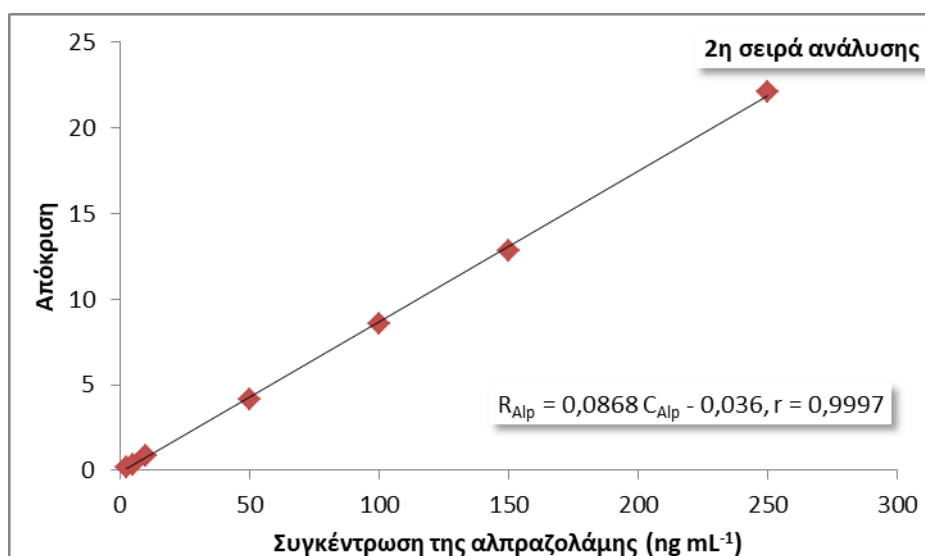
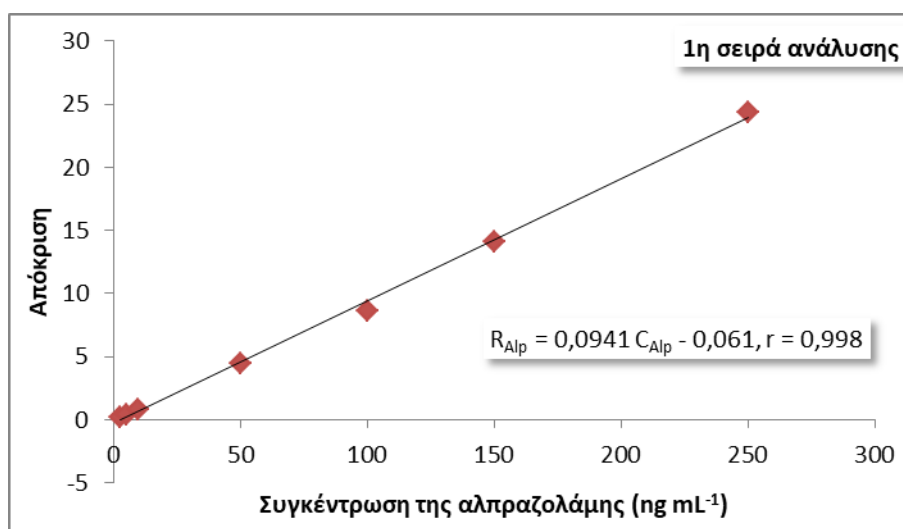
Όπως είναι φανερό από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 5.6 και 5.7 στην περίπτωση της εφαρμογής του μη ζυγισμένου μοντέλου παρατηρείται μία υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του πρώτου και του δεύτερου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης της αλπραζολάμης, ενώ στην περίπτωση της α-OH αλπραζολάμης η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς ζύγιση.

5.9.1.4 Καμπύλες βαθμονόμησης

Η στατιστική επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων και η εξαγωγή των εξισώσεων παλινδρόμησης έγινε με εφαρμογή ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης με συντελεστή στατιστικού βάρους τον όρο $1/y^2$ για την ανάλυση της αλπραζολάμης και χωρίς τη χρήση συντελεστή στατιστικού βάρους για την ανάλυση της α-υδροξυ αλπραζολάμης. Πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS ver 22. Χρησιμοποιήθηκαν τα εμβολιασμένα δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος που παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Κάθε ένα από τα δείγματα αυτά αναλύεται δύο φορές στο σύστημα LC-ESI/MS. Σε κάθε μέτρηση υπολογίζονται οι λόγοι των επιφανειών της κορυφής του κάθε αναλύτη προς την επιφάνεια της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (τιαμουλίνης). Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή του λόγου των επιφανειών καθώς και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών από τη θεωρητική τιμή.

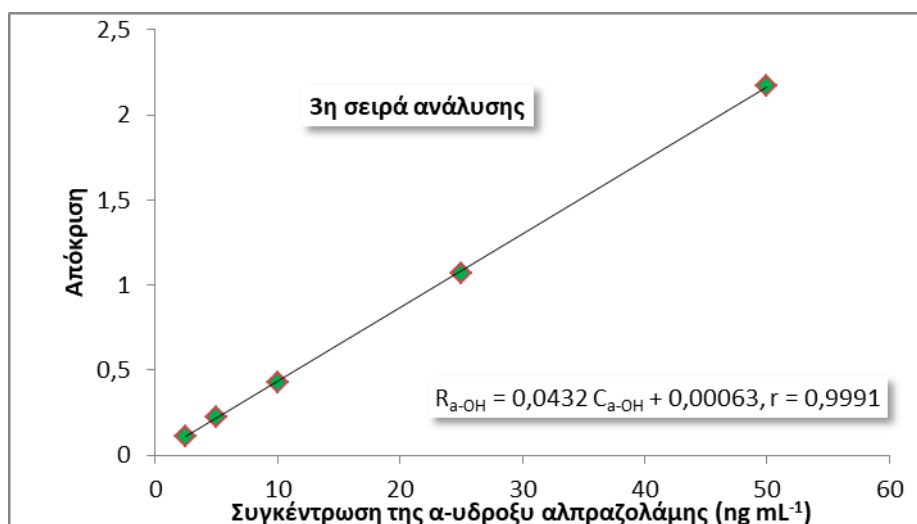
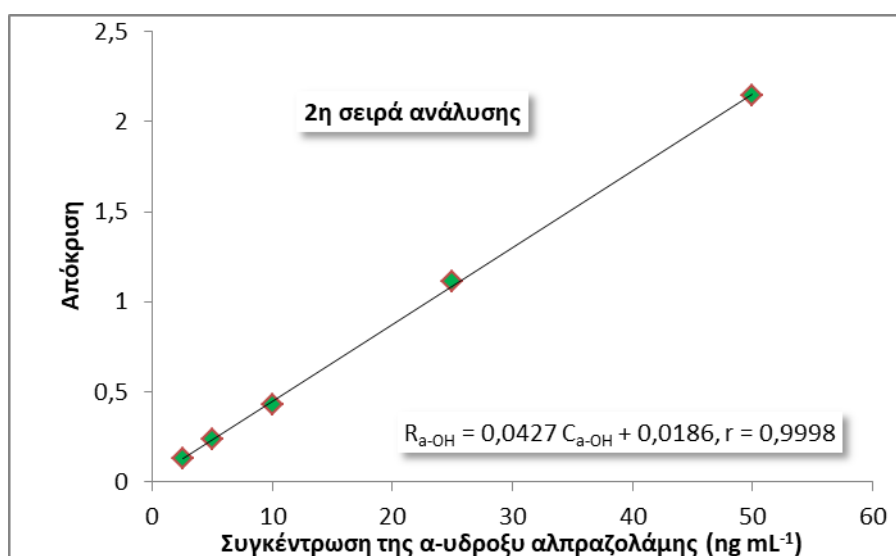
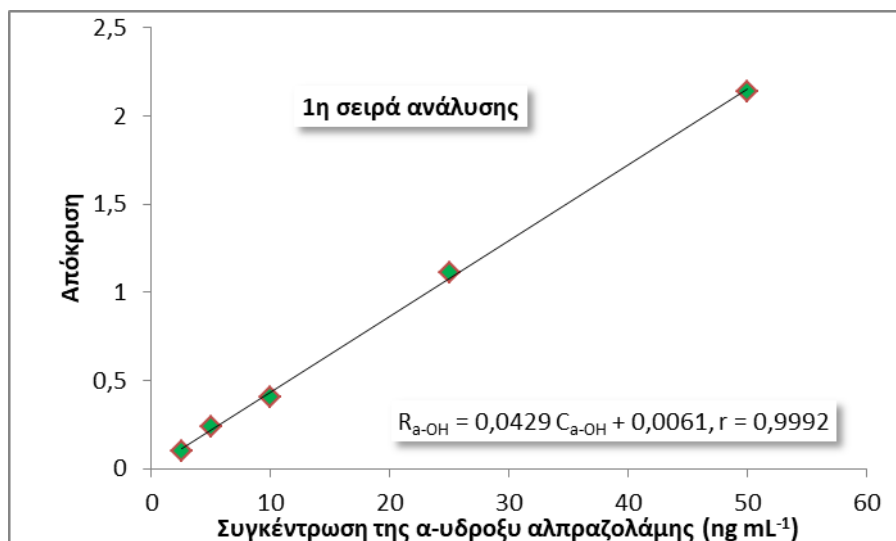
Τα αποτελέσματα για κάθε μία από τις τρεις σειρές μετρήσεων παρουσιάζονται στους πίνακες 5.8 και 5.9, ενώ τα αντίστοιχα γραφήματα παρουσιάζονται στα σχήματα 5.8 και 5.9. Στον πίνακα 5.12 παρουσιάζονται οι εξισώσεις συμμεταβολής για κάθε μία από τις τρεις σειρές μετρήσεων μαζί με τις αντίστοιχες τιμές των συντελεστών συσχέτισης, του τυπικού σφάλματος και των τυπικών αποκλίσεων για την τομή και την κλίση.

Πίνακας 5.8: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης της αλπραζολάμης			
Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειων_(n=2)	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
2,5	0,187	2,63	5,4
	0,205	2,77	11,1
	0,194	2,73	9,3
5	0,427	5,19	3,7
	0,368	4,65	-6,9
	0,391	4,83	-3,2
10	0,849	9,67	-3,3
	0,840	10,09	0,9
	0,848	9,71	-2,9
50	4,498	48,44	-3,1
	4,145	48,16	-3,7
	4,710	50,93	1,9
100	8,657	92,64	-7,4
	8,551	98,93	-1,1
	8,730	93,84	-6,2
150	14,12	150,8	0,5
	12,85	148,4	-1,0
	13,65	146,4	-2,4
250	24,36	259,6	0,5
	22,10	255,1	2,0
	24,36	260,6	4,2



Σχήμα 5.8: Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης της αλπραζολάμης μετά από ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Πίνακας 5.9: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης της α-υδροξυ αλπραζολάμης			
Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειων_(n=2)	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
2,5	0,103	2,25	-9,7
	0,128	2,56	2,6
	0,109	2,52	0,7
5	0,239	5,43	8,6
	0,234	5,04	0,9
	0,224	5,08	3,8
10	0,406	9,33	-6,7
	0,426	9,54	-4,6
	0,429	9,92	-0,8
25	1,109	25,71	2,8
	1,110	25,55	2,2
	1,107	24,87	-0,9
50	2,138	49,69	-0,6
	2,146	49,83	-0,3
	2,167	50,15	0,3



Σχήμα 5.9: Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης της α-υδροξυ αλπραζολάμης μετά από ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος.

Πίνακας 5.10: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης της αλπραζολάμης και της α-OH αλπραζολάμης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος με την τεχνική HILIC-ESI/MS

Αναλύτης	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (ng mL ⁻¹)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r ^b	Τυπική απόκλιση		S _r ^c	α/S _α ^d
				Κλίσης	Τομής		
Αλπραζολάμη	2,5 - 250	R _{alp} = 0,0941C _{alp} - 0,061	0,9991	1,8×10 ⁻³	0,021	0,19	-1,27
		R _{alp} = 0,0868 C _{alp} - 0,036	0,9997	8,8×10 ⁻⁴	0,023	0,095	-1,56
		R _{alp} = 0,0937C _{alp} - 0,062	0,996	1,8×10 ⁻³	0,027	0,26	-1,06
α-OH αλπραζολάμη	2,5-50	R _{αOH} = 0,04287C _{αOH} - 0,0061	0,9991	7,1×10 ⁻⁴	0,013	0,028	0,33
		R _{αOH} = 0,04271 C _{αOH} + 0,019	0,9998	4,6×10 ⁻⁴	0,012	0,031	1,56
		R _{αOH} = 0,04324C _{αOH} + 0,00065	0,9996	2,1×10 ⁻⁴	0,0054	0,018	0,12

^a Λόγοι του εμβαδού κορυφής της αλπραζολάμης, R_{alp} και της α-OH αλπραζολάμης, R_{αOH} σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου (τιαμουλίνη) έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της αλπραζολάμης, C_{alp}, και της α-OH αλπραζολάμης, C_{αOH}.

^b Συντελεστής συσχέτισης

^c Τυπικό σφάλμα της μεθόδου,

^d Πειραματική τιμή του t, η θεωρητική τιμή του t σε P= 0,05 και f = n-2 = 5 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,57 για την αλπραζολάμη και f = n-2 = 3 βαθμούς ελευθερίας είναι 3,18 για την α-OH αλπραζολάμη

Διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα καθώς η τιμή του συντελεστή συσχέτισεως βρέθηκε μεγαλύτερη από 0,996 για την αλπραζολάμη και μεγαλύτερη από 0,9991 για τον μεταβολίτη της ενώ το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων κυμάνθηκε από -7,4 έως 11,1% για την αλπραζολάμη και κυμάνθηκε από -9,7 έως 8,6% για την α-υδροξυ αλπραζολάμη.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος διέλευσης των καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων και συγκεκριμένα εφαρμογή της δοκιμασίας Student (t-test) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι πειραματικές τιμές της τομής των αξόνων διαφέρουν σημαντικά ή όχι από το μηδέν. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκε η πειραματική t ($t_{\text{πειρ}}$) από την σχέση $t_{\text{πειρ}} = |a|/S_a$, όπου a , η τομή της εκάστοτε εξίσωσης συμμεταβολής και S_a η αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Η τιμή $t_{\text{πειρ}}$ στη συνέχεια συγκρίθηκε με τη θεωρητική τιμή $t_{\text{θεωρ}}$ από τον πίνακα κατανομής Student για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και για $n-2$ βαθμούς ελευθερίας όπου n , ο αριθμός των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.10 για την αλπραζολάμη και τον μεταβολίτη της, αντίστοιχα, οι υπολογισθείσες τιμές του λόγου $t_{\text{πειρ}}$ δεν υπερβαίνουν ($t_{\text{πειρ}} < t_{\text{θεωρ}}$) και για τις τρεις αναλυτικές δοκιμασίες την θεωρητική τιμή που για 5 βαθμούς ελευθερίας είναι ίση με 2,57 για την αλπραζολάμη και 3,18 για την α-υδροξυ-αλπραζολάμης για 3 βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Αυτό συνεπάγεται ότι η τομή σε όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν.

5.10 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και επικύρωσή των μεθόδων αυτών. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within day ή intra day accuracy and precision), όσο και δια των ημερών (between days ή inter day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (quality control samples) τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα

συγκέντρωσης (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) 2,5, 50, 250 ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη και δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή και υψηλή) 2,5, 50 ng mL⁻¹ για τον μεταβολίτη της. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πέντε δείγματα σε κάθε σειρά ανάλυσης (εργαστηριακή ημέρα). Τελικά σε κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν από πέντε μετρήσεις σε τρεις εργαστηριακές ημέρες (15 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο).

Για τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Η πιστότητα εκτιμήθηκε με βάση τις % σχετικές τυπικές αποκλίσεις και η ορθότητα με βάση το % σχετικό σφάλμα.

Αναλυτικότερα υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι:

- η ολική μέση τιμή των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων (overall mean)
- η εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD)
- η μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική απόκλιση (inter day % RSD)
- το % σχετικό σφάλμα (Er%)

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver 22. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τον έλεγχο της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου HILIC-ESI/MS.

5.10.1 Ορθότητα

Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη (αληθή τιμή). Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% relative error, %Er) που υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\% Er = [(C_{\text{πειραματικό}} - C_{\text{θεωρητικό}}) / C_{\text{θεωρητικό}}] \times 100 \quad (3)$$

Αξιολογήθηκε η ορθότητα της μεθόδου τόσο με έλεγχο της ορθότητας εντός της κάθε δοκιμασίας, όσο και μεταξύ των ημερών.

Σε κάθε εργαστηριακή σειρά ανάλυσης υπολογίστηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης:

- η μέση τιμή των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων των πέντε δειγμάτων ελέγχου
- η τυπική απόκλιση (SD) αυτών και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)

- το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Er)

Ως κριτήριο αποδοχής της ορθότητας λαμβάνονται τα όρια της μέσης τιμής της πειραματικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης που θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 85 και 115% της αντίστοιχης θεωρητικής τιμής ($-15 < \%Er < +15$) για κάθε επίπεδο που μελετήθηκε [180]. Τα αποτελέσματα της ορθότητας για κάθε αναλυτική δοκιμασία και για το σύνολο των εργαστηριακών ημερών συνοψίζονται στον πίνακα 5.11 για την αλπραζολάμη και στον πίνακα 5.12 παρουσιάζεται ο αντίστοιχος πίνακας για τον μεταβολίτη της.

Πίνακας 5.11: Αξιολόγηση της ορθότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της αλπραζολάμης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος				
Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL⁻¹)		Μέση τιμή ± SD (ng mL⁻¹)	% RSD	%Er^a
1^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,54 ± 0,25	9,8	1,6
2	50	51,5 ± 5,1	9,9	3,0
3	250	254,3 ± 4,2	1,7	1,7
2^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,47 ± 0,16	6,5	-1,2
2	50	49,8 ± 1,9	3,8	-0,4
3	250	241,8 ± 8,8	3,6	-3,3
3^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,32 ± 0,15	6,5	-7,2
2	50	53,8 ± 4,1	7,6	7,6
3	250	251,5 ± 4,5	1,8	0,6
4^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,44 ± 0,14	5,7	-2,4
2	50	52,2 ± 2,4	4,6	4,4
3	250	252,4 ± 6,9	2,7	1,0
5^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,349 ± 0,088	3,7	-6,0
2	50	52,9 ± 2,3	4,3	5,8
3	250	247,7 ± 3,7	1,5	-0,9

^a Το % σχετικό σφάλμα = [(ολική μέση τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης - τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης) / (τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης concentration) × 100]

Πίνακας 5.12: Αξιολόγηση της ορθότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της α-υδροξυ αλπραζολάμης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος				
Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL⁻¹)		Μέση τιμή ± SD (ng mL⁻¹)	% RSD	%E_r^a
1^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,59 ± 0,09	3,5	3,6
2	50	51,1 ± 3,1	6,1	2,2
2^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,53 ± 0,18	7,1	1,2
2	50	53,1 ± 1,0	1,9	6,2
3^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,51 ± 0,15	6,0	0,4
2	50	50,3 ± 1,3	2,6	0,6
4^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,34 ± 0,11	4,7	-6,4
2	50	50,5 ± 1,9	3,8	1,0
5^η σειρά μετρήσεων				
1	2,5	2,54 ± 0,12	4,7	1,6
2	50	50,5 ± 3,2	6,3	1,0

^a Το % σχετικό σφάλμα = [(ολική μέση τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης – τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης)/(τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης concentration)×100]

Όπως διαπιστώνεται από τους παραπάνω πίνακες, η απόλυτη τιμή του επί τοις εκατό σχετικού σφάλματος κυμαίνεται από 0,4% έως 7,6% για την αλπραζολάμη και από 0,4 έως 6,4 για την α-OH αλπραζολάμη δηλαδή εντός των αποδεκτών ορίων.

5.10.2 Πιστότητα

Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την τυπική απόκλιση (SD), με την σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) ή με το εύρος του διαστήματος εμπιστοσύνης. Για την αξιολόγηση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της αλπραζολάμης και του μεταβολίτη της μελετήθηκε τόσο η εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day ή within-day precision), όσο και η μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day ή between-days precision) και ως μέτρο αυτής χρησιμοποιήθηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Για την εξαγωγή των στατιστικών

παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA).

Για τον υπολογισμό της εντός της ημέρας επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD_{intra-day}) εφαρμόστηκε η εξίσωση:

$$\%RSD_{intra-day} = \frac{100 \times \sqrt{\text{μέσο τετράγωνο}_{intra-day}}}{ολική \text{ μέση τιμή}} \quad (4)$$

Η μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD_{inter-day}) υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\%RSD_{inter-day} = \frac{100 \times \sqrt{\frac{\text{μέσο τετράγωνο}_{inter-day} - \text{μέσο τετράγωνο}_{intra-day}}{5}}}{ολική \text{ μέση τιμή}} \quad (5)$$

Οι υπολογισμοί σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης έγιναν για 24 βαθμούς ελευθερίας που αντιστοιχούν στις 25 αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν συνολικά (5 προσδιορισμοί ανά ημέρα × 5 ημέρες).

Το κριτήριο αποδοχής των αποτελεσμάτων πιστότητας λαμβάνεται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης με εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz, σύμφωνα με την οποία:

$$\% RSD_{max} = \pm 2^{(1-0,5\log C)} \quad (6)$$

όπου C, η θεωρητική συγκέντρωση του αναλύτη (ng mL⁻¹). Οι τιμές της εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών σχετικής τυπικής απόκλισης δε θα πρέπει να υπερβαίνουν τις τιμές 2/3 RSD_{max} και RSD_{max}, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και της πιστότητας για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης που μελετήθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.13.

Πίνακας 5.13: Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου HILIC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα (n = 5 σειρές μέτρησης, 5 επαναλήψεις ανά σειρά μέτρησης)

Αναλύτης	Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)		
Αλπραζολάμη			
Θεωρητική συγκέντρωση	2,5	50	250
1 ^η σειρά μέτρησης	2,54 ± 0,25	51,5 ± 5,1	254,3 ± 4,2
2 ^η σειρά μέτρησης	2,47 ± 0,16	49,8 ± 1,9	241,8 ± 8,8
3 ^η σειρά μέτρησης	2,32 ± 0,15	53,8 ± 4,1	251,5 ± 4,5
4 ^η σειρά μέτρησης	2.44 ± 0,14	52,2 ± 2,4	252,4 ± 6,9
5 ^η σειρά μέτρησης	2,349 ± 0,088	52,9 ± 2,3	247,7 ± 3,7
Ολική μέση τιμή	2,42	52,1	249,5
Εντός της ημέρας CV(%) ^a	6,8	6,5	2,4
Μεταξύ ημερών CV(%) ^a	1,9	N.V. ^c	1,7
Ολική ορθότητα % E _r ^b	-3,1	4,1	-0,2
α-υδροξυ αλπραζολάμη			
Θεωρητική συγκέντρωση	2,5	50	
1 ^η σειρά μέτρησης	2,59 ± 0,09	51,1 ± 3,1	
2 ^η σειρά μέτρησης	2,53 ± 0,18	53,1 ± 1,0	
3 ^η σειρά μέτρησης	2,51 ± 0,15	50,3 ± 1,3	
4 ^η σειρά μέτρησης	2,34 ± 0,11	50,5 ± 1,9	
5 ^η σειρά μέτρησης	2,54 ± 0,12	50,5 ± 3,2	
Ολική μέση τιμή	2,51	51,1	
Εντός της ημέρας CV(%) ^a	5,3	4,5	
Μεταξύ ημερών CV(%) ^a	3,0	1,0	
Ολική ορθότητα % E _r ^b	0,1	2,2	

^aΓια τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA

^bΤο % σχετικό σφάλμα = [(ολική μέση τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης - τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης)/(τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης concentration) × 100] relative percentage error = [(overall mean assayed concentration - added concentration) / (added concentration) × 100]

^cN.V. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή

Οι % σχετικές αποκλίσεις εντός της ημέρας (% RSD_{intra-day}) κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 2,4 και 6,8% για την αλπραζολάμη και 4,5 έως 5,3% για την α-υδροξυ αλπραζολάμη. Οι % σχετικές αποκλίσεις μεταξύ των ημερών (%RSD_{inter-day}) για την αλπραζολάμη βρέθηκε ότι δεν ήταν μεγαλύτερη από 1,7% και για τον μεταβολίτη της κυμάνθηκε μεταξύ 1 και 3%.

Η ολική ακρίβεια εκφράζεται από το επί τις εκατό σχετικό σφάλμα, E_r %, το οποίο για την αλπραζολάμη κυμάνθηκε από -3,1 έως 4,1 και για την α-υδροξυ αλπραζολάμη από 0,1 έως 2,2. Οι αντίστοιχες τιμές για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων που υπολογίστηκαν από την εξίσωση Horwitz.

5.11 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Στην παρούσα μελέτη οι τιμές LOD και LOQ υπολογίστηκαν από εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης και πειραματική επιβεβαίωση. Οι τιμές των LOD βρέθηκε πειραματικά ότι είναι περίπου $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και την α-υδροξυ αλπραζολάμη, ενώ οι τιμές των LOQ βρέθηκε πειραματικά ότι είναι $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και την α-υδροξυ αλπραζολάμη.

5.12 Επίδραση υποστρώματος

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά τη χρησιμοποίηση των συστημάτων LC-MS αποτελεί το φαινόμενο ιοντικής καταστολής (ion suppression) που παρατηρείται στην τεχνική της φασματομετρίας μαζών και κυρίως σε συστήματα με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Η ιοντική και αφορά στην καταστολή του σήματος του αναλύτη από ουσίες του υποστρώματος που συνεκλούνται και εισέρχονται ταυτόχρονα με αυτόν στην πηγή ιοντισμού και μπορεί να οδηγήσει σε δραστική μείωση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, με κίνδυνο ακόμα την εσφαλμένη εξαγωγή ψευδώς-αρνητικού αποτελέσματος. Η ένταση του φαινομένου μπορεί να διαφέρει από το ένα δείγμα στο άλλο.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η επίδραση του υποστρώματος σε κάθε αναλύτη συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται μετά την ανάλυση κατεργασμένου λευκού δείγματος πλάσματος, το οποίο εμβολιάστηκε με τους αναλύτες μετά την κατεργασία, με το σήμα του αναλύτη σε διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης παρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης (ακετονιτρίλιο: 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο $93:7$, (v/v)). Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων για την αλπραζολάμη 50 και 150 ng mL^{-1} , για την αOH αλπραζολάμη σε συγκέντρωση 50 ng mL^{-1} και για το εσωτερικό πρότυπο (τιαμουλίνη) σε συγκέντρωση 250 ng mL^{-1} . Υπολογίστηκε ο παράγοντας υποστρώματος (matrix factor) από το λόγο της απόκρισης (εμβαδόν κορυφής) του κάθε αναλύτη στα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα μετά την κατεργασία προς την απόκριση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα ελέγχου παρασκευασμένα σε διαλύτη ανασύστασης.¹⁸¹ Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον πίνακα 5.14. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι δεν υπάρχει σημαντική καταστολή του σήματος

στο φασματόμετρο μαζών με την προτεινόμενη HILIC-ESI/MS μέθοδο. Οι παράγοντες υποστρώματος που ελήφθησαν από την ανάλυση των πέντε παρτίδων πλάσματος διαπιστώθηκε ότι είναι $82,1 \pm 1,2$ και $83,3 \pm 1,2$ ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη σε συγκεντρώσεις 50 και 150 ng mL⁻¹ αντίστοιχα, για την α-υδροξυ αλπραζολάμη βρέθηκε ότι είναι $85,1 \pm 1,2$ ng mL⁻¹ σε συγκεντρώση 50 ng mL⁻¹ και $91,6 \pm 0,1$ ng mL⁻¹ σε συγκεντρώση 250 ng mL⁻¹ για την τιαμουλίνη.

5.13 Ανάκτηση της μεθόδου HILIC-ESI/MS

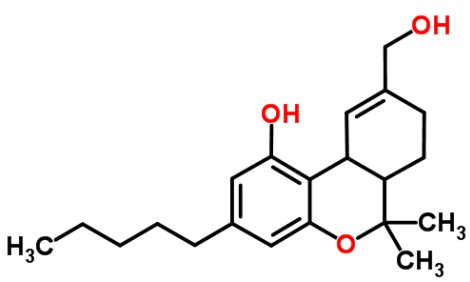
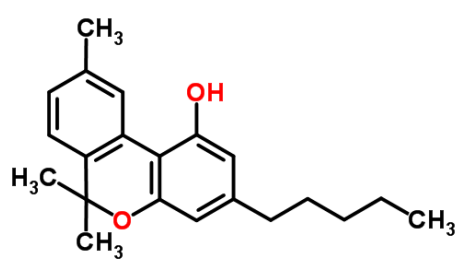
Για τον έλεγχο της ανάκτησης της πορείας κατεργασίας, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 50 ng mL⁻¹ και 150 ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη, για την αΟΗ αλπραζολάμη σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹ και για το εσωτερικό πρότυπο (τιαμουλίνη) σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹. Ταυτόχρονα, κατεργάσθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και αναλύθηκαν δείγματα ανθρώπινου πλάσματος (προερχόμενα από διαφορετικές πηγές) τα οποία εμβολιάσθηκαν μετά την κατεργασία με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹ και 150 ng mL⁻¹ για την αλπραζολάμη, για την αΟΗ αλπραζολάμη σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹ και για το εσωτερικό πρότυπο (τιαμουλίνη) σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹. Η ανάκτηση του αναλύτη υπολογίζεται από το λόγο της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα πλάσματος που έχει υποστεί την εκχυλιστική διαδικασία προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη στο δείγμα πλάσματος που έχει εμβολιαστεί με τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο μετά την κατεργασία.

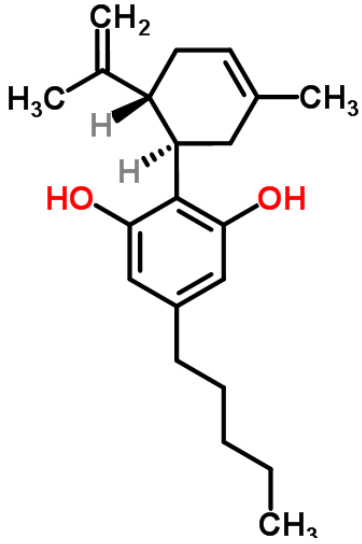
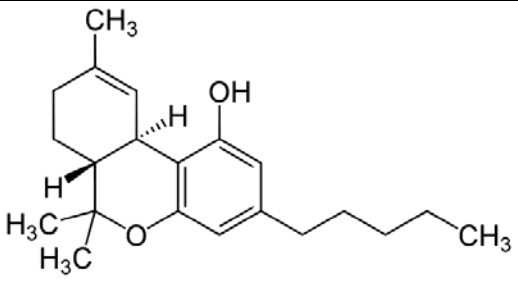
Πίνακας 5.14: Ανάκτηση και παράγοντες υποστρώματος για τον προσδιορισμό της αλπραζολάμης, της α-υδροξυ-αλπραζολάμης σε πλάσμα με την τεχνική HILIC-ESI/MS		
	Συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	
Αλπραζολάμη	50	150
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	77,9 ± 0,4	79,5 ± 0,3
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	82,1 ± 1,2	83,3 ± 1,2
α-υδροξυ αλπραζολάμη	50	
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	87,7 ± 1,9	
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	85,1 ± 1,2	
Τιαμουλίνη (εσωτερικό πρότυπο)	250	
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	82,9 ± 2,8	
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	91,6 ± 0,1	

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.14 και αποδεικνύεται ότι η ανάκτηση για την αλπραζολάμη είναι μεγαλύτερη από 77,9% για την αλπραζολάμη, 87,7% για την α-υδροξυ αλπραζολάμη και για την τιαμουλίνη η ανάκτηση βρέθηκε 82,9% σε συγκέντρωση 250 ng mL⁻¹.

5.14 Έλεγχος ειδικότητας

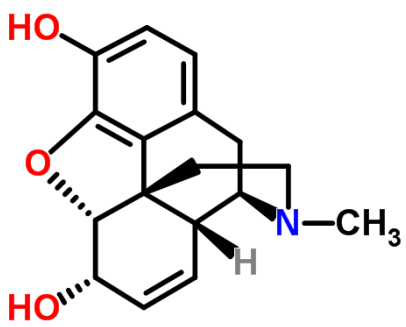
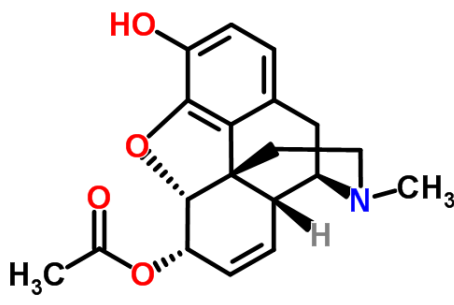
Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε περαιτέρω αναλύοντας έξι QC δείγματα που περιείχαν αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη σε συγκέντρωση 50ng mL⁻¹ και εμβολιάστηκαν με 27 φαρμακευτικές ενώσεις σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹. Αναλυτικά για τον έλεγχο ειδικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα κανναβινοειδή 11-hydroxy tetrahydrocannabinol, cannabinol, cannabidiol, και Δ9-tetrahydrocannabinol, οι χημικές δομές των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 5.15.

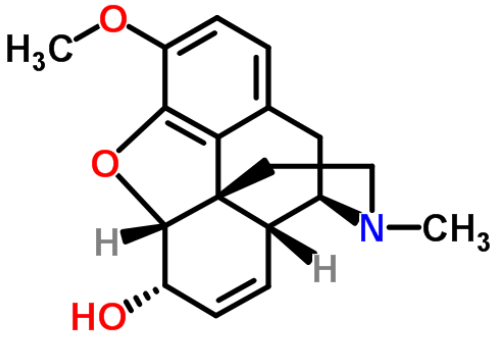
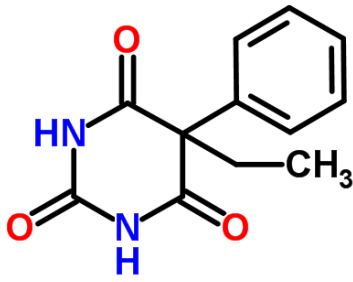
Πίνακας 5.15: Χημικές δομές των κανναβινοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ειδικότητας	
	
11-hydroxy tetrahydrocannabinol, M.B. =330,461 g/mol	Cannabinol M.B. = 310,437 g/mol

	
Cannabidiol M.B. = 314,225 g/mol	Δ9-tetrahydrocannabinol M.B. = 314,225 g/mol

Τα ναρκωτικά morphine και ο μεταβολίτης monoacetylmorphine, codeine, και phenobarbital, οι χημικές δομές των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 5.16.

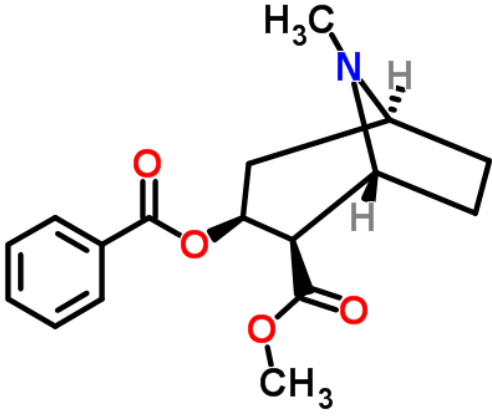
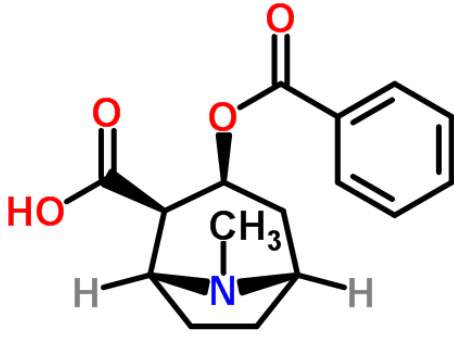
Πίνακας 5.16: Χημικές δομές ορισμένων ναρκωτικών ουσιών και μεταβολιτών τους που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ειδικότητας

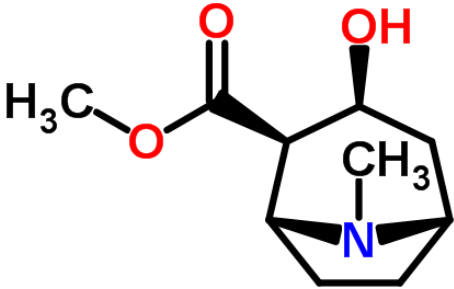
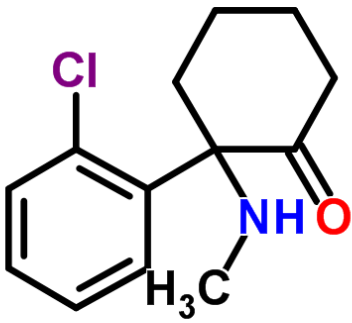
	
Morphine M.B. = 285,343 g/mol	6-Acetylmorphine (μεταβολίτης morphine) M.B. = 327,374 g/mol

	
Codeine M.B. = 299,152 g/mol	Phenobarbital M.B. = 232,239 g/mol

Άλλες ναρκωτικές ουσίες όπως cocaine και οι μεταβολίτες της 6-benzoylecgonine και ecgonine methylester και η αναισθητική ουσία ketamine, οι χημικές δομές των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 5.17.

Πίνακας 5.17 Χημικές δομές ορισμένων ναρκωτικών ουσιών και μεταβολιτών τους που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ειδικότητας

	
Cocaine M.B. = 303,358 g/mol	6-benzoylecgonine (μεταβολίτης cocaine) M.B. = 289,326 g/mol

	
ecgonine methylester M.B. = 199,247 g/mol	ketamine M.B. = 232,239 g/mol

Άλλες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα αναλγητικά methadone, acetaminophen και aspirin, το αντιισταμινικό cetirizine, τα διεγερτικά pseudoephedrine, methamphetamine, amphetamine και ephedrine, και διάφορες ενώσεις της κατηγορίας των βενζοδιαζεπινών όπως diazepam, flunitrazepam, bromazepam, midazolam, oxazepam, temazepam, και το γ -hydroxybutyric acid.

Η συγκέντρωση των αναλυτών στα παραπάνω δείγματα βρέθηκε ότι ήταν $49,6 \pm 1,3 \text{ ng mL}^{-1}$ και $47,4 \pm 1,9 \text{ ng mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και την α -υδροξυ αλπραζολάμη αντίστοιχα. Κανένα από τα παραπάνω φάρμακα δεν εμφάνισε κάποια παρεμβολή στον χρόνο έκλουσης της αλπραζολάμης και της α -υδροξυ αλπραζολάμης. Η ανάλυση του τυφλού δείγματος πραγματοποιήθηκε μέχρι τα 20 λεπτά προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων που μπορεί να εκλούνται μετά τα 7 λεπτά.

5.15 Μελέτη σταθερότητας

Η σταθερότητα των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου, σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος, μελετήθηκε υπό διάφορες συνθήκες αποθήκευσης. Η σταθερότητα ενός φαρμάκου σε βιολογικό υγρό είναι συνάρτηση των χημικών ιδιοτήτων του, των συνθηκών αποθήκευσης και του βιολογικού υγρού στο οποίο βρίσκεται το φάρμακο. Οι διαδικασίες εκτίμησης της σταθερότητας θα πρέπει να αποτιμούν τη σταθερότητα του αναλύτη κατά τη συλλογή και το χειρισμό του δείγματος, μετά από μεγάλη περίοδο φύλαξης (long-term), μετά από μικρή περίοδο παραμονής στον πάγκο εργασίας (short-term) και μετά από συνεχείς κύκλους ψύξης - απόψυξης (freeze-thaw cycles).

Δείγματα πλάσματος εμβολιάσθηκαν με κατάλληλα διαλύματα εργασίας ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα που ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα να είναι 50 και 150 ngmL⁻¹ για την αλπραζολάμη και 50 ngmL⁻¹ για την α-υδροξύ-αλπραζολάμη. Για κάθε μια από τις μελετούμενες συνθήκες φύλαξης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 3 δείγματα ανά συγκέντρωση. Τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος για 4 ώρες και στην συνέχεια στους -20°C για 28 ημέρες. Αυτές οι συνθήκες αποθήκευσης χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της σταθερότητας για μικρό χρονικό διάστημα.

Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, κύκλοι ψύξης-απόψυξης κατά τους οποίους σε κάθε κύκλο τα δείγματα αποψύχονται και επιστρέφουν στις συνθήκες ψύξης μέχρι να ολοκληρωθεί και ο τελευταίος κύκλος οπότε και αναλύονται. Πραγματοποιήθηκαν, συνολικά τέσσερις κύκλοι ψύξης-απόψυξης κατά τους οποίους τα δείγματα ψύχονται στους -20°C και αποψύχονται κάθε επτά ημέρες (ένας κύκλος αντιστοιχεί σε επτά ημέρες) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών, σε κάθε δείγμα, βρέθηκαν συγκρίνοντας την επιφάνεια της κορυφής κάθε αναλύτη που προκύπτει από την ανάλυση του εμβολιασμένου δείγματος για τις εκάστοτε συνθήκες αποθήκευσης, με την επιφάνεια της αντίστοιχης κορυφής που προκύπτει από την ανάλυση πρόσφατα παρασκευασμένου εμβολιασμένου δείγματος ίδιας συγκέντρωσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας παρουσιάζονται στον πίνακα 5.18, όπου παρατίθενται οι μέσες τιμές των υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων των

αναλυτών σε δείγματα αποθηκευμένα σε διάφορες συγκεντρώσεις, οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων και τα αντίστοιχα σχετικά τυπικά σφάλματα.

Κάθε ένας από τους αναλύτες θεωρείται σταθερός στο βιολογικό δείγμα εάν η συγκεντρωσή του βρεθεί εντός των ορίων 80-120% της αρχικής. Η % διαφορά από τα αντίστοιχα φρέσκα δείγματα (%Er), η οποία υπολογίζεται ως εξής:

- ✓ για τις μελέτες σταθερότητας σε μικρό χρονικό διάστημα:
$$\%Er = 100 \times (C_{6 \text{ ώρες σε } \theta \text{ περιβάλλοντος}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$
- ✓ για τις μελέτες σταθερότητας σε μεγάλο χρονικό διάστημα:
$$\%Er = 100 \times (C_{a \text{ εβδομάδες στους } -20^{\circ}\text{C}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$
- ✓ για τις μελέτες σταθερότητας ψύξης – απόψυξης:
$$\%Er = 100 \times (C_{a \text{ κύκλους ψύξης / απόψυξης}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.18 οι αναλύτες μπορούν να θεωρηθούν σταθεροί καθώς δεν διαφέρουν περισσότερο από -3,4% και 1,6% για την αλπραζολάμη και α-υδροξυ αλπραζολάμη, αντίστοιχα, σε σχέση με το σημείο αναφοράς για οποιαδήποτε από τις δοκιμασίες. Τα αποτελέσματα σταθερότητας επομένως έδειξαν ότι τα δείγματα πλάσματος που περιείχαν τους αναλύτες μπορούν να διατηρηθούν σε συνθήκες περιβάλλοντος για 4 ώρες, στους -20°C για 28 ημέρες και μετά από τέσσερις κύκλους ψύξης-απόψυξης στους -20°C χωρίς σημαντική διάσπαση.

Πίνακας 5.18: Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της αλπραζολάμης και τη α-υδροξύ αλπραζολάμης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος σε διαφορες συνθήκες αποθήκευσης

Αναλύτης	Συνθήκες αποθήκευσης/Χρόνος					
	25°C 4 ώρες		-20 °C /28 μέρες		-20°C/4κύκλους ψύξης/απόψυξης	
Επίπεδα Συγκέντρωσης (ng mL ⁻¹)	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E _r ^a	Μέση τιμή ± s.d.(n=3)	%E _r ^a	Μέση τιμή ± s.d.(n=3)	%E _r ^a
Αλπραζολάμη						
50	50,1 ± 1,3	1,7	49,1 ± 2,1	-1,9	48,3 ± 1,3	-3,4
150	150,2 ± 2,1	-0,1	147,7 ± 1,1	-1,6	145,6 ± 2,3	-2,9
a-OH-αλπραζολάμη						
50	49,2 ± 1,4	-1,6	51,9 ± 1,3	1,1	50,8 ± 1,9	1,6

%E_r: %σχετικό σφάλμα = (ευρεθείσα συγκέντρωση–θεωρητική συγκέντρωση) /(θεωρητική συγκέντρωση) ×100

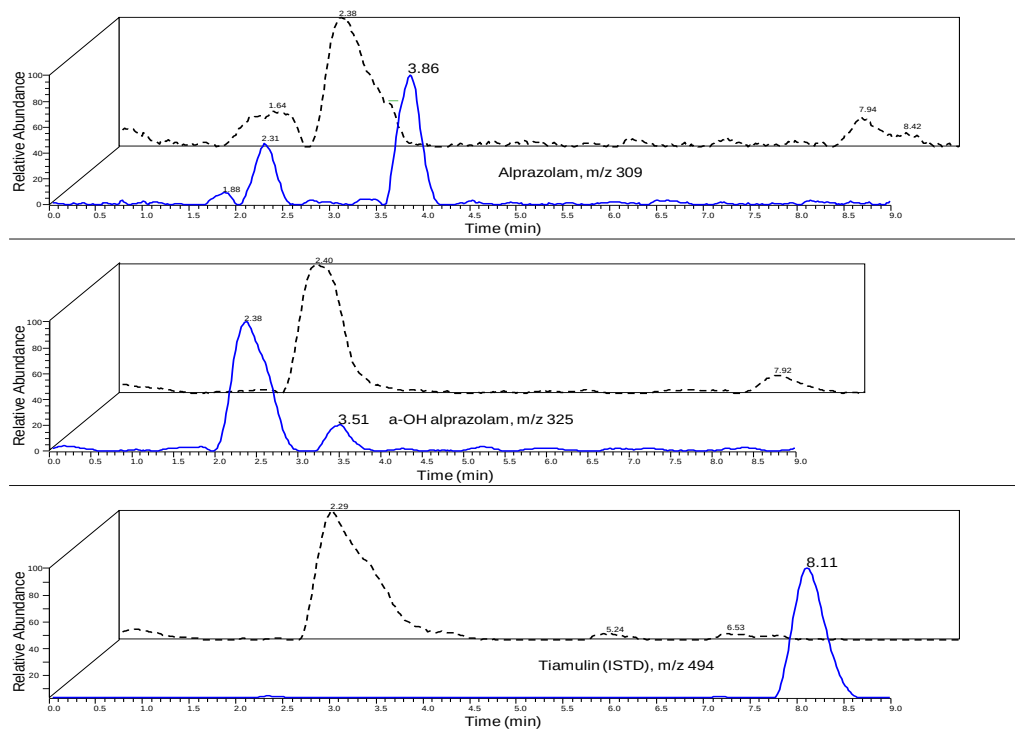
5.16 Εφαρμογή της μεθόδου για μέτρηση των αναλυτών σε δείγμα πλάσματος ασθενούς

Προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα εφαρμογής της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου η αλπραζολάμη και η α-υδροξυ αλπραζολάμη αναλύθηκαν σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε αλπραζολάμη, Xanax®,Pfizer,Hellas AE. Συγκεκριμένα, το πρώτο δείγμα προήλθε από γυναίκα ασθενή, ηλικίας 40 ετών, η οποία λάμβανε αλπραζολάμη σε δόση 3mg/ημέρα για μακρό διάστημα και το δεύτερο δείγμα από άνδρα ασθενή ηλικίας 60 ετών, στον οποίο χορηγήθηκαν 2mg αλπραζολάμης εφ'άπαξ.

Τα δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν σε φιαλίδια Venoject τα οποία περιείχαν ηπαρίνη ως αντιπηκτική ουσία. Τα δείγματα μετά από ήπια ανάδευση φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 4000 στροφές στους 4°C. Τα δείγματα πλάσματος κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν μετά από μία εβδομάδα αποθήκευσης στους -20°C σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο.

Από την ανάλυση του πρώτου δείγματος πρέκυψε ότι η συγκέντρωση της αλπραζολάμης ήταν $39,3 \pm 3,5 \text{ ng mL}^{-1}$ και της α-υδροξυ αλπραζολάμης $10,3 \pm 2,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ενώ από το δεύτερο δείγμα η συγκέντρωση της αλπραζολάμης ήταν $14,3 \pm 2,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ενώ η α-υδροξυ αλπραζολάμη δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί καθώς η συγκεντρωσή της ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Στο σχήμα 5.10 παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα μαζών δείγματος ασθενούς το οποίο συγκρίνεται με ένα χρωματογράφημα τυφλού δείγματος αποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει καμμία παρεμπόδιση στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.



Σχήμα 5.10: Χρωματογράφημα μαζών τυφλού δείγματος (διακεκομμένη γραμμή) και χρωματογράφημα μαζών δείγματος πλάσματος από ασθενή στον οποίο χορηγήθηκε Xanax® σε δόση 3mg/ημέρα. Οι χρόνοι έκλουσης της α-υδροξυ αλπραζολάμης, της αλπραζολάμης και του εσωτερικού προτύπου ήταν 3,5, 3,9 και 8,1 λεπτά αντίστοιχα. Χρωματογραφικές συνθήκες: χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με χρωματογραφική στήλη BEH Xbridge HILIC, κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου με 7% 10mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου, ταχύτητα ροής 0,2 mL min⁻¹.

5.17 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος HILIC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της της αλπραζολάμης και του βασικού μεταβολίτη της, α-υδροξυ αλπραζολάμη, σε ανθρώπινο πλάσμα η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς και ρύθμιση της δοσολογίας τους. Για την υγροχρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκε στήλη XBridge-HILIC 135 Å, μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-ESI/MS με αναλυτή απλό τετράπολο και εφαρμόστηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την ανίχνευση των αναλυτών. Στα πλαίσια της μελέτης διερευνήθηκαν διεξοδικά οι μηχανισμοί που διέπουν τη συγκράτηση των αναλυτών στη στήλη HILIC-BEH. Η μέθοδος HILIC-ESI/MS αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος. Βρέθηκε ότι είναι ειδική και εκλεκτική, χωρίς να παρεμποδίζεται από τα συστατικά του πλάσματος. Ο χρόνος κάθε ένεσης δεν ξεπερνούσε τα 10 λεπτά. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στον ποσοτικό προσδιορισμό του συγκεκριμένου φαρμάκου σε κλινικά δείγματα ασθενών που βρίσκονται σε θεραπεία για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης.

Κεφάλαιο 6:

Μελέτες αποικοδόμησης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης

6.1 Εισαγωγή

Η Αλισκιρένη είναι ένας σχετικά νέος, από του στόματος δραστικός, ισχυρός και άμεσος αναστολέας της ρενίνης [182]. Με την αναστολή του ενζύμου της ρενίνης, η αλισκιρένη αναστέλλει το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης στο σημείο ενεργοποίησης, εμποδίζοντας τη μετατροπή του αγγειοτασινογόνου σε αγγειοτασίνη I και μειώνοντας τα επίπεδα της αγγειοτασίνης I και της αγγειοτασίνης II. Η ταυτόχρονη χορήγηση διουρητικών με αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης, αποτελεί συνηθισμένη στρατηγική στη θεραπευτική αντιμετώπιση της αρτηριακής υπέρτασης, καθώς ο συνδιασμός τους ενισχύει την αντιυπερτασική δράση των δραστικών αυτών ουσιών. Έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μελέτες που περιλαμβάνουν το συνδιασμό της αλισκιρένης με βαλσαρτάνη και υδροχλωροθειαζίδιο σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη μονοθεραπεία με υδροχλωροθειαζίδιο για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [183].

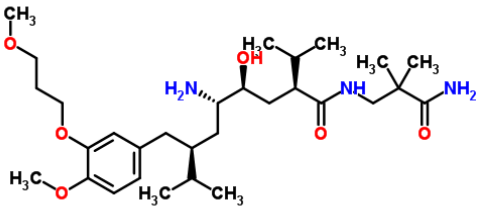
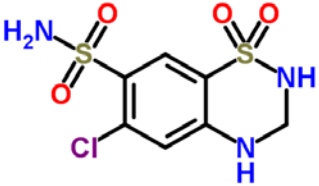
Μέχρι τώρα ελάχιστες αναλυτικές μέθοδοι έχουν δημοσιευθεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η αναλυτική μεθοδολογία σε αυτά τα άρθρα περιλαμβάνει τη χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση μονολιθικής αναλυτικής στήλης[184], και ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικυλλίων (ΜΕΚC)[185]. Ο προσδιορισμός της αλισκιρένης σε φαρμακευτικά σκευάσματα έχει επιτευχθεί με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή ¹⁸⁶. Ενώ πρόσφατα έχει δημοσιευθεί μέθοδος υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (stability-indicating) κατάλληλη για μελέτη σταθερότητας της αλισκιρένης σε φαρμακευτικά σκευάσματα[187]. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μέθοδος HPLC-UV για τον προσδιορισμό της αλισκιρένης σε ανθρώπινο πλάσμα με παραγωγοποίηση με 1-naphthyl-isocyanate πριν το χρωματογραφικό

διαχωρισμό [188], ενώ έχει δημοσιευθεί μελέτη ποσοτικού προσδιορισμού της αλισκιρένης με LC-MS/MS [189]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη ανίχνευσης της αλισκιρένης σε ανθρώπινο σάλιο με LC-MS/MS, επιλέγοντας, με τον τρόπο αυτό, μη επεμβατικές μεθόδους, όπως η αιμοληψία, για τη λήψη του βιολογικού δείγματος [190]. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μελέτη προσδιορισμού της αλισκιρένης με αμλοδιπίνη με HPLC και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων [191]. Η αλισκιρένη έχει προσδιοριστεί σε ούρα μαζί με πρασουγρέλη και ριβαροξαμπάνη με LC-MS/MS, η κατεργασία των ούρων έγινε με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (MEPS) [192]. Η υδροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με φασματομετρία μαζών έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμός της αλισκιρένης, του υδροχλωροθειαζιδίου και άλλων αντιυπερτασικών σε ανθρώπινο πλάσμα [193]. Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει πληθώρα δημοσιεύσεων για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υδροχλωροθειαζιδίου μόνου του ή σε συνδιασμό με άλλα φάρμακα σε φαρμακευτικά σκευάσματα και βιολογικά υγρά με την τεχνική HPLC [194, 195, 196, 197, 198, 199].

Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει ότι δεν υπάρχει επίσημη μέθοδος σε καμία από τις φαρμακοποιίες για την ανάλυση της αλισκιρένης. Επιπλέον δεν υπάρχει αναφορά σχετική με τη μελέτη σταθερότητας αυτών των φαρμάκων σε σκευάσματα. Επομένως, σκεφτήκαμε ότι θα ήταν ενδιαφέρον να αποδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο είναι ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικού προϊόντος που περιέχει το συνδιασμό αλισκιρένης με το υδροχλωροθειαζίδιο.

Οι χημικές δομές και πληροφορίες για τους αναλύτες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1: Χημικές δομές της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου

	Αλισκιρένη IUPAC: (2S,4S,5S,7S)-5-Amino-N-(3-amino-2,2-dimethyl-3-oxopropyl)-4-hydroxy-2-isopropyl-7-[4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy)benzyl]-8-methylnonanamid M.B. = 551.758 Da Log P= 2,45 (pH 7.4)²⁰⁰ pKa: 9,6 base
	Υδροχλωροθειαζίδιο IUPAC: 1,1-Dioxyde de 6-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide M.B. = 297.739 Da Log P=-0,07 pKa: 8,9 acid πηγή: ChemSpider, PubMed

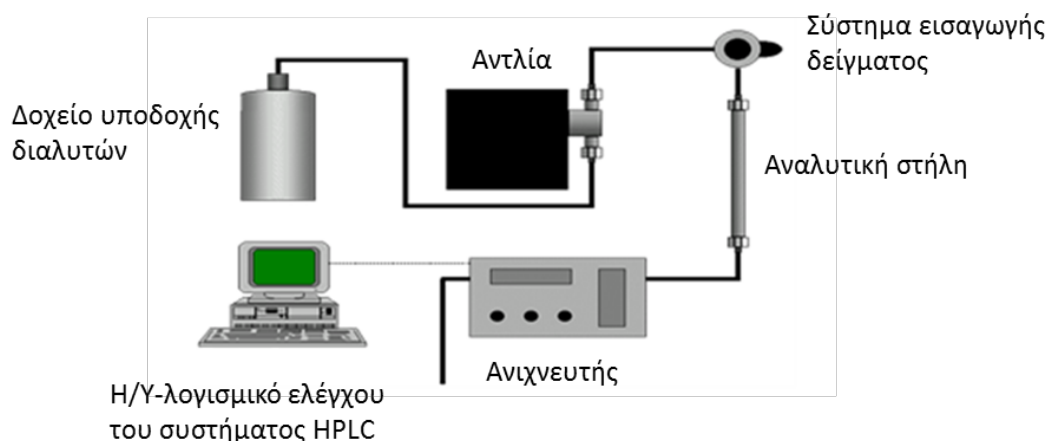
6.2 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της σταθερότητας της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε αναλυτική στήλη Phenyl, η οποία είχε χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε δισκία. Για τους σκοπούς της μελέτης η μέθοδος RP-HPLC επικυρώθηκε μερικώς

χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου [201]. Με στόχο τη διασφάλιση της εκλεκτικότητας της μεθόδου έναντι πιθανόν προϊόντων αποικοδόμησης και την επιβεβαίωση ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ενδεικτική για μελέτες σταθερότητας των αναλυτών οι κινητικές παράμετροι διερευνήθηκαν διεξοδικά σε διάφορες συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης [202] .

6.3 Εξοπλισμός-Οργανολογία

- **Σύστημα HPLC-UV:** το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης SpetraSeries της εταιρίας SP ThermoSperation products, από σύστημα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL και από ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) της εταιρίας Waters μοντέλο 486 ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 280nm. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι στήλη αντιστρόφου φάσης Fortis Phenyl με μέγεθος σωματιδίων 5 μm (150 x 2,1 mm i.d.) της εταιρίας Fortos. Η εξαγωγή και επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters. Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος HPLC-UV παρουσιάζεται στο σχήμα 6.1.



Σχήμα 6.1: Σχηματικό διάγραμμα του χρωματογραφικού συστήματος

- Για τη ρύθμιση των τιμών του pH χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό πεχάμετρο της Metrohm, μοντέλο 654.

- Η απαραίτητη απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρα νάυλον μεγέθους πόρων 0,45 μm .
- Η ζύγιση των πρώτων υλών για την παρασκευή των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε ζυγό ακρίβειας της εταιρείας Gibertini, μοντέλο E 42.
- Η διαλυτοποίηση των αναλυτών έγινε με λουτρό υπερήχων της εταιρείας Emla, μοντέλο Transsonic 460.
- Η ανάδευση έγινε σε κατάλληλη συσκευή Vortex, της εταιρείας Velp Scientifica.
- Οι μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν σε υδατόλουτρο σε υδρατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας και ρυθμισμένο σε θερμοκρασία $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ μοντέλο Precistern.
- Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες Gilson των 200 και 1000 μL .

6.4 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
- Νερό, απεσταγμένο και απιοντισμένο, με τη συσκευή Milli-Q Plus (Millipore, Ltd).
- Οξικό αμμώνιο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Merck.
- Οι αναλύτες υδροχλωροθειαζίδιο και αλισκιρένη, ήταν φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας και προσφέρθηκαν από την εταιρεία Novartis.
- HCL, NaOH, HCOOH και H₂O₂ αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, της εταιρείας Merck

6.5 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

Διάλυμα παρακαταθήκης A: Ζυγίζονται με ακρίβεια 12,5 mg υδροχλωροθειαζιδίου και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Ακολουθεί διάλυση με μίγμα ακετονιτριλίου-νερού σε αναλογία 1:1, v/v σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι πρότυπο διάλυμα υδροχλωροθειαζιδίου συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Διάλυμα παρακαταθήκης B: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 33.15 mg υδροχλωρικής αλίσκιρνης (ισοδύναμη ποσότητα με 30 mg αλίσκιρνης) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Ακολουθεί διάλυση με μίγμα ακετονιτριλίου-νερού σε αναλογία 1:1 v/v σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι πρότυπο διάλυμα αλίσκιρνης συγκέντρωσης 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Διαλύματα εργασίας των αναλυτών για την καμπύλη βαθμονόμησης: Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης παρασκευάζονται κάθε φορά διαλύματα εργασίας αλίσκιρνης σε συγκεντρώσεις 1,5, 2,1, 3,0, 3,6, 3,9 και 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και διαλύματα εργασίας υδροχλωροθειαζιδίου και 1,25, 1,75, 2,50, 3, 3,75 και 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4°C, όπου παραμένουν σταθερά για αρκετές εβδομάδες. Τα διαλύματα εργασίας για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται φρέσκα κάθε εργαστηριακή ημέρα.

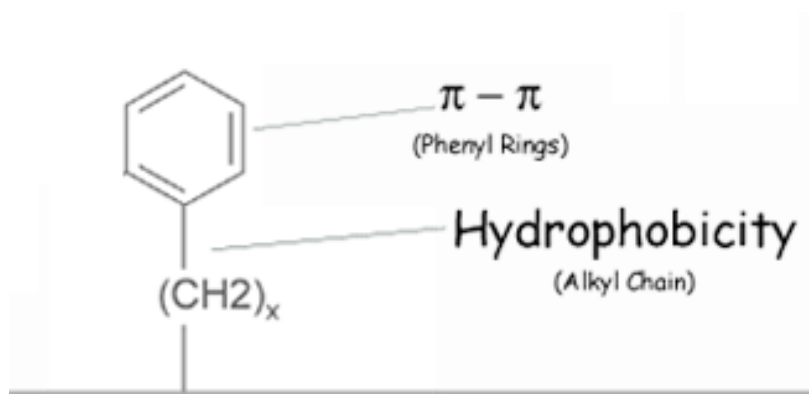
Διαλύματα εργασίας για τις μελέτες σταθερότητας της αλίσκιρνης: Παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα αλίσκιρνης σε HCL 1 M, NaOH 1 M και σε 5% v/v H₂O₂. Τα διαλύματα παρασκευάζονται αραιώνοντας ακριβώς 1250 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης B σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με τον κατάλληλο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι διάλυμα εργασίας αλίσκιρνης συγκέντρωσης 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Διαλύματα εργασίας για τις μελέτες σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου:
Παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα υδροχλωροθειαζιδίου σε HCL 1 M, NaOH 1 M και σε 5% v/v H₂O₂. Τα διαλύματα παρασκευάζονται αραιώνοντας ακριβώς 1500 μ L από το διάλυμα παρακαταθήκης Α σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με τον κατάλληλο διαλύτη. Παρασκευάζεται έτσι διάλυμα εργασίας υδροχλωροθειαζιδίου συγκέντρωσης 60 μ g mL⁻¹.

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου: το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 30 mM παρασκευάζεται με ζύγιση 0,231 g CH₃COONH₄ διάλυση σε νερό HPLC και αραιώση μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με νερό.

6.6 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Ο κυρίαρχος μηχανισμός κατακράτησης στην αναλυτική στήλη Phenyl Fortis που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες σταθερότητας είναι αυτός της υδρόφιλης κατανομής, έχουμε υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Επιπλέον η λειτουργική ομάδα της στήλης (σχήμα 6.2) είναι υπεύθυνη για υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και π-π αλληλεπιδράσεις.

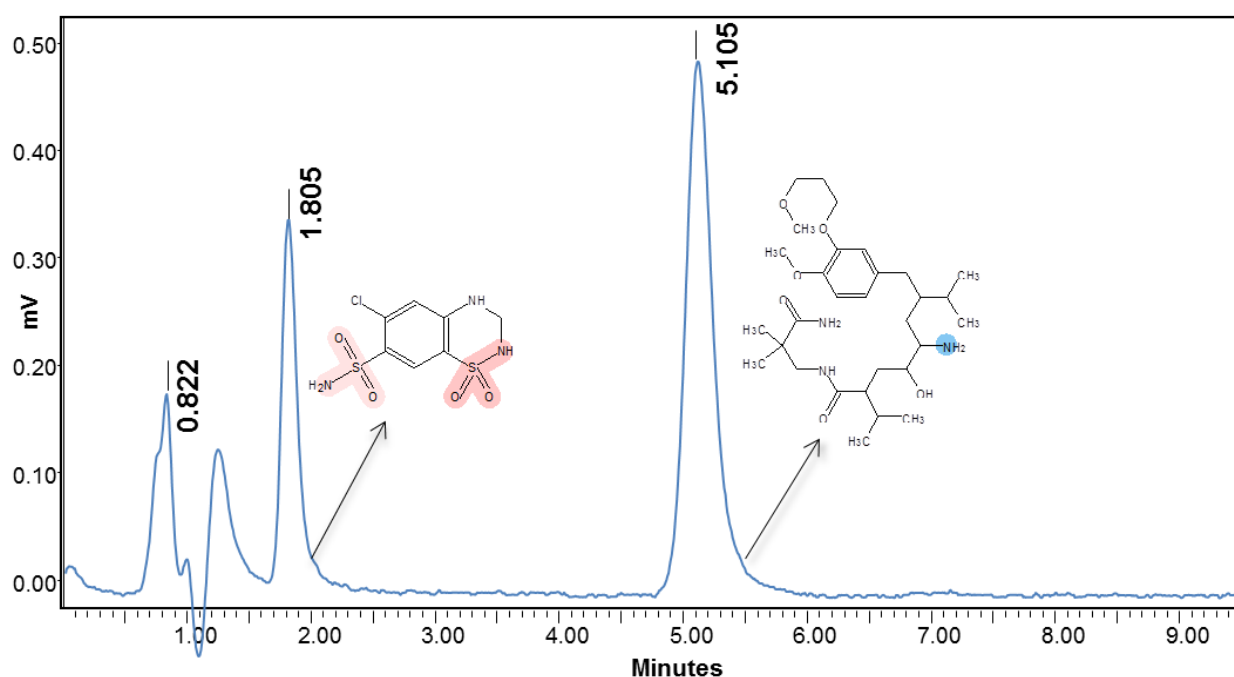


Σχήμα 6.2 Λειτουργική ομάδα της αναλυτικής στήλης Phenyl (πηγή Fortis®)

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του υδροχλωροθειαζιδίου και της αλίσκιρνης καθορίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο και είναι οι εξής:

- Στατική φάση: στήλη Fortis® Phenyl 150×2,1 mm, 5 μm.
- Κινητή φάση: 30mM CH₃COONH₄/ακετονιτρίλιο σε αναλογία 60/40 v/v.
- Ταχύτητα ροής: 0,40 mL min⁻¹
- Όγκος βρόχου: 20 μL
- Ανιχνευτής: UV-Vis με μήκος κύματος ανίχνευσης τα 280 nm.

Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα μίγματος διαλύματος αλίσκιρνης και υδροχλωροθειαζιδίου.



Σχήμα 6.3: Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση μικτού διαλύματος εργασίας που περιέχει αλίσκιρνη και υδροχλωροθειαζίδιο.

Υπό τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες οι χρόνοι κατακράτησης της αλίσκιρνης και του υδροχλωροθειαζιδίου είναι 5,1 και 1,8 λεπτά αντίστοιχα.

6.7 Μερική επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου

Για τις μελέτες σταθερότητας της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη και τον υπολογισμό της %αποικοδόμησης του. Πραγματοποιήθηκε επομένως ο έλεγχος γραμμικότητας με καμπύλες βαθμονόμησης χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου.

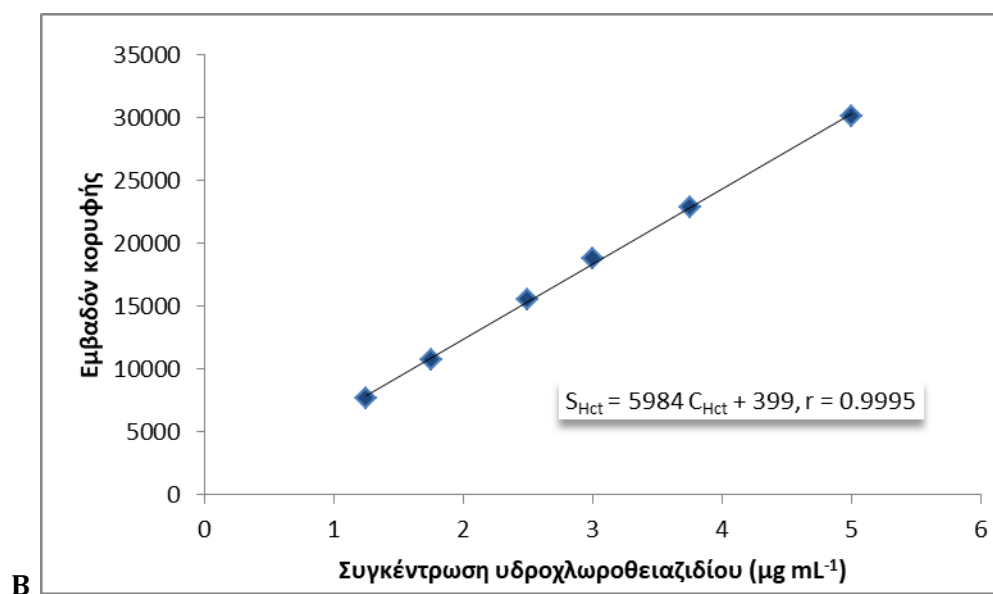
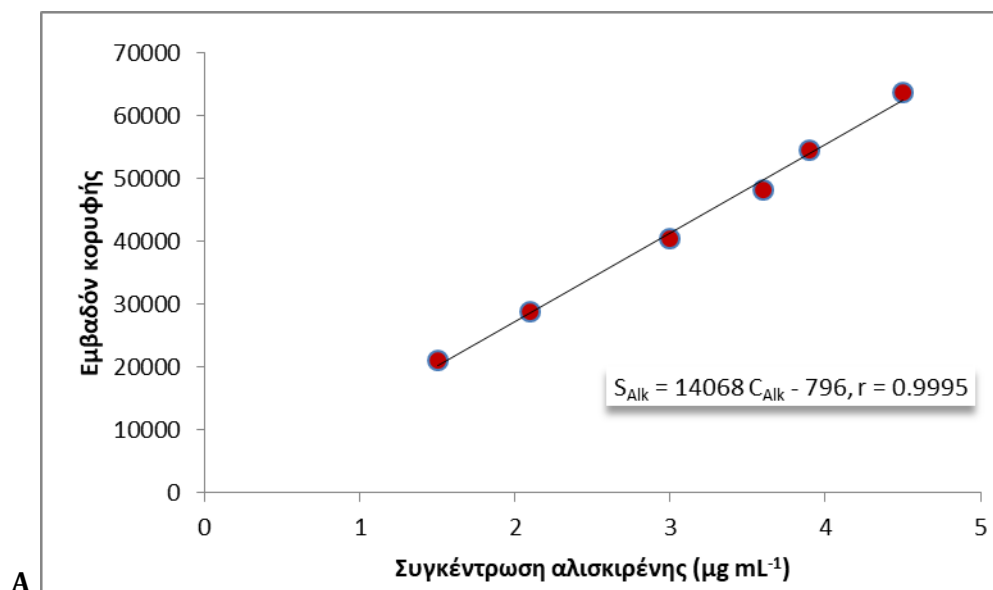
6.7.1 Έλεγχος γραμμικότητας

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τρεις καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη που κατασκευάζονται σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Χρησιμοποιούνται τα διαλύματα εργασίας αλισκιρένης και υδροχλωροθειαζιδίου που αναφέρθηκαν παραπάνω. Κάθε ένα από αυτά τα δείγματα ενίεται 2 φορές στο σύστημα HPLC-UV. Σε κάθε μέτρηση μετράται το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή των επιφανειών. Τα αποτελέσματα για κάθε μία από τις 3 σειρές μετρήσεων για κάθε παρουσιάζονται στους πίνακες 6.2 και 6.3. Σε κάθε πίνακα παρουσιάζεται η θεωρητική τιμή της συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη, η μέση τιμή του εμβαδού κορυφής, η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με βάση την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης, καθώς και το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα.

Πίνακας 6.2: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης της αλίσκιρένης			
Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Μέση τιμή του εμβαδού κορυφής _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,5	21211	1,46	-2,8
	20911	1,501	0,2
	21979	1,55	3,4
2,1	30348	2,16	2,9
	28997	2,09	-0,5
	28834	2,10	0,1
3	41552	3,02	0,7
	41595	3,01	0,2
	40486	2,93	-2,3
3,6	48890	3,59	-0,4
	49801	3,60	0,1
	48271	3,48	-3,2
3,9	52113	3,83	-1,7
	53925	3,90	0,1
	54550	3,93	0,8
4,5	61336	4,54	0,9
	62018	4,49	-0,2
	63681	4,58	1,8

Πίνακας 6.3: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου			
Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Μέση τιμή του εμβαδού κορυφής _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
1,25	7626	1,23	-1,8
	7634	1,28	2,0
	7646	1,21	-3,0
1,75	11029	1,75	-0,1
	10350	1,73	-1,0
	10774	1,74	-0,8
2,5	15415	2,49	-0,6
	15050	2,52	0,9
	15497	2,53	1,0
3	19002	3,09	2,9
	17596	2,95	-1,7
	18742	3,07	2,2
3,75	19781	3,71	-1,0
	18825	3,76	0,3
	20105	3,76	0,3
4	22720	4,99	-0,2
	22425	5,01	0,2
	22903	4,96	-0,8

Η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη και του μετρούμενου σήματος πραγματοποιήθηκε με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Έτσι λήφθηκαν οι γραμμικές εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις που προέκυψαν από τις εξισώσεις των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης δεν απείχαν περισσότερο από 3,4 % από τις ονομαστικές τιμές (πίνακας 6.3). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις διεθνείς οδηγίες και αποτελεί ένδειξη ότι το γραμμικό μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τη σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του κάθε αναλύτη και την αντίστοιχη απόκριση του οργάνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα γραφικών παραστάσεων με τα διαγράμματα των καμπυλών βαθμονόμησης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου που προέκυψαν μετά από την ανάλυση μιας εργαστηριακής μέρας παρουσιάζεται στο σχήμα 6.4.



Σχήμα 6.4 Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης: Α) της αλισκιρένης και Β) του υδροχλωροθειαζιδίου, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς μετρήσεων για κάθε αναλύτη

Πίνακας 6.4: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου για τη μελέτη σταθερότητας						
Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg mL ⁻¹)	Γραμμική εξίσωση ^α	r ^β	Τυπική απόκλιση		S _r ^γ	α/S _α ^δ
Αναλύτης						
Αλισκιρένη						
1 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Alk} = 13016 × C _{Alk} + 2225	0,9998	284	931	721	2,39
2 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Alk} = 13746 × C _{Alk} + 241	0,99998	41	134	104	1,95
3 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Alk} = 14068 × C _{Alk} – 796	0,998	465	1518	1177	0,52
Υδροχλωροθειαζίδιο						
1 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Hct} = 5957 × C _{Hct} + 611	0,9994	303	97	296	2,01
2 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Hct} = 5952 × C _{Hct} + 42	0,9997	64	199	195	0,21
3 ^η σειρά μετρήσεων						
	S _{Hct} = 5984 × C _{Hct} + 399	0,9995	90	283	275	1,41
α Εμβαδόν της κορυφής της αλισκιρένης, S _{Alk} , και του υδροχλωροθειαζιδίου, S _{Hct} , σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της αλισκιρένης, C _{Alk} , και του υδροχλωροθειαζιδίου, C _{Hct} , αντίστοιχα.						
β Συντελεστής συσχέτισης						
γ Σχετικό τυπικό σφάλμα μεθόδου.						
δ Η θεωρητική τιμή του t για 95% επίπεδο εμπιστοσύνης (P= 0,05) και f= n-2 = 4 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,77						

6.8 Μελέτες χημικής κινητικής

Μελετήθηκε η χημική κινητική της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε υδατικά διαλύματα και σύμφωνα με τις εξής συνθήκες:

- Όξινη υδρόλυση σε 1 M HCl στους 25°C
- Αλκαλική υδρόλυση 1 M NaOH στους 25 °C
- Οξειδωτική αποικοδόμηση σε διάλυμα H₂O₂ συγκέντρωσης 5,0% v/v στους 25 °C.

Οι μελέτες αυτές έγιναν στις συνθήκες RP-HPLC που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο.

Στη χημική κινητική ως μέτρο της ταχύτητας της αντίδρασης ενός αναλύτη χρησιμοποιείται, αντί της μετατροπής του αναλύτη ανά μονάδα χρόνου dn/dt , η μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη ανά μονάδα χρόνου dc/dt . Επομένως σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το εμβαδόν της κορυφής του κάθε αναλύτη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του με βάση την αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης και στη συνέχεια η συγκέντρωση εκφράζεται σε molarity, M για τις μελέτες της χημικής κινητικής. Ο προσδιορισμός της τάξης της αντίδρασης και η σταθερά ταχύτητας υπολογίζονται από τα διαγράμματα του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στις μελέτες αποικοδόμησης τόσο της αλισκιρένης όσο και του υδροχλωροθειαζιδίου η συγκέντρωση του ενός από τα δύο αντιδρώντα (HCl, NaOH , H₂O₂) παραμένει σταθερή, επειδή παρέχεται σε περίσσεια, με αποτέλεσμα η τάξη της αντίδρασης να εμφανίζεται μικρότερη απότι είναι στην πραγματικότητα. Η συγκέντρωση του αντιδρώντος που βρίσκεται σε περίσσεια ενσωματώνεται στη σταθερά ταχύτητας k , δίνοντας έτσι τη νέα σταθερά k' .

6.8.1 Πορεία εργασίας

Το διάλυμα εργασίας κάθε αναλύτη για τη μελέτη σταθερότητας, συγκέντρωσης $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ τοποθετείται σε ειδικό φιαλίδιο αντίδρασης και σε υδρατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας και ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 25°C . Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται ακριβώς καθορισμένοι όγκοι δείγματος από το κάθε πυκνό διάλυμα και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL εξουδετερώνοντας κάθε φορά με την αντίστοιχη ποσότητα οξέος ή βάσης. Τα αραιωμένα διαλύματα των αναλυτών τοποθετούνται σε παγόλουτρο ώστε να διακοπεί η αντίδραση, ενώ παραμένουν σε αυτό μέχρι την ανάλυση τους στο σύστημα HPLC-UV και σύμφωνα με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών επιτυγχάνεται με καμπύλες βαθμονόμησης που έγιναν με τον προσδιορισμό του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών. Ως μηδενικός χρόνος, t_0 , θεωρείται η στιγμή της ανάμιξης του κάθε αναλύτη με το αρχικό διάλυμα (HCl, NaOH ή H_2O_2).

6.8.2 Μελέτης σταθερότητας της αλισκιρένης

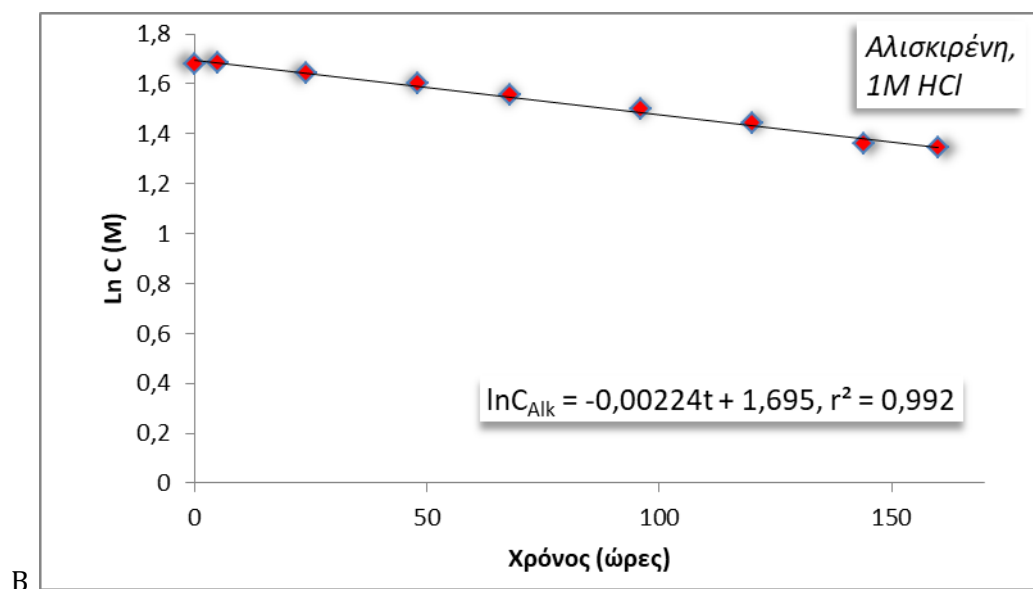
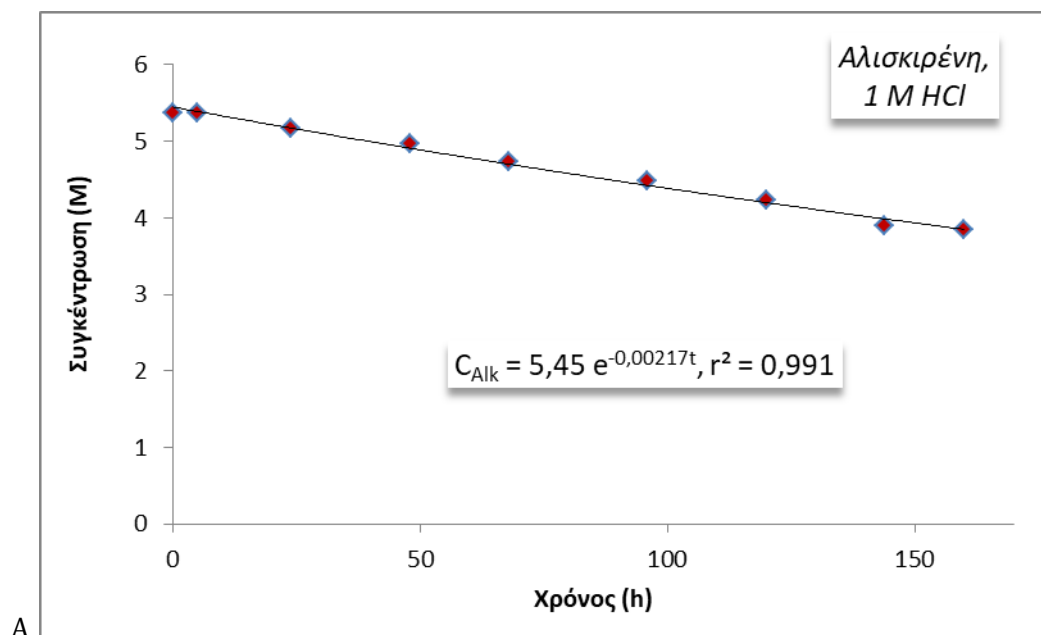
Η μελέτη σταθερότητας της αλισκιρένης στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκε με λήψεις δειγμάτων εις τριπλούν σε κάθε χρονική περίοδο και για κάθε συνθήκη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλισκιρένης επιτυγχάνεται με μέτρηση του εμβαδού της χρωματογραφικής της κορυφής και χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης.

6.8.2.1 Χημική κινητική της όξινης αποικοδόμησης της αλισκιρένης

Τα αποτελέσματα της όξινης αποικοδόμησης της αλισκιρένης παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5: Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας της αλισκιρένης σε όξινες συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$)		
Όξινες συνθήκες (1 M HCl, 25°C)		
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση_(n=3)</i>	% Ανάκτηση
0	$2,965 \pm 0,037$	$98,8 \pm 1,2$
5	$2,968 \pm 0,043$	$98,9 \pm 1,4$
24	$2,848 \pm 0,018$	$94,9 \pm 0,6$
48	$2,740 \pm 0,058$	$91,3 \pm 0,2$
68	$2,616 \pm 0,065$	$87,2 \pm 2,2$
96	$2,437 \pm 0,026$	$82,4 \pm 0,9$
120	$2,331 \pm 0,060$	$77,7 \pm 2,0$
144	$2,154 \pm 0,025$	$71,8 \pm 0,8$
160	$2,123 \pm 0,096$	$70,8 \pm 3,2$

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της αλισκιρένης (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 6.5.



Σχήμα 6.5: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης της αλυσικιρένης σε συνάρτηση με το χρόνο σε όξινες συνθήκες.

Η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του χρόνου υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση της αλυσικιρένης σε όξινες συνθήκες ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς αποικοδόμησης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση [203]:

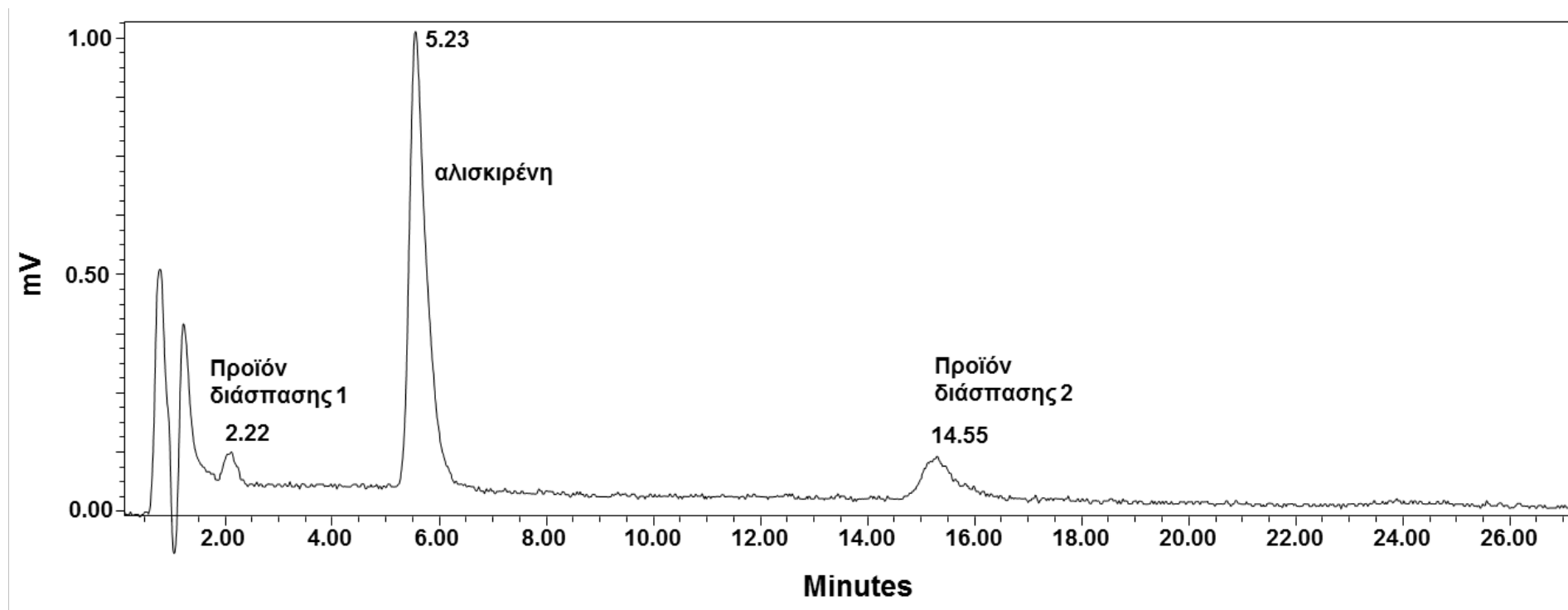
$$C = C_0 e^{-kt},$$

όπου C η συγκέντρωση της αλισκιρένης εκφρασμένη σε M,

t ο χρόνος αποικοδόμησης, και k η σταθερά αποικοδόμησης. Η παραπάνω εξίσωση βρίσκει εφαρμογή σε χημικές αντιδράσεις που ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης.

Από το ημι-λογαριθμικό διάγραμμα της μεταβολής του $\ln C$ σε συνάρτηση με το χρόνο, προκύπτει εμφανώς γραμμική σχέση (σχήμα 6.5B), η κλίση αυτής της γραμμικής εξίσωσης αντιστοιχεί στη σταθερά αποικοδόμησης της αλισκιρένης και η τομή στο λογάριθμο της αρχικής πειραματικής συγκέντρωσης εκφρασμένη σε M.

Η %ανάκτηση της αλισκιρένης μετά από 160 ώρες παραμονής σε όξινο περιβάλλον ανέρχεται σε ποσοστό 70,8%. Στο σχήμα 6.6 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προέρχεται από την ανάλυση δείγματος αλισκιρένης μετά από 96 ώρες αποικοδόμησης σε όξινες συνθήκες 1M HCl. Στις συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης ανιχνεύονται στο μήκος κύματος ανίχνευσης (280 nm) δύο προϊόντα αποικοδόμησης τα οποία εκλούνται σε χρόνους 2,2 και 14,5 λεπτά.



Σχήμα 6.6: Τυπικό χρωματογράφημα που προέρχεται από την ανάλυση διαλύματος αλισκιρένης μετά από 96 ώρες αποικοδόμησης σε όξινες συνθήκες 1M HCl. Η συγκέντρωση της αλισκιρένης στο διάλυμα που αναλύθηκε ήταν $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ και ο χρόνος κατακράτησης της είναι 5,2 λεπτά

6.8.2.2 Χημική κινητική της οξειδωτικής αποικοδόμησης της αλισκιρένης

Τα αποτελέσματα της οξειδωτικής αποικοδόμησης της αλισκιρένης σε υδατικό διάλυμα 5% v/v H₂O₂, 25°C παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6.

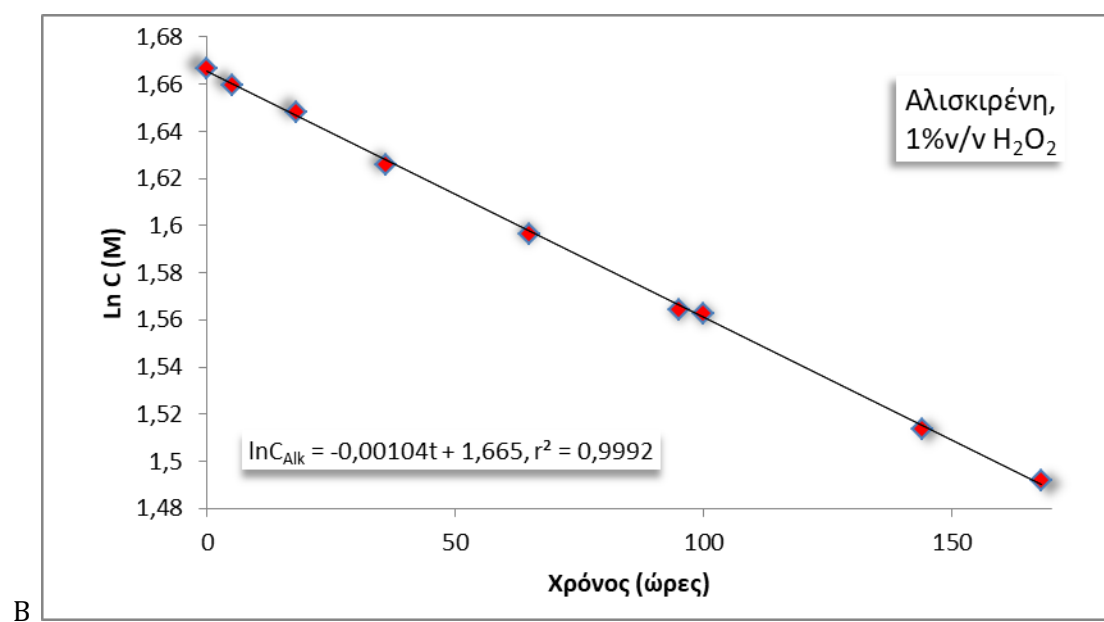
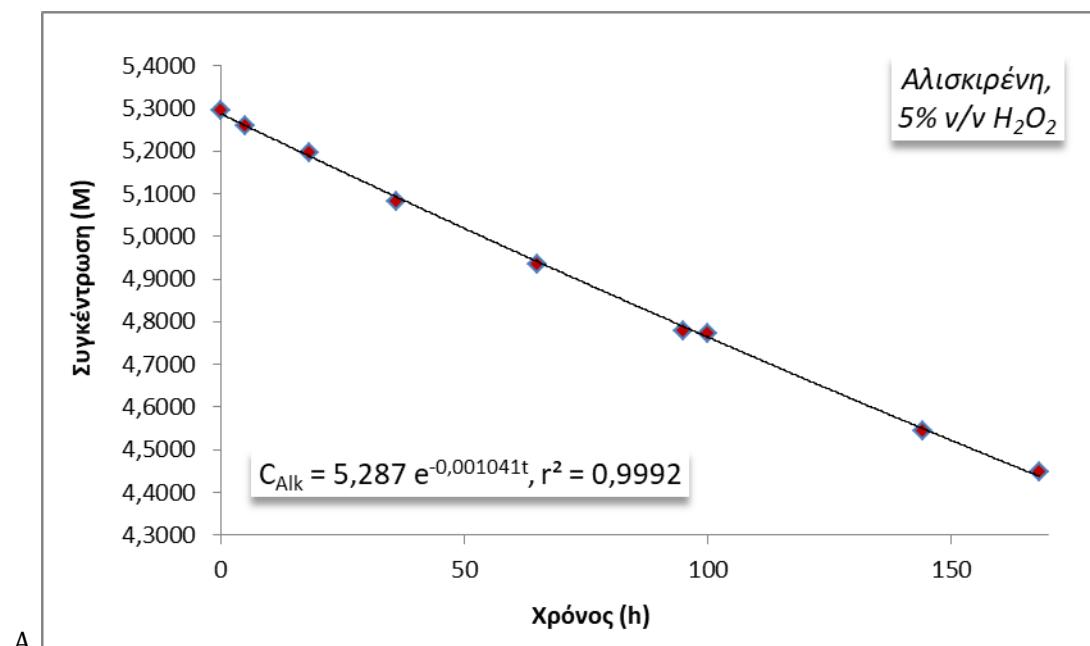
Πίνακας 6.6 Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας της αλισκιρένης σε οξειδωτικές συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

	Όξινες συνθήκες (5% v/v H ₂ O ₂ , 25°C)	
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση_(n=3)</i>	% Ανάκτηση
0	2,922 $\pm$ 0,028	97,4 $\pm$ 0,9
5	2,901 $\pm$ 0,032	96,7 $\pm$ 1,1
18	2,867 $\pm$ 0,011	95,6 $\pm$ 0,3
36	2,805 $\pm$ 0,048	93,5 $\pm$ 1,1
65	2,723 $\pm$ 0,035	90,8 $\pm$ 0,7
95	2,637 $\pm$ 0,032	87,9 $\pm$ 0,9
100	2,633 $\pm$ 0,029	87,8 $\pm$ 0,8
144	2,507 $\pm$ 0,032	83,6 $\pm$ 1,1
168	2,453 $\pm$ 0,035	81,8 $\pm$ 0,6

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της αλισκιρένης (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 6.7. Η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του χρόνου υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση της αλισκιρένης σε οξειδωτικές συνθήκες ακολουθεί επίσης κινητική ψευδοπρώτης τάξης.

Από το ημι-λογαριθμικό διάγραμμα της μεταβολής του $\ln C$ σε συνάρτηση με το χρόνο, προκύπτει εμφανώς γραμμική σχέση (σχήμα 6.7B), η κλίση αυτής της γραμμικής εξίσωσης αντιστοιχεί στη σταθερά αποικοδόμησης της αλισκιρένης

και η τομή στο λογάριθμο της αρχικής πειραματικής συγκέντρωσης της εκφρασμένη σε M.



Σχήμα 6.7: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης της αλισκιρένης σε συνάρτηση με το χρόνο σε οξειδωτικές συνθήκες

Από την αποικοδόμησή της σε οξειδωτικές συνθήκες προκύπτουν δύο προϊόντα αποικοδόμησης που εκκλύονται στα 3,33 και 7,89 λεπτά και μετά από 168 ώρες αποικοδόμησης η % ανάκτησή της είναι 81,2 %.

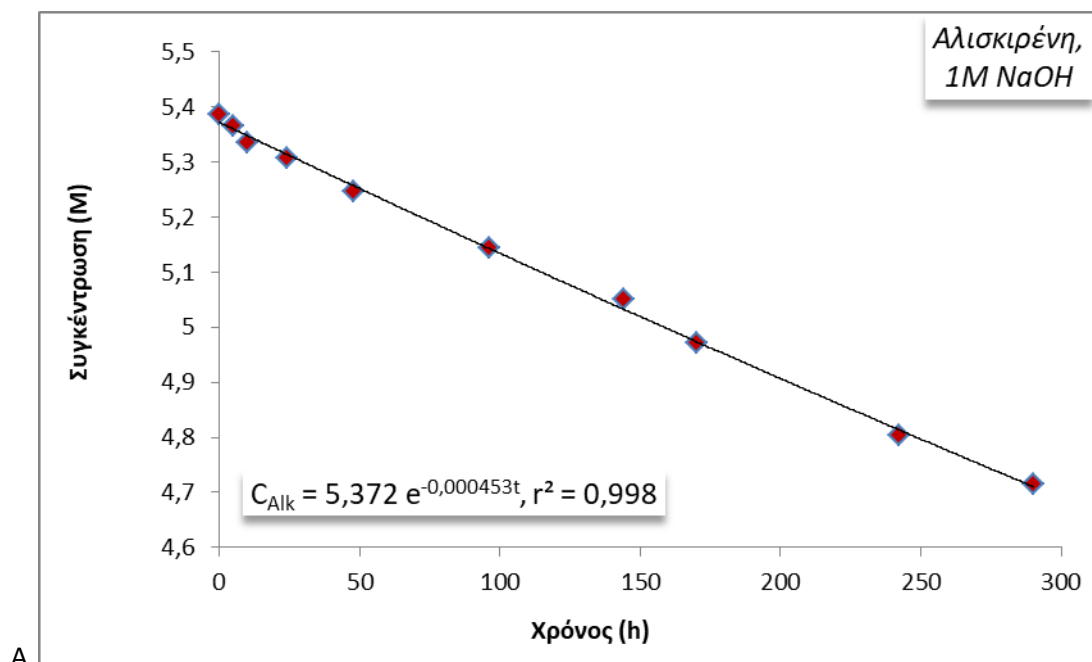
Η % ανάκτηση της αλισκιρένης μετά από 168 ώρες παραμονής σε οξειδωτικό περιβάλλον ανέρχεται σε ποσοστό 81,2 %. Στις συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης ανιχνεύονται στο μήκος κύματος ανίχνευσης (280 nm) δύο προϊόντα αποικοδόμησης τα οποία εκκλύονται σε χρόνους 2,22 και 14,45 λεπτά.

6.8.2.3 Χημική κινητική της αλκαλικής αποικοδόμησης της αλισκιρένης

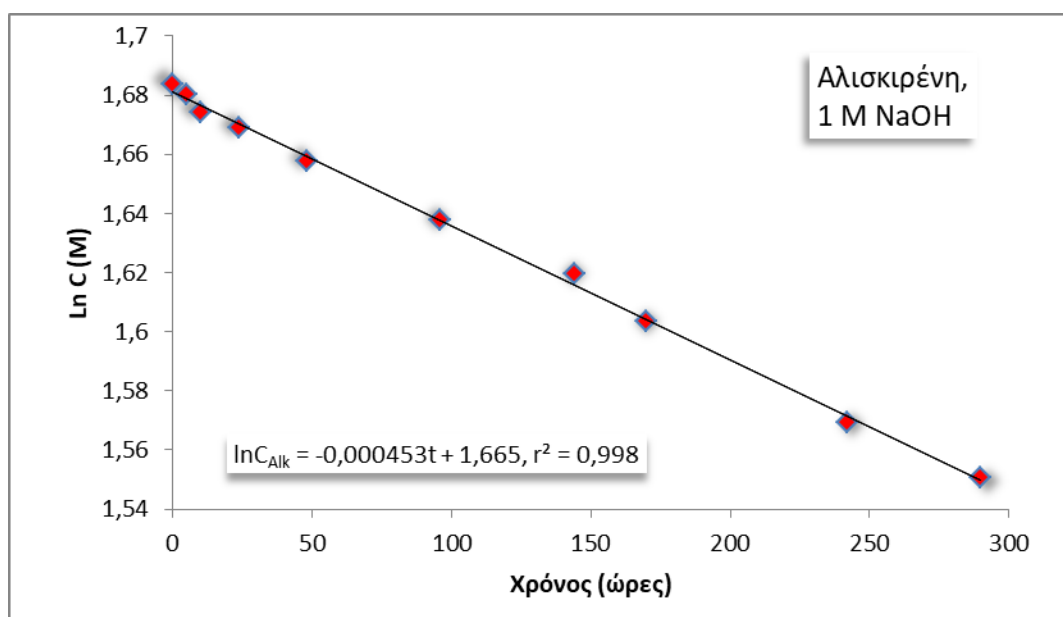
Τα αποτελέσματα της αποικοδόμησης της αλισκιρένης σε αλκαλικές συνθήκες με υδατικό διάλυμα 1 M NaOH και στους 25°C παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7: Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας της αλισκιρένης σε αλκαλικές συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$)		
	Αλκαλικές συνθήκες (1M NaOH, 25°C)	
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση_(n=3)</i>	% Ανάκτηση
0	2,972 $\pm$ 0,021	99,1 $\pm$ 0,7
5	2,961 $\pm$ 0,019	98,7 $\pm$ 0,6
10	2,944 $\pm$ 0,010	98,1 $\pm$ 0,3
24	2,928 $\pm$ 0,028	97,6 $\pm$ 0,1
48	2,886 $\pm$ 0,018	96,2 $\pm$ 0,6
96	2,838 $\pm$ 0,015	94,6 $\pm$ 0,5
144	2,787 $\pm$ 0,011	92,9 $\pm$ 0,3
170	2,743 $\pm$ 0,017	91,4 $\pm$ 0,6
242	2,650 $\pm$ 0,008	88,3 $\pm$ 0,3
290	2,601 $\pm$ 0,019	86,7 $\pm$ 0,6

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της αλίσκιρένης (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 6.8. Επικρατεί λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του χρόνου αποικοδόμησης και υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση της αλίσκιρένης σε αλκαλικές συνθήκες ακολουθεί κινητική ψευδοπρώτης τάξης.



A



B

Σχήμα 6.8: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης της αλίσκιρηνς σε συνάρτηση με το χρόνο σε αλκαλικές συνθήκες α) γραμμική συσχέτιση, β) λογαριθμική συσχέτιση

Όπως και στις προηγούμενες συνθήκες αποικοδόμησης η κλίση της εξίσωσης αντιστοιχεί στη σταθερά αποικοδόμησης της αλίσκιρηνς και η τομή στην αρχική συγκέντρωση της αλίσκιρηνς. Από την αποικοδόμηση της αλίσκιρηνς σε αλκαλικές με 1 M NaOH ανιχνεύεται ένα προϊόν αποικοδόμησης στα 2,99 λεπτά.

Η συγκέντρωση της αλισκιρένης ελαττώνεται εκθετικά σε σχέση με το χρόνο, η χημική αντίδραση της αποικοδόμησης της ακολουθεί σε όλες τις συνθήκες κινητική πρώτης τάξης.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να διασπαστεί το 50% της αρχικής ποσότητας μίας ουσίας που αντιδρά. Για τον υπολογισμό του χρόνου ημίσειας ζωής της αλισκιρένης, $t_{1/2}$, η αποικοδόμηση της οποίας σε όλες τις συνθήκες ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

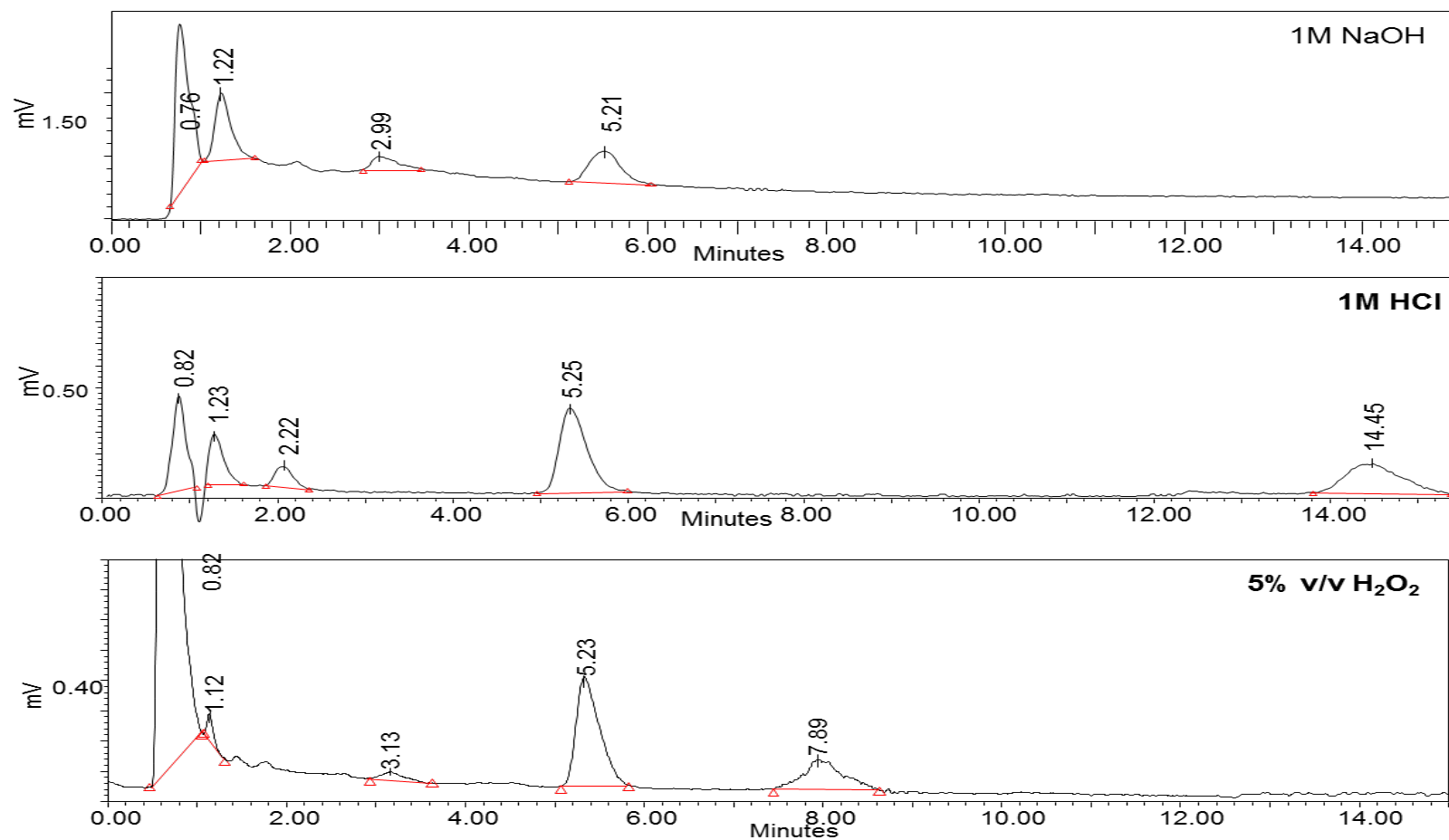
όπου k η σταθερά αποικοδόμησης (μονάδες hr^{-1}).

Οι τιμές των σταθερών αποικοδόμησης της σε διάφορες συνθήκες υπολογίστηκαν με μη γραμμική παραμετρική μέθοδο και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8: Αποτελέσματα της χημικής κινητικής της αλισκιρένης σε διάφορες συνθήκες αποικοδόμησης			
Συνθήκες αποικοδόμησης	($k \pm \text{s.d.}$) (hr^{-1})	Συντελεστής συσχέτισης	Half-life (hr)
<i>Αλισκιρένη (κινητική πρώτης τάξης, 25°C)</i>			
HCl 1M	$2,17 \times 10^{-3} (\pm 2,4 \times 10^{-4})$	>0,992	321
H ₂ O ₂ 5% v/v	$1,04 \times 10^{-3} (\pm 9,8 \times 10^{-5})$	>0,993	668
NaOH 1M	$4,53 \times 10^{-4} (\pm 7,2 \times 10^{-6})$	>0,996	1530

Όπως είναι φανερό από τα αποτελέσματα η αλισκιρένη αποικοδομείται ταχύτερα σε όξινο περιβάλλον όπου ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 321 ώρες και προκύπτουν δύο προϊόντα διάσπασης στα 2,2 και στα 14,5 λεπτά. Σε αλκαλικό περιβάλλον η αποικοδόμηση της αλισκιρένης πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό και ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 1530 λεπτά, ενώ προέκυψε ένα προϊόν αποικοδόμησης στα 2,99 λεπτά.

Στο σχήμα 6.9 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα που προέρχονται από τη αποικοδόμηση της αλίσκιρένης σε αλκαλικές, όξινες και οξειδωτικής διάσπασης.



Σχήμα 6.9: Τυπικά χρωματογραφήματα που προέρχονται από τη αποικοδόμηση της αλισκιρένης Α) μετά από 144 ώρες αποικοδόμησης σε αλκαλικές με 1M NaOH, Β) μετά από 144 ώρες αποικοδόμησης σε όξινης συνθήκες 1M HCl και Γ) μετά από 168 ώρες αποικοδόμησης σε οξειδωτικές συνθήκες με 5% v/v H₂O₂. Η συγκέντρωση της αλισκιρένης στο διάλυμα που αναλύθηκε ήταν 3 μg mL⁻¹ και ο χρόνος κατακράτησης της είναι 5,2 λεπτά

6.8.3 Μελέτη σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου

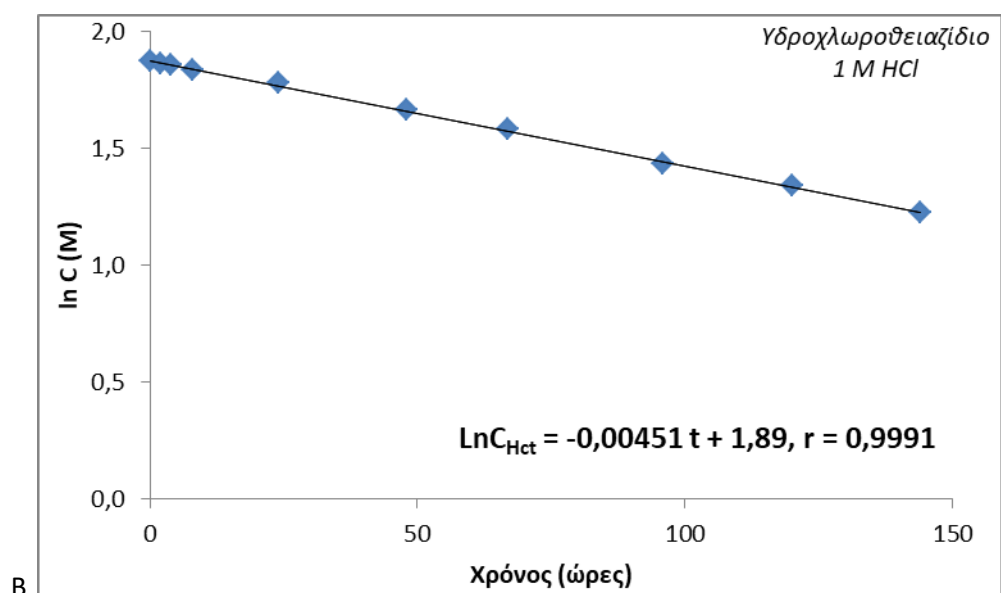
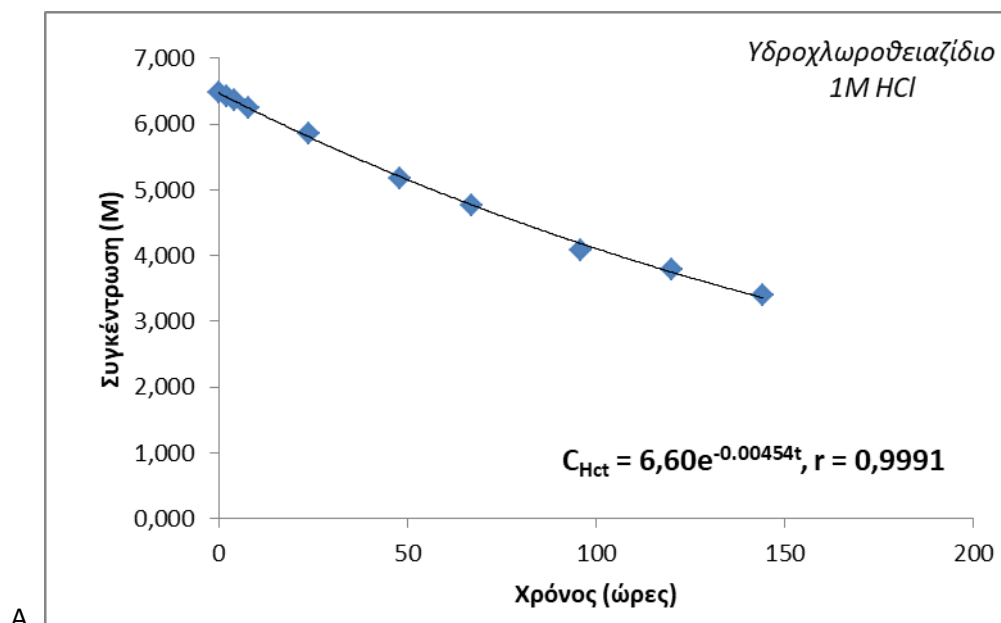
Η μελέτη σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου σε όξινες, αλκαλικές και οξειδωτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε με λήψεις δειγμάτων εις τριπλούν σε κάθε χρονική περίοδο και για κάθε συνθήκη. Σε κάθε χρονική περίοδο ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδροχλωροθειαζιδίου επιτυγχάνεται με μέτρηση του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής του και χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης.

6.8.3.1 Χημική κινητική της όξινης αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου

Τα αποτελέσματα της όξινης αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6.9.

Πίνακας 6.9: Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου σε όξινες συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$)		
	Όξινες συνθήκες (1 M HCl, 25°C)	
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)</i>	% Ανάκτηση
0	$3,524 \pm 0,062$	$102,2 \pm 0,8$
2	$3,538 \pm 0,042$	$101,1 \pm 1,2$
4	$3,513 \pm 0,031$	$100,4 \pm 0,9$
8	$3,446 \pm 0,022$	$98,4 \pm 0,6$
24	$3,284 \pm 0,074$	$92,4 \pm 1,1$
48	$2,857 \pm 0,081$	$81,6 \pm 2,3$
67	$2,667 \pm 0,156$	$74,9 \pm 3,1$
96	$2,249 \pm 0,059$	$64,3 \pm 1,7$
120	$2,090 \pm 0,069$	$59,7 \pm 1,9$
144	$1,874 \pm 0,037$	$53,6 \pm 1,0$

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 6.10Α. Η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του χρόνου υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση του υδροχλωροθειαζιδίου σε όξινες συνθήκες ακολουθεί επίσης κινητική ψευδοπρώτης τάξης. Η κλίση της εξίσωσης αντιστοιχεί στη σταθερά διάσπασης της αλίσκιρνης και η τομή στην αρχική συγκέντρωση της αλίσκιρνης.



Σχήμα 6.10: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνάρτηση με το χρόνο σε όξινες συνθήκες

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 6.10Α. Για τον υπολογισμό της σταθεράς διάσπασης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$C = C_0 e^{-kt},$$

όπου C η συγκέντρωση του υδροχλωροθειαζιδίου εκφρασμένη σε M,

t ο χρόνος αποικοδόμησης, και k η σταθερά αποικοδόμησης.

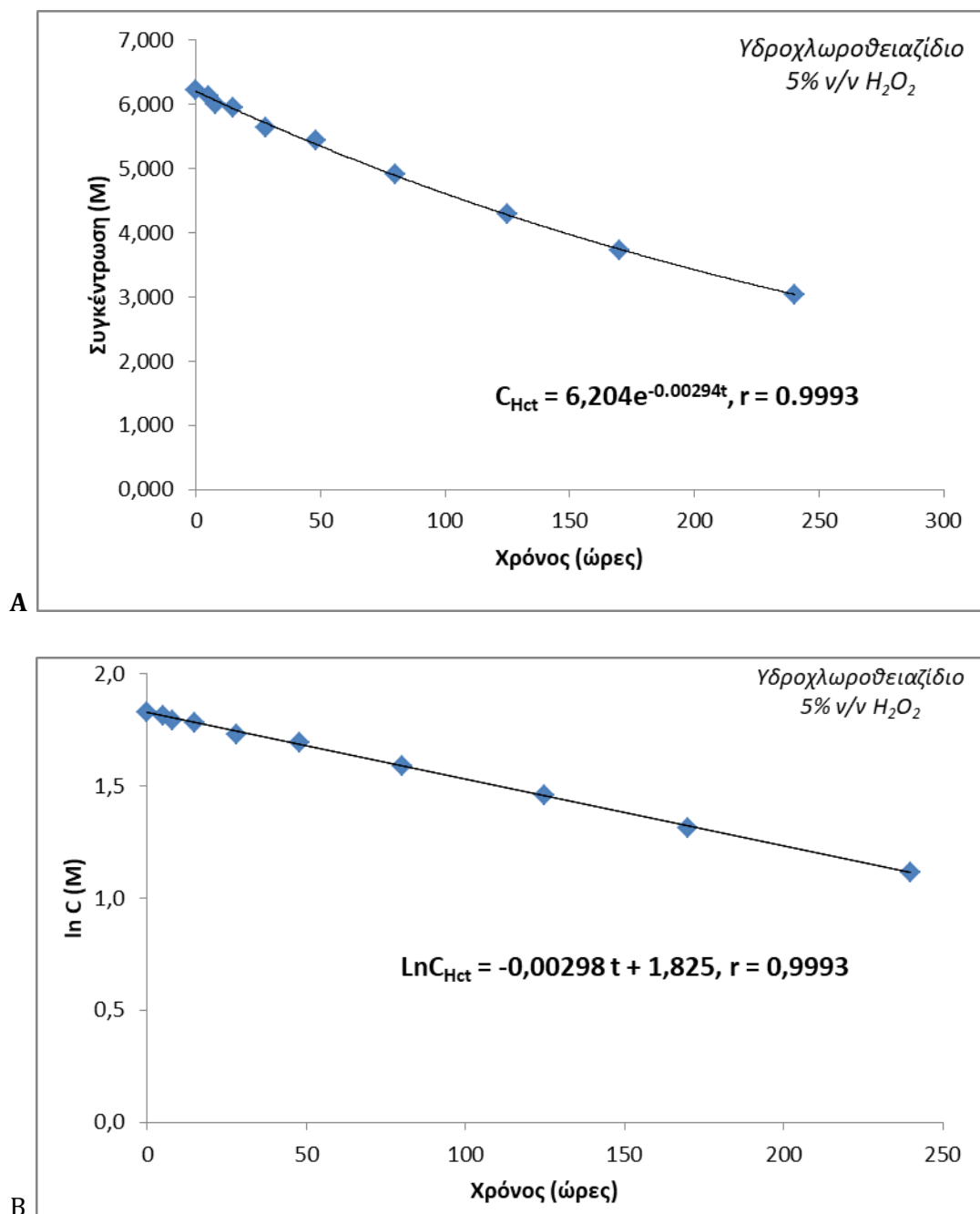
Η παραπάνω εξίσωση βρίσκει εφαρμογή σε χημικές αντιδράσεις που ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης. Η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου και του χρόνου υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση του σε όξινες συνθήκες ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Από το ημι-λογαριθμικό διάγραμμα της μεταβολής του $\ln C$ σε συνάρτηση με το χρόνο, προκύπτει εμφανώς γραμμική σχέση (σχήμα 6.10Β), η κλίση αυτής της γραμμικής εξίσωσης αντιστοιχεί στην σταθερά αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου και η τομή στην αρχική πειραματική συγκέντρωση εκφρασμένη σε M.

6.8.3.2 Χημική κινητική της οξειδωτικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου

Τα αποτελέσματα της οξειδωτικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου σε υδατικό διάλυμα 5% v/v H₂O₂, 25°C παρουσιάζονται στον πίνακα 6.10.

Πίνακας 6.10: Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου σε οξειδωτικές συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280$ nm)		
Όξινες συνθήκες (5% v/v H ₂ O ₂ , 25°C)		
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση_(n=3)</i>	% Ανάκτηση
0	3,524 $\pm$ 0,062	102,2 $\pm$ 0,8
5	3,538 $\pm$ 0,042	101,1 $\pm$ 1,2
8	3,513 $\pm$ 0,031	100,4 $\pm$ 0,9
15	3,446 $\pm$ 0,022	98,4 $\pm$ 0,6
28	3,284 $\pm$ 0,074	92,4 $\pm$ 1,1
48	2,857 $\pm$ 0,081	81,6 $\pm$ 2,3
80	2,667 $\pm$ 0,156	74,9 $\pm$ 3,1
125	2,249 $\pm$ 0,059	64,3 $\pm$ 1,7
168	2,090 $\pm$ 0,069	59,7 $\pm$ 1,9
240	1,874 $\pm$ 0,037	53,6 $\pm$ 1,0

Οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες οξειδωτικής αποικοδόμησης παρουσιάζονται στα σχήματα 6.11A και 6.11B.



Σχήμα 6.11: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνάρτηση με το χρόνο σε οξειδωτικές συνθήκες.

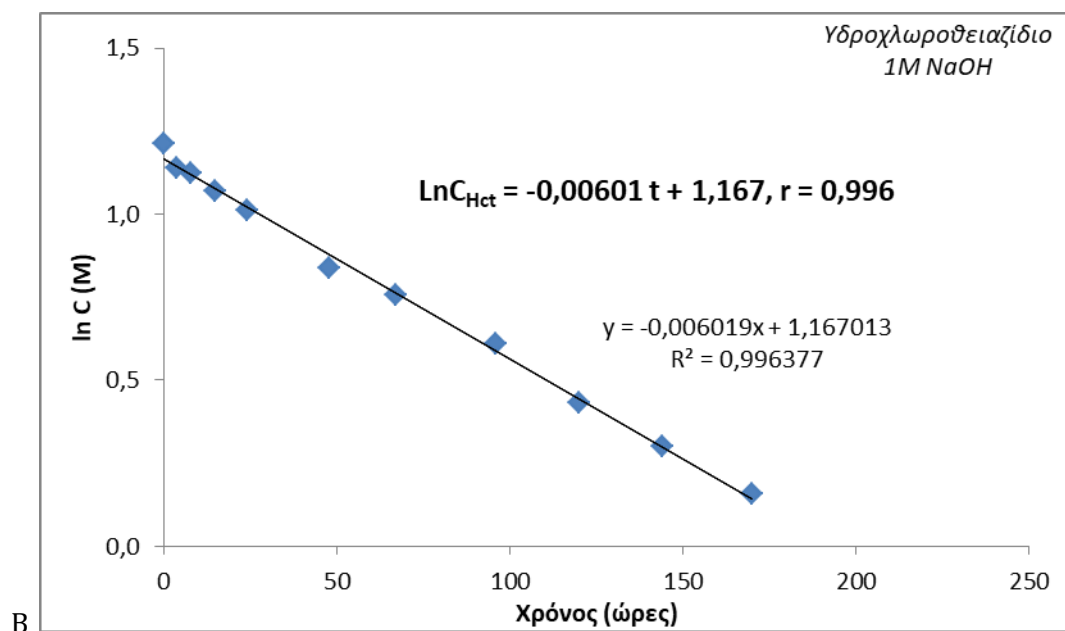
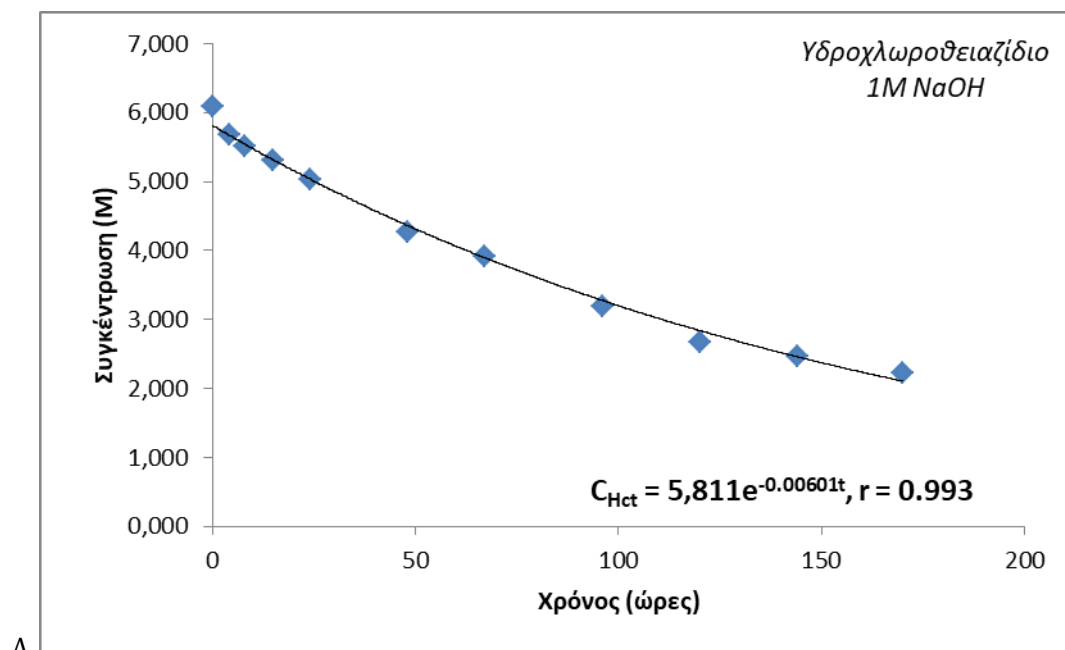
Η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου και του χρόνου, σχήμα 6.11A, δείχνει ότι η διάσπασή του σε οξειδωτικές συνθήκες ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Από το ημι-λογαριθμικό διάγραμμα της μεταβολής του $\ln C$ σε συνάρτηση με το χρόνο, προκύπτει εμφανώς γραμμική σχέση (σχήμα 6.11B), η κλίση αυτής της γραμμικής εξίσωσης αντιστοιχεί στην σταθερά αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου και η τομή στο λογάριθμο της αρχικής πειραματικής συγκέντρωσης εκφρασμένη σε M.

6.8.3.3 Χημική κινητική της αλκαλικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου

Τα αποτελέσματα της αλκαλικής αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου σε υδατικό διάλυμα NaOH 1M, 25°C παρουσιάζονται στον πίνακα 6.11.

Πίνακας 6.11 Πειραματικά δεδομένα της μελέτης σταθερότητας του υδροχλωροθειαζιδίου σε αλκαλικές συνθήκες με την τεχνική HPLC-UV ($\lambda = 280$ nm).		
Αλκαλικές συνθήκες (1M NaOH, 25°C)		
Χρόνος (hr)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$)</i>	% Ανάκτηση
0	3,356 $\pm$ 0,019	95,9 $\pm$ 0,5
4	3,126 $\pm$ 0,034	89,3 $\pm$ 0,1
8	3,043 $\pm$ 0,030	86,9 $\pm$ 0,9
15	2,931 $\pm$ 0,023	83,7 $\pm$ 0,6
24	2,776 $\pm$ 0,026	79,3 $\pm$ 0,7
48	2,359 $\pm$ 0,051	67,4 $\pm$ 1,4
67	2,161 $\pm$ 0,072	61,7 $\pm$ 2,1
96	1,810 $\pm$ 0,081	51,7 $\pm$ 2,3
120	1,476 $\pm$ 0,082	42,2 $\pm$ 2,4
144	1,361 $\pm$ 0,007	38,9 $\pm$ 0,2
170	1,231 $\pm$ 0,054	35,2 $\pm$ 1,5

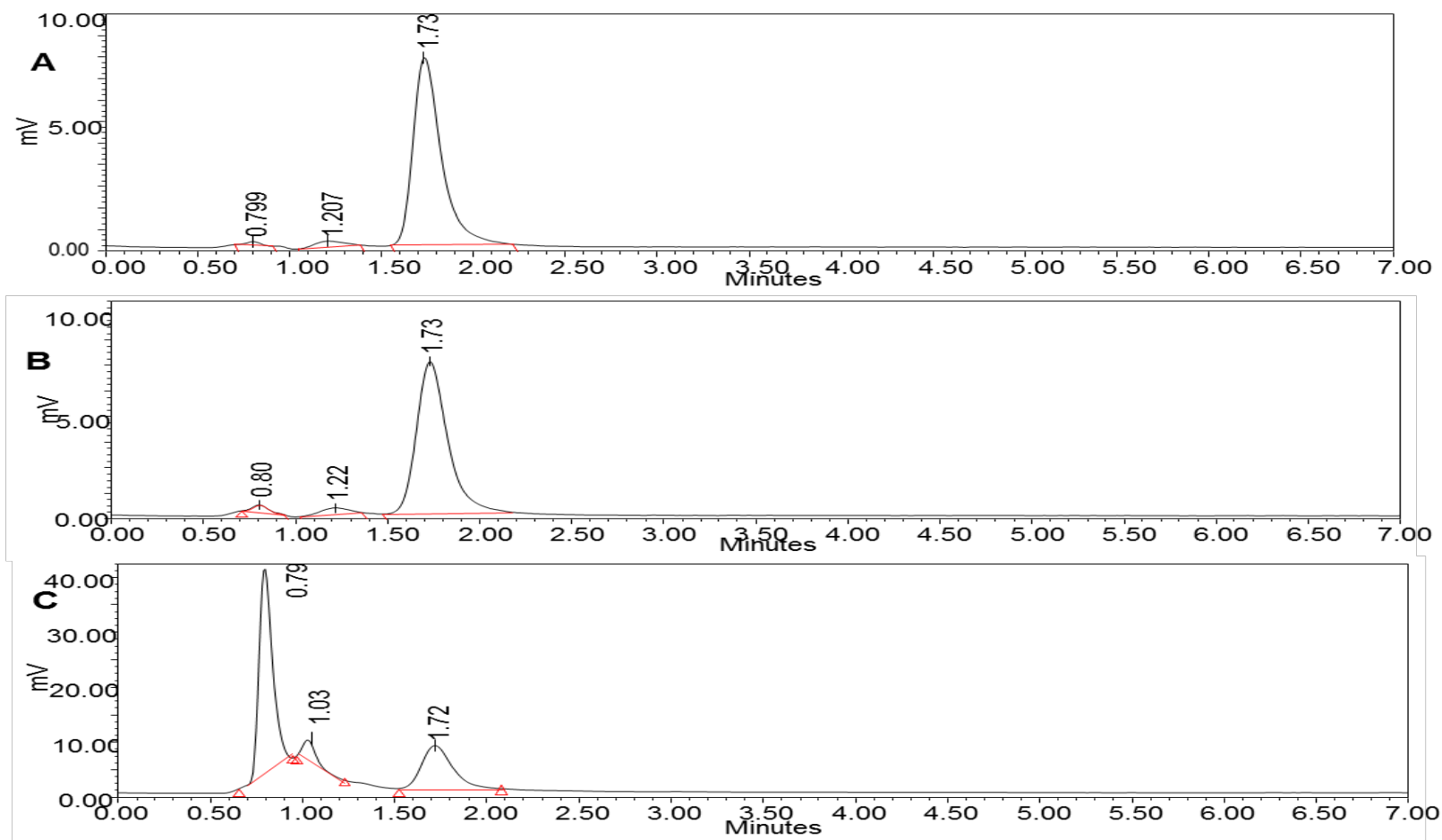
Οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο σε συνθήκες αλκαλικής αποικοδόμησης παρουσιάζονται στα σχήματα 6.12A και 6.12B.



Σχήμα 6.12: Σχηματικό διάγραμμα της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνάρτηση με το χρόνο σε αλκαλικές συνθήκες

Από τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του υδροχλωροθειαζιδίου (εκφρασμένη σε molarity, M) σε συνάρτηση με το χρόνο η οποία παρουσιάζεται στο σχήμα 6.12A, είναι φανερό ότι η αποικοδόμηση του υδροχλωροθειαζιδίου σε αλκαλικές συνθήκες ακολουθεί επίσης κινητική πρώτης τάξης. Αυτό αποδεικνύεται περαιτέρω από τη γραμμικότητα του ημι-λογαριθμικού

διαγράμματος του σχήματος 6.12B, από την κλίση της εξίσωσης υπολογίζεται η σταθερά αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου.



Σχήμα 6.13: Τυπικά χρωματογραφήματα που προέρχονται από τη αποικοδόμηση του υδροχλωροθειαζιδίου Α) μετά από 144 ώρες αποικοδόμησης σε αλκαλικές με 1M NaOH, Β) μετά από 144 ώρες αποικοδόμησης σε όξινες συνθήκες 1M HCl και Γ) μετά από 168 ώρες αποικοδόμησης σε οξειδωτικές συνθήκες με 5% v/v H₂O₂. Η συγκέντρωση του υδροχλωροθειαζιδίου στο διάλυμα που αναλύθηκε ήταν 3 μg mL⁻¹ και ο χρόνος κατακράτησης του είναι 1,7 λεπτά.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να διασπαστεί το 50% της αρχικής ποσότητας μίας ουσίας που αντιδρά. Για τον υπολογισμό του χρόνου ημίσειας ζωής του υδροχλωροθειαζιδίου, $t_{1/2}$, η αποικοδόμησης του οποίου σε όλες τις συνθήκες ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

όπου k η σταθερά αποικοδόμησης (μονάδες hr^{-1}).

Τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας για το υδροχλωροθειαζίδιο συνοψίζονται στον πίνακα 6.12.

Πίνακας 6.12: Αποτελέσματα της χημικής κινητικής του υδροχλωροθειαζιδίου σε διάφορες συνθήκες αποικοδόμησης			
Συνθήκες αποικοδόμησης	($k \pm \text{s.d.}$) (hr^{-1})	Συντελεστής συσχέτισης	Half-life (hr)
<i>Υδροχλωροθειαζίδιο (κινητική πρώτης τάξης, 25°C)</i>			
NaOH 1M	$6,09 \times 10^{-3} \pm 0,00017$	>0,992	114
HCl 1M	$4,16 \times 10^{-3} \pm 0,00052$	>0,993	166
H ₂ O ₂ 5% v/v	$2,94 \times 10^{-3} \pm 0,00017$	>0,996	216

Η συγκέντρωση του υδροχλωροθειαζιδίου ελαττώνεται εκθετικά σε σχέση με το χρόνο, η χημική αντίδραση της αποικοδόμησης του ακολουθεί σε όλες τις συνθήκες κινητική πρώτης τάξης. Οι τιμές των σταθερών αποικοδόμησης του σε διάφορες συνθήκες υπολογίστηκαν με μη γραμμική παραμετρική μέθοδο και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.12. Όπως ήδη αναφέρθηκε η μαθηματική σχέση που περιγράφει τη αποικοδόμηση του υδροχλωροθειαζιδίου σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν είναι η εξίσωση $C = pe^{-kt}$, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε αντιδράσεις πρώτης και ψευδο-πρώτης τάξης, όπου C είναι η συγκέντρωση του υδροχλωροθειαζιδίου εκφρασμένη σε M , t είναι ο χρόνος και p είναι μια σταθερά η οποία εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες. Ο συντελεστής

συσχέτισης των διαγραμμάτων της κινητικής πρώτης τάξης ήταν σε όλες τις συνθήκες μεγαλύτερος από 0,993. Η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου μετά από 140 ώρες παραμονής σε όξινο περιβάλλον ανέρχεται σε ποσοστό 53,6% χωρίς να ανιχνεύονται προϊόντα αποικοδόμησης στο μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση (280 nm). Από τη διάσπασή του σε οξειδωτικές συνθήκες δεν ανιχνεύονται προϊόντα αποικοδόμησης και η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου είναι 53,6% μετά από 240 ώρες. Στην περίπτωση της αλκαλικής υδρόλυσης η % ανάκτηση του υδροχλωροθειαζιδίου μετά από 170 ώρες είναι 35,2 % χωρίς να ανιχνεύονται προϊόντα αποικοδόμησης.

Από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα αποικοδόμησης που ανιχνεύονται δεν παρεμποδίζουν τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των δύο αναλυτών στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

6.8.4 Συμπεράσματα

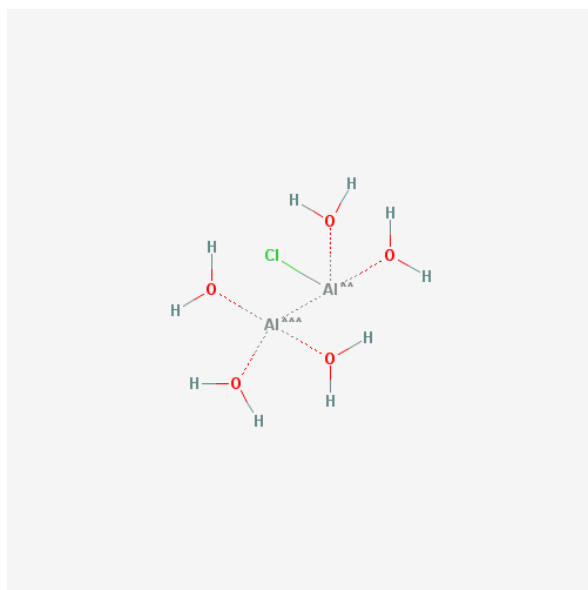
Οι κινητικές μελέτες έχουν ευρεία εφαρμογή στην επιστήμη της Φαρμακευτικής διότι παρέχουν πληροφορίες για τη σταθερότητα και το χρόνο ζωής των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών. Μια κινητική μελέτη συνήθως αναπτύσσεται με σκοπό να καθοριστούν οι συνθήκες φύλαξης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, ή για να διερευνηθεί η δυνατότητα παρασκευής μιας νέας φαρμακοτεχνικής μορφής ενός φαρμάκου. Επίσης μελέτες αποικοδόμησης πραγματοποιούνται στο στάδιο της ανάπτυξης μιας νέας αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των δραστικών συστατικών ενός φαρμακευτικού σκευάσματος ώστε να ελεγχθεί ο διαχωρισμός των δραστικών ουσιών από πιθανά προϊόντα αποικοδόμησης. Από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης της χημικής υδρόλυσης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου προκύπτει ότι και οι δύο ενώσεις ακολουθούν ψευδοταξική κινητική πρώτης τάξης. Η αποικοδόμηση της αλισκιρένης σε όξινο περιβάλλον οδηγεί σε δύο προϊόντα διάσπασης που εκλύονται στα 2,2 και 14,6 λεπτά, σε αλκαλικές συνθήκες προκύπτει ένα προϊόν διάσπασης που εκλύεται στα 2,99 λεπτά, ενώ σε οξειδωτικές συνθήκες προκύπτουν δύο νέα προϊόντα διάσπασης που εκλύονται στα 3,1 και 7,9 λεπτά. Από τις μελέτες αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου δεν προέκυψε κάποιο προϊόν αποικοδόμησης που να ανιχνεύεται στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

Ποσοτικός προσδιορισμός του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιϋδρωτική κρέμα με αντίδραση συμπλοκοποίησης του αργιλίου με κερκετίνη πριν από την ανάλυση στο σύστημα HPLC-UV

7.1 Εισαγωγή

Τα άλατα του αργιλίου, όπως είναι το υδροξυχλωριούχο αργίλιο (σχήμα 7.1), εισήχθησαν στην αγορά από το 1947 και αποτελούν δραστικά συστατικά αντιδρωτικών προϊόντων που εφαρμόζονται στην περιοχή της μασχάλης και του στήθους [204].



Ονοματολογία κατά IUPAC:

aluminum,chloroaluminum,pentahydrate

Εμπειρικός τύπος: $\text{Al}_2\text{ClH}_{10}\text{O}_5$

CAS: 12042-91-0

EC: 234-933-1

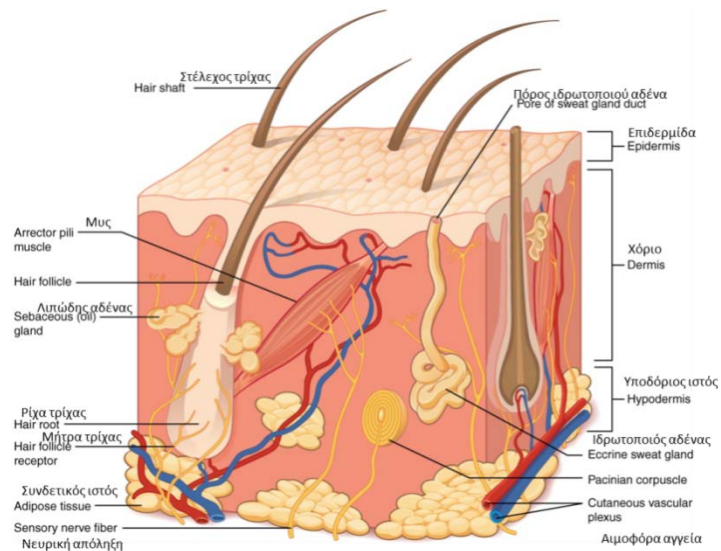
M.B.: 179.488 g/mol

Ονομασία: Dialuminium chloride

pentahydroxide ή aluminum chlorohydrate

Σχήμα 7.1: Χημική δομή του υδροξυχλωριούχου αργιλίου (πηγή: PubMed)

Η αντιδρωτική δράση του αργιλίου οφείλεται στη μηχανική παρεμπόδιση του εκφορητικού πόρου του ιδρωτοποιού αδένα (σχήμα 7.2). Η μακροχρόνια παρεμπόδιση του εκφορητικού πόρου οδηγεί σε δομική και λειτουργική εκφύλιση του αδένα με συνέπεια την απώλεια της εκκριτικής λειτουργίας²⁰⁵.



Σχήμα 7.2: Εγκάρσια τομή του δέρματος όπου φαίνεται ο ιδρωτοποιός αδένας και ο πόρος του αδένος. Πηγή: <http://cnx.org/contents/FPtK1zmh@6.27:RxywCGkA@5/Layers-of-the-Skin>

Είναι γνωστό ότι το αργίλιο έχει πιθανή γενετοξική δράση καθώς προκαλεί τροποποιήσεις στο DNA και κληρονομικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού [206]. Ωστόσο, οι ακριβείς επιδράσεις της μακροχρόνιας και τακτικής χρήσης αλάτων του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα παραμένουν άγνωστες. Υπάρχουν δημοσιεύσεις που ισχυρίζονται ότι το αργίλιο με τη μορφή του χλωριούχου αργιλίου ή με τη μορφή του υδροξυχλωριούχου αργιλίου μπορεί να παρέμβει στη λειτουργία των υποδοχέων οιστρογόνων MCF7 που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκινικών κυττάρων στην περιοχή του μαστού ως δεσμευμένου συνδέτη και ως ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης των οιστρογόνων [207]. Τα παραπάνω εντάσουν το αργίλιο στη λίστα των μετάλλων που είναι ικανά να εμπλακούν στη δράση των οιστρογόνων και καλούνται μεταλλοοιστρογόνα (metalloestrogens) [208]. Η χρήση αντιιδρωτικών προϊόντων που περιέχουν αργίλιο έχει συνδεθεί επίσης με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης Alzheimer λόγω της συστηματικής συσσώρευσης αργιλίου, ωστόσο, η παραπάνω υπόθεση είναι αμφιλεγόμενη [209, 210, 211].

Αν και έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σχετικές με τις αντιιδρωτικές ιδιότητες των αλάτων του αργιλίου, ελάχιστες εργασίες έχουν δημοσιευθεί σχετικές με την ποσοτικοποίηση του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα. Με δεδομένο την αποδεδειγμένη τοξικότητα του αργιλίου, είναι αναγκαία η ανάπτυξη μιας

αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του σε καλλυντικά προϊόντα που εφαρμόζονται στην περιοχή της μασχάλης και ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης του σε αυτά τα προϊόντα.

Οι πιο αποδοτικές αναλυτικές μέθοδοι σε ότι αφορά τον προσδιορισμό του αργιλίου σε βιολογικά υγρά αφορούν συνδιαστικές τεχνικές ανάλυσης που συνδιάζουν τη χρωματογραφία με διάφορους ανιχνευτές όπως η ατομική φασματομετρία ή φασματομετρία μαζών [212,213]. Πρόσφατα, για την ποσοτικοποίηση συμπλόκων του αργιλίου σε δείγματα υπόγειων υδάτων, δημοσιεύθηκε αναλυτική μέθοδος HPLC- FAAS και μέθοδος παραγωγοποίησης του αργιλίου μετά τη στήλη με το αντιδραστήριο 4,5-dihydroxy-1,3benzene disulfonic acid. Έχουν δημοσιευθεί επίσης διάφορες χρωματογραφικές μελέτες για την ανάλυση του αργιλίου σε υδατικά δείγματα, σε ορό πλάσματος και σε δείγματα κρασιού. Η πλειοψηφία αυτών των αναλυτικών μεθόδων περιλαμβάνει παραγωγοποίηση μετά τη στήλη με διάφορα αντιδραστήρια συμπλοκοποίησης όπως: lumogallion, morin, κερκετίνη, n-o-vanillidine-2-amino-p-cresol και 8-hydroxyquinoline. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αργιλίου σε φαρμακευτικά σκευάσματα έχει επιτευχθεί με φασματοφωτομετρία απορρόφησης χρησιμοποιώντας το chromotropic acid ως αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης. Μέχρι τώρα δεν έχει αναφερθεί καμία αναλυτική μέθοδος σχετική με τον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα.

Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με την ποσοτικοποίηση του αργιλίου και παρατίθενται περιληπτικά τα στοιχεία των αναλυτικών πρωτοκόλλων.

Πίνακας 7.1: Βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων του αργιλίου

Αναλύτες	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφία
Σύμπλοκα αργιλίου φθορίου	Σύστημα HPLC - FAAS, αναλυτική στήλη: DionexIonPac CS5A (ιοντοανταλλαγής) , προστήλη: IonPac CS5A, σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης (A) : νερό, (B) NH ₄ Cl (1,8 M, pH: ~ 3.0), ταχύτητα ροής: 2 mL/min	Μέθοδος HPLC – FAAS στην ανάλυση συμπλόκων αργιλίου-φθορίου ²¹⁴
Υπόγεια ύδατα	Σύστημα HPLC-UV (310 nm), αναλυτική στήλη: DionexIonPac CS5A (ιοντοανταλλαγής), προστήλη: IonPac CS5A, βαθμιδωτή έκλουση	Μέθοδος HPLC-UV στον προσδιορισμό του αργιλίου, σε δείγματα υπόγειων υδάτων ²¹⁵
Ορός πλάσματος	Σύστημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (λ _{ex} 505 nm, λ _{em} 574 nm), αναλυτική στήλη: LiChrosorb RP-18, κινητή φάση → ακετονιτρίλιο: 0,02M potassium hydrogen phthalate = 30:70 and 10μM lumogallion, ταχύτητα ροής: 1 mL/min.	Προσδιορισμός αργιλίου σε δείγματα ορού πλάσματος χρησιμοποιώντας ion-pair HPLC και φθορομετρική ανίχνευση με συμπλεκτικό αντιδραστήριο lumogallion ²¹⁶
Πόσιμο νερό	Φθορισμομετρία (λ _{ex} 450 nm, λ _{em} 530 nm) υπό την παρουσία μη ιοντικού επιφανειοδραστικού Triton X-100, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: lumogallion.	Προσδιορισμός αργιλίου σε πόσιμο νερό ²¹⁷
Ορός πλάσματος και δείγματα ούρων	Σύστημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (λ _{ex} 500 nm, λ _{em} 575 nm), αναλυτική στήλη: Nova – Pak C18, κινητή φάση → ακετονιτρίλιο: potassium hydrogen phthalate (0.2M): νερό= 22:10:68, pH:4.8, ταχύτητα ροής: 1 mL/min, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: lumogallion.	Προσδιορισμός αργιλίου σε δείγματα ορού και ούρων ²¹⁸
Περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα	Σύστημα HPLC-UV (415 nm), αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS2, κινητή φάση → μεθανόλη : νερό= 30:70 (pH:1 με υπερχλωρικό οξύ), ταχύτητα ροής: 1 mL/min, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: morin.	Προσδιορισμός αργιλίου σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα ²¹⁹
Διαλύματα αργιλίου	Σύστημα HPLC-UV (415 nm), αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS2, κινητή φάση → μεθανόλη : νερό= 30:70 (pH:1 με υπερχλωρικό οξύ), ταχύτητα ροής: 1 mL/min, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: κερκετίνη.	Προσδιορισμός αργιλίου χρησιμοποιώντας κερκετίνη ως αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης ²²⁰
Δείγματα φυσικού νερού	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός (λ _{ex} 423nm, λ _{em} 553nm), αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: n-o-vanillidine-2-amino-p-cresol (OVAC).	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός αργιλίου με ανάλυση δείγματος με συνεχή ροή και εφαρμογή σε δείγματα φυσικού νερού ²²¹
Δείγματα κρασιού	Σύστημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (λ _{ex} 370 nm, λ _{em} 517 nm), αναλυτική στήλη: C18 Chromcart Nucleosil, κινητή φάση → 0,02M 8-hydroxy quinoline (oxine) – 0,09M sodium dodecylsulphate (SDS) σε Na ₂ HPO ₄ 0,05M: ακετονιτρίλιο = 65:35 (pH:7), ταχύτητα ροής: 0,6 mL/min, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: 8-hydroxy quinoline	HPLC-FL στον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου σε δείγματα κρασιού ²²²
Δείγματα γαστρικού βλεννογόνου	Σύστημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (λ _{ex} 370 nm, λ _{em} 504 nm), αναλυτική στήλη: Carcell phenyl (50×4,6 mm.), αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: 8-quinolinol, ταχύτητα ροής: 0,8 mL/min.	Προσδιορισμός του αργιλίου σε δείγματα γαστρικού βλεννογόνου ²²³
Φαρμακευτικά σκευάσματα	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός (λ _{ex} 360 nm, λ _{em} 385 nm), αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: chromotropic acid	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός του αργιλίου με αντίδραση συμπλοκοποίησης και ανάλυση του δείγματος με συνεχή ροή ²²⁴

Δείγματα πόσιμου νερού	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 425 nm) υπό την παρουσία μη ιοντικού επιφανειοδραστικού Tween-20, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: morin, pH:4,5	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός του αργιλίου με αντίδραση συμπλοκοποίησης και ανάλυση του δείγματος με συνεχή ροή ²²⁵
Δείγματα πόσιμου νερού και βιολογικά δείγματα	Σύστημα HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (λ_{ex} 418 nm, λ_{em} 490 nm), αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS 2, κινητή φάση → μεθανόλη : νερό= 30:70 (pH:1 με υπερχλωρικό οξύ), ταχύτητα ροής: 1 mL/min, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: morin	HPLC-FL στον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου ²²⁶
Διαλύματα αργιλίου	Φασματοφωτομετρία UV-Vis, αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: morin	Φασματομετρικός προσδιορισμός του αργιλίου με συμπλοκοποίηση με μορίνη ²²⁷
Δείγματα πόσιμου νερού	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός (λ_{ex} 500 nm, λ_{em} 595 nm για υδατικό διάλυμα και 580 nm για οργανική εκχύλιση), αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης: lumogallion.	Φθορισμομετρικός προσδιορισμός αργιλίου σε δείγματα πόσιμου νερού. ²²⁸

Ο έλεγχος ποιότητας των «καλλυντικών προϊόντων» παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Σύμφωνα την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, ως «καλλυντικό προϊόν» νοείται κάθε ουσία ή μείγμα που προορίζεται να έλθει σε επαφή με εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, τριχωτά μέρη του σώματος και της κεφαλής, νύχια, χείλη και εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, με αποκλειστικό ή κύριο σκοπό τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, τη μεταβολή της εμφάνισής τους, την προστασία τους, τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση των σωματικών οσμών. Ως «ουσία» νοείται χημικό στοιχείο και οι ενώσεις αυτού σε φυσική κατάσταση ή έχοντας προκύψει από διαδικασία παρασκευής, συμπεριλαμβανομένων των αναγκαίων για τη σταθερότητά του προσθηκών και των προσμείξεων που προέκυψαν από την διαδικασία αλλά εξαιρουμένων των εκχυλισμάτων που μπορούν να απομακρυνθούν χωρίς να θιγεί η σταθερότητα ή να αλλάξει η σύνθεση της ουσίας. Κάθε καλλυντικό προϊόν που κυκλοφορεί στην ευρωπαϊκή αγορά πρέπει να συνοδεύεται από τεχνικό φάκελο που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και τα εξής [229]:

- ✓ Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του προϊόντος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες.
- ✓ Τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου.
- ✓ Τη μέθοδο παρασκευής του προϊόντος.

- ✓ Πληροφορίες για την καθαρότητα των ουσιών και μειγμάτων.
- ✓ Σε περίπτωση που υπάρχουν ίχνη απαγορευμένων ουσιών, στοιχεία που αποδεικνύουν ότι δεν είναι τεχνικά δυνατόν να αποφευχθούν.
- ✓ Σχετικά χαρακτηριστικά του υλικού συσκευασίας, ιδίως καθαρότητα και σταθερότητα.
- ✓ Τα αποτελέσματα της μελέτης ασφάλειας, τις ανεπιθύμητες ενέργειες και τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελεσματικότητας.
- ✓ Στις περιπτώσεις που ο παραγωγός ισχυρίζεται ότι το προϊόν διαθέτει συγκεκριμένη δράση (Ισχυρισμός Δράσης Καλλυντικού Προϊόντος, Cosmetic Claim) π.χ. αν φέρεται στο εμπόριο ως προϊόν που αυξάνει την ελαστικότητα ή είναι αντιρυτιδικό θα πρέπει στον τεχνικό φάκελο του προϊόντος να υπάρχει η μελέτη που υποστηρίζει την αύξηση της ελαστικότητας ή τη μείωση των ρυτίδων μετά από κάποιες εφαρμογές.

Με βάση τα παραπάνω κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιιδρωτική κρέμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της παραγωγοποίησης πριν από τη χρωματογραφική στήλη (pre-column), χρησιμοποιώντας την κερκετίνη (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one) ως αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, γραμμική περιοχή, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ακρίβεια), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα βάσης κρέμας [230]. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης παρασκευάστηκαν αντιιδρωτικά προϊόντα που περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις υδροξυχλωριούχου αργιλίου και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός τους με την προτεινόμενη μέθοδο. Πρόκειται για την πρώτη αναλυτική μέθοδο που έχει αναφερθεί και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας σε αντιιδρωτικά σκευάσματα που περιέχουν υδροξυχλωριούχο αργίλιο.

7.2 Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης

7.2.1 Αρχή της μεθόδου

Το αργίλιο προσδιορίζεται ποσοτικά σε αντιδρωτικά προϊόντα. Αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος προεργασίας δείγματος με στόχο την απομόνωση του αργιλίου από το αντιδρωτικό προϊόν και την απομάκρυνση των εκδόχων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ακολουθήσαμε την τεχνική της παραγωγοποίησης πριν από τη χρωματογραφική στήλη, χρησιμοποιώντας την κερκετίνη ως αντιδραστήριο συμπλοκοποίησης. Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης από την περίσσεια της κερκετίνης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος αντιστρόφου φάσης υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) σε αναλυτική στήλη XTerraMS C₁₈ με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) και μήκος κύματος ανίχνευσης 415 nm.

7.2.2 Εξοπλισμός-οργανολογία

- **Σύστημα HPLC-UV:** αποτελείται από αντλία Spectra Series μοντέλο P100, από σύστημα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μ L και από ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) της εταιρίας Waters μοντέλο 486. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι στήλη αντιστρόφου φάσης XTerraMS C₁₈ με μέγεθος σωματιδίων 5 μ m (150 x 3 mm i.d.) της εταιρίας Waters. Η εξαγωγή και επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters.
- Τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου του αργιλίου με κερκετίνη, για την κατάλληλη ρύθμιση του μήκους κύματος του ανιχνευτή, ελήφθησαν στο φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (UV-Vis) Perkin Elmer, μοντέλο lamda 7.
- Για τη ρύθμιση των τιμών του pH χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό πεχάμετρο της Metrohm, μοντέλο 654.

- Η απαραίτητη απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρα νάυλον μεγέθους πόρων 0,45 μm .
- Η ζύγιση των πρώτων υλών για την παρασκευή των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε ζυγό ακρίβειας της εταιρείας Gibertini, μοντέλο E 42.
- Η διαλυτοποίηση των αναλυτών έγινε με λουτρό υπερήχων της εταιρείας Emla, μοντέλο Transsonic 460.
- Η ανάδευση έγινε σε κατάλληλη συσκευή Vortex, της εταιρείας Velp Scientifica.
- Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή φυγοκέντρου της εταιρείας Hettich, μοντέλο Universal 32 R.
- Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες Gilson των 200 και 1000 μL .

7.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
- Νερό, απεσταγμένο και απιοντισμένο, με τη συσκευή Milli-Q Plus (Millipore, Ltd).
- Κερκετίνη, καθαρότητας 95% (HPLC grade) της εταιρείας Sigma-Aldrich
- H_3NO_3 , καθαρότητας 65% της εταιρείας Merck.
- Τριφθοροξικό οξύ, μυρμηκικό αμμώνιο και οξικό αμμώνιο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Merck.
- Διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου 50% w/w της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Το αργίλιο προσδιορίζεται ποσοτικά σε τρία αντιδρωτικά προϊόντα που περιέχουν υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε συγκέντρωση 22, 26 και 32% w/w. Τα αντιδρωτικά προϊόντα παρασκευάσθηκαν στο Τμήμα Αισθητικής & Κοσμητολογίας του TEI Αθηνών.

- Η καλλυντική βάση αποτελείται από τα ακόλουθα έκδοχα: distarch phosphate, allantoin, cetareth-12, cetareth-20, glyceryl stearate, cetyl alcohol, octyl stearate, dimethicone, triethyl citrate, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben, cyclomethicone, PPG-25-laureth-25, parfum, aqua.

Καθαρισμός υάλινων σκευών: Κρίθηκε απαραίτητο όλα τα χρησιμοποιούμενα υάλινα σκεύη να καθαρίζονται προσεκτικά με αραιό διάλυμα νιτρικού οξέος (1M HNO_3) για την απομάκρυνση πιθανόν υπολειμάτων αλουμινίου ή άλλων μετάλλων και με μεθανόλη για την απομάκρυνση της περίσσειας κερκετίνης. Κατόπιν ακολούθησε έκπλυση με νερό καθαρότητας HPLC. Η παραπάνω διαδικασία αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματική καθώς δεν παρατηρήθηκε καμμία παρεμπόδιση.

7.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας

7.4.1 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης

Διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου 50% w/w: η πυκνότητα του διαλύματος είναι $1,4\text{ g mL}^{-1}$ και η περιεκτικότητα του σε αργίλιο είναι 12,5% w/w, επομένως το διάλυμα περιέχει αργίλιο σε συγκέντρωση $87,5\text{ mg mL}^{-1}$.

Διάλυμα παρακαταθήκης A: Ακριβώς 1 mL από το διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου συγκέντρωσης 50% w/w μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα συγκέντρωσης $875\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο.

Διάλυμα παρακαταθήκης B: Με κατάλληλη αραιώση σε νερό του διαλύματος παρακαταθήκης A παρασκευάστηκε το διάλυμα παρακαταθήκης B το οποίο περιείχε $43,75\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ αργίλιο.

Πρότυπο διάλυμα αντιδραστηρίου: ζυγίζονται με ακρίβεια 25 mg κερκετίνης και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50mL. Ακολουθεί διάλυση με 10 mL

μεθανόλης σε λουτρό υπερήχων και αραίωση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Λαμβάνεται έτσι διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε κερκετίνη.

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται στο σκοτάδι και στο ψυγείο (4°C) όπου διατηρούνται σταθερά για αρκετές εβδομάδες.

7.4.2 Διαλύματα εργασίας

Τα εμβολιασμένα δείγματα βάσης κρέμας για τις καμπύλες βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης Α και Β. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα εργασίας συγκεντρώσεων 3,71, 4,38, 6,56, 10,94, 15,31, 17,06, 19,68, 26,25 και $30,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο.

Για την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 4,4, 17,1 και $30,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν από διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης του αναλύτη.

Τα διαλύματα εργασίας και τα διαλύματα ελέγχου παρασκευάζονταν φρέσκα κάθε εργαστηριακή μέρα.

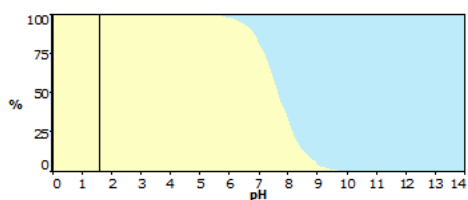
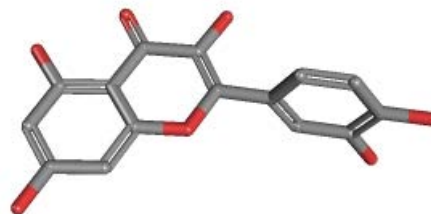
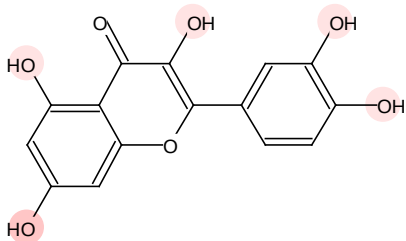
7.5 Αντίδραση συμπλοκοποίησης του αργιλίου με χρωματομετρικό αντιδραστήριο

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου πραγματοποιήθηκε χρωματομετρική αντίδραση συμπλοκοποίησης του αργιλίου με κατάλληλο συμπλεκτικό αντιδραστήριο πριν τη χρωματογραφία με σκοπό να επιτευχθεί η ανίχνευσή του από το σύστημα HPLC-UV με βάση την απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Το σύμπλοκο με το αργίλιο πρέπει να είναι σταθερό σε μεγάλο εύρος τιμών pH, η αντίδραση πρέπει να είναι ποσοτική στη γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο πρέπει να δίνει ικανοποιητικό σήμα στον ανιχνευτή UV το οποίο να παραμένει σταθερό.

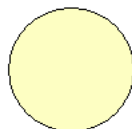
Πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα για την επιλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου συμπλοκοποίησης. Τα αντιδραστήρια που δοκιμάστηκαν ήταν η κερκετίνη, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one και η μορίνη, 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των συμπλεκτικών αντιδραστηρίων υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα ADME boxes και παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Φυσικοχημικές ιδιότητες των συμπλεκτικών αντιδραστηρίων

Κερκετίνη



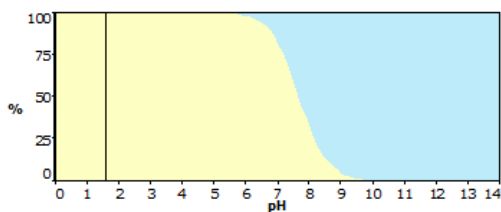
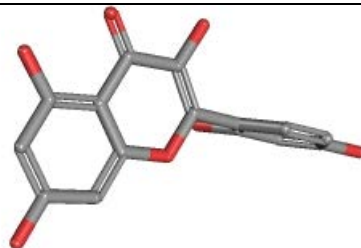
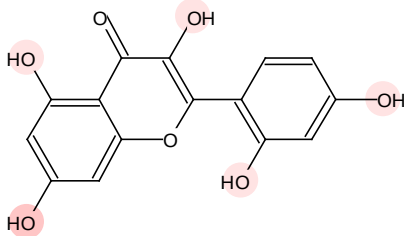
pH = 1.58



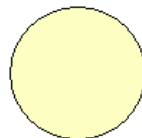
0.0 % Pos. Fraction
0.0 % Zwitter. Fraction
100.0 % Neutr. Fraction
0.0 % Neg. Fraction

pKa(οξύ)=7,7 ± 0,8

Μορίνη



pH = 1.58



0.0 % Pos. Fraction
0.0 % Zwitter. Fraction
100.0 % Neutr. Fraction
0.0 % Neg. Fraction

pKa(οξύ)=7,7 ± 0,8

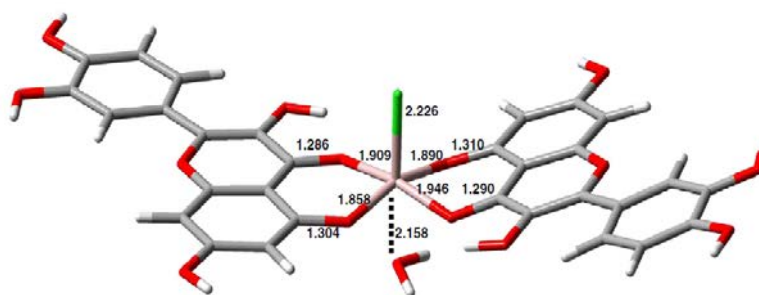
Η κερκετίνη και η μορίνη είναι φλαβονοειδή που έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλοϊόντα. Τα χηλικά σύμπλοκα

σχηματίζονται από πολυσχιδείς υποκαταστάτες και είναι συνήθως πολύ σταθερά.

7.5.1 Αντίδραση συμπλοκοποίησης με κερκετίνη

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η κερκετίνη ως το καταλληλότερο συμπλεκτικό αντιδραστήριο και πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης. Η κερκετίνη είναι πολυσχιδής υποκαταστάτης και φέρει 3 τοποθεσίες σύνδεσης με μεταλλοϊόντα στη δομή του μορίου της, τις 3-υδροξυ-4-οξο-, 5-υδροξυ-4-οξο- και 3',4'-διυδροξυ-²³¹. Γενικά σε κάθε συμπλοκοποίηση οι υποκαταστάτες τείνουν να διευθετηθούν γύρω από το μεταλλοϊόν έτσι, ώστε η ελάχιστη μεταξύ τους απόσταση να γίνει όσο γίνεται μεγαλύτερη. Για ορισμένη ελάχιστη απόσταση ο αριθμός σύνταξης (αριθμός των υποκαταστατών στην πρώτη σφαίρα σύνταξης) τείνει επίσης να γίνει όσο γίνεται μεγαλύτερος.

Σε πρόσφατες μελέτες απομονώθηκε το σύμπλοκο αργιλίου-κερκετίνης σε στερεά κατάσταση από οργανικό διαλύτη (μεθανόλη) και πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τη διερεύνηση της δομής του συμπλόκου²³². Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι δύο μόρια κερκετίνης διευθετούνται στο χώρο γύρω από το αργίλιο, κάθε ένα με τη μορφή του μονοανιόντος στην 5-υδροξυ θέση, σχηματίζοντας εξαμελή χειλικό δακτύλιο μέσω των ομάδων 5-υδροξυ-4-οξο-. Η οκταεδρική δομή του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης με ιόντα χλωρίου και μόρια νερού σε αξονικές θέσεις παρουσιάζεται στο σχήμα 7.3.



Σχήμα 7.3: Βελτιστοποιημένη δομή του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Πηγή: Journal of Inorganic Biochemistry 110 (2012) 27–35

Είναι επίσης γνωστό ότι η προσθήκη ιόντων Al^{3+} σε διαλύματα κερκετίνης προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση στο λ_{max} του φάσματος απορρόφησης της κερκετίνης λόγω του σχηματισμού του χηλικού συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Συγκεκριμένα το φάσμα απορρόφησης μεθανολικού διαλύματος εμφανίζει λ_{max} στα 370 nm, ενώ στο σύμπλοκο αργίλιο-κερκετίνη παρατηρήθηκε βαθυχρωμική μετατόπιση λ_{max} 415 nm. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του αργιλίου μετρώντας την απορρόφηση του συμπλόκου στο λ_{max} .

7.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης συμπλοκοποίησης

Η αντίδραση συμπλοκοποίησης του αργιλίου με την κερκετίνη λαμβάνει χώρα ακαριαία χωρίς θέρμανση και το χηλικό σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι ιδιαίτερα σταθερό.

Βελτιστοποιήθηκαν όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης συμπλοκοποίησης του αργιλίου με την κερκετίνη και που είναι οι εξής:

- Η αναλογία moles αντιδραστηρίου (κερκετίνη) και αναλύτη (αργίλιο).
- Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$
- Η τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$.

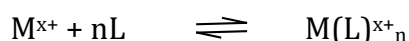
Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης, υπό τις οποίες παρατηρείται μεγαλύτερη απόδοση με τις ελάχιστες παρεμποδίσεις, μελετάται κάθε παράγοντας ξεχωριστά ενώ οι υπόλοιποι διατηρούνται σταθεροί. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται σειρά πειραμάτων, όπου σε καθένα από αυτά ο εξεταζόμενος παράγοντας λαμβάνει διαφορετική τιμή και προσδιορίζεται η επίδρασή του στην αντίδραση. Αυτό επιτυγχάνεται με μέτρηση της επιφάνειας της κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Στη συνέχεια η βελτιστοποιημένη παράμετρος χρησιμοποιείται στο επόμενο πείραμα.

Η διαδικασία με την οποία πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες βελτιστοποίησης περιλαμβάνει αρχικά την ανάμειξη 100 μL διαλύματος εργασίας υδροξυχλωριούχου αργιλίου και ορισμένης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου εντός ογκομετρικής φιάλης των 10 mL. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη ορισμένης ποσότητας διαλύματος κερκετίνης και ακολουθεί

ανάδευση σε συσκευή vortex και αραιώση μέχρι χαραγής με μίγμα ακετονιτριλίου: μεθανόλης σε αναλογία 1:9 v/v. Ακριβώς 20 μL από το αραιωμένο διάλυμα ενίονται στο σύστημα HPLC-UV.

7.6.1. Μελέτη της επίδρασης της περίσσειας του συμπλεκτικού αντιδραστηρίου

Θεωρείται ότι η αντίδραση συμπλοκοποίησης περιγράφεται από την εξίσωση:



Το μεταλλοϊόν δρα ως οξύ κατά Lewis και ο υποκαταστάτης L είναι βάση κατά Lewis η οποία συνεισφέρει ζεύγος ηλεκτρονίων για το σχηματισμό δοτικού ομοιοπολικού δεσμού. Η βάση L στην παρακάτω εξίσωση παριστάνεται ως ηλεκτρικά ουδέτερη ωστόσο μπορεί να φέρει και φορτίο. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου πραγματοποιούνται σε διάλυμα και τα μεταλλοϊόντα στην περίπτωση αυτή πρέπει να είναι διαλυτωμένα. Το σύμπλοκο ως σύνολο μπορεί να είναι φορτισμένο ή όχι. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του M πρέπει να προστεθεί περίσσεια του υποκαταστάτη L ώστε να μετατοπιστεί η ισορροπία προς όφελος του συμπλόκου. Είναι επομένως φανερό ότι η αναλογία υποκαταστάτη/αναλύτη έχει μεγάλη σημασία στη βελτιστοποίηση μιας αντίδρασης συμπλοκοποίησης.

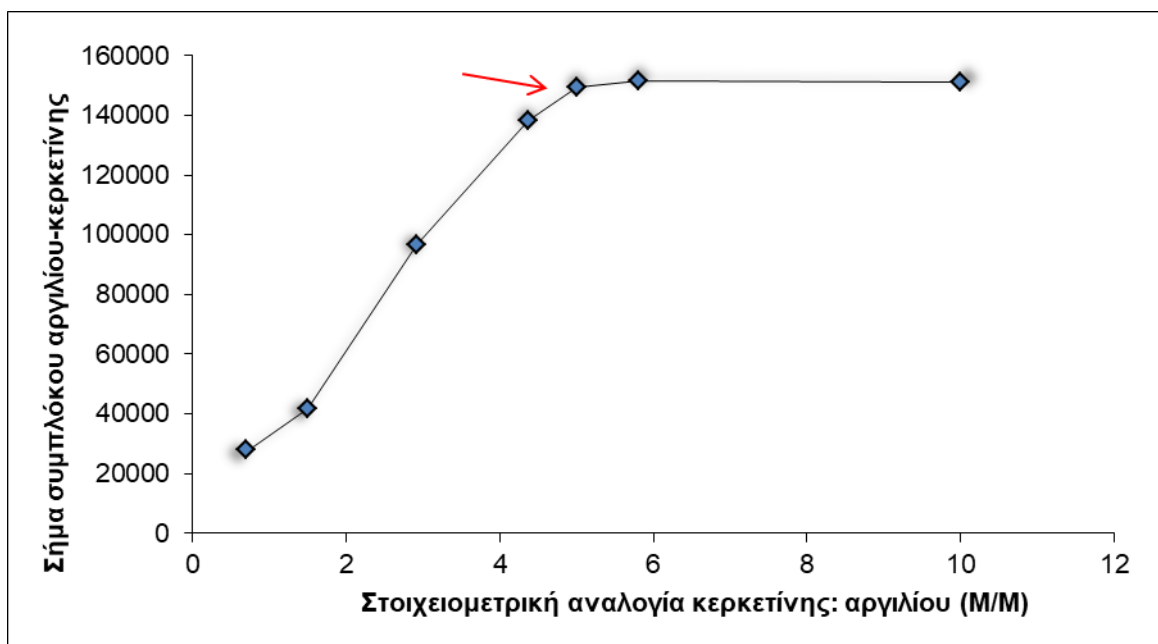
Στη μελέτη λάβαμε υπόψη ότι τα ιόντα του Al^{3+} σε όξινο υδατικό διάλυμα ($\text{pH} < 5$) μπορεί να βρίσκονται υπό τη μορφή $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, όπως και ότι μεγάλη περίσσεια συμπλεκτικού αντιδραστηρίου μπορεί να προκαλέσει παρεμπόδιση στο διαχωρισμό του αντιδραστηρίου από το σύμπλοκο. Επιπλέον η μελέτη έπρεπε να πραγματοποιηθεί στο ίδιο επίπεδο συγκεντρώσεων με αυτό που θα γίνει και η ανάλυση σε πραγματικές συνθήκες.

Η επίδραση της στοιχειομετρικής αναλογίας κερκετίνης – αργιλίου, M/M στο σήμα του συμπλόκου μελετήθηκε σε εύρος 0,7:1 έως 300:1 M/M. Η μελέτη γίνεται σε δεκαπέντε σειρές αντιδράσεων στις οποίες η αναλογία moles κερκετίνης/αργιλίου είναι: 0,7, 1,5, 2,9, 4,4, 5, 5,8, 10, 20, 39, 47, 52, 78, 130, 200

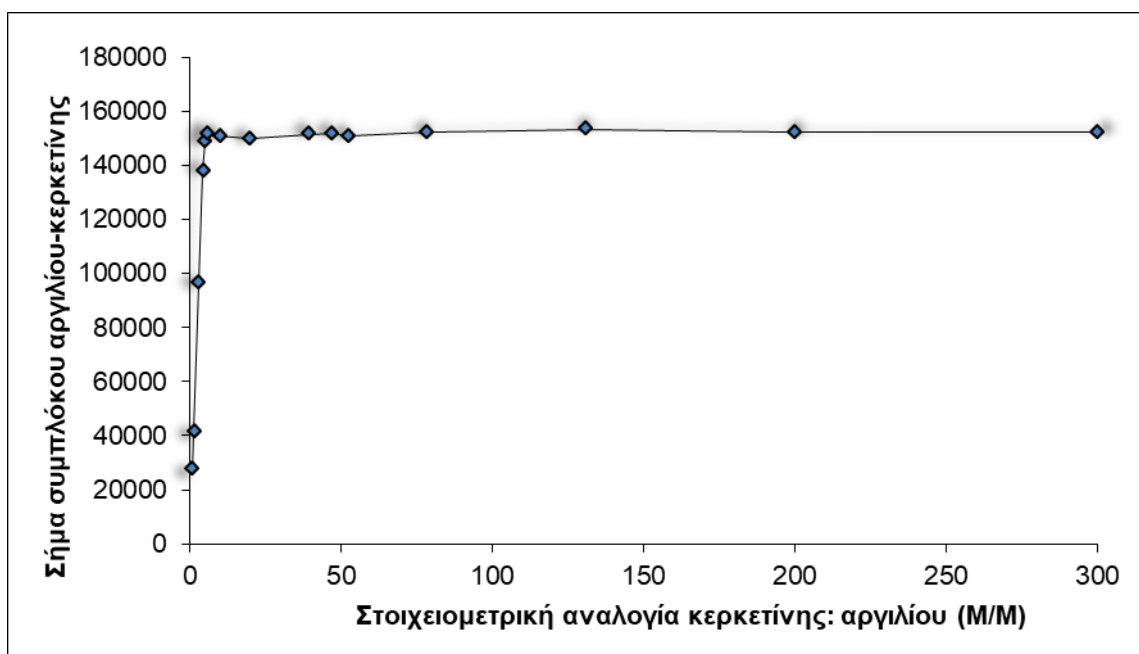
και 300. Για κάθε σειρά αντιδράσεων παρασκευάζεται και ένα λευκό δείγμα. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης $10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο, 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος (pH 4,5) και κατάλληλη ποσότητα συμπλεκτικού αντιδραστήριου (κερκετίνη).

Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζεται η επίδραση της αναλογίας moles κερκετίνης-αργιλίου στο σήμα του συμπλόκου στο εύρος 0,7:1 – 10:1 M/M. Το εμβαδόν κορυφής του συμπλόκου κερκετίνης-αργιλίου αυξάνεται γραμμικά μέχρι το στοιχειομετρικό σημείο, στο οποίο το αργίλιο βρίσκεται εξ'ολοκλήρου στη μορφή συμπλόκου με την κερκετίνη. Παρατηρήθηκε ότι επιπλέον προσθήκη κερκετίνης πέρα από την αναλογία 5:1 δεν αυξάνει το μετρούμενο σήμα και το διάγραμμα φτάνει σε ένα πλατό M/M. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η μετρούμενη απορρόφηση σε σημεία κοντά στο στοιχειομετρικό σημείο είναι συνήθως μικρότερη από την αναμενόμενη. Το μέγεθος της καμπύλωσης του διαγράμματος στην περιοχή του στοιχειομετρικού σημείου εξαρτάται από τη διάσταση του συμπλόκου και αυξάνεται με αύξηση της σταθεράς ασταθείας του συμπλόκου.²³³ Στο συγκεκριμένο πείραμα το αργίλιο ήταν υπό τη μορφή του υδροξυχλωριούχου αργιλίου που είναι σύμπλοκο και ενδεχομένως αυτό να επηρεάζει τον ακριβή καθορισμό του στοιχειομετρικού σημείου. Ενδεχομένως για τον ακριβή καθορισμό του τύπου του συμπλόκου θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν περισσότερες μετρήσεις μεταξύ των αναλογιών 0,7:1 έως 10:1 ή να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος των συνεχών μεταβολών.

Στο σχήμα 7.5 παρουσιάζεται η επίδραση της αναλογίας moles κερκετίνης-αργιλίου σε όλο το εύρος που μελετήθηκε και μέχρι την αναλογία 300:1.



Σχήμα 7.4: Επίδραση της αναλογίας moles κερκετίνης-αργιλίου στο σήμα του συμπλόκου στο εύρος 0,7:1 – 10:1 M/M



Σχήμα 7.5: Επίδραση της αναλογίας moles κερκετίνης-αργιλίου στο σήμα του συμπλόκου στο εύρος 0,7:1 – 300:1 M/M

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επιλέγεται η χρήση 1 mL διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ έτσι ώστε η μεταβολή της αναλογίας κερκετίνης/αργιλίου σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων της καμπύλης βαθμονόμησης να μην επηρεάζει το σήμα του συμπλόκου.

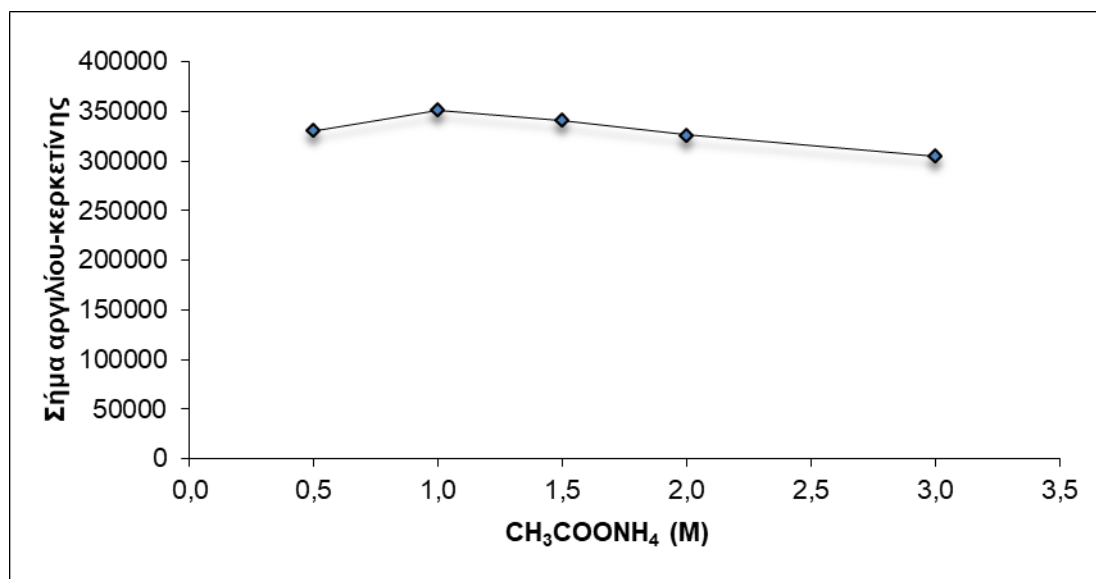
7.6.2. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος

Το ρυθμιστικό διάλυμα του οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος θεωρείται κατάλληλο μέσω αντίδρασης για το σχηματισμό του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο παρελθόν για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του αργιλίου μετά από αντίδραση συμπλοκοποίησης με κερκετίνη.²³⁴ Επομένως στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα για την αντίδραση συμπλοκοποίησης και μελετήθηκε αναλυτικά η επίδραση της συγκέντρωσής του.

Η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος στην απόδοση της αντίδρασης συμπλοκοποίησης μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5 έως 3 M. Η μελέτη γίνεται σε σειρές αντιδράσεων στις οποίες χρησιμοποιούνται 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος (pH 4,5) συγκέντρωσης: 0,5, 1, 1,5, 2 και 3 M. Για κάθε σειρά αντιδράσεων παρασκευάζεται και ένα λευκό δείγμα. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης 30,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο, 1 mL διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος (pH 4,5) κατάλληλης συγκέντρωσης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα χωρίς την προσθήκη του εν λόγω ρυθμιστικού διαλύματος ή με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών.

Παρατηρήθηκε ότι χωρίς την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου - οξικού οξέος ή με τη χρήση άλλων ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, το αργίλιο δεν ανιχνεύεται από το σύστημα HPLC-UV.

Στο σχήμα 7.6 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν στην απόδοση της αντίδρασης συμπλοκοποίησης.



Σχήμα 7.6: Επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο μέσο αντίδρασης στο σήμα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

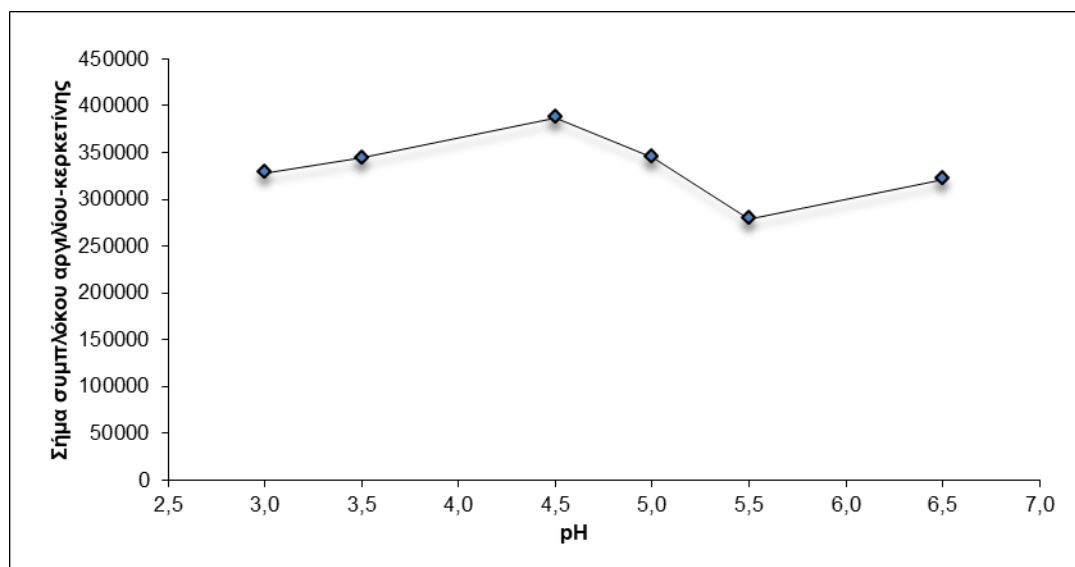
Το εμβαδόν κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης είναι μέγιστο όταν χρησιμοποιούνται 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος συγκέντρωσης 1M, αντιθέτα επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος προκαλεί μείωση του παρατηρούμενου σήματος του συμπλόκου. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση συμπλοκοποίηση ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος συγκέντρωσης 1M.

7.6.3. Μελέτη της επίδρασης της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος- οξικού αμμωνίου

Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος αποδείχθηκε κρίσιμος παράγοντας για το σχηματισμό του συμπλόκου γιατί επηρεάζει τη διαλυτότητα του αργιλίου. Η επίδραση της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος μελετήθηκε σε εύρος τιμών 3 έως 6,5. Η μελέτη γίνεται σε σειρές αντιδράσεων στις οποίες χρησιμοποιούνται 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος συγκέντρωσης 1 M σε τιμές pH 3, 3,5, 4,5, 5, 5,5 και 6. Για κάθε σειρά αντιδράσεων παρασκευάζεται και ένα λευκό δείγμα. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 100 μ L διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης 30,63 μ g mL⁻¹ σε αργίλιο, 1 mL

διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ και $500 \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος συγκέντρωσης 1 M σε κατάλληλη τιμή pH.

Στο σχήμα 7.7 παρουσιάζεται η επίδραση της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος στην απόδοση της αντίδρασης συμπλοκοποίησης.



Σχήμα 7.7: Επίδραση της τιμής του pH του μέσου αντίδρασης στο σήμα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης.

Η μέγιστη απόδοση της αντίδρασης επιτεύχθηκε σε τιμή pH 4,5, αντιθέτως σε μεγαλύτερες τιμές pH από την τιμή των 5,5 το σήμα του σχηματιζόμενου συμπλόκου μειώνεται άμεσα, σχήμα 7.7. Το παραπάνω φαινόμενο αποδίδεται στο γεγονός ότι σε όξινα υδατικά διαλύματα ($\text{pH} < 5$), το αργίλιο επικρατεί κυρίως υπό τη μορφή ιόντων αργιλίου (Al^{3+}). Αυξάνοντας την τιμή του pH σε εύρος τιμών pH 5-6,5, το αργίλιο σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα υδροξυλίου όμως το σήμα του σχηματιζόμενου συμπλόκου μειώνεται και τελικά σε ουδέτερη τιμή pH σχηματίζεται άλας υδροξυλίου του αργιλίου αδιάλυτο στο μέσο της αντίδρασης. Ενδεχομένη αύξηση του pH σε τιμές $\text{pH} > 7$ οδηγεί στο σχηματισμό του υδατοδιαλυτού $\text{Al}(\text{OH})_4^-$.

7.6.4 Βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης συμπλοκοποίησης

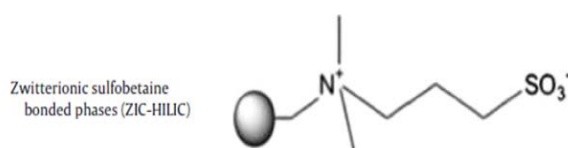
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης της αντίδρασης συμπλοκοποίησης καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες:

- ✓ Μοριακή αναλογία κερκετίνης -αργιλίου σε αναλογία μεγαλύτερη από 5:1, M/M, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση 1 mL διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων της καμπύλης βαθμονόμησης.
- ✓ Χρήση 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος συγκέντρωσης 1 M.
- ✓ Η τιμή του pH ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος ρυθμίζεται στα 4,5.

7.7 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC

7.7.1 Επιλογή στατικής φάσης

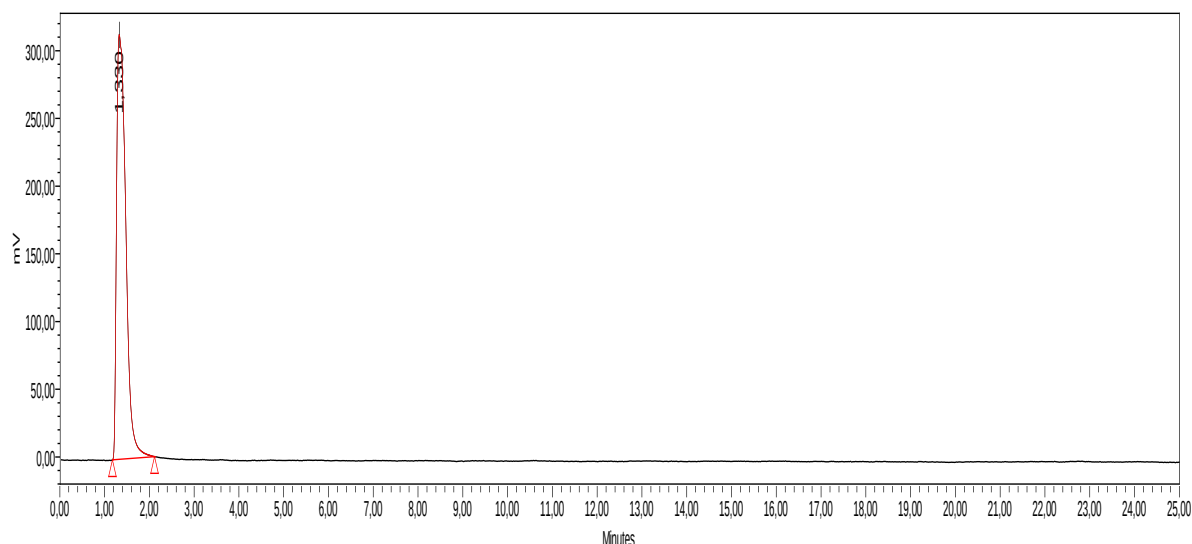
Αρχικά διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε επαμφοτερίζουσα στήλη ZIC®-HILIC διαστάσεων 150 x 2,1 mm, με μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm . Η σουλφοβεταΐνη είναι η λειτουργική ομάδα της στήλης ZIC®-HILIC (σχήμα 7.8), και είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα.



Σχήμα 7.8: Η λειτουργική ομάδα σουλφοβεταΐνης σε στήλες ZIC®-HILIC, Merck ®

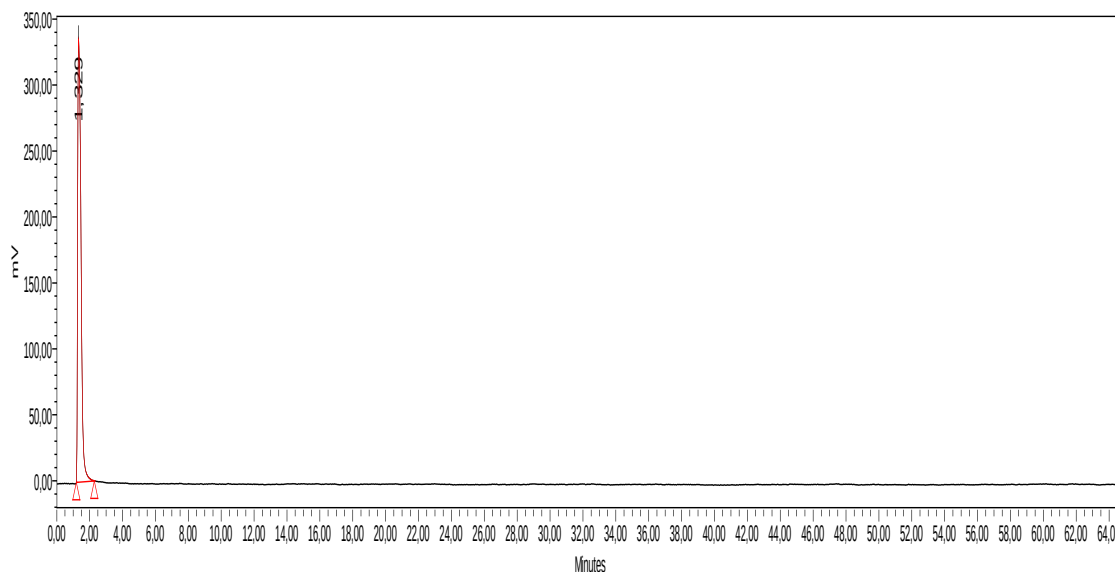
Το κύριο χαρακτηριστικό της χρωματογραφίας HILIC είναι ότι επιτρέπει τη χρήση μεγάλου ποσοστού οργανικού τροποποιητή (συνήθως ακετονιτριλίου), και μικρού ποσοστού υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος (το νερό αποτελεί τον ισχυρό διαλύτη HILIC). Δοκιμάσθηκαν κινητές φάσεις με διαφορετικές αναλογίες ακετονιτριλίου με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα οξικού αμμωνίου ή μυρμηκικού αμμωνίου οι οποίες όμως δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Στο σχήμα 7.9 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος που προκύπτει μετά από την ανάλυση βάσης της κρέμας μετά από επεξεργασία και ένεση στο σύστημα HPLC-UV.



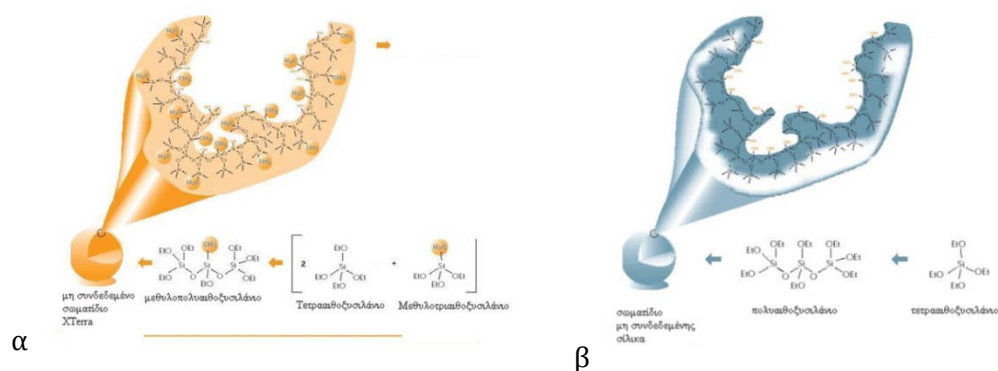
Σχήμα 7.9: Τυπικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη ZIC®-HILIC 150 x 2,1 mm, 3,5μm, κινητή φάση: 75/15 ακετονιτρίλιο/ 25mM μυρμηκικό αμμώνιο, 0,08% HCOOH, ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,5 mL min⁻¹, λ= 415 nm

Στο σχήμα 7.10 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από την ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση 19,7 μg mL⁻¹ μετά από επεξεργασία και ένεση στο σύστημα HPLC-UV. Σε όλες τις μελέτες με τη στήλη ZIC®-HILIC το σύμπλοκο αργιλίου-κερκετίνης εκκλύεται μαζί με την περίσσεια του αντιδραστηρίου συμπλοκοποίησης (κερκετίνη).



Σχήμα 7.10: Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από την ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση $19,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη ZIC®-HILIC 150 x 2,1 mm, 3,5μm, κινητή φάση: 75/15 ακετονιτρίλιο/ μυρμηκικό αμμώνιο 25mM, 0,08% HCOOH, ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,5 mL min⁻¹, λ= 415 nm

Σε επόμενες μελέτες χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη XTerraMS C18, διαστάσεων 150 x 3 mm, με μέγεθος σωματιδίων 5μm. Η στήλη αυτή έδωσε τη δυνατότητα χρωματογραφικού διαχωρισμού του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης από την περίσσεια του αντιδραστηρίου σχήμα 7.11. Το πληρωτικό υλικό της στήλης XTerraMS C18 είναι υβριδικής τεχνολογίας και ανήκει στην κατηγορία των χημικά συνδεδεμένων στατικών φάσεων με βάση πολυμερές υλικό. Υπάρχει υψηλού βαθμού επικάλυψη των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης (σχήμα 7.11 α) με αποτέλεσμα να βελτιώνεται το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών σε αντίθεση με πληρωτικά υλικά με βάση την πηκτή πυριτίας (σχήμα 7.11 β), επιπλέον χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα σε ευρεία περιοχή τιμών pH 1-12.



Σχήμα 7.11: (α) Πολυμερή παράγωγα της πηκτής πυριτίας (XTerra®), β) σωματίδιο πηκτής πυριτίας (b), Waters ®

Η αναλυτική στήλη XTerraMS C18 που τελικά χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ήταν στήλη μικρής εσωτερικής διαμέτρου και αυτό δίνει τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η χρωματογραφική ανάλυση με σχετικά χαμηλή ταχύτητα ροής ($0,3 \text{ mL min}^{-1}$). Η μείωση της εσωτερικής διαμέτρου της στήλης οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, καθώς ο ίδιος όγκος δείγματος εκλούεται με μικρότερο όγκο κινητής φάσης, οπότε η ογκομετρική αραίωση είναι μικρότερη.

7.7.2 Επιλογή κινητής φάσης

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στη συγκράτηση και στη χρωματογραφική συμπεριφορά του συμπλόκου του αργιλίου-κερκετίνης και στο διαχωρισμό του από την περίσσεια του αντιδραστήριου στην αναλυτική στήλη XTerraMS C18.

Συγκεκριμένα για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μελέτες:

- Επιλογή οργανικού τροποποιητή
- Μελέτη της επίδρασης του % ποσοστού του οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

- Μελέτη της επίδρασης του % ποσοστού τριφθοροοξικού οξέος της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλονταν ένας παράγοντας, ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να διερευνηθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Σε όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης της κινητής φάσης αναλύονται δειγμάτων βάσης της αντιδρωτικής κρέμας τα οποία εμβολιάζονται με 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης 26,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο και τα οποία κατεργάζονται σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες προεργασίας δείγματος. Οι χρωματογραφικές παράμετροι που μετρήθηκαν σε κάθε κινητή φάση ήταν το σήμα, ο παράγοντας χωρητικότητας, ο παράγοντας συμμετρίας και ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης.

Επιλογή οργανικού τροποποιητή

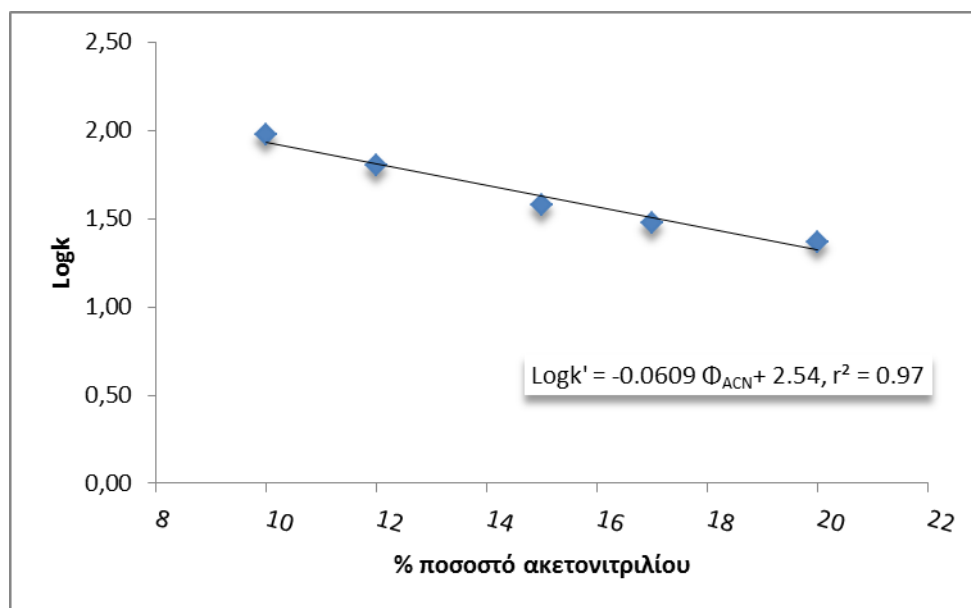
Μελετήθηκε η επίδραση της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου ως οργανικών τροποποιητών και επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο ως οργανικός τροποποιητής στην κινητή φάση, καθώς βελτίωνε τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

Η επίδραση του % ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε σε εύρος 10 έως 20%, ενώ το % ποσοστό του τριφθοροοξικού οξέος διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 0,08%. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3 και είναι φανερό ότι με αύξηση του % ποσοστού του ακετονιτριλίου προκαλείται μείωση του χρόνου κατακράτησης του συμπλόκου του αργιλίου-κερκετίνης.

Πίνακας 7.3: Επίδραση του % ποσοστού του οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης στο μετρούμενο σήμα και στα βασικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

% ακετονιτρίλιο	Εμβαδόν κορυφής	t_R (min)	$\log k'$	T^i	N^{ii}
10	183508	14,2	1,972	1,30	2055
12	199866	9,6	1,801	1,29	966
15	258176	5,1	1,575	1,29	1189
17	167129	4,6	1,477	1,26	918
20	132738	3,7	1,369	1,58	1533
ⁱ N: αριθμός θεωρητικών πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					
ⁱⁱ T: παράγοντας συμμετρίας, μέση τιμή δύο μετρήσεων					

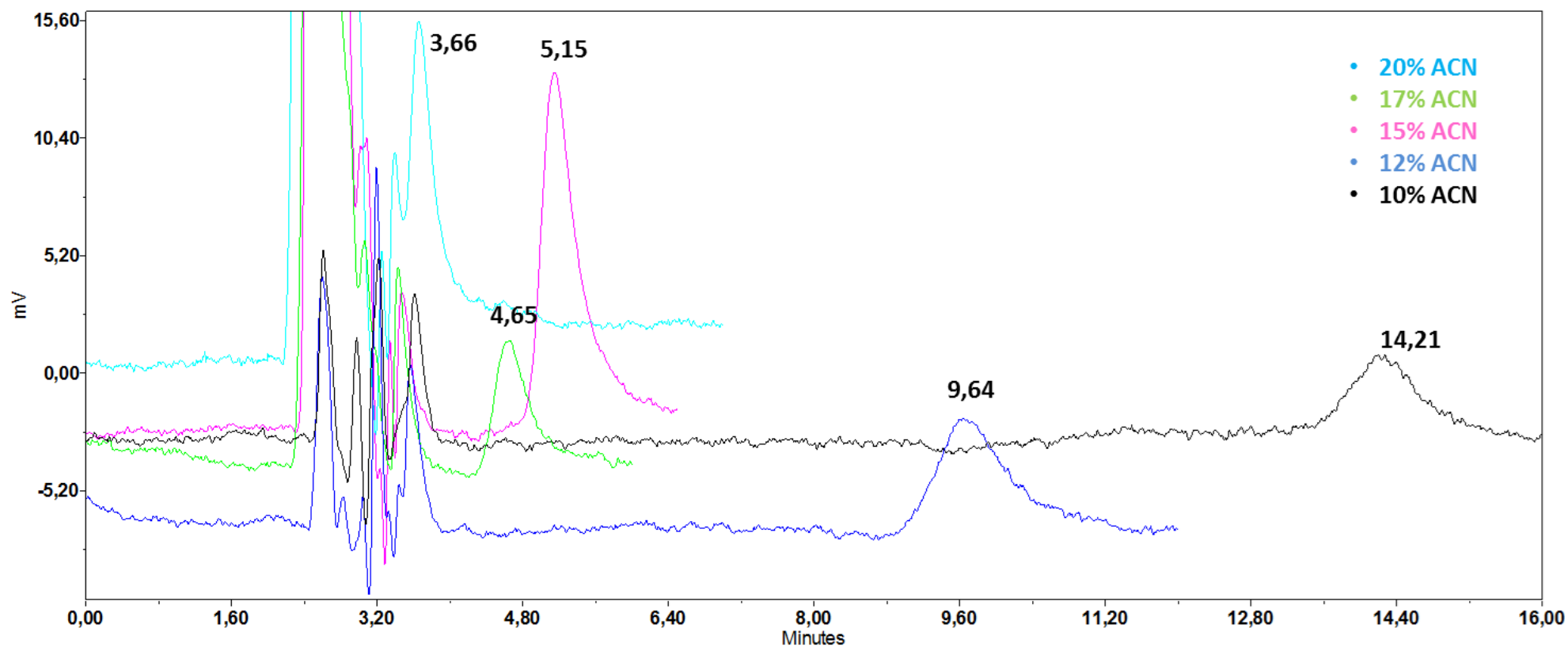
Όπως είναι φανερό από το διάγραμμα του σχήματος 7.12 υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στην τιμή $\log k'$ του συμπλόκου και στο % ποσοστό του ακετονιτρίλιου της κινητής φάσης, όπως ήταν αναμενόμενο καθώς έχουμε υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης στην οποία το ακετονιτρίλιο είναι ο διαλύτης με την μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ.



Σχήμα 7.12: Σχηματικό διάγραμμα της επίδρασης του % ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης στον παράγοντα χωρητικότητας, $\log k$, του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 7.3, ο παράγοντας συμμετρίας της κορυφής του αναλύτη παραμένει σταθερός και δεν υπερβαίνει την τιμή 1,30 όταν το % ποσοστό του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης κυμαίνεται από 10 έως 17%. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου μεταβάλλεται με μεταβολή του % ποσοστό του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης, με καλύτερες τιμές όταν το %ποσοστό ακετονιτριλίου είναι 10, 15 ή 20%.

Τυπικά χρωματογραφήματα που παρουσιάζουν την επίδραση του % ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης στο χρόνο έκλουσης του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης παρουσιάζονται στο σχήμα 7.13. Τα χρωματογραφήματα προκύπτουν μετά από ανάλυση δειγμάτων βάσης της αντιδρωτικής κρέμας τα οποία εμβολιάζονται με 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης 26,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο.



Σχήμα 7.13: Τυπικά χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων βάσης της αντιδρωτικής κρέμας τα οποία εμβολιάζονται με 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης $26,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο σε κινητές φάσεις με διαφορετικό % ποσοστό ακετονιτριλίου

Το κυριότερο κριτήριο για την επιλογή της βέλτιστης τιμής του % ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης ήταν το σήμα (εμβαδόν κορυφής). Επομένως επιλέχθηκε ως βέλτιστο % ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση η τιμή 15% στην οποία ο παράγοντας συμμετρίας και ο αριθμός θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης ήταν σε ικανοποιητικές τιμές.

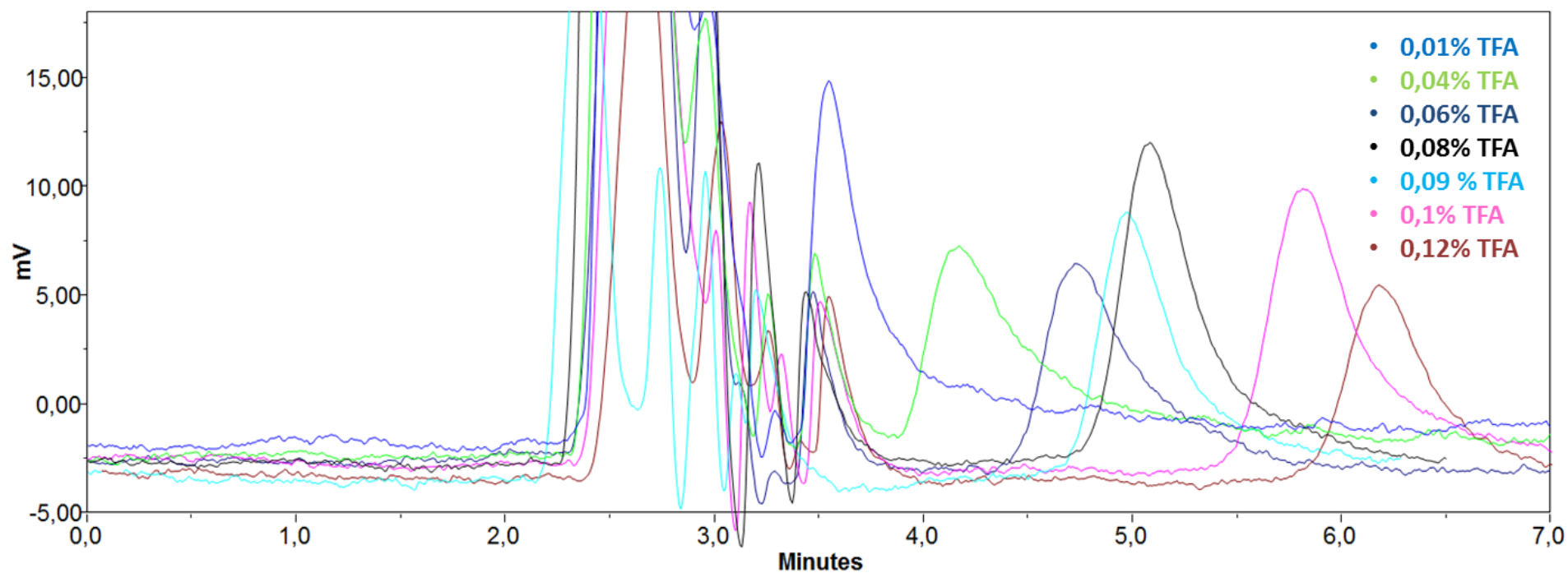
Μελέτη της επίδρασης του % ποσοστού του τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης

Η επίδραση του του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος πραγματοποιήθηκε σε εύρος 0,01 έως 0,12% , ενώ το % ποσοστό του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης διατηρήθηκε σταθερό στο 15%.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.4 φαίνεται ότι αύξηση του τριφθοροξικού οξέος προκαλεί αύξηση της κατακράτησης του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης, βελτίωση της συμμετρίας και αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών. Επιπλέον, σε ποσοστό 0,04 έως 0,12% διαπιστώθηκε αύξηση του σήματος του αντιδραστηρίου μέχρι την τιμή 0,08% TFA όπου και τελικά επιλέχθηκε ως βέλτιστη.

Πίνακας 7.4: Επίδραση του % ποσοστού του τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης στο μετρούμενο σήμα και στα βασικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

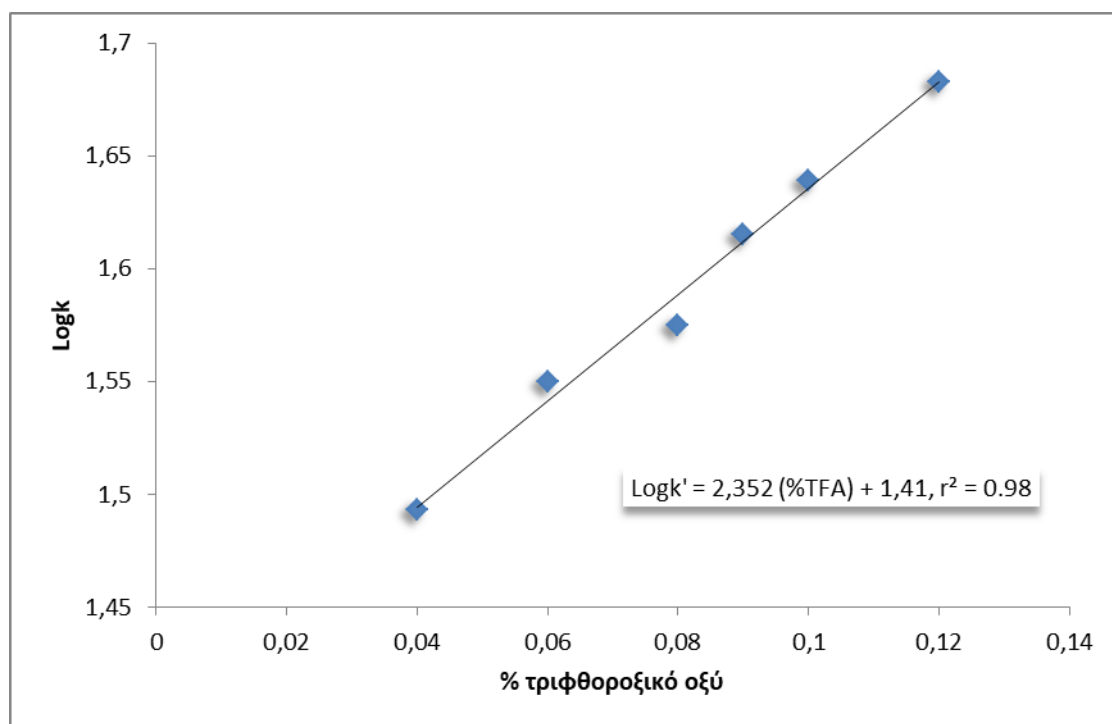
% TFA	Εμβαδόν κορυφής	t _R (min)	logk'	N ⁱ	T ⁱⁱ
0,01	-	-	-	-	-
0,04	220244	4,16	1,493	691	1,62
0,06	225187	4,74	1,550	867	1,41
0,08	258176	5,15	1,575	1189	1,29
0,09	223499	5,50	1,615	1341	1,16
0,1	240020	5,82	1,666	1371	1,28
0,12	226285	6,37	1,683	1499	1,31
ⁱ N: αριθμός θεωρητικών πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					
ⁱⁱ T: παράγοντας συμμετρίας, μέση τιμή δύο μετρήσεων					



Σχήμα 7.14: Τυπικά χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων βάσης της αντιδρωτικής κρέμας τα οποία εμβολιάζονται με 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης $26,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο σε κινητές φάσεις με διαφορετικό % ποσοστό τριφθοροξικού οξέος.

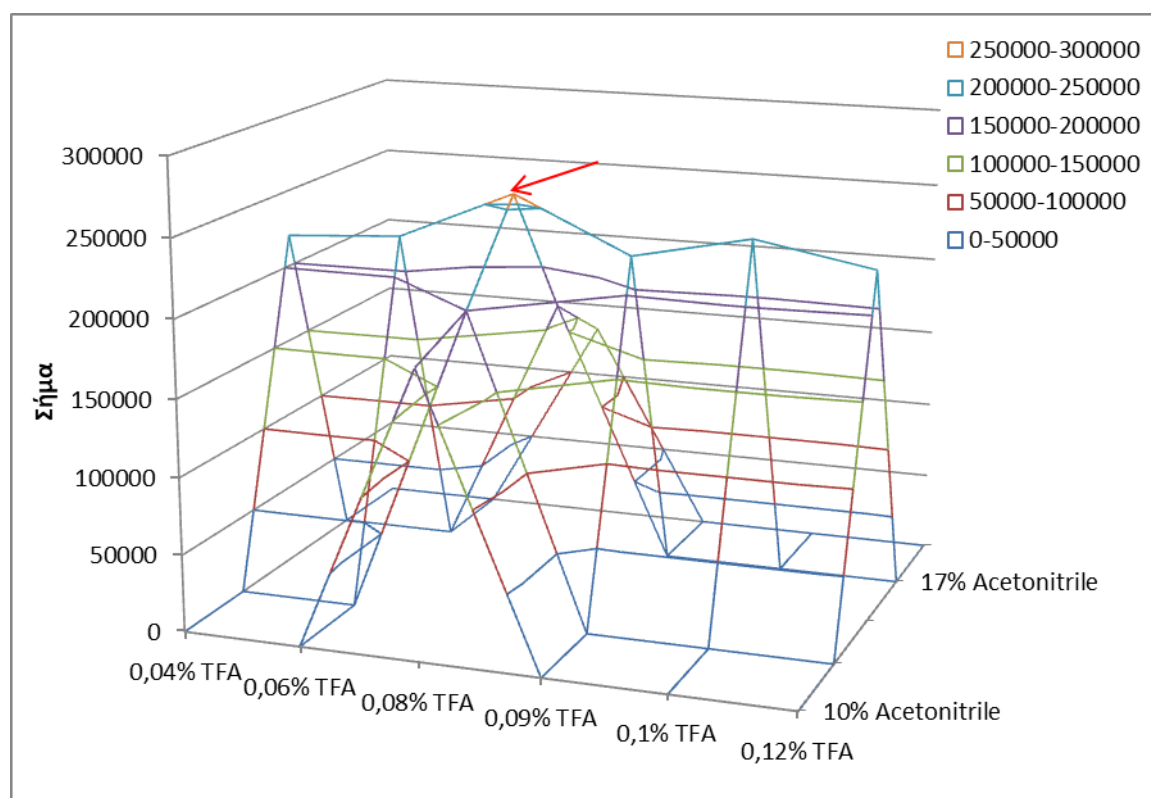
Τυπικά χρωματογραφήματα που παρουσιάζουν την επίδραση του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης στο χρόνο έκλουσης του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης παρουσιάζονται στο σχήμα 7.14. Τα χρωματογραφήματα προκύπτουν μετά από ανάλυση δειγμάτων βάσης της αντιδρωτικής κρέμας τα οποία εμβολιάζονται με 100 μL διαλύματος (υδροξυχλωριούχου αργιλίου) συγκέντρωσης $26,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο.

Η κατακράτηση του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης αυξάνεται με αύξηση του % ποσοστού του τριφθοροξικού οξέος στην κινητή φάση γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει την αύξηση της λιποφιλίας του συμπλόκου λόγω της μείωσης του ιοντισμού της κερκετίνης. Επιπλέον από το διάγραμμα του παράγοντα χωρητικότητας, $\log k'$ του συμπλόκου σε σχέση με το % ποσοστό του τριφθοροξικού οξέος (σχήμα 7.15) φαίνεται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην τιμή $\log k'$ και στο % ποσοστό του τριφθοροξικού οξέος (Φ_{TFA}) της κινητής φάσης.



Σχήμα 7.15: Σχηματικό διάγραμμα της επίδρασης του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης στον παράγοντα χωρητικότητας, $\log k'$ του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης

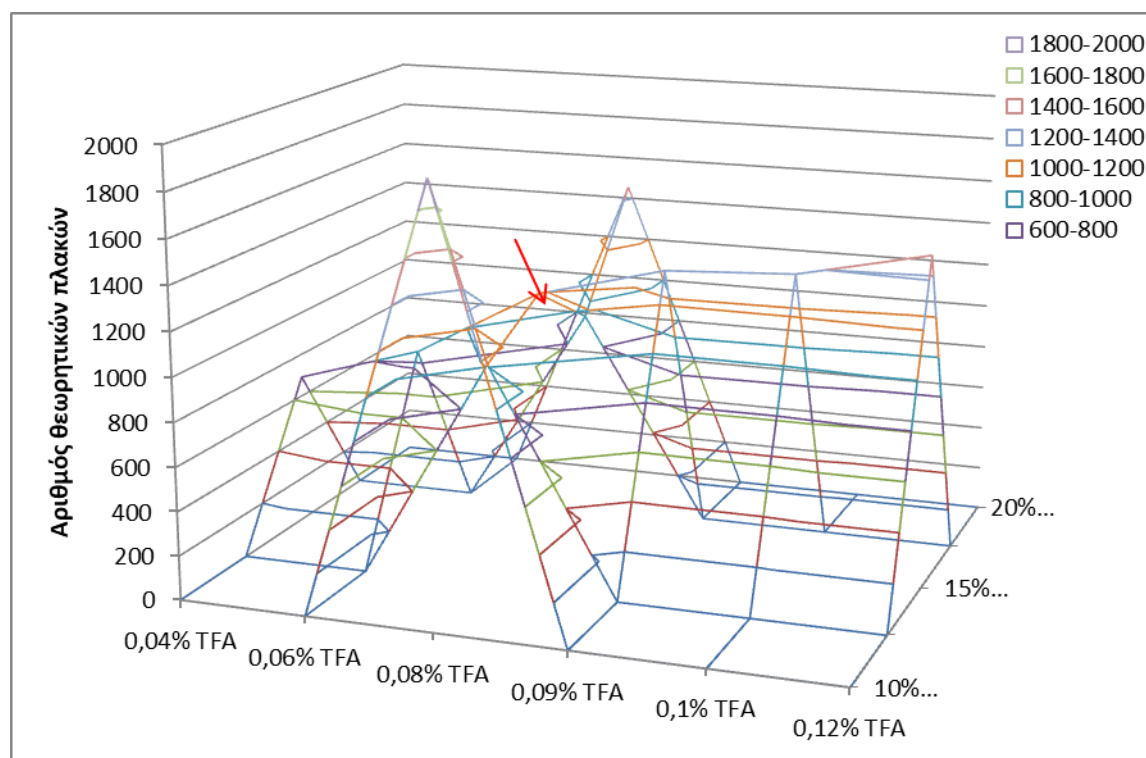
Καθώς αυξάνεται το τριφθοροξικό οξύ της κινητής φάσης ο παράγοντας συμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης βελτιώνεται σημαντικά, ενώ ο αριθμός των θεωρητικών πλακών αυξάνεται σημαντικά. Εντούτοις το κυριότερο κριτήριο για την επιλογή της βέλτιστης τιμής του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης ήταν το σήμα (εμβαδόν κορυφής). Επομένως επιλέχθηκε ως βέλτιστο % ποσοστό τριφθοροξικού οξέος η τιμή 0,08% στην οποία επίσης ο παράγοντας συμμετρίας και ο αριθμός θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης ήταν σε ικανοποιητικές τιμές.



Σχήμα 7.16: Τρισδιάστατο διάγραμμα των αλλαγών του σήματος του συμπλόκου συναρτήσει του % ποσοστού ακετονιτριλίου και του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης.

Τελικά επιλέχθηκε η χρήση μίγματος ακετονιτριλίου/νερού σε αναλογία 15/75 v/v που περιείχε 0,08% τριφθοροξικό οξύ ως βέλτιστη κινητή φάση, με ταχύτητα ροής 0,30 mL min⁻¹. Αυτή η επιλογή επιβεβαιώνεται επιπλέον από το τρισδιάστατο διάγραμμα του σχήματος 7.16 όπου παρουσιάζεται συνολικά η

επίδραση στο μετρούμενο σήμα των αλλαγών στο % ποσοστό του ακετονιτριλίου και στο % ποσοστό τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης.



Σχήμα 7.17: Τρισδιάστατο διάγραμμα των αλλαγών του αριθμού των θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου συναρτήσει του % ποσοστού ακετονιτριλίου και του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης.

Από το τρισδιάστατο διάγραμμα των αλλαγών στον αριθμό των θεωρητικών πλακών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου συναρτήσει του % ποσοστού ακετονιτριλίου και του % ποσοστού τριφθοροξικού οξέος της κινητής φάσης (σχήμα 7.17) είναι φανερό ότι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δεν είναι ο μεγαλύτερος στη βέλτιστη κινητή φάση. Ωστόσο, η επιλογή της βέλτιστης κινητής φάσης δικαιολογείται λαμβάνοντας υπόψη ότι το κυριότερο κριτήριο για την επιλογή της ήταν το σήμα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης.

7.8 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης του υγροχρωματογραφικού συστήματος όσο και της αντίδρασης παραγωγοποίησης καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου σε καλλυντικά σκευάσματα.

Στατική φάση: χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη XTerra MS C-18 αντιστρόφου φάσης μικρής διαμέτρου με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις: 150 x 3,0 mm i.d.

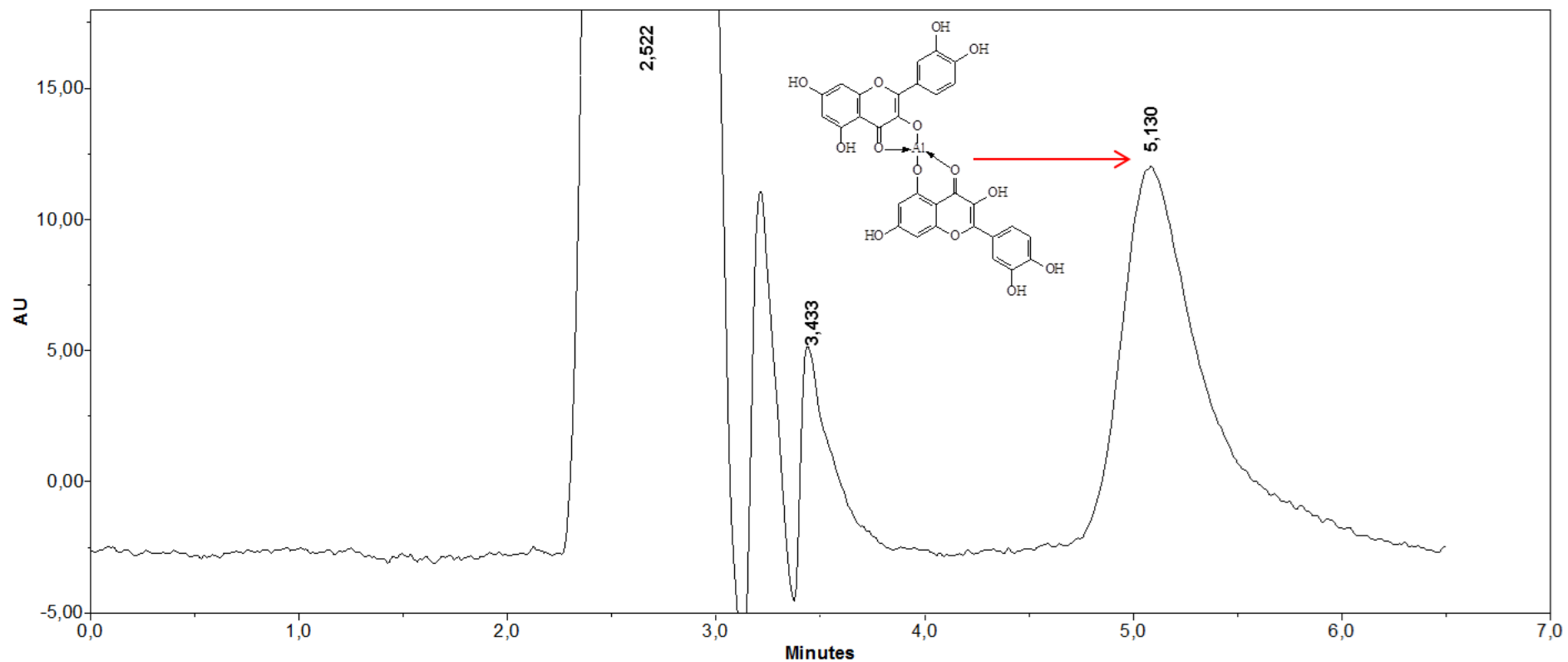
Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτριλίου/ νερού σε αναλογία 15/85. Το παραπάνω μίγμα περιέχει 0,08% τριφθοροξικό οξύ και το φαινόμενο pH της κινητής φάσης είναι $\sim 2,1$.

Ταχύτητα Ροής: 0,30 mLmin⁻¹.

Ανιχνευτής: ανιχνευτής υπεριώδους ορατού (UV-Vis) ρυθμισμένος στα 415nm.

Οι χρόνοι έκλουσης για του συμπλόκου αργιλίου – κερκετίνης ήταν περίπου στα 5,1 λεπτά.

Στο σχήμα 7.18 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει μετά ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση 19,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, η περίσσεια της κερκετίνης εκλούεται στα 2,5 λεπτά, ενώ το σύμπλοκο της με το αργίλιο εκλούεται στα 5,1 λεπτά.



Σχήμα 7.18: Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από την ανάλυση βάσης της κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση $19,7\mu\text{g mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη XTerraMS C18, κινητή φάση: 15/75 ακετονιτρίλιο/νερό, 0,08% TFA, ταχύτητα ροής $0,3\text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 415\text{ nm}$

7.9 Ανάπτυξη μεθόδου προεργασίας της αντιδρωτικής κρέμας

Η προεργασία της αντιδρωτικής κρέμας είχε ως στόχο την απαλλαγή του δείγματος από τα έκδοχα της κρέμας.

7.9.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου προεργασίας

Η κρέμα περιέχει αργίλιο με τη μορφή υδροξυσυμπλόκου (υδροξυχλωριούχο αργίλιο), και ο τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού περιελάμβανε ανίχνευση μέσω αντίδρασης συμπλοκοποίησης του Al^{3+} με κερκετίνη.

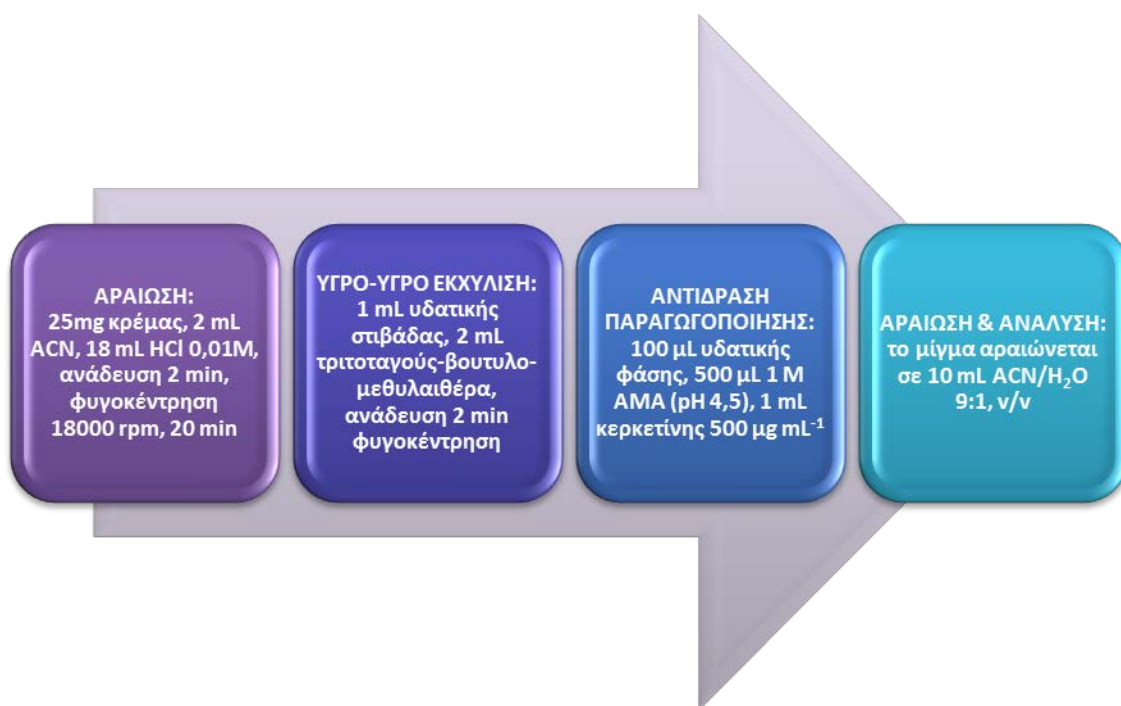
Σε προκαταρκτικά πειράματα είχε επιχειρηθεί απλή αραίωση της κρέμας με νερό όμως έδωσε πολύ μικρότερο σήμα για τη χρωματογραφική κορυφή του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης σε σχέση με το σήμα που δίνει διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου αραιωμένο σε νερό. Ακολούθως επιχειρήθηκε η αραίωση της κρέμας σε αλκαλικό περιβάλλον με προσθήκη αμμωνίας, αυτό όμως οδήγησε στο σχηματισμό ζελατινώδους ιζήματος $\text{Al}(\text{OH})_3$. Κατά ανάλογο τρόπο η χρήση διαλύματος NaOH στο στάδιο της αραίωσης δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ενδεχομένως γιατί περίσσεια ισχυρής βάσης επαναδιαλυτοποιεί το αρχικά σχηματιζόμενο ίζημα $\text{Al}(\text{OH})_3$ με σχηματισμό διαλυτών υδροξυσυμπλόκων του αργιλίου και δεν ευνοεί τη μετατόπιση της ισορροπίας προς όφελος των ιόντων Al^{3+} . Για τους παραπάνω λόγους, στο αρχικό στάδιο της κατεργασίας της κρέμας πραγματοποιείται αραίωση της κρέμας σε όξινο περιβάλλον με HCl 0,01 M με στόχο την ταχύτατη διάλυση του υδροξυχλωριούχου αργιλίου και την μετατόπιση της αντίδρασης διάστασης του υδροξυχλωριούχου αργιλίου προς όφελος των ιόντων Al^{3+} τα οποία παραμένουν στην υδατική στιβάδα μετά το επόμενο στάδιο της εκχύλισης.

Με στόχο την απαλλαγή του δείγματος ελέγχου από τα λιποδιαλυτά έκδοχα της αντιδρωτικής κρέμας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης. Για την εκτίμηση του βήματος της εκχύλισης παρασκευάστηκε διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου, συγκέντρωσης $30,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο, σε υδατικό διάλυμα HCl 0,01 M ακολούθησε αντίδραση παραγωγοποίησης με κερκετίνη σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και το δείγμα ενέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα. Ακολούθησε εκχύλιση δείγματος υδροξυχλωριούχου

αργιλίου, συγκέντρωσης $30,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο, παρασκευασμένο σε υδατικό διάλυμα HCL $0,01 \text{ M}$ με τριτοταγή βουτυλο μεθυλο αιθέρα (αναλογία όγκων 2/1). Η σύγκριση των εμβαδών της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης πριν και μετά την εκχύλιση επιβεβαιώνει την παραλαβή του αργιλίου στην υδατική στρώση. Στο στάδιο αυτό κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη μικρής ποσότητας ακετονιτριλίου σε ποσοστό 1% v/v κατά την αρχική αραίωση της κρέμας καθώς βοηθούσε στην κατεργασία. Η αντικατάσταση του τριτοταγούς βουτυλο μεθυλο αιθέρα με διαιθυλο αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα ή εξάνιο για την υγρό-υγρό εκχύλιση της βάσης της αντιδρωτικής κρέμας έδωσε πολύ μικρότερο σήμα για το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Επομένως απορρίφθηκε η ένταξή τους στην κατεργασία της αντιδρωτικής κρέμας, ενώ η μειωμένη απόδοση της αντίδρασης ενδεχομένως να οφείλεται στην παρουσία εκδόχων που παραμένουν στην υδατική στρώση όταν η εκχύλιση πραγματοποιείται με εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα ή διαιθυλο αιθέρα. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε ο τριτοταγής βουτυλο μεθυλο αιθέρας ως διαλύτης για την εκχύλιση.

7.9.2 Βέλτιστες συνθήκες προεργασίας δείγματος

Η πορεία παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχήμα 7.19. Σύμφωνα με αυτή την πορεία προεργασίας, πραγματοποιείται αρχικά αραίωση των συστατικών της κρέμας σε διάλυμα $0,01 \text{ M}$ υδροχλωρικού οξέος, ακολουθεί υγρό-υγρό εκχύλιση με τριτοταγή βούτυλο μεθυλο αιθέρα με στόχο την απομάκρυνση των λιποδιαλυτών εκδόχων της κρέμας, και τελικά αντίδραση παραγωγοποίησης του αργιλίου με κερκετίνη πριν από την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα HPLC-UV.



Σχήμα 7.19: Πορεία προεργασίας της αντιδρωτικής κρέμας

Αναλυτικά η προεργασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Ζύγιση 25 mg κρέμας σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL, προσθήκη 2 mL ακετονιτριλίου και αραιώση μέχρι τελικού όγκου με διάλυμα 0,01M υδροχλωρικού οξέος. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex για για 2 λεπτά. Ακριβώς 2 mL από το μίγμα μεταφέρονται σε φιαλίδιο Eppendorf και ακολουθεί φυσοκέντρωση στις 18000 στροφές για 20 λεπτά και στους 25 °C. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά στην κάτω στιβάδα.
- Ακριβώς 1 mL της υδατικής στιβάδας (κάτω στιβάδα) μεταφέρονται σε φιαλίδιο Eppendorf και ακολουθεί η προσθήκη 500 μ L τριτοταγή βούτυλο μεθυλο αιθέρα. Το μίγμα αναδεύεται έντονα για 2 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 18000 στροφές για 15 λεπτά και στους 25 °C.
- Η οργανική φάση απορρίπτεται και σε ακριβώς 100 μ L της υδατικής φάσης προστίθενται 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 1 M οξικού αμμωνίου-οξικού οξέος (pH 4,5) και 1 mL διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης 500 μ g mL⁻¹.

- Το παραπάνω διάλυμα αναδεύεται έντονα για 1 λεπτό και αραιώνεται με μίγμα ακετονιτριλίου: μεθανόλης (90/10, v/v) και αναλύεται στο σύστημα HPLC-UV.

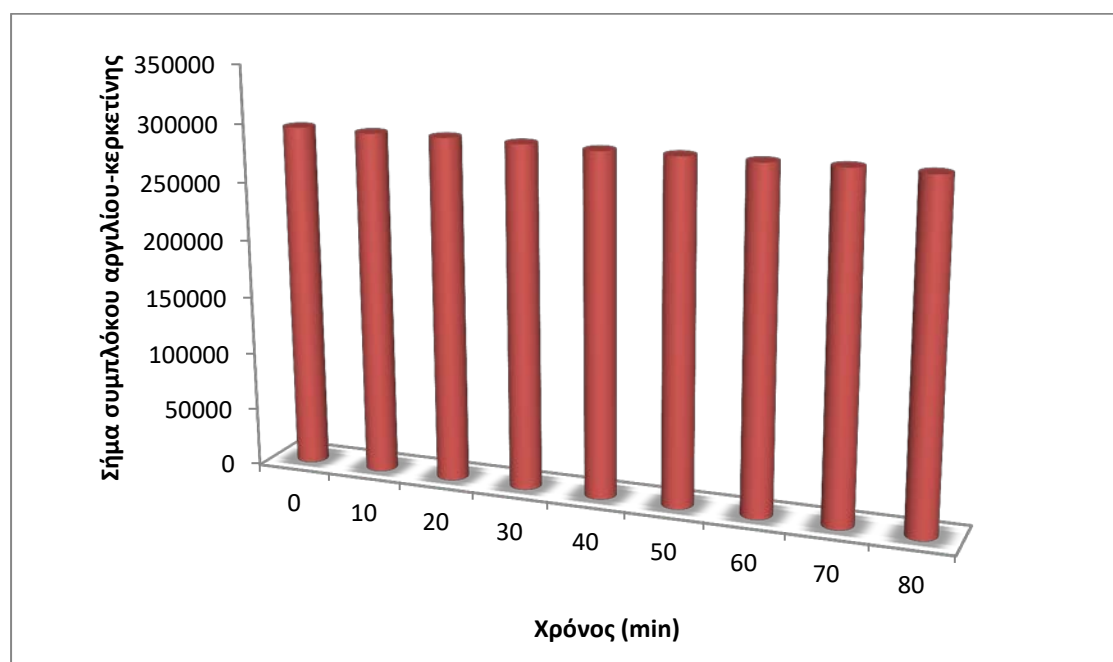
7.10 Μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

Μετά τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης συμπλοκοποίησης και της μεθόδου προεργασίας της αντιδρωτικής κρέμας μελετήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 80 λεπτών λαμβάνοντας δείγματα στο χρόνο μηδέν και μετά κάθε δέκα λεπτά.

Παρασκευάστηκαν 18 δείγματα (δύο δείγματα για κάθε χρονικό σημείο) τα οποία περιείχαν αργίλιο σε συγκέντρωση $30,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι και ενίονταν στο σύστημα HPLC-UV στην κατάλληλη χρονική στιγμή. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης, υπολογίστηκε η % απόκλιση από το αντίστοιχο μετρούμενο σήμα στο χρόνο μηδέν, η συγκέντρωση του αργιλίου και το % σχετικό σφάλμα, %Er. Τα αποτελέσματα της σταθερότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης στο αναλυόμενο δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.5 και στο σχήμα 7.20.

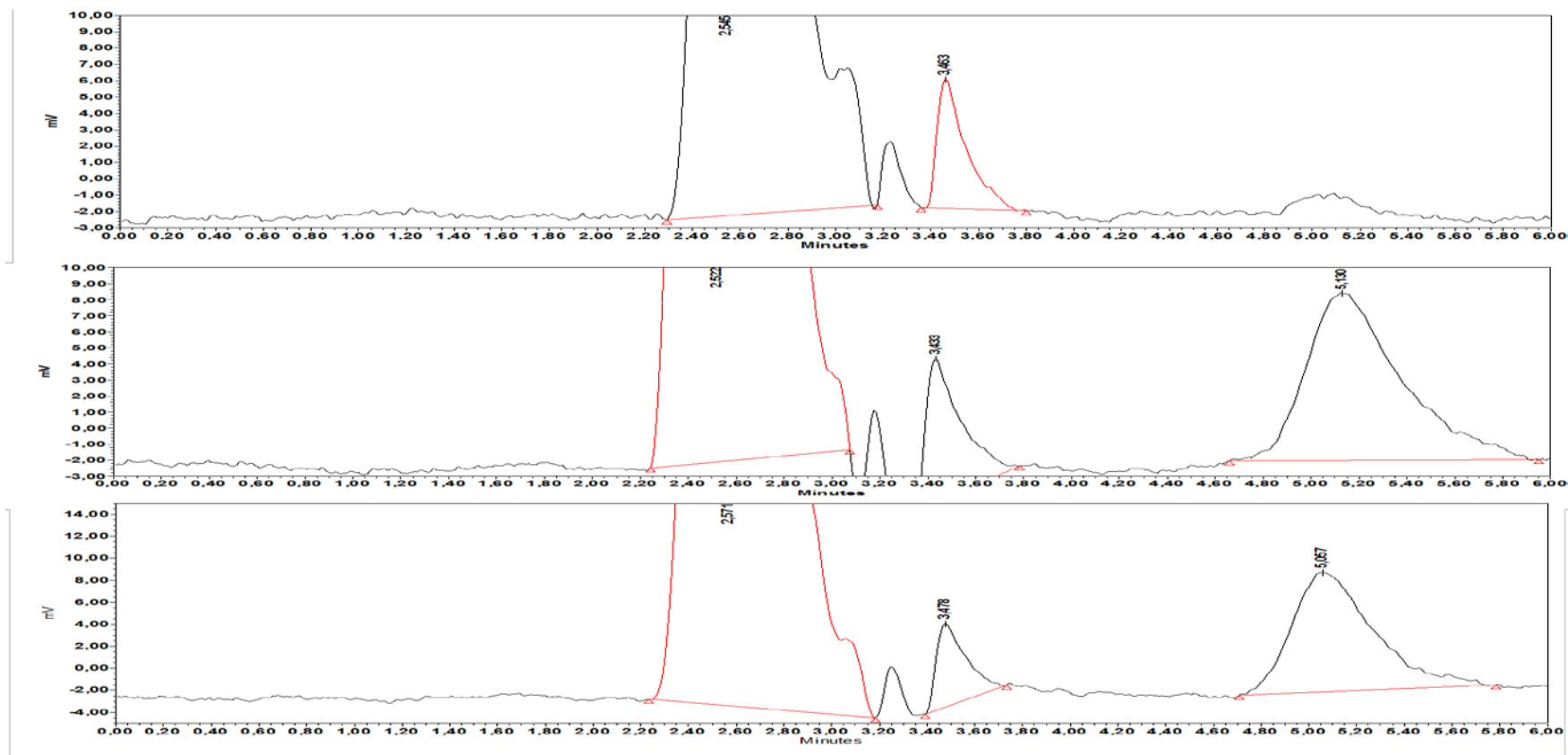
Πίνακας 7.5: Μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης

Χρόνος (λεπτά)	Εμβαδόν κορυφής	%Απόκλιση	t _R	Συγκέντρωση Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Er
0	296040	-	5,77	30,1	-1,6
10	295135	-0,3	5,77	30,01	-1,9
20	295654	-0,2	5,78	30,06	-1,8
30	294561	-0,5	5,76	29,95	-2,1
40	293289	-0,9	5,74	29,82	-2,6
50	293495	-0,9	5,78	29,84	-2,5
60	292999	-1,0	5,80	29,79	-2,7
70	293524	-0,8	5,81	29,84	-2,5
80	292957	-1,0	5,80	29,78	-2,7

**Σχήμα 7.20:** Μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης στο τελικό αραιωμένο διάλυμα για 80 λεπτά πριν από την εισαγωγή του στο σύστημα HPLC-UV

Βρέθηκε ότι το σχηματιζόμενο σύμπλοκο είναι σταθερό για χρονικό διάστημα 80 λεπτών όταν το υπό ανάλυση διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στο σχήμα 7.21 παρουσιάζονται τυπικά χρωματογράφημα που προκύπτουν μετά από την ανάλυση βάσης (ελεύθερης αργιλίου), ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση $19,7\mu\text{g mL}^{-1}$ και δείγματος κρέμας που περιέχει αργίλιο σε συγκέντρωση $17,0\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα δείγματα κατεργάστηκαν με τη μέθοδο κατεργασίας δείγματος, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση παραγωγοποίησης με κερκετίνη πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα HPLC-UV. Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα της κρέμας που περιείχε υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε ποσοστό 11% w/w.



Σχήμα 7.21: Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από την ανάλυση βάσης της κρέμας, την ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένης με αργίλιο σε συγκέντρωση $19,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ και δείγματος κρέμας που περιέχει αργίλιο σε συγκέντρωση $17 \mu\text{g mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη XTerraMS C18, κινητή φάση: 15/75 ακετονιτρίλιο/νερό, 0,08% TFA, ταχύτητα ροής $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 415 \text{ nm}$.

7.11 Αξιολόγηση της μεθόδου

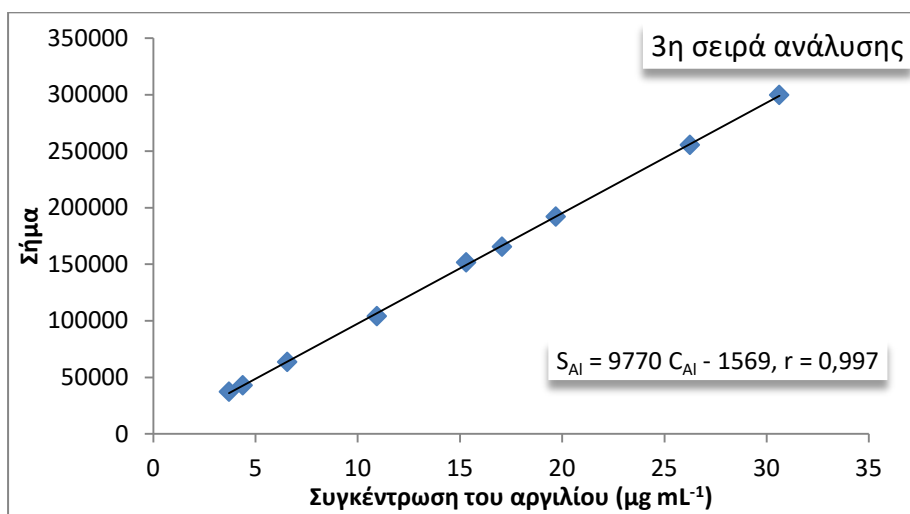
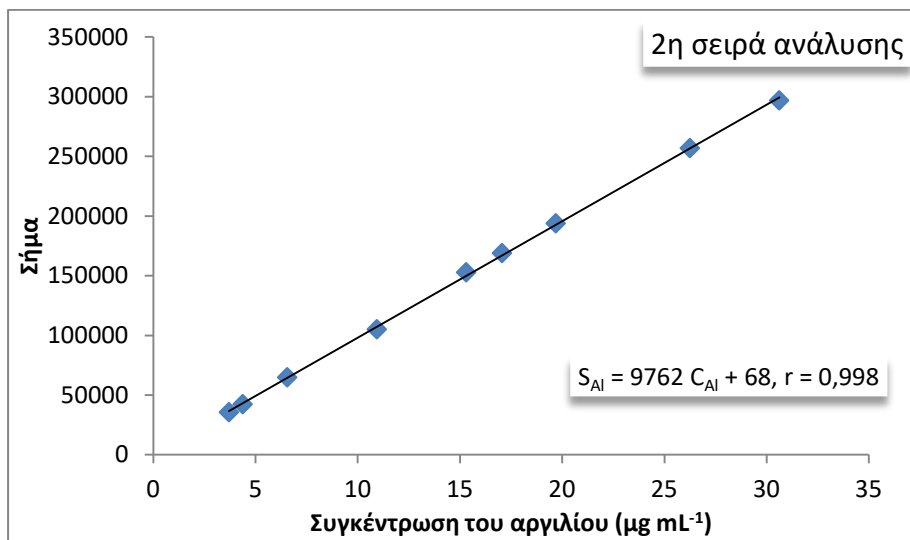
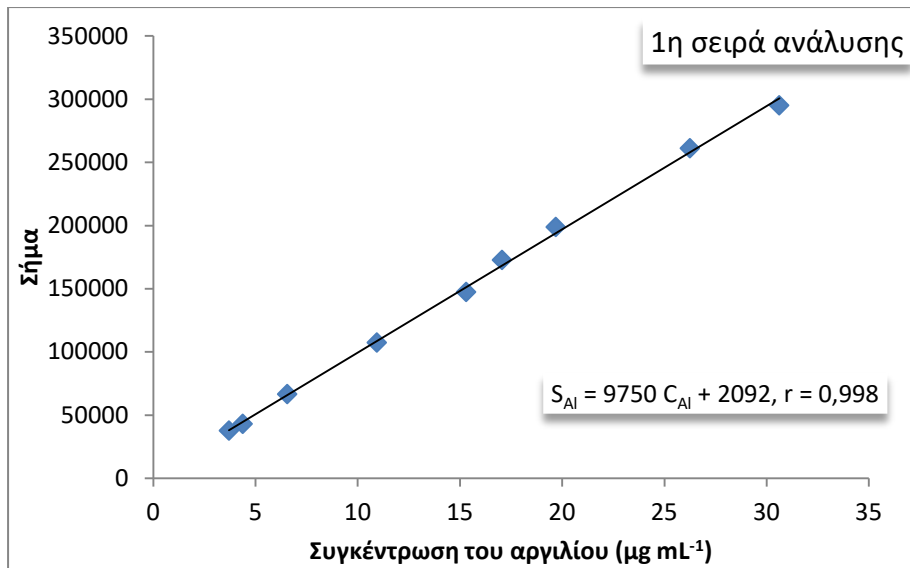
7.11.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ικανότητα της απόκτησης αποτελεσμάτων μετρήσεων που είναι ευθέως ανάλογες με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η ύπαρξη γραμμικότητας πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της μεθόδου ανάλυσης. Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τρεις καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάζονται σε 3 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες σε περίοδο ενός μήνα. Για την κατάρτιση των καμπυλών βαθμονόμησης αναλύονται εμβολιασμένα δείγματα αντιδρωτικής κρέμας που παρασκευάζονται με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 7.2.4.2. Κάθε καμπύλη βαθμονόμησης αποτελείται από εννέα σημεία που προκύπτουν από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων κρέμας με εύρος συγκεντρώσεων από 3,7 έως 30,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο. Κάθε ένα από τα δείγματα ενίεται 2 φορές στο σύστημα HPLC-UV.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου και σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή της επιφάνειας, η πειραματική συγκέντρωση και το % σχετικό σφάλμα, %E_r, με βάση τη θεωρητική συγκέντρωση.

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εφαρμόζεται γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χωρίς τη χρήση συντελεστή στατιστικού βάρους. Στον πίνακα 7.6 παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης του αργιλίου για κάθε εργαστηριακή ημέρα με τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων κρέμας. Επιπλέον παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας της καμπύλης βαθμονόμησης η οποία πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε νερό και η οποία θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω στον υπολογισμό της ανάκτησης του αναλύτη από το υλικό μήτρας.

Πίνακας 7.6: Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης του αργιλίου σε αντιδρωτική κρέμα			
Συγκέντρωση ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής_(n=2)	Πειραματική συγκέντρωση αργιλίου ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
3,71	37664	3,66	-1,1
	35560	3,59	-2,9
	37214	3,83	3,5
4,38	43053	4,21	-3,7
	42412	4,30	-1,8
	42821	4,40	0,6
6,56	66625	6,63	1,0
	64808	6,59	0,4
	63612	6,53	-0,5
10,94	107221	10,79	-1,3
	105032	10,71	-2,1
	104142	10,68	-2,4
15,31	147372	14,91	-2,6
	152830	15,61	1,9
	151672	15,54	1,5
17,06	172720	17,51	2,6
	169064	17,27	1,2
	165513	16,96	-0,6
19,69	198839	20,19	2,5
	193810	19,80	0,6
	192109	19,68	0,01
26,25	261066	26,57	1,2
	257022	26,28	0,1
	255684	26,19	-0,2
30,63	295009	30,05	-1,9
	296881	30,36	-0,9
	299845	30,71	0,3



Σχήμα 7.22: Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης του αργιλίου μετά από ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων κρέμας

Στον πίνακα 7.7 παρουσιάζονται οι εξισώσεις συμμεταβολής για κάθε μία απο τις τρεις σειρές μετρήσεων μαζί με τις αντίστοιχες τιμές των συντελεστών συσχέτισης, του τυπικού σφάλματος και των τυπικών αποκλίσεων για την τομή και την κλίση. Η μέση τιμή των αποτελεσμάτων της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.7 όπου έχουν υπολογιστεί ο συντελεστής συσχέτισης r , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης βαθμονόμησης S_r , η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου καθώς και η τυπική απόκλιση της κλίσης.

Διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα καθώς η τιμή του συντελεστή συσχετίσεως βρέθηκε μεγαλύτερη από 0,997 ενώ το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων δεν ξεπέρασε την τιμή 3,4%.

Πίνακας 7.7: Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης του αργιλίου με την τεχνική HPLC-UV							
Μήτρα	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg mL ⁻¹)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r ^b	Τυπική απόκλιση Κλίση Τομή		S _r ^c	α/S _α ^d
Νερό							
1 ^η σειρά ανάλυσης	4,38-30,63	S _{AIQ} = 10301 × C _{AI} + 2466	0,998	177	3152	2126	1,27
Εμβολιασμένα δείγματα κρέμας							
1 ^η σειρά ανάλυσης	4,38-30,63	S _{AIQ} = 9750 × C _{AI} + 2092	0,998	198	3651	2780	0,57
2 ^η σειρά ανάλυσης	4,38-30,63	S _{AIQ} = 9762× C _{AI} + 68	0,998	119	2203	2884	0,03
3 ^η σειρά ανάλυσης	4,38-30,63	S _{AIQ} = 9756 × C _{AI} – 1659	0,997	119	2188	2865	0,76
Μέση τιμή των καμπυλών βαθμονόμησης							
Εμβολιασμένα δείγματα κρέμας	4,38-30,63	S _{AIQ} = 9756 × C _{AI} + 167	≥ 0,997	6,1	1877	≤ 2780	≤ 0,76
^a Εμβαδόν κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης, S _{AIQ} , έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης του αργιλίου , C _{AI}							
^b Συντελεστής συσχέτισης							
^c Τυπικό σφάλμα.							
^d Θεωρητική τιμή του t για P= 0,05 και f = n-2 = 6 df, 2,45							

7.11.2 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με βάση το λόγο του σήματος προς θόρυβο.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$LOD = 3,3 \times \frac{Sa}{b}$$

όπου Sa είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης βαθμονόμησης στον άξονα των y , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης και b είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$LOQ = 10 \times \frac{Sa}{b}$$

Στην παρούσα μελέτη οι τιμές LOD και LOQ υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης και πειραματική επιβεβαίωση. Οι μέσες τιμές των LOD βρέθηκε πειραματικά ότι είναι στο επίπεδο των $1,24 \mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ οι μέσες τιμές των LOQ βρέθηκε πειραματικά ότι είναι στο επίπεδο των $3,74 \mu\text{g mL}^{-1}$.

7.11.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις προηγούμενες μελέτες η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου [235].

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας, όσο και δια των ημερών. Για τον έλεγχο αυτό παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλή, μεσαία και υψηλή)

4,38, 17,06 και 30,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πέντε δείγματα σε κάθε σειρά ανάλυσης (εργαστηριακή ημέρα). Τελικά σε κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν από πέντε μετρήσεις σε τρεις εργαστηριακές ημέρες (15 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver 22.

Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Er). Για την αξιολόγηση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του αργιλίου μελετήθηκε τόσο η εντός της ημέρας πιστότητα (intra-day), όσο και η μεταξύ των ημερών πιστότητα (inter-day) και ως μέτρο αυτής χρησιμοποιήθηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA).

Τα συνολικά αποτελέσματα του ελέγχου ορθότητας και πιστότητας παρουσιάζονται στον πίνακα 7.8.

Πίνακας 7.8 Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου σε εμβολιασμένα δείγματα καλλυντικής κρέμας (n = 5 runs, five replicates per run)

	Συγκέντρωση αργιλίου (μg mL ⁻¹)		
Θεωρητική συγκέντρωση	4,38	17,06	30,62
1 ^η σειρά μετρήσεων	4,18 ± 0,15	17,06 ± 0,11	30,28 ± 0,31
2 ^η σειρά μετρήσεων	4,08 ± 0,25	17,41 ± 0,23	30,38 ± 0,25
3 ^η σειρά μετρήσεων	4,221 ± 0,083	17,32 ± 0,13	30,36 ± 0,29
4 ^η σειρά μετρήσεων	4,24 ± 0,13	17,39 ± 0,11	30,48 ± 0,19
5 ^η σειρά μετρήσεων	4,38 ± 0,11	17,34 ± 0,17	30,51 ± 0,23
Ολική μέση τιμή	4,22	17,31	30,40
RSD _{Εντός της ημέρας} (%)	3,7	0,9	0,8
RSD _{Δια των ημερών} (%)	5,5	1,8	0,5
Ολική ορθότητα			
% E _r ^b	-3,8	1,5	-0,7
ⁱ % σχετικό σφάλμα = [(πειραματική συγκέντρωση- θεωρητική συγκέντρωση)/θεωρητική συγκέντρωση] x100			

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου δείχνουν ότι η εντός της ημέρας % σχετική αποκλίση (% RSD_{intra-day}) κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,8 και 3,7% . Η μεταξύ των ημερών % σχετική τυπική αποκλίση (%RSD_{inter-day}) βρέθηκε μεταξύ των τιμών 0,5 και 5,5%. Η ολική ακρίβεια εκφράζεται από το επί % σχετικό σφάλμα, E_r%, το οποίο για το αργίλιο, κυμαίνεται από -3,8 έως 1,5.

7.11.4 Έλεγχος ανάκτησης

Η ανάκτηση της προτεινόμενης πορείας κατεργασίας της καλλυντικής κρέμας υπολογίζεται με βάση το μέσο όρο των κλίσεων των τριών καμπυλών βαθμονόμησης και την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευάζεται με ανάλυση διαλυμάτων αργιλίου χωρίς την παρουσία βάσης της κρέμας πίνακας 7.9.

Τα δείγματα ελέγχου για την καμπύλη αναφοράς σε νερό παρασκευάζονται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από τα διαλύματα παρακαταθήκης του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL μαζί με 2 mL ακετονιτριλίου και αραιώση μέχρι χαραγής με διάλυμα 0,01M υδροχλωρικού οξέος ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις 3,71, 4,38, 6,56, 10,94, 15,31, 17,06, 19,69, 26,25 και 30,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο. Τα δείγματα αναλύονται χωρίς το βήμα της υγρό-υγρό εκχύλισης διότι θα χρησιμοποιηθούν ώστε σε σύγκριση με τα εμβολιασμένα δείγματα κρέμας αντίστοιχης συγκέντρωσης να υπολογιστεί η ανάκτηση. Έτσι στη συνέχεια ακριβώς 100 μL από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα κατεργάζονται με 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M οξικού αμμωνίου - οξικού οξέος (pH 4,5) και 1 mL διαλύματος κερκετίνης συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα διαλύματα αναδεύονται έντονα για 1 λεπτό και κάθε ένα αραιώνεται με μίγμα ακετονιτριλίου: μεθανόλης (90/10, v/v) πριν από την ανάλυσή του στο σύστημα HPLC-UV.

Τα αποτελέσματα των καμπυλών βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της % ανάκτησης της μεθόδου παρουσιάζονται στον πίνακα 7.9. Η % ανάκτηση για το αργίλιο υπολογίσθηκε ότι είναι 94,7%.

Πίνακας 7.9: Ανάκτηση της μεθόδου προσδιορισμού του αργιλίου					
Εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης (εμβολιασμένα δείγματα κρέμας)	Κλίση της εξίσωσης παλινδρόμησης				
1^η σειρά μετρήσεων Σήμα= 9750 C + 2092	9750				
2^η σειρά μετρήσεων Σήμα= 9762 C + 68	9762				
3^η σειρά μετρήσεων Σήμα= 9756 C -1659	9756				
Μέσος όρος κλίσεων	9752				
% RSD των κλίσεων	0,03%				
Εξίσωση της καμπύλης αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα αργιλίου	κλίση	r	Τυπική απόκλιση		S _r
			Κλίσης	Τομής	
Σήμα= 10301 C + 2466	10301	0,998	177	3152	2126
% Ανάκτηση = [(9752 x 100)/ 10301] = 94,7 %					

7.11.5 Έλεγχος ειδικότητας

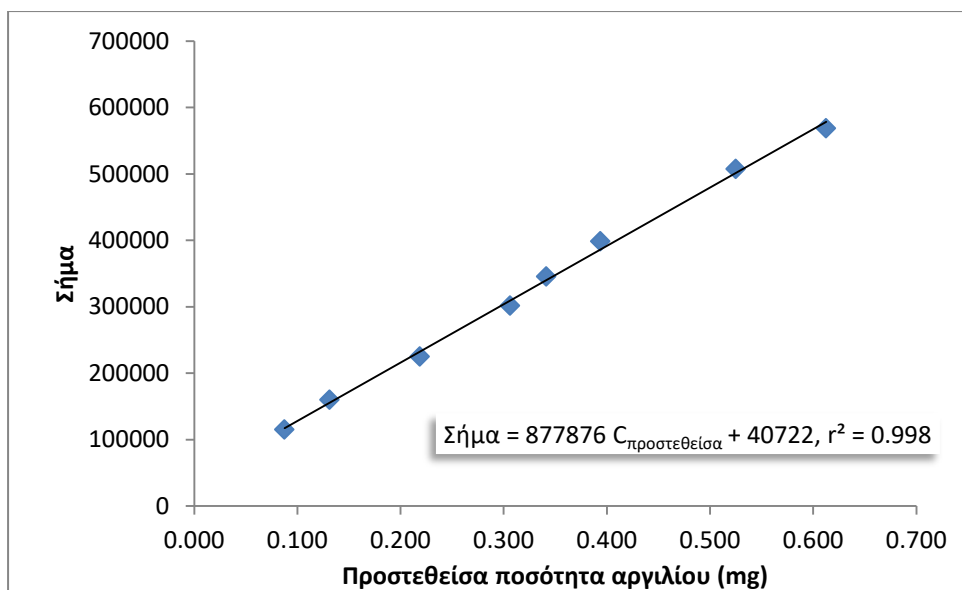
Η ικανότητα της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αργιλίου παρουσία των εκδόχων της αντιδρωτικής κρέμας επιβεβαιώνεται με τον έλεγχο της ειδικότητας. Προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων από το υλικό μήτρας (κρέμα) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των γνωστών προσθηκών. Ως εξής: σε κάθε μία από 9 διαφορετικές ογκομετρικές φιάλες των 20 mL προστίθενται ποσότητα κρέμας η οποία περιέχει 11% w/w υδροξυχλωριούχο αργίλιο που αντιστοιχούν θεωρητικά σε 0,044 mg αργιλίου. Κατόπιν στις οκτώ από αυτές προστίθενται διαδοχικά αυξανόμενοι όγκοι από διάλυμα υδροξυχλωριούχου αργιλίου ώστε στο τελικό διάλυμα (πριν την

συμπλοκοποίηση) να αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 3,71, 4,38, 6,56, 10,94, 15,31, 17,06, 19,69, 26,25 και 30,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε αργίλιο.

Ακολουθώς τα δείγματα κατεργάζονται και αναλύονται σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.10.

Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα της τεχνικής των γνωστών προσθηκών				
Προσθεθείσα συγκέντρωση αργιλίου ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Προσθεθείσα ποσότητα αργιλίου (mg)	Επιφάνεια κορυφής	Ευρεθείσα ποσότητα αργιλίου (mg)	%Er
4,4	0,0875	115206	0,0845	-3,5
6,6	0,1312	160179	0,1358	3,4
10,9	0,2188	225192	0,2099	-4,1
15,3	0,3063	301556	0,2969	-3,0
17,1	0,3412	345618	0,3472	1,7
19,7	0,3938	398519	0,4075	3,5
26,3	0,525	507569	0,5318	1,3
30,6	0,6125	568683	0,6015	-1,8

Η γραφική παράσταση του εμβαδού κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης συναρτήσει της ανάλυση της προσθεθείσας ποσότητας του αργιλίου (mg) σε αντιδρωτική κρέμα παρουσιάζεται στο σχήμα 7.23.



Σχήμα 7.23: Γραφική παράσταση του εμβαδού κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης συναρτήσει της ανάλυση της προσθεθείσας ποσότητας του αργιλίου (mg) σε αντιδρωτική κρέμα.

Η ποσότητα του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα αντιστοιχεί στην αρνητική τομή στον x-άξονα, η οποία υπολογίζεται από το λόγο της τομής της καμπύλης αναφοράς προς την κλίση της.

Με βάση τα παραπάνω η ποσότητα του αργιλίου στην κρέμα βρέθηκε ίση με 0,0464 mg και αντιστοιχεί σε ανάκτηση 105,4%.

7.11.6 Ανθεκτικότητα μεθόδου

Η ανθεκτικότητα εκφράζει την ικανότητα μεθόδου να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα κάτω από προσχεδιασμένες μεταβολές των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών. Για την αξιολόγηση της μεθόδου μελετήθηκε η επιρροή μικρών προμελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στις χρωματογραφικές παραμέτρους (χρόνο κατακράτησης, παράγοντας συμμετρίας) της κορυφής του συμπλόκου αργιλίου κερκετίνης και στον ποσοτικό προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου στην αντιδρωτική κρέμα.

Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν το μήκος κύματος στο οποίο ήταν ρυθμισμένος ο ανιχνευτής, το % ποσοστό του ακετονιτριλίου και η συγκέντρωση του τριφθοροξικού οξέος στην κινητή φάση. Κάθε παράγοντας μελετήθηκε σε τρία επίπεδα (-1, 0, +1) και πραγματοποιήθηκαν δύο εγχύσεις για κάθε επίπεδο. Κάθε φορά μεταβάλλεται μόνο ένας παράγοντας για να υπολογιστεί η επιδρασή του, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες διατηρούνται σταθεροί. Παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα κρέμας συγκέντρωσης 26,0%. Ακολουθήθηκε η πορεία κατεργασίας που έχει ήδη περιγραφεί.

Στον πίνακα 7.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανθεκτικότητας της μεθόδου.

Πίνακας 7.11: Πειραματικά αποτελέσματα για την μελέτη ελέγχου της ανθεκτικότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του αργιλίου				
Χρωματογραφικές αλλαγές	Μετρούμενη απόκριση			
Παράμετροι^α	tR	k'	T	Συγκέντρωση υδροξυχλωριούχου αργιλίου, % (w/w)
<i>A. Μήκος κύματος ανίχνευσης (414 – 416 nm)</i>				
Μέση τιμή (%RSD)	5,07 (0,4)	1,31 (0,8)	1,23 (0,3)	11,3 (2,5)
<i>B. % ποσοστό τριφθοροξικού οξέος (0,079 – 0,081%, v/v)</i>				
Μέση τιμή (%RSD)	5,14 (0,9)	1,29 (1,7)	1,28 (0,5)	11,4 (3,3)
<i>Γ. % ποσοστό ακετονιτριλίου (14 – 16 %, v/v)</i>				
Μέση τιμή (%RSD)	5,12 (2,1)	1,32 (3,4)	1,24 (0,7)	11,5 (3,5)

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ανθεκτική καθώς κανένας από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στις παραμέτρους που διερευνήθηκαν.

7.12 Εφαρμογή της μεθόδου στη μέτρηση αντιδρωτικών προϊόντων που περιέχουν υδροξυχλωριούχο αργίλιο

Το αργίλιο προσδιορίζεται ποσοτικά σε τρία αντιδρωτικά προϊόντα που περιέχουν υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε συγκέντρωση 11, 13 και 16% w/w. Δέκα διαφορετικά δείγματα αναλύθηκαν χρωματογραφικά σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και τα αποτελέσματα των αναλύσεων συνοψίζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 7.12: Ανάλυση δειγμάτων αντιδρωτικής κρέμας που περιέχει υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε ποσοστό 11 % w/w			
α/α	Υδροξυχλωριούχο αργίλιο %w/w	%Er	% δηλούμενη περιεκτότητας
1	11,2	1,4	101,4
2	10,9	-1,1	98,9
3	10,7	-2,4	97,6
4	10,7	-2,5	97,5
5	11,1	0,9	100,9
6	10,8	-1,9	98,1
7	10,6	-3,3	96,7
8	11,0	-0,3	99,7
9	11,3	2,7	102,7
10	11,2	1,8	101,8
Μέση τιμή ± s.d	10,95 ± 0,23	-0,5	99,5 ± 2,1

Πίνακας 7.13: Ανάλυση δειγμάτων αντιδρωτικής κρέμας που περιέχει υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε ποσοστό 13 % w/w			
α/α	Υδροξυχλωριούχο αργίλιο %w/w	%Er	% δηλούμενη περιεκτότητας
1	12,9	-0,5	99,5
2	12,4	-4,8	95,2
3	12,5	-3,9	96,2
4	12,6	-3,2	96,8
5	12,4	-4,4	95,6
6	12,9	-1,1	98,9
7	13,3	2,6	102,6
8	12,7	-2,4	97,6
9	12,9	-0,2	99,8
10	12,7	-2,3	97,7
Μέση τιμή ± s.d	12,74 ± 0,31	-2,1	98 ± 2,3

Πίνακας 7.14: Ανάλυση δειγμάτων αντιδρωτικής κρέμας που περιέχει υδροξυχλωριούχο αργίλιο σε ποσοστό 16 % w/w			
α/α	Υδροξυχλωριούχο αργίλιο %w/w	%Er	% δηλούμενη περιεκτικότητας
1	15,6	-2,7	97,3
2	15,4	-3,7	96,3
3	15,5	-3,3	96,7
4	15,4	-3,7	96,3
5	15,8	-1,3	98,7
6	15,9	-0,4	99,6
7	15,5	-3,3	96,7
8	16,5	2,9	102,9
9	15,5	-3,1	96,9
10	15,4	-3,7	96,3
Μέση τιμή ± s.d	15,64 ± 0,34	-2,2	97,8 ± 2,0

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στους πίνακες 7.12 έως 7.14 σε όλες τις περιπτώσεις το η % ανάκτηση ήταν 99,5% για την αντιδρωτική κρέμα που περιείχε 11% w/w υδροξυχλωριούχο αργίλιο, 98% για την κρέμα περιεκτικότητας 13% w/w υδροξυχλωριούχο αργίλιο και 97,8% για την κρέμα με περιεκτικότητα 16% σε υδροξυχλωριούχο αργίλιο.

7.5 Συμπεράσματα

Το υδροξυχλωριούχο αργίλιο αποτελεί δραστικό συστατικό αντιϋδρωτικών προϊόντων και προϊόντων περιποίησης σώματος που εφαρμόζονται στην περιοχή της μασχάλης και του στήθους. Μέχρι τώρα δεν είχε αναπτυχθεί κάποια αναλυτική μέθοδος για την ποσοτικοποίηση του. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας εκλεκτικής μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιϋδρωτική κρέμα.

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τη χρήση συστήματος RP-HPLC με ανιχνευτή UV-Vis, σε χρωματογραφική στήλη XTerra MS C18 με διάμετρο πόρων 5 μm , (150 x 3 mm i.d.) και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ H_2O , 15:85 (v/v) που περιείχε 0,08% τριφθοροξικό οξύ και ταχύτητα ροής 0,3 mL min⁻¹.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού αργιλίου επιτυγχάνεται με συμπλοκοποίηση του αργιλίου με κερκετίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε ως συμπλεκτικό αντιδραστήριο και μέτρηση της απορρόφησης του χρωματογραφικού εκλούσματος στα 415 nm. Ο χρόνος κατακράτησης του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης ήταν 5,1 λεπτά, ενώ η περίσσεια της κερκετίνης εκλούεται στα 2,5 λεπτά. Μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης σε σχέση με το χρόνο κατακράτησης, τον παράγοντα χωρητικότητας, τον παράγοντα συμμετρίας και τον αριθμό των θεωρητικών πλακών και την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το % ποσοστό του ακετονιτρίλιου και το % ποσοστό του τριφθοροξικού οξέος στην κινητή φάση.

Βελτιστοποιήθηκε η αντίδραση συμπλοκοποίησης εξετάζοντας την επίδραση των κυριότερων παραγόντων στο σήμα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης. Έτσι πραγματοποιήθηκαν μελέτες της επίδρασης της αναλογίας moles αντιδραστήριου (κερκετίνη) και αναλύτη (αργίλιο), της συγκέντρωσης και της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ στο σήμα του συμπλόκου αργιλίου-κερκετίνης.

Επιπλέον βελτιστοποιήθηκε η πορεία κατεργασίας του κοσμητολογικού σκευάσματος και κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη ενός σταδίου εκχύλισης πριν

από την αντίδραση συμπλοκοποίησης με στόχο την απομάκρυνση των λιποδιαλυτών εκδόχων της κρέμας. Η μέθοδος επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα αντιδρωτικής κρέμας. Η κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε με σειρά μετρήσεων σε γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων από 3,7 μέχρι 30,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκε ότι είναι 1,24 και 3,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα, τόσο εντός της ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Η εντός της ημέρας, % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD) βρέθηκε μικρότερη από 3,7 %, και η μεταξύ των ημερών, % σχετική τυπική απόκλιση (inter day % RSD) μικρότερη από 5,5%, το ποσοστό του σχετικού τυπικού σφάλματος (Er %) βρέθηκε από -3,8 έως 1,5. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις κοσμητολογικού αντιδρωτικού σκευάσματος που παρασκευάσθηκε στο ΤΕΙ Αθήνας. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης (~6 λεπτά) καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας.

Τίτλος: Εφαρμογές διαχωριστικών τεχνικών ανάλυσης σε προσδιορισμούς ενώσεων με φαρμακευτική δράση

Ελένη Καλογρηά

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκαν, αξιολογήθηκαν και επικυρώθηκαν νέες διαχωριστικές τεχνικές ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων με φαρμακευτική δράση.

Στο **κεφάλαιο 1**, περιγράφονται τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά των αναλυτών. Στην 1^η υποενότητα περιγράφονται οι βενζοδιαζεπίνες και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην αλπραζολάμη την οποία προσδιορίσαμε σε ανθρώπινο πλάσμα. Γίνεται αναφορά στο μηχανισμό φαρμακολογικής, τη φαρμακοκινητική και τις θεραπευτικές ενδείξεις της αλπραζολάμης. Η 2^η υποενότητα του κεφαλαίου είναι αφιερωμένη στην υπέρταση με έμφαση στην αλίσκιρην και το υδροχλωροθειαζίδιο στα οποία μελετήθηκε η χημική κινητική σε συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης. Περιγράφονται η θεραπευτική αντιμετώπιση της υπέρτασης, ο μηχανισμός δράσης και τα φαρμακινητικά χαρακτηριστικά των αναλυτών. Στη 3^η υποενότητα του ίδιου κεφαλαίου γίνεται αναφορά σε θέματα φυσιολογίας του δέρματος και περιγράφεται ο μηχανισμός δράσης των αντιδρωτικών και των αποσμητικών προϊόντων. Γίνεται αναφορά στο ρόλο του αργιλίου σε αντιδρωτικά προϊόντα και περιγράφονται δημοσιευμένες μελέτες για την πιθανή τοξικότητα του.

Στο **κεφάλαιο 2**, αναφέρονται οι αρχές λειτουργίας της υγροχρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών. Αναφέρονται οι πηγές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην τεχνική ιοντισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού όπου περιγράφονται οι παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία της τεχνικής ESI. Γίνεται αναφορά στους πλέον συνηθισμένους αναλυτές μαζών με έμφαση στον γραμμικό τετραπολικό αναλυτή όπου περιγράφεται η γενική αρχή λειτουργίας του, ενώ τέλος περιγράφεται η αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή που είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής ιόντων.

Στο **κεφάλαιο 3**, γίνεται αναφορά στο μηχανισμό συγκράτησης στη χρωματογραφία HILIC, στις στατικές φάσεις και την επιλογή των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών, ενώ στο τελευταίο μέρος αναφέρονται χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογών της στη φαρμακευτική ανάλυση.

Στο **κεφάλαιο 4**, περιγράφονται οι γενικές αρχές της πορείας ανάπτυξης μεθόδου για μελέτες σταθερότητας και οι αρχές για την κινητική μελέτη χημικών αντιδράσεων. Περιγράφεται ο τρόπος υπολογισμού των κυριότερων κινητικών παραμέτρων

Στο **κεφάλαιο 5**, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος HILIC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλπραζολάμης και του βασικού μεταβολίτη της, α-υδροξυ αλπραζολάμη, σε ανθρώπινο πλάσμα η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς και ρύθμιση της δοσολογίας τους. Για χρωματογραφία HILIC χρησιμοποιήθηκε στήλη XBridge-HILIC 135 Å, μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-ESI/MS με αναλυτή απλό τετράπολο και εφαρμόστηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την ανίχνευση των αναλυτών. Διαπιστώθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα για την αλπραζολάμη σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5-250 ng mL⁻¹ και 2,5-50 ng mL⁻¹ για την α-υδροξυ αλπραζολάμη. Οι % σχετικές αποκλίσεις εντός της ημέρας (% RSD_{intra-day}) κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 2,4 και 6,8% για την αλπραζολάμη και 4,5 έως 5,3% για την α-υδροξυ αλπραζολάμη και οι % σχετικές αποκλίσεις μεταξύ των ημερών (%RSD_{inter-day}) για την αλπραζολάμη βρέθηκε ότι δεν ήταν μεγαλύτερη από 1,9% και για τον μεταβολίτη της κυμάνθηκε μεταξύ 1 και 3%. Η ολική ακρίβεια εκφράζεται από το επί τις εκατό σχετικό σφάλμα, E_r %, το οποίο για την αλπραζολάμη κυμάνθηκε από -3,1 έως 4,1 και για την α-υδροξυ αλπραζολάμη από 0,1 έως 2,2. Βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι ειδική και εκλεκτική, χωρίς να παρεμποδίζεται από τα συστατικά του πλάσματος. Ο χρόνος κάθε ένεσης δεν ξεπερνούσε τα 10 λεπτά.

Στο **κεφάλαιο 6**, έγιναν μελέτες αποικοδόμησης της αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου σε συνθήκες επιταχυνόμενης αποικοδόμησης. Από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης της χημικής υδρόλυσης της

αλισκιρένης και του υδροχλωροθειαζιδίου προκύπτει ότι και οι δύο αναλύτες ακολουθούν ψευδοταξική κινητική πρώτης τάξης. Η αποικοδόμηση της αλισκιρένης σε όξινο περιβάλλον οδηγεί σε δύο προϊόντα διάσπασης που εκλύονται στα 2,22 και 14,55 λεπτά, σε αλκαλικές συνθήκες προκύπτει ένα προϊόν διάσπασης που εκλύεται στα 2,99 λεπτά, ενώ σε οξειδωτικές συνθήκες προκύπτουν δύο νέα προϊόντα διάσπασης που εκλύονται στα 3,13 και 7,89 λεπτά. Από τις μελέτες αποικοδόμησης του υδροχλωροθειαζιδίου δεν προέκυψε κάποιο προϊόν αποικοδόμησης που να ανιχνεύεται στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Τέλος, στο **Κεφάλαιο 7**, περιγράφεται η ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας εκλεκτικής μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό του υδροξυχλωριούχου αργιλίου σε αντιδρωτική κρέμα. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τη χρήση συστήματος RP-HPLC με ανιχνευτή UV-Vis, σε χρωματογραφική στήλη XTerra MS C18 με διάμετρο πόρων 5 μm , (150 x 3 mm i.d.) και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ H_2O , 15:85 (v/v) που περιείχε 0,08% τριφθοροξικό οξύ και ταχύτητα ροής 0,3 mL min^{-1} . Η μέθοδος επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα αντιδρωτικής κρέμας. Η κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε με σειρά μετρήσεων σε γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων από 3,7 μέχρι 30,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκε ότι είναι 1,24 και 3,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, αντίστοιχα. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα, τόσο εντός της ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Η εντός της ημέρας, % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD) βρέθηκε μικρότερη από 3,7 %, και η μεταξύ των ημερών, % σχετική τυπική απόκλιση (inter day % RSD) μικρότερη από 5,5%, το ποσοστό του σχετικού τυπικού σφάλματος (Er %) βρέθηκε από -3,8 έως 1,5. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις κοσμητολογικού αντιδρωτικού σκευάσματος που παρασκευάστηκε στο ΤΕΙ Αθήνας. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης (~6 λεπτά) καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας.

Title: Applications of analytical separation techniques in quantitative determinations of pharmaceutical compounds

Eleni Kalogria

Summary

In this work novel analytical separation techniques have been developed and validated for the quantitative determination of pharmaceutical compounds.

Chapter 1, describes the pharmacological characteristics of substances used for anxiety disorders such as benzodiazepines, and in particular the mechanism of action and therapeutic effects of alprazolam. The second subsection of this chapter describes the treatment of hypertension, the mechanism of action and the pharmacokinetic characteristics of aliskiren and hydrochlorothiazide. In the third subsection of the same chapter the mechanism of action of antiperspirant and deodorant products.

Chapter 2, describes the operating principles of liquid chromatography - mass spectrometry which is a frequently used hyphenated analytical technique in the field of pharmaceutical analysis. A thorough description of the instrumentation including atmospheric pressure ionization sources, mass analyzers and mass detectors is also included in this chapter.

In chapter 3, an overview of the HILIC separation system comparing it to other chromatographic modes is described. Furthermore, the progress in understanding the separation mechanism along the new trends in HILIC packing materials is discussed. Characteristic applications of HILIC mode chromatography in the field of pharmaceutical analysis are also presented.

Chapter 4, refers to the general principles for the development of a stability-indicated HPLC method. The second part of this chapter is dedicated to a basic introduction to the chemical kinetics of simple reaction systems in solution.

In Chapter 5, a hydrophilic interaction liquid chromatography /positive ion electrospray-mass spectrometry (HILIC-ESI/MS) method has been developed and fully validated for the quantification of alprazolam and its main metabolite, a-hydroxy-alprazolam, in human plasma. The assay is based on 50 μL plasma samples, following liquid-liquid extraction. All analytes and the internal standard (tiamulin) were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography using an X-Bridge-HILIC analytical column (150 x 2.1 mm i.d., particle size 3.5 μm) under isocratic elution. The mobile phase was composed of a 7% 10 mM ammonium formate water solution in acetonitrile and pumped at a flow rate of 0.20 mL min^{-1} . Running in positive electrospray ionization and selected ion monitoring (SIM) the mass spectrometer was set to analyze the protonated molecules $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 309, 325 and 494 for alprazolam, a-hydroxy-alprazolam and tiamulin (internal standard) respectively. The assay was linear over the concentration range of 2.5-250 ng mL^{-1} for alprazolam and 2.5-50 ng mL^{-1} for a-hydroxy alprazolam. The method is the first reported application of HILIC in the analysis benzodiazepines in human plasma. With a small sample size (50 μL human plasma) and a run time less than 10 min for each sample the method can be used to support a wide range of clinical studies concerning alprazolam quantification.

In Chapter 6, chemical kinetics of aliskiren and hydrochlorothiazide have been investigated under acidic, basic and oxidative conditions. The rate constants (k) along with half-life's, $t_{1/2}$, obtained from the acidic, basic and oxidative stressed samples of aliskiren and hydrochlorothiazide have been determined. For this purpose a reversed-phase HPLC method on a silica-based phenyl analytical column have been partially validated and quantification of the analytes was based on peak area values. It was found that both compounds follow pseudo-first order reaction kinetics. The degradation of aliskiren under basic conditions proceeded slowly with one unknown degradation peak at 2.99 min. In the acid stressed samples, two unknown degradation peaks appeared at retention times 2.22 min and 14.45 min. Under oxidative conditions, two unknown degradation products appeared at 3.13 and 7.89 min along with a strong interaction peak at 0.82 min that is due to the presence sodium peroxide in the sample. Degradation

of hydrochlorothiazide did not reveal any degradation product that could be detected at the wavelength used for this assay.

Chapter 7 describes the development and validation of a selective high-performance liquid chromatography method that allows, after liquid-liquid extraction and pre-column derivatization reaction with quercetin, the quantification of aluminium chlorohydrate in antiperspirant creams. Chromatographic separation was achieved on an XTerra MS C18 analytical column (150mm x 3,0 mm i.d., particle size 5 μm) using a mobile phase of acetonitrile: water (15:85, v/v) containing 0.08% trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.30 mL min⁻¹. Ultraviolet (UV) spectrophotometric detection at 415nm was used. The assay was linear over a concentration range of 3.7-30.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for aluminium. The method was used to quantify aluminium in antiperspirant creams containing 11 %, 13 % and 16 % (w/w) aluminium chlorohydrate, respectively.

Βιβλιογραφία

1. G.B. O'Beirne, M.J.Woods, , D.C.Williams, , Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. *European Journal of Biochemistry* 188 (1990) 131–138.
2. C. R.Lawrence, *Psychotropic Drugs and Popular Culture: Essays on Medicine, Mental Health and the Media*, McFarland and Company Inc., North Carolina 2006.
3. M.J. Mycek, R.A. Harvey, P.C. Champe, *Φαρμακολογία*, 2^η έκδοση, εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2003.
4. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R.J. Flower, G. Henderson, *Range και Dale, Φαρμακολογία*, 7^η έκδοση, εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2007.
5. E.U. Kolle, D.D Breimer, R. Jochemsen, H.H von Albert, *Arzneimittelforschung* 30 (5a) (1980) 875-881.
6. E. Elberts, Y. Philopoulos, L.M. Reinaki, R.W. Vliek, Disposition of ¹⁴C-alprazolam, a new anxiolytic-antideressant in man. *Pharmacologist*, 22(1980) 279-283.
7. D.J Greenblatt, L.L. von Moltke, J.S. Harmatz, D.A. Ciraulo, R.I. Shader, Alprazolam pharmacokinetics, metabolism, and plasma levels: clinical implications. *J Clin Psychiatry.*, 54 (10 Suppl) (1993) 4-14.
8. W. Dawson, S.G. Jue, R.N. Brogden, Alprazolam, a review of its pharmacodynamics properties and efficacy in the treatment of anxiety and depression, *Drugs*, 27 (1984) 132-147.
9. D.A. Ciraulo, J.G. Barnhill, H.G. Boxenbaum et al. Pharmacokinetics and clinical effects of alprazolam following single and multiple oral doses in patients with panic disorder *J. Clin. Pharm.*, 26 (1986) 292-298.
10. D.A. Fraser, Use and abuse of the benzodiazepines, *Ther. Drug Monitoring*, 20(5) (1998) 481-489.
11. E. Breier, D.S. Charney, J.C. Nelson, Seizures induced by abrupt discontinuation of alprazolam, *Am. J. Psych.* 141 (1984) 1606-1607.
12. E.M. Weerts, W. Froestl, R.R. Griffiths, Effects of GABAergic modulators on food and cocaine self-administration in baboons, *Drug Alcohol Depend.* 80 (2005) 369-376.

-
13. J.A. Lile, W.W. Stoops, P.E.A. Glaser, L.R. Hays, C.R. Rusha, Physiological and subjective effects of acute intranasal methamphetamine during extended-release alprazolam maintenance, *Drug and Alcohol Depend.* 119 (2011) 187-193.
 14. S. Maitra, B. Saha, C.R. Santra, A. Mukherjee, S. Goswami, P.K. Chanda, P. Karmakar, Alprazolam induced conformational change in hemoglobin. *International, J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 23-29.
 15. B. Saha, A. Mukherjee, C.R. Santra, A. Chattopadhyay, A.N. Ghosh, U. Choudhuri, P. Karmakar, Alprazolam intercalates into DNA. *J. Biomol. Struct. & Dynam.* 26 (2009) 421-429.
 16. B. Saha, A. Mukherjee, S. Samanta, P. Saha, A.K. Ghosh, C.R. Santra, P. Karmakar, Caffeine augments Alprazolam induced cytotoxicity in human cell lines, *Toxicol. in Vitro* 23 (2009) 1100-1109.
 17. Α. Σ. Κουτσελίνης, Τοξικολογία, Αθήνα 1997.
 18. T. D. Giles, B. C. Berk, H. R. Black, J. N. Cohn, J. B. Kostis, J. L. Izzo, M. A. Weber, Expanding the definition and classification of hypertension, *J. Clin, Hyper.*, 7 (2005) 505-512.
 19. F. Angeli, G. Reboldi, P. Verdecchia, Hypertension, inflammation and atrial fibrillation, *J Hypertens.*, 32(3) (2014) 480-483.
 20. A. H. Gradman, J.N. Basile, B. L. Carter, G. L. Bakris, Combination therapy in hypertension, *Journal of the American Society of Hypertension* 4(2) (2010) 90-98.
 21. Y. Yamaguchi, K. Menear, N.C. Cohen, R. Maha, F. Cumin, C. Schnell, J. M. Wood, J. Maibaum, The P1 N-isopropyl motif bearing hydroxyethylene dipeptide isostere analogues of aliskiren are in vitro potent inhibitors of the human aspartyl protease renin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 4863-4867.
 22. J. L. Pool, Direct renin inhibition: focus on aliskiren, *J Manag Care Pharm.* 13, (2007) 21-33.
 23. E. Judd, E. A. Jaimes, Aliskiren, amlodipine and hydrochlorothiazide triple combination for hypertension, *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 10(3) (2012) 293-303.

-
24. J.E. Frampton, M.P. Curran, Aliskiren: a review of its use in the management of hypertension, *Drugs*. 67 (2007) 1767-1792.
25. J. Slade, H. Liu, M. Prashad, K. Prasad, A new synthesis of the orally active renin inhibitor aliskiren, *Tetrahedron Letters*, 52 (2011) 4349-4352.
26. A.H. Gradman, R.E. Schmieder, R.L. Lins, J. Nussberger, Y. Chiang, M.P. Bedigian Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo like tolerability in hypertensive patients. *Circulation*, 111 (2005) 1012-1018.
27. H. Geiger, E. Barranco, M. Gorostidi, A. Taylor, X. Zhang, Z. Xiang, J. Zhang, Combination Therapy With Various Combinations of Aliskiren, Valsartan, and Hydrochlorothiazide in Hypertensive Patients Not Adequately Responsive to Hydrochlorothiazide Alone, *J. Clin. Hypert.*, 11 (2009) 324-332.
28. S. Oparil, S.A. Yarows, S. Patel, H. Fang, J. Zhang, A. Satlin, Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial, *Lancet* 370 (2007) 221-229.
29. S. Vaidyanathan, J. Valencia, C. Kemp, C. Zhao, C.M. Yeh, M.N. Bizot, J. Denouel, H.A. Dietrich, W.P. Dole, Lack of pharmacokinetic interactions of aliskiren, a novel direct renin inhibitor for the treatment of hypertension, with the antihypertensives amlodipine, valsartan, hydrochlorothiazide (HCTZ) and ramipril in healthy volunteers, *Int. J Clin. Pract*, 60 (2006) 1343-1356.
30. D. A. Sica, B. Carter, W. Cushman, L. Hamm, Thiazide and loop diuretics, *J. Clin. Hypertens.*, 13(9), 639-643, 2011.
31. S.G. Chrysant, Fixed combination therapy of hypertension: focus on valsartan/hydrochlorothiazide combination (Diovan®/HCT), *Exp. Rev. Cardiovasc. Ther.*, 1 (2003) 335-343.
32. Ε. Κατρίτσης, Ν. Παπαδόπουλος, Ανατομική του Ανθρώπου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 2002.
33. Γ.Θ. Παπαϊωάννου, Κοσμητολογία, Συστατικά, παρασκευή, χρήση καλλυντικών, 3^η έκδοση, Αθήνα 2000.
34. Ε. Τσιρίβας, Α. Βαρβαρέσου, Σ. Παπαγεωργίου Εφαρμοσμένη Κοσμητολογία, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2016.

-
35. Κ. Αυγουστάκης, Σημειώσεις Χημείας και Τεχνολογίας Καλλυντικών, Πανεπιστημίο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα 2003.
36. US Patent No. 2,230,084.
37. US D168109 S.
38. J. Fitzgerald J., A. H. Rosenberg, K. Laden, Chemistry of Aluminum Chlorohydrate and Activated Aluminum Chlorohydrates. In Antiperspirants and Deodorants Vol. 20 στο βιβλίο Antiperspirant and Deodorants, 2nd Edition, Edited by K. Landen, Marcel Dekker, 1999.
39. J. J. Fitzgerald, K. Laden, C.B. Felger, Chemistry of Basic Commercial Aluminum Hydrolysis Complexes, Vol. 7, In Antiperspirants and Deodorants, Edited by K. Landen, New York, Marcel Dekker, 1988.
40. V. Pophristic, V.S.K. Balagurusamy, M.L. Klein, Structure and dynamics of $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}\text{Cl}_7$, Al_{13} Polymer, J. Phys. Chem., 6 (2004) 919.
41. J. Y. Bottero, J. M. Cases, F. Flessinger, J. E. Poirier, Studies of hydrolyzed aluminum chloride solutions. 1. Nature of aluminum species and composition of aqueous solutions, J. Phys. Chem., 84(22) (1980) 2933- 2939.
42. D.N. Waters, M.S. Henty, Raman spectra of aqueous solutions of hydrolysed aluminium(III) salts, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 3 (1977) 243-245.
43. D.A. Riesgraf, M.L. May, Raman spectra of aqueous solutions of hydrolysed aluminium(III) salts, Appl. Spectrosc., 32 (4) (1978) 362-366.
44. C. Brosset, G. Biedermann, L. G. Sillen, Studies of the hydrolysis of metal ions ,Acta Chem. Scand., 8 (1954) 1917.
45. V. Pophristic, M.L. Klein, M. N. Holerca, Modeling Small Aluminum Chlorohydrate Polymers, J. Phys. Chem. A, 108 (2004) 113-120.
46. E.W. Flick, Cosmetic and Toiletry Formulations, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, 1989.
47. Food and Drug Administration, Fed. Regist. 47 (No 162) (1982) 36492–36505, Food and Drug Administration, Fed. Regist. 68 (No 110) (2003) 34272–34293, EU Cosmetics Directive <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301>: en:PDF 76/768/EEC.

-
48. R.P. Quartrale The mechanism of antiperspirant action in eccrine sweat glands pp 89–118. In *Antiperspirants and Deodorants*, Edited by K. Landen, New York, Marcel Dekker, 1988.
49. A. Pineau, B. Fauconneau, A.P.Sappino, R. Deloncle, O.Guillard, If exposure to aluminium antiperspirants presents health risks, its content should be reduced *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28 (2014) 147–150.
50. P.D. Darbre Aluminium, antiperspirants and breast cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005) 1912–1919.
51. L.C. Watson, R.N. Donna Gies, R.N.E. Thompson, B. Thomas, Randomized Control Trial: Evaluating Aluminum-Based Antiperspirant Use, Axilla Skin Toxicity, and Reported Quality of Life in Women Receiving External Beam Radiotherapy for Treatment of Stage 0, I, and II Breast Cancer, *Int. J. Rad. Oncol., Biol. and Phys.*, 83 (2012) 30–34.
52. J. Milos, M. C. Rodriguez, I. Lavilla, C. Bendicho, Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Talanta* 77 (2009) 1490–1496.
53. H.R. Makowska, E. Forma, M. Brys, W.E.M. Krajewska, B. Smolarz, Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer, *Pol. J. Pathol.*, 4 (2011) 257–261.
54. F. Mannello, G.A. Tonti, V. Medda, P. Simone, P.D. Darbre, Analysis of aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients *J. Appl. Toxicol.*, 31 (2011) 262–269.
55. W.L. Donegan, in: D.J. Winchester, D.P. Winchester, C.A. Hudis, L. Norton (Eds.), *Breast Cancer*, BC Dekker, Ontario, 2006, pp. 1–14.
56. T.J. Key, P.K. Verkasalo, E. Banks, *Lancet Oncol.* 2 (2001) 133–140.
57. M.J. Quinn, N. Cooper, B. Rachet, E. Mitry, M.P. Coleman, *Brit. J. Cancer* 99 (2008) S53–S55.
58. S.B.F. Brown, E.A. Mallon, J. Edwards, F.M. Campbell, L.M. McGlynn, B. Elsberger, T.G. Cooke, *Brit. J. Cancer* 100 (2009) 807–810.
59. P.E. Lonning, *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 18 (2004) 1–130.

-
60. P.D. Darbre, D. Pugazhendhi, F. Mannello Aluminium and human breast diseases, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 1484–1488.
61. C. Exley, L. M. Charles, L.Barr, C. Martin, A.Polwart, P. D. Darbre, Aluminium in human breast tissue, *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 1344–1346.
62. T.M. Ismail, S. Zhang, D.G. Fernig, S. Gross, M.L.M. Fernandez, V. See, K. Tozawa, C.J. Tynan, G. Wang, M.C. Wilkinson, P.S. Rudland, R. Barraclough, Self-association of calcium-binding protein S100A4 and metastasis, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 914–922.
63. E. McKieran, E.W. McDermott, D. Evoy, J. Crown, M.J. Duffy, The role of S100 genes in breast cancer progression, *Tumor Biol.*, 32 (2011) 441–450.
64. P. D. Darbre, F. Mannello, C. Exley, Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology, *J. Inorg. Biochem.*, 128 (2013) 257–261.
65. P.D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.*, 26 (2006) 191–197.
66. W.R. Miller, *Estrogen and Breast Cancer*, Chapman and Hall, London, 1996.
67. K.G. McGrath, Apocrine sweat gland obstruction by antiperspirants allowing transdermal absorption of cutaneous generated hormones and pheromones as a link to the observed incidence rates of breast and prostate cancer in the 20th century, *Medical Hypotheses*, 72 (2009) 665–674.
68. S.J. Mandriota, M. Tenan, P. Ferrari, A.P.Sappino, Aluminium chloride promotes tumorigenesis and metastasis in normal murine mammary gland epithelial cells, *Int. J. Cancer*, 139 (2016) 2781–2790.
69. E. Gelpí, From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part I 1965–1984., *J Mass Spectrom*, 43 (4) (2008) 419–435.
70. E. Gelpí, From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part II 1985–2000, *J Mass Spectrom*, 44(8) (2009) 1137–1161.
71. A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis., *Anal Chem.*, 72 (6) (2000) 1156–1162.

-
72. G.L. Glush, D.J. Burinsky, Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, 19(2) (2008) 161–172.
73. T. Kind, O. Fiehn, Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry, *Bioanal Rev.*, 2 (2010) 23–60.
74. A. Vaniya, O. Fiehn, Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics., *Trends Analyt Chem.*, 69 (2015) 52–61.
75. E. De Hoffmann, Tandem mass spectrometry: a primer. *J Mass Spectrom.*, 31(2) (1996) 129–137.
76. E. Kalogria, C. Pistos, I. Panderi, Hydrophilic interaction liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of alprazolam and α -hydroxy-alprazolam in human plasma., *J Chromatogr B, Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 942–943 (2013) 158–64.
77. P. Dawson: *Quadrupole Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
78. P. E. Toschek, Obituary: Wolfgang Paul", *Physics Today*, 47 (7) (1994) 76–77.
79. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules., *Science*, 246 (1989) 64–71.
80. J. Iribarne, B. Thompson, On the evaporation of small ions from charged droplets., *J. Chem. Phys.*, 64 (1976) 2287–2294.
81. R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process, *Journal of the American Chemical Society*, 120(13) (1998) 3265–3266.
82. C. K. Meng, M. Mann, J. Fenn., Of protons or proteins. *Zeitschrift für Physik D Atoms, Mol. Clust.*, 10 (1988) 361–368.
83. J. Barker, D.J. Ando, *Mass spectrometry*, 2nd Edition, Wiley, 1998.
84. Ε. Παντερή, Μ/ Παρίση-Πούλου, Σημειώσεις Προχωρημένης Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Αθήνα 2015.
85. H.D. Dewald, Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation and Applications, *J. Chem. Ed.*, 76 (1999) 33–39.

-
86. T.R. Covey, B.A. Thomson, B.B. Schneider, Atmospheric pressure ion sources, *Mass Spectrom. Rev.*, 28(6) (2009) 870–897.
87. R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies, *J. Mass Spectrom.*, 38(4) (2003) 357–372.
88. C.J. Proctor, J.F.J. Todd, Atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom.*, 18 (1983) 509.
89. E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry*, 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2007.
90. D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography– mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72(15) (2000) 3653–3659.
91. D.B. Robb, M.W. Blades, State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS, *Anal. Chim. Acta*, 627(1) (2008) 34–49.
92. J.B. Fenn, Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4(7) (1993) 524–535.
93. M.S. Wilm, M. Mann, Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last? ,*Int. J. Mass Spectrom.*, 136 (1994) 167–180.
94. M. Wilm, Principles of Electrospray Ionization, *Mol. Cell Proteom.*, 10(7) (2011) M111.009407.
95. B. Thompson, J. Iribarne, Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure, *J. Chem. Phys.*, 71 (1979) 4451–4463.
96. J.V. Iribarne, B.A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.*, 64(6) (1976) 2287–2294.
97. J. Smith, R. Flagan, J. Beauchamp, Droplet evaporation and discharge dynamics in electrospray ionization, *J. Phys. Chem. A*, 106 (2002) 9957–9967
98. R.L. Grimm, J.L. Beauchamp, Evaporation and discharge dynamics of highly charged multicomponent droplets generated by electrospray ionization, *J. Phys. Chem. A*, 114 (2010) 1411–1419
99. M.N. Eberlin, “Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase,” *Eur. J. Mass Spectrom.*, 13(1) (2007) 19–28.

-
100. B. Shibdas, S. Mazumdar, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *Int. J. Anal. Chem.*, Article ID 282574 (2012).
101. I.A. Kaltashov, R.R. Abzalimov, Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19(9) (2008) 1239–1246.
102. M. Peschke, U.H. Verkerk, P. Kebarle, Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15 (2004) 1424 –1434.
103. A. Schmidt, M. Karas, T. Dulcks, Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI?, *J Am Soc Mass Spectrom.*, 14(5) (2003) 492–500.
104. E.R. Wickremesinha, G. Singh, B.L. Ackermann, T.A. Gillespie, A.K Chaudhary, A review of nanoelectrospray ionization applications for drug metabolism and pharmacokinetics, *Curr. Drug Metab.*, 7(8) (2006) 913–928.
105. R.H. Perry, R.G. Cooks, R.J. Noll, Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications, *Mass Spectrom Rev.*, 27(6) (2008) 661–699.
- 106 F. Lemiére, *Mass Analyzers for LC-MS, LC-GC*, 12 (2001) 2-9.
107. K. L. Brown, G. W. Tautfest, "Faraday-Cup Monitors for High-Energy Electron Beams", *Rev. Sci. Instr.*, 27 (9) (1956) 696–702.
108. D.L. Hoffmann, D.A. Richards, T.R. Elliott, P.L. Smart, C.D. Coath and C.J. Hawkesworth, Characterisation of secondary electron multiplier nonlinearity using MC-ICPMS, *Int. J. Mass Spectrom.*, 244 (2005) 97-108.
109. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch *Practical HPLC method development*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., 1997.
110. Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κουππάρη, *Ενόργανη Ανάλυση*, 3η Έκδοση, Αθήνα 2000
111. M. Tswett, Absorption analysis and Chromatographic methods, *Berichte der deutschen botanischen Gessellschaft*, *J. Chem. Education*, vol 24, 384, 1906, translated by H.H. Stain, 44 (1967) 238-242.

-
112. T. Wieland, H. Determan, Some recent developments in gel chromatography, with special reference to thin layers, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 2-11.
113. J.C. Linden, C.L. Lawhead, Liquid chromatography of saccharides, *J. Chromatogr. A*, 105 (1975) 125-135.
114. B. Dejaegher, Y.V. Heyden, HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 698-715.
115. J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 2116-2122.
116. W. Naidong, Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases, *J. Chromatogr. B*, 796 (2003) 209-224.
117. W.Z. Shou, W. Naidong, Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds, *J. Chromatogr. B*, 825 (2005) 186-192.
118. G. Lunn, L.C. Hellwig, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley-Interscience, New York 1998.
119. A. Periat, B. Debrus, S. Rudaz, D. Guillarme, Screening of the most relevant parameters for method development in ultra-high performance hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1282 (2013) 72.
120. F. Gritti, A dos Santos Pereira, P. Sandra, G., Guiochon, Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 683-688.
121. P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2011) 1-25.
122. P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821.

-
123. Y. Guo, Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Analyst*, 140 (2015) 6452-6466.
124. B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012) 231-247.
125. S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5358-5364.
126. S. Qi, W. Naidong, Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS)—Eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction, *J. Chromatogr. B*, 830 (2006) 135-142.
127. S.D. Brown, C.A. White, M.G. Bartlett, Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 16 (2002) 1871-1876.
128. A.C. Li, H. Junga, W.Z. Shou, M.S., Bryant, Direct injection of solid-phase extraction eluents onto silica columns for the analysis of polar compounds isoniazid and cetirizine in plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (2004) 2343-2350.
129. G. Kahsay, H. Song, A. Van-Schepdael, D. Cabooter, E. Adams, Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 142-154.

-
130. J.C. Valette, C. Demesmay, J.L. Rocca, E. Verdon, Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase, *Chromatographia*, 59 (2004) 55–60.
131. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum, *J. Chromatogr. A*, 1058 (2004) 197–201.
132. R. Pisano, M. Breda, S. Grassi, C.A. James, Hydrophilic interaction liquid chromatography-APCI-mass spectrometry determination of 5-fluorouracil in plasma and tissues, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 738–745.
133. R.P. Li, J.X. Huang, Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1041 (2004) 163–169.
134. C. Giroud, K. Michaud, F. Sporkert, C. Eap, M. Augsburger, P. Cardinal, P. Mangin, A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry (HILIC-MS), *J. Anal. Toxicol.*, 28 (2004) 464–447.

-
135. A. Vonaparti, E. Lyris, I. Panderi, M. Koupparis, C. Georgakopoulos, Direct injection horse-urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. IV. Determination of 3-methoxytyramine by hydrophilic interaction liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 1 (2009) 365–371.
136. S. Georgakakou, M. Kazanis, I. Panderi, Hydrophilic interaction liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of perindopril and its main metabolite in human plasma, *Anal Bioanal Chem.*, 397 (6) (2010) 2161-2170.
137. S. Meimaroglou, A. Vonaparti, G. Migias, D. Gennimata, S. Poulou, I. Panderi, Direct injection human plasma analysis for the quantification of antihypertensive drugs for therapeutic drug monitoring using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 1004 (2015) 1-9.
138. H. Pligoropoulou, A. Vonaparti, I. Panderi, *J. Chromatogr. B* 114 (20) (2012) 893-894.
139. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004080en.pdf>, Waters application note

-
140. L. Kovalova, C. Mc Ardell, J. Hollender, Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1100–1108.
141. A.M. Dixon, D.C. Delinsky, J.V. Bruckner, J.W. Fisher, M.G. Bartlett, Analysis of Dichloroacetic Acid in Drinking Water by Ion Exchange HILIC-LC/MS/MS, *J. Liq.Chromatogr. Relat. Technol.*, 27 (2004) 2343–2355.
142. C. Dell'Aversano, G.K. Eaglesham, M.A. Quilliam, Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1028 (2004) 155–164.
143. C.A. Mizzen, Purification and Analyses of Histone H1 Variants and H1 Posttranslational Modifications, *Meth. Enzymol.*, 375 (2004) 278–297.
144. V.V. Tolstikov, O. Fiehn, Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 301 (2002) 298–307.
145. J.E. House Principles of Chemical Kinetis, Wm B. Brown Publishers, USA , 1997
146. J. T. Carstensen, C.T. Rhodes, Drug Stability Principles and Practices, 3rd Edition, Marcel Dekker, 2000.
147. G.B. O'Beirne, M.J. Woods, D.C. Williams, Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, 188 (1990) 131-138.
148. E.M. Weerts, W. Froestl, R.R. Griffiths, Effects of GABAergic modulators on food and cocaine self-administration in baboons, *Drug Alcohol Depend.*, 80 (2005) 369-376.
149. J.A. Lile, W.W. Stoops, P.E.A. Glaser, L.R. Hays, C.R. Rusha, Physiological and subjective effects of acute intranasal methamphetamine during extended-release alprazolam maintenance, *Drug and Alcohol Depend.*, 119 (2011) 187-193.
150. S. Maitra, B. Saha, C.R. Santra, A. Mukherjee, S. Goswami, P.K. Chanda, P. Karmakar, Alprazolam induced conformational change in hemoglobin. *International, J. Biol. Macromol.*, 41 (2007) 23-29.

-
151. B. Saha, A. Mukherjee, C.R. Santra, A. Chattopadhyay, A.N. Ghosh, U. Choudhuri, P. Karmakar, Alprazolam intercalates into DNA. *J. Biomol. Struct. & Dynam.*, 26 (2009) 421-429.
152. B. Saha, A. Mukherjee, S. Samanta, P. Saha, A.K. Ghosh, C.R. Santra, P. Karmakar, Caffeine augments Alprazolam induced cytotoxicity in human cell lines, *Toxicol. in Vitro*, 23 (2009) 1100-1109.
153. R.C. Baselt, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, Biomedical Publications, California, 7th ed., 2004.
154. D.J. Greenblatt, L.L. von Moltke, J.S. Harmatz, D.A. Ciraulo, R.I. Shader, Alprazolam pharmacokinetics, metabolism, and plasma levels: clinical implications., *J Clin Psychiatry*., 54 (1993) 4-11.
155. F.S. Eberts, Y. Philopoulos, L.M. Reineki, R.W. Vlieg. Disposition of ¹⁴C-alprazolam, a new anxiolytic-antidepressant in man. *Pharmacologist*, 22 (1980) 279-282.
156. D.A. Ciraulo, J.G. Barnhill, H.G. Boxenbaum, D.J. Greenblatt, R.B. Smith, Pharmacokinetics and clinical effects of alprazolam following single and multiple oral doses in patients with panic disorder, *J.Clin.Pharmacol.*, 26 (1986) 292-298.
157. J. Shenga, J. Leia, H. Jua, C. Songb, D. Zhangb, Rapid ultraviolet monitoring of multiple psychotropic drugs with a renewable microfluidic device, *Anal. Chim. Acta*, 679 (2010) 1-6.
158. O. Quintela, P. López, A.M. Bermejo, M. López-Rivadulla, Determination of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine and alprazolam in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 834 (2006) 188-194.
159. W.J. Adams, P.A. Bombardt, J.E. Brewer, Normal-Phase Liquid Chromatographic Determination of Alprazolam in Human Serum, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1590-1594.
160. W. Rieck, D. Platt, High-performance liquid chromatographic method for the determination of alprazolam in plasma using the column-switching technique, *J. Chromatogr.* ,578 (1992) 259-263.

-
161. M.A. Hall, C.A. Robinson, R.M. Brissie, High-performance liquid chromatography of alprazolam in postmortem blood using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.*, 19 (1995) 511-513.
162. L. Jin, C.E. Lau, Determination of alprazolam and its major metabolites in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 654 (1994) 77-83.
163. M.F. Renou-Gonnord, K. David, Optimized micellar electrokinetic chromatographic separation of benzodiazepines, *J. Chromatogr. A*, 735 (1996) 249-261.
164. G. Hancua, A. Gáspár, Á. Gyéresia, Separation of 1,4-benzodiazepines by micellar elektrokinetic capillary chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69 (2007) 251-259.
165. K.M. Hold, D.J. Crouch, D.E. Rollins, D.G. Wilkins, D.V. Canfield, R.A. Maes, Determination of alprazolam and alpha-hydroxyalprazolam in human plasma by gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 31 (1996) 1033-1038.
166. D.J. Crouch, D.E. Rollins, D.V. Canfield, D.M. Andrenyak, J.E. Schulties, Quantitation of alprazolam and alpha-hydroxyalprazolam in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 479-485.
167. T. Toyo'oka, Y. Kumaki, M. Kanbori, M. Kato, Y. Nakahara, Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electrospray ionization mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2003) 1773-1787.
168. A. Allqvist, A. Wennerholm, J. Svensson, R.A. Mirghani, Simultaneous quantification of alprazolam, 4- and α -hydroxyalprazolam in plasma samples using liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 814 (2005) 127-131.
169. I. Marchi, J. Schappler, J.L. Veuthey, S. Rudaz, Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass

spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 2275–2283.

170. K. Akerman, J. Jolkkonen, M. Parviainen, I. Penttilä, Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid-phase extraction, *Clin. Chem.*, 42 (1996) 1412-1416.

171. B.E.Smink, J.E. Brandsma, A. Dijkhuizen, K.J. Lusthof, J.J. de Gier, A.C.G. Egberts, D.R.A. Uges, Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 811 (2004) 13-20.

172. H. Miyagushi, K. Kuwayama, K. Tsujikawa, T. Kanamori, Y.T. Iwata, H. Inoue, T. Kishi, A method for screening for various sedative-hypnotics in serum by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry, *Forens. Sci. Intern.*, 157 (2006) 57-70.

173. L. Mercolini, R. Mandrioli, M. Amore, M.A. Raggi, Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma, *J.Sep.Sci.*, 31 (2008) 2619-2626.

174. M. Nakamura, T. Ohmori, Y. Itoh, M. Terashita and K. Hirano, Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds, *Biomed. Chromatogr.*, 23 (2009) 357-364.

175. T. Ishida, K. Kudo, M. Hayashida, N. Ikeda, Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/ mass spectrometry with a small particle column, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 2652-2657.

-
176. I. Papoutsis, S.A. Athanasis, P.D. Nikolaou, C.M. Pistos, C.A. Spiliopoulou, C.P. Maravelias, Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: applications in clinical and forensic toxicology, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 52(4) (2010) 609-614.
177. S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski, Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods, *J. Chromatogr. A*, 1278 (2013) 89-97.
178. B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012) 231-247.
179. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.* 33 (6-7) (2010) 698-715.
180. Guidance for industry. Bioanalytical method validation. FDA May 2001
<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.pdf>
181. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 3019-3030.
182. J. Slade, H. Liu, M. Prashad, K. Prasad, A new synthesis of the orally active renin inhibitor aliskiren, *Tetrahedron Letters*, 52 (2011) 4349-4352.
183. H. Geiger, E. Barranco, M. Gorostidi, A. Taylor, X. Zhang, Zh. Xiang, J. Zhang Combination Therapy With Various Combinations of Aliskiren, Valsartan, and Hydrochlorothiazide in Hypertensive Patients Not Adequately Responsive to Hydrochlorothiazide Alone, *J. Clin. Hypert.*, 11 (2009) 324-332.
184. S.M. Sangoi, M. Wrasse-Sangoi, V. Todeschini, C.M. Bueno Rolim, Rapid simultaneous determination of aliskiren and hydrochloride from their pharmaceutical formulations by monolithic silica HPLC column employing experimental designs, *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.*, 34(17) (2011) 1976-1996.
185. M.S. Sangoi, M. Wrasse-Sangoi, P.R. Oliveira, C.M.B. Rolim, M. Steppe, Simultaneous Determination of Aliskiren and Hydrochlorothiazide From Their

Pharmaceutical Preparations Using a Validated Stability-Indicating MEKC Method, *J. Sep. Sci.*, 34 (15) (2011) 1859–1866.

186. M. Dousa, J. Brichác, J. Svoboda, R. Klvana, Rapid HILIC Method With Fluorescence Detection Using Derivatization Reaction Utilizing O-Phthaldialdehyde for Determination of Degradation Product of Aliskiren, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 66 (2012) 359–364.

187. M. Wrasse-Sangoi, M.S. Sangoi, P.R. Oliveira, L.T. Secretti, C.MB. Rolim, Determination of aliskiren in tablet dosage forms by a validated stability-indicating RP-LC method, *J. Chromatogr. Sci.*, 49 (2011) 170–175.

188. F. Belal, M. Walash, N. El-Enany, S. Zayed, Highly sensitive HPLC method for assay of aliskiren in human plasma through derivatization with 1-naphthyl isocyanate using UV detection, *J. Chromatogr. B*, 933 (2013) 24–29.

189. V. Adireddy, N. R. Pillib, V. R. Derangulaa, S. R. Satlac, C. V. B. Gangurid, V. Ponnerie, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for aliskiren, a novel renin inhibitor in micro-volumes of human plasma: a pharmacokinetic application in healthy South Indian male subjects, *Biomed. Chromatogr.*, 27 (2013) 1062–1069.

190. B. Burckhardt, J. Tins, S. Laeer, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of aliskiren in saliva and its application to a clinical trial with healthy volunteers, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 96 (2014) 118–126.

191. S.S. Mannemala, J. S. Nagarajan, Development and validation of a HPLC-PDA bioanalytical method for the simultaneous estimation of Aliskiren and Amlodipine in human plasma, *Biomed. Chromatogr.*, 29(3) (2015) 346–352.

192. S. Magiera, Fast simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS–UHPLC–MS/MS for therapeutic drug monitoring, *J. Chromatogr. B*, 938 (2013) 89–95.

193 S. Meimaroglou, A. Vonaparti, G. Migias, D. Gennimata, S. Poulou, I. Panderi, Direct injection human plasma analysis for the quantification of antihypertensive drugs for therapeutic drug monitoring using hydrophilic interaction liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr B*, 1004 (2015) 1–9.

-
194. I. Panderi, M. Parissi-Poulou, Determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by micro-bore high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (1999) 1017-1024.
195. S. Hillaert, W. Van den Bossche, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31(2) (2003) 329-339.
196. M.A. Obando, J.M. Estela, V. Cerdà, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column, *Anal. and Bioanal. Chem.*, 391(6) (2008) 2349-2356.
197. G. Carlucci, L. Di Federico, P. Iuliani, HPLC-DAD method for the simultaneous determination of zofenopril and hydrochlorothiazide in oral pharmaceutical formulations, *J. Sep. Sci.* 33(12) (2010) 1717-1722.
198. ICH Topic Q1F, November 2003; www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf
199. H. J. Shah, N. B. Kataria, G. Subbaiah, C. N. Patel, Simultaneous LC-MS-MS Analysis of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma, *Chromatographia*, 69 (2009) 1055-1066.
200. M. J. O'Neil, *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., (2006) 46.
201. ICH Topic Q1F, November 2003; www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf.
202. M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods-critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28(2) (2002) 1011-1040.
203. J.T. Carstensen and C.T., *Drugs and the Pharmaceutical Science, A Series of Textbooks and Monographs, Drug Stability: Principles and Practices*, Vol 108, 3rd Edition Rhodes, Marcel Dekker, New York 2000.
204. K. Laden, C.B. Felger, *Antiperspirants and Deodorants: Cosmetic Science and Technology Series*, vol 7. Marcel Dekker, New York, 1988.
205. Ε. Τσιρίβας, Α. Βαρβαρέσου, Σ. Παπαγεωργίου, *Βασικές αρχές κοσμητολογίας*, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2014.

-
206. P.D. Darbre, F. Mannello, C. Exley, Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology, *J. Inorg. Biochem.*, 128 (2013) 257-261.
207. C. Scheel, R.A. Weinberg, Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links, *Semin. Cancer Biol.*, 22 (2012) 396-403.
208. P.D. Darbre, Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol.*, 26 (2006) 191-197.
209. C. Exley, Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease? *Mol Med Today*, 4 (1998) 107-109
210. M. Pohanda, Copper, aluminum, iron and calcium inhibit human acetylcholinesterase in vitro, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 37 (2014) 455-459.
211. F. Di Lorenzo, B. Di Lorenzo, Iron and aluminum in Alzheimer's disease, *Neuro Endocrinol. Lett.*, 34 (2013) 504-507.
212. B. Chen , Y. Zeng , B. Hu, Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection, *Talanta*, 81 (2010) 180-186.
213. S. Murko, R. Milacic, B. Kralj, J. Scancar, Convective interaction media monolithic chromatography with ICPMS and ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization MS detection: a powerful tool for speciation of aluminum in human serum at normal concentration levels, *Anal Chem.*, 81 (2009) 4929-4936.
214. M. Frankowski, A. Ziola – Frankowska, J. Siepak, New method for speciation analysis of aluminium fluoride complexes by HPLC-FAAS hyphenated technique, *Talanta*, 80 (2010) 2120-2126.
215. M. Frankowski, Simultaneous determination of aluminium, aluminium fluoride complexes and iron in groundwater samples by new HPLC-UVVIS method, *Microchem. J.*, 101 (2012) 80-86.
216. J. Wu, C.Y. Zhou, H. Chi, M. K. Wong, H. K. Lee, H. Y. Ong, C. N. Ong., Determination of serum aluminium using an ion-pair reversed-phase high-

performance liquid chromatographic-fluorimetric system with lumogallion, *J. Chromatogr. B*, 663 (1995) 247-253.

217. J.L. Ren, J. Zhang, J.Q. Luo, X.K. Pei, Z.X. Jiang, Improved fluorimetric determination of dissolved aluminium by micelle-enhanced lumogallion complex in natural waters, *Analyst*, 126 (2001) 698-702.

218. B.L. Lee, L.H. Chua, H.Y. Ong, H.G. Yang, J. Wu, C.N. Ong., Determination of serum and urinary aluminum by HPLC with fluorometric detection of Al-lumogallion complex, *Clin. Chem.*, 42 (1996) 1405-1411.

219. H.Z. Lian, Y.F. Kang, S.P. Bi, A. Yasin, D.L. Shao, Y.J. Chen, L.M. Dai, L.C. Tian, Determination of aluminum in environmental and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography via pre-column complexation with morin, *J. Chromatogr. A*, 993 (2003) 179-185.

220. H. Lian, Y. Kang, S. Bi, Y. Arkin, D. Shao, D.Li, Y.Chen, L. Dai, N. Gan, L. Tian, Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography, *Talanta*, 62 (2004) 43-50.

221. D. Kara, A. Fisher, S.J. Hill, Flow Injection Determination of Aluminium by Spectrofluorimetric Detection After Complexation With N-O-Vanillidine-2-Amino-P-Cresol: The Application to Natural Waters, *Anal. Chim. Acta*, 611 (2008) 62-67.

222. M.T. Kelly, A. Blaise, Validation and evaluation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of aluminium in wine, *J. Chromatogr. A*, 1134 (2006) 74-80.

223. K. Kashimura, Y. Mizushima, E. Hoshino, S. Matsubara, Kinetic differentiation mode chromatography using 8-quinolinol and fluorimetric detection for sensitive determination of aluminum adhering to the gastric mucosa, *Journal of Chromatography B*, 791 (2003) 13-19.

224. D.G. Themelis, F.S. Kika, Flow and sequential injection methods for the spectrofluorimetric determination of aluminium in pharmaceutical products using chromotropic acid as chromogenic reagent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 1179-1185.

225. S.M.Z. Al-Kindy, F.O. Suliman, S.B. Salama, A sequential injection method for the determination of aluminum in drinking water using fluorescence

enhancement of the aluminum–morin complex in micellar media, *Microchem. J.*, 74 (2003) 173-179.

226. H.Z. Lian, Y.F. Kang, S.P. Bi, A. Yasin, D.L. Shao, Y.J. Chen, L.M. Dai, L.C. Tian, Morin applied in speciation of aluminium in natural waters and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 542-548.

227. M.J. Ahmed, J. Hossan, Spectrophotometric determination of aluminium by morin, *Talanta*, 42 (1995) 1135-1142.

228. J. Zhang, H. Xu, J.L. Ren, Fluorimetric determination of dissolved aluminium in natural waters after liquid–liquid extraction into *n*-hexanol, *Analytica Chimica Acta*, 405 (2000) 31- 42.

229. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1223/2009 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ, της 30ης Νοεμβρίου 2009 για τα καλλυντικά προϊόντα. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΕΚΘΕΣΗ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1223>.

230. International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1): current step 4 version patent guideline dated 27 October 1994, (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).

231. A. Ahmedova, K. Paradowska, I. Wawer, ¹H, ¹³C MAS NMR and DFT GIAO study of quercetin and its complex with Al(III) in solid state, *J. Inorg. Biochem.*, 110 (2012) 27–35.

232. A.C. Gutierrez, M.H. Gehlen, Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al³⁺, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, 58(1) (2002) 83-9.

233. Θ.Π. Χατζηγιάννου, Ποιοτική Ανάλυση και Χημική Ισορροπία, (σελ. 194), Αθήνα 1972.

-
234. J.P. Connard, L. Dangleterre, C. Lapouge, Computational and Spectroscopic Characterization of the Molecular and Electronic Structure of the Pb(II)–Quercetin Complex, *J Phys.Chem A*, 109 (2005) 10044-10051.
- 235 J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th edition, Pearson Education Ltd, Harlow 2005.