



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

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ -
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (HILIC-ESI/MS) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΡΟΣΟΥΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΘΗΝΑ 2017

"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του
Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα."
(N. 5343/1932, άρθρο 202)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μιχαήλ Κουμπάρης

Ειρήνη Παντερή (Επιβλέπουσα)

Ιωάννης Λουκάς

Καθηγητής

Καθηγήτρια

Αναπληρωτής Καθηγητής

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας “Φαρμακευτική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας”.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Παντερή Ειρήνη, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσα της ερευνητικής εργασίας, για όλη την επιστημονική καθοδήγηση, την υπομονή, τη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής αυτής, καθώς και για τη δυνατότητα και την τιμή που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής της ομάδας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κο Κουμπάρη Μιχαήλ και τον Καθηγητή κο Λουκά Ιωάννη για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας, για το χρόνο που διέθεσαν για τη διόρθωσή της και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύτιμη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς και τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ’ όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS).....	9
1.1 Εισαγωγή.....	9
1.2 Οργανολογία	9
1.3 Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	11
1.4 Αναλυτές Μαζών	13
1.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών.....	13
1.5 Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μαζών.....	15
1.6 Σύζευξη υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ - HILIC ...	18
2.1 Εισαγωγή.....	18
2.2 Μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC.....	19
2.3 Είδη κινητών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC.....	21
2.3.1 Γενικά.....	21
2.3.2 Οργανικοί τροποποιητές	21
2.3.3 Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα.....	22
2.4 Είδη στατικών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC.....	23
2.4.1 Μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας	24
2.4.2 Πηκτή πυριτίας με ομάδες προπυλαμίνης	26
2.4.3 Πηκτή πυριτίας με ομάδες διόλης	26
2.4.4 Πηκτή πυριτίας με ομάδα αμιδίου	27
2.4.5 Πηκτή πυριτίας με ομάδες προπιονιτριλίου.....	28
2.4.6 Πηκτή πυριτίας με ομάδες κυκλοδεξτρίνης.....	28
2.4.7 Πηκτή πυριτίας με ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης.....	29
2.4.8 Πηκτή πυριτίας με ομάδες φωσφορυλο-χολίνης	29
2.4.9 Πηκτή πυριτίας με με σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας (BEH)	30
2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρωματογραφίας HILIC.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	33
3.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II	33
3.1.1 Εισαγωγή	33
3.1.2 Συμπτώματα και ενδείξεις	34

3.1.3 Διάγνωση	35
3.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση	36
3.2 Μετφορμίνη	38
3.2.1 Εισαγωγή	38
3.2.2 Μηχανισμός δράσης	39
3.2.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα	40
3.2.3.1 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα	40
3.2.3.2 Κατανομή	41
3.2.3.3 Μεταβολισμός και αποβολή	41
3.2.4 Δοσολογία	41
3.2.5 Αντενδείξεις	42
3.2.6 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές ...	43
3.2.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες	43
3.3 Δυσλιπιδαιμία	44
3.3.1 Εισαγωγή	44
3.3.2 Αιτίες εμφάνισης της ασθένειας	45
3.3.3 Συμπτώματα της νόσου	46
3.3.4 Διάγνωση	46
3.3.5 Αντιμετώπιση	47
3.3.5.1 Βελτίωση τρόπου ζωής	47
3.3.5.2 Φαρμακευτική αντιμετώπιση	48
3.3.5.3 Άλλοι τρόποι αντιμετώπισης	49
3.3.6 Πρόληψη της νόσου	49
3.4 Ροσουβαστατίνη	50
3.4.1 Εισαγωγή	50
3.4.2 Μηχανισμός δράσης	51
3.4.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα	51
3.4.3.1 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα	51
3.4.3.2 Κατανομή	52
3.4.3.3 Μεταβολισμός	52
3.4.3.4 Απέκκριση	52
3.4.4 Δοσολογία	53
3.4.5 Αντενδείξεις	54
3.4.6 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές ...	55
3.4.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες	55

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (HILIC-ESI/MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΣΟΥΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ	57
4.1 Εισαγωγή.....	57
4.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία	58
4.2.1 Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.....	58
4.2.2 Φασματόμετρο Μαζών	59
4.2.3 Προκατεργασία Δείγματος.....	59
4.2.4 Αντιδραστήρια – Διαλύτες	60
4.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	60
4.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης.....	60
4.3.2 Διαλύματα εργασίας	61
4.4 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC.....	63
4.4.1 Επιλογή στατικής φάσης	63
4.4.2 Επιλογή κινητής φάσης	64
4.5 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών.....	72
4.6 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC/MS	75
4.7 Εφαρμογή της μεθόδου HILIC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων Ροσουβαστατίνη, Μετφορμίνη σε ανθρώπινο πλάσμα.	77
4.7.1 Ανθρώπινο πλάσμα	77
4.7.2 Προετοιμασία βιολογικού δείγματος	78
4.8 Αξιολόγηση της μεθόδου	81
4.8.1 Έλεγχος γραμμικότητας- καμπύλες αναφοράς.....	81
4.8.2 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας.....	88
4.8.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης.....	92
4.8.4 Έλεγχος επίδρασης φαινομένου καταστολής σήματος (ion suppression phenomenon) στη μέθοδο	93
4.8.5 Έλεγχος ανάκτησης της μεθόδου (recovery)	95
4.8.6 Έλεγχος ειδικότητας (specificity).....	96
4.8.7 Μελέτη σταθερότητας	97
4.9 Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού σε δείγματα πλάσματος ασθενών στους οποίους χορηγήθηκαν τα αναλυόμενα φάρμακα	101
4.10 Συμπεράσματα.....	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετφορμίνη είναι ένας αντιυπεργλυκαιμικός παράγοντας, ο οποίος χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2, μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η ροσουβαστατίνη είναι ένα ισχυρό αντιλιπιδαιμικό φάρμακο που χορηγείται με στόχο τη μείωση της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Λόγω της εξαιρετικής αποτελεσματικότητας των φαρμάκων αυτών αλλά και λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων τους, συνταγογραφούνται συχνά μαζί για την καταπολέμηση του διαβήτη τύπου 2 και της δυσλιπιδαιμίας, δύο ασθένειες οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συννοσηρότητα.

Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών σε ανθρώπινο πλάσμα. Η ανάλυση βασίζεται στη χρήση 100 μL πλάσματος που κατεργάζεται με ακετονιτρίλιο και μυρμηκικό αμμώνιο 5 mM με στόχο την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων και διήθηση από φίλτρα Millipore PTFE, μεγέθους πόρων 0,45 μm , πριν την έγχυση του στο σύστημα LC-ESI/MS. Οι αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο (N-Despropyl Ropinirole) διαχωρίζονται χρωματογραφικά με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, σε αναλυτική στήλη Xbridge HILIC (150.0 x 2.1mm i.d., particle size 3.5 μm , 135Å), με ισοκρατική έκλουση. Η κινητή φάση αποτελείται από 12% 15,0 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου σε ακετονιτρίλιο, με ταχύτητα ροής 0,25 mL min⁻¹. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών επιτυγχάνεται με ηλεκτροψεκασμό με τη μέθοδο SIM. Η περιοχή γραμμικότητας της μεθόδου κυμαίνεται από 62,5 – 5000 ng mL⁻¹ για τη μετφορμίνη και 2,0 – 100 ng mL⁻¹ για τη ροσουβαστατίνη.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε δείγματα πλάσματος ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε μία από τις παραπάνω ενώσεις. Μελλοντικά, η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς και ρύθμιση της δοσολογίας τους.

ABSTRACT

HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE QUANTIFICATION OF METFORMIN AND ROSUVASTATIN IN HUMAN PLASMA

Metformin is an anti-hyperglycemic agent used in patients with type 2 diabetes, reducing blood glucose. Rosuvastatin is an anti-lipidemic drug used in patients with dyslipidemia, reducing LDL cholesterol and triglycerides. Due to the superiority in efficacy and other benefits, rosuvastatin and metformin are often prescribed together due to the high comorbidity of dyslipidemia and type 2 diabetes.

Main objective of the current study is HILIC-ESI/MS method development and validation for the quantification of the compounds mentioned above, in human plasma. The analysis is based in using 100 μ l plasma, treated with acetonitrile – ammonium formate 5mM solution, leading to protein precipitation. After 20 min centrifuge, the samples are filtrated through 0.45 μ m Millipore PTFE filters and injected to the LC-ESI/MS system. The column, Xbridge HILIC (150.0 x 2.1mm i.d., particle size 3.5 μ m, 135Å), is used for the analytical separation of the analytes and the internal standard (N-Despropyl Ropinirole), through isocratic elution. A 12% 15.0 mM ammonium formate solution in acetonitrile is used as mobile phase, with 0,25 mL min⁻¹ flow rate. The quantification of the analytes is achieved by ESI – SIM method, within 62.5 – 5000 ng mL⁻¹ for metformin and 2,0 – 100 ng mL⁻¹ for rosuvastatin.

The method was successfully applied for the analysis of plasma samples from patients administered one of the above compounds. In the future, the method could be used in clinical studies to monitor the levels of these drugs in patients and adjust their dosage.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)

1.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία ανακαλύφθηκε από τους Thomson (1910) και Aston (1919) και η πρώτη της εφαρμογή ήταν στην ανακάλυψη νέων ισοτόπων. Τα πρώτα εμπορικά όργανα εμφανίστηκαν γύρω στο 1940 και χρησιμοποιήθηκαν στη βιομηχανία πετρελαίου. Η εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών σε αναλύσεις σειράς οργανικών μορίων άρχισε κυρίως από το 1960 και μετά.¹ Είναι από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών. Αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής των οργανικών και ανόργανων ουσιών. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιοντισμό του μορίου και το διαχωρισμό τους βάσει του λόγου m/z , όπου m η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του ιόντος.² Παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

- Την στοιχειακή σύσταση του δείγματος
- Τις δομές ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων
- Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων
- Τη δομή και σύσταση επιφανειών και
- Την αναλογία ισοτόπων ατόμων στα δείγματα.³

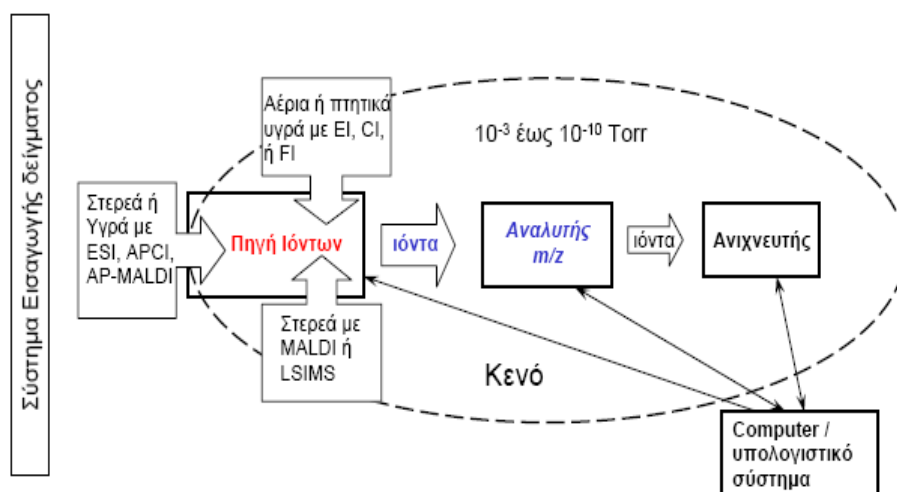
1.2 Οργανολογία

Ένα φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα (Σχήμα 1.1):

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
2. Πηγή ιοντισμού.
3. Αναλυτής μαζών για το διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο μάζας/φορτίο.
4. Ανιχνευτής για την καταγραφή της θέσης και έντασης των ιόντων.
5. Επεξεργαστής του ηλεκτρικού σήματος του ανιχνευτή και αποθήκευση στη μνήμη του υπολογιστή.
6. Καταγραφή και εκτύπωση φασμάτων.

Ο σκοπός του συστήματος εισόδου είναι να αφήνει ένα πολύ μικρό ποσό του δείγματος (ένα μικρογραμμομόριο ή λιγότερο) να εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών, όπου τα συστατικά του μετατρέπονται σε ιόντα σε αεριώδη κατάσταση. Συχνά το σύστημα εισαγωγής περιλαμβάνει και ένα σύστημα εξαέρωσης στερεών ή υγρών δειγμάτων.

Οι πηγές ιόντων για τα φασματόμετρα μαζών μετατρέπουν τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα. Σε πολλές περιπτώσεις σύστημα εισαγωγής και πηγή ιόντων συνδυάζονται σε μια ενιαία μονάδα. Σε άλλες περιπτώσεις, η έξοδος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικών), τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Η λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι ανάλογη με αυτή του φράγματος περίθλασης σε ένα οπτικό φασματόμετρο. Ωστόσο, στον πρώτο η διασπορά βασίζεται στον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) των ιόντων της ουσίας και όχι στο μήκος κύματος των φωτονίων. Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή μαζών.



Σχήμα 1.1: Σχηματική παρουσίαση λειτουργίας MS.

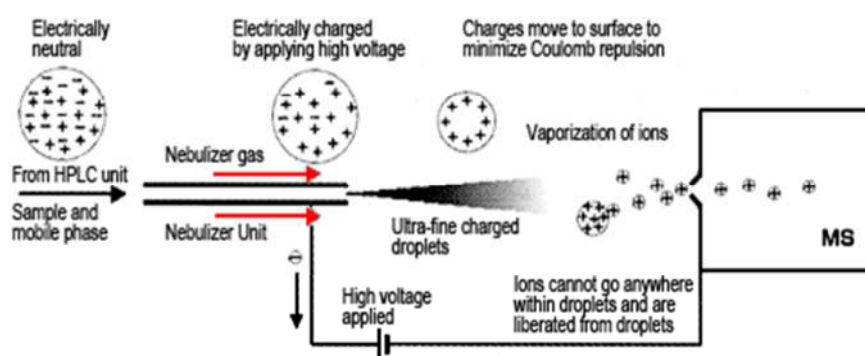
Όπως και σε ένα οπτικό φασματόμετρο, στο φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνεται ένας μεταλλάκτης (για τα ιόντα), που μετατρέπει τη δέσμη ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό στη συνέχεια μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία, να αποθηκευθεί στη μνήμη υπολογιστή και να παρουσιασθεί ή να καταγραφεί με ποικίλους τρόπους.

Σε αντίθεση με τα οπτικά όργανα, για τα φασματομέτρα μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-4} έως και 10^{-8} torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου, εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων. Το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, επειδή τα φορτισμένα σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των ηλεκτρονίων, αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται.^{2,3,4}

1.3 Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μεγάλης ποικιλίας μορίων (πολικών, μετρίως πολικών και θερμικά ασταθών). Έχει πολλά πλεονεκτήματα καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό μοριακού βάρους χωρίς περιορισμό στη μάζα, έχει καλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση και συνδυάζεται με τεχνικές όπως η υγροχρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.

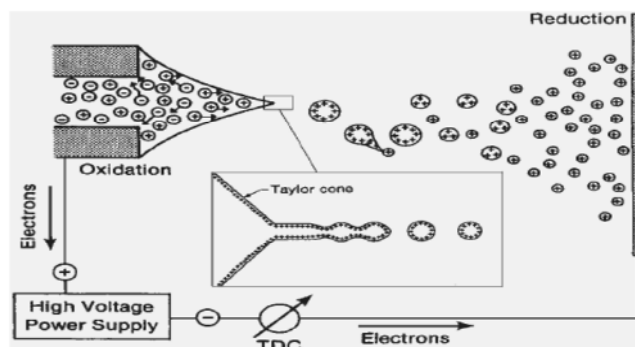
Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τροχοειδούς σωλήνα μέσα σε ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Ο συμβατικός ηλεκτροψεκασμός είναι μία άκρως ευαίσθητη τεχνική και επιπλέον οι παραλλαγές του, όπως ο μικροηλεκτροψεκασμός ή ο νανοψεκασμός έχουν αποδειχθεί ικανές για τέλεια απόδοση με υψηλές ευαισθησίες.^{5,6,7}



Σχήμα 1.2: Αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή ιόντων.

Στον ηλεκτροψεκασμό (υπό ατμοσφαιρική πίεση και σε κάποια θερμοκρασία), το υγρό ψεκάζεται σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο χιλιάδων Volts μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα με αποτέλεσμα να διασπείρεται σε ένα νέφος πολλών φορτισμένων. Οι δημιουργούμενες φορτισμένες μικρές σταγόνες διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς όπου ο αναλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόριά του. Απαραίτητη, στην παραπάνω διαδικασία, είναι η ύπαρξη ενός βοηθητικού αερίου (auxiliary gas) το οποίο είναι συνήθως άζωτο και το οποίο παρέχεται γύρω από το τριχοειδές βοηθώντας την εξάτμιση του διαλύτη. Απαραίτητο είναι το άζωτο ως εκνεφωτικό αέριο (sheath gas) το οποίο ελευθερώνεται υπό πίεση γύρω από την άκρη του τριχοειδούς διευκολύνοντας τη σχάση του κώνου που σχηματίζεται.²

Πιο αναλυτικά, κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, το διάλυμα του δείγματος εισάγεται σε ένα μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με πολύ μικρή ταχύτητα ροής της τάξης των $\mu\text{L min}^{-1}$. Μεταξύ αυτού του τριχοειδούς και ενός αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 3-6 kV, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου. Το πεδίο αυτό δημιουργεί μια συσσώρευση φορτίου μέσω ηλεκτροαπωθητικών δυνάμεων στην επιφάνεια του υγρού που βρίσκεται στο άκρο του τριχοειδούς, απ' όπου θα σχηματιστούν τα φορτισμένα σταγονίδια. Ανάλογα με τον τρόπο ιοντισμού, τα συσσωρευμένα φορτία έχουν θετικό ή αρνητικό φορτίο. Έτσι δημιουργείται ο "κώνος του Taylor". Καθώς το δυναμικό αυξάνει, το διάλυμα που σχηματίζει τον κώνο του Taylor ξεπερνά το όριο Rayleigh, δηλαδή το σημείο εκείνο όπου η πίεση από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο κώνος να υφίσταται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σταγονίδια. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι δυνατό να υπάρξει σχάση και πριν από το όριο Rayleigh, δημιουργώντας ένα νέο κώνο Taylor απ' όπου απελευθερώνονται μικροσωματίδια.⁵



Σχήμα 1.3: Απεικόνιση της δημιουργίας του κώνου Taylor και των φορτισμένων σταγονιδίων.

Ο σχηματισμός των σταγονιδίων και η εκδίωξή τους στην περιοχή αποδιαλύτωσης είναι γνωστή και ως εκνέφωση. Η αποτελεσματικότητα και η σταθερότητα της εκνέφωσης είναι ανάλογη του μεγέθους της διαφοράς δυναμικού στο σύστημα. Όσο αυξάνεται η διαφορά δυναμικού, το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται και η κίνησή τους γίνεται οριζόντια.

Τα σταγονίδια θα συνεχίσουν να χάνουν μόρια διαλύτη, και όταν το ηλεκτρικό πεδίο στην επιφάνειά τους γίνει αρκετά μεγάλο, θα πραγματοποιηθεί αποδιαλύτωση των ιόντων. Για να γίνει πιο αποδοτικός ο ιοντισμός έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου με τη βοήθεια αερίων διασπώνται τα συσσωματώματα. Έτσι στην περιοχή γύρω από το τριχοειδές υπάρχει άζωτο (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) που βοηθά στην εξάτμιση του διαλύτη καθώς επίσης και αέριο άζωτο υπό πίεση που απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο τη σχάση του κώνου.⁸

Ένα σημαντικό μειονέκτημα του ηλεκτροψεκασμού είναι η εξάρτησή του από τις πειραματικές συνθήκες και το φαινόμενο της μήτρας. Ενίσχυση και καταστολή του σήματος στο ESI προκαλείται επίσης και από άλλους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό ιοντισμού των αναλυτών όπως αστάθεια ροής, θόρυβος υποστρώματος, η σύσταση της κινητής φάσης και ουσίες του δείγματος.^{9,10}

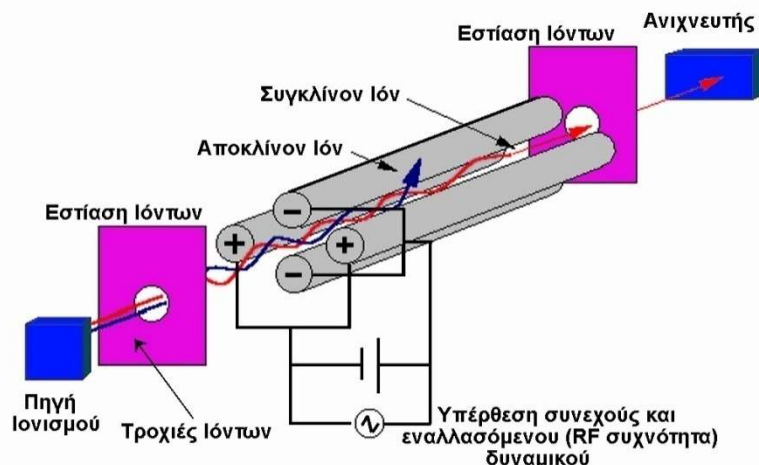
1.4 Αναλυτές Μαζών

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται οφείλεται σε ένα μόνο (m/z) κάθε στιγμή. Οι αναλυτές μαζών χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: συνεχείς αναλυτές μαζών (τετραπολικός αναλυτής μαζών ή Quadrupole , αναλυτές μαγνητικού τομέα ή magnetic sector) και παλμικούς αναλυτές μαζών (τετραπολική παγίδα ιόντων ή IT , αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης ή TOF, αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με σχηματισμό Fourier ή FTICR).¹⁰⁷

1.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Αποτελεί μία από τις νεότερες μεθόδους διαχωρισμού μαζών, οικονομικότερη από την χρήση του μαγνητικού φίλτρου μαζών με αποτέλεσμα την σημαντικά ευρύτερη

χρήση της. Δίνει απλά φάσματα αλλά έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα ($\sim 1\text{Da}$). Ο διαχωρισμός μαζών επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσομένου ηλεκτρικού πεδίου έχοντας συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radio frequency) σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται σε τέσσερις παράλληλες ράβδους, όπως δείχνεται στο Σχήμα 1.5.^{11,12}



Σχήμα 1.4: Τετραπολικός ανιχνευτής μαζών (*quadrupole mass*)

Οι τέσσερις μεταλλικές κυλινδρικές ράβδοι (πόλοι) βρίσκονται φορτισμένες ανά ζεύγη, το ένα ζεύγος απέναντι από το άλλο, στο ίδιο συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Στο σύστημα εφαρμόζεται, με διαφορά φάσης 180 μοίρες, εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (ραδιοσυχνότητα). Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο μετά από επιτάχυνση σε δυναμικό 5-15 V. Ο συνδυασμός των τεσσάρων πόλων επιτρέπει σε ιόντα συγκεκριμένου μόνο m/z να περάσουν τον αναλυτή και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Για τη σάρωση σε ένα τετραπολικό αναλυτή τα δυναμικά των δύο ρευμάτων (εναλλασσόμενου και συνεχούς) αυξάνονται από τιμή 0 έως μία μέγιστη τιμή, με το λόγο περίπου των δύο στο 6. Με τον τρόπο αυτό τα δυναμικά μεταβάλλονται από 0 έως περί τα + 250 V για το συνεχές ρεύμα και από 0 έως + 1500 V για το εναλλασσόμενο. Η σάρωση αυτή των δυναμικών επηρεάζει την κίνηση των ιόντων με τρόπο που ορίζεται από περίπλοκες διαφορικές εξισώσεις. Τα ιόντα ουσιαστικά κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο.^{3,8} Κύρια πλεονεκτήματα είναι η αξιοπιστία, είναι κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση είναι κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας, έχει μεγάλη ταχύτητα σάρωσης,

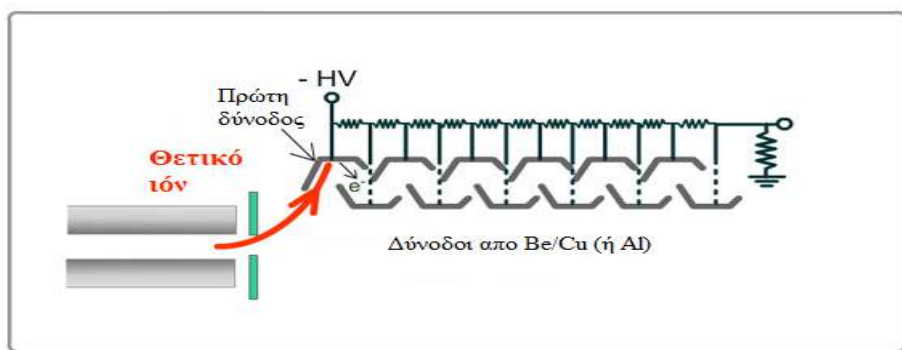
είναι φθηνός, μέτριες απαιτήσεις κενού, έχει δυνατότητα για ms/ms και ίναι ιδανικός για σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP. Μειονεκτεί ως προς την χαμηλή διακριτική ικανότητα, το περιορισμένο εύρος m/z και την μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή διακριτική ικανότητα.³

1.5 Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μαζών

Στη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούνται ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (electron multipliers) των οποίων η αρχή βασίζεται στη μέτρηση των ηλεκτρικών φορτίων των ιόντων.^{1, Error! Bookmark not defined.}

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών δυνόδων (discrete dynode electron multipliers)

Αποτελούνται από πολλές δυνόδους. Τα θετικά ιόντα που προκύπτουν μετά τον αναλυτή μαζών, βομβαρδίζουν μια κάθοδο από Βηρύλλιο και Χαλκό (Be/Cu) και πρόσφατα από Αλουμίνιο (Al) και ελευθερώνουν ηλεκτρόνια τα οποία επιταχυνόμενα μέσω μιας σειράς δυνόδων από το ίδιο υλικό προκαλούν ένα «καταρράκτη» ηλεκτρονίων. Ο ανιχνευτής αυτός είναι πολύ ευαίσθητος και έχει ενίσχυση ρεύματος μέχρι 10^8 .

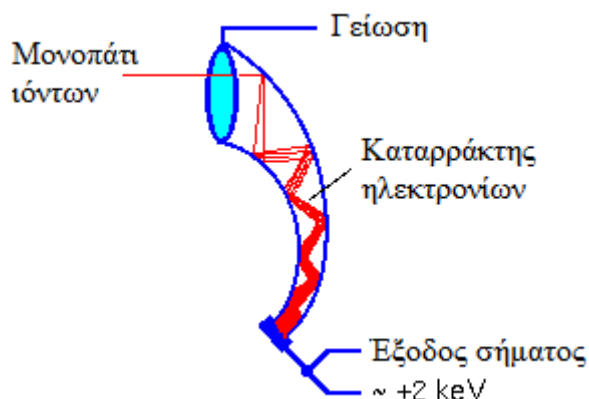


Σχήμα 1.5: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς δυνόδου (continuous dynode multipliers, channeltron)

Έχουν το σχήμα τρομπέτας, είναι από γυαλί με προσθήκη μολύβδου και κατά μήκος τους εφαρμόζεται ένα δυναμικό περίπου 2 kV. Τα ιόντα προσκρούουν στην επιφάνεια κοντά στην είσοδο και τα εκτοξευόμενα ηλεκτρόνια προκαλούν έναν καταρράκτη ηλεκτρονίων από τις συγκρούσεις με τα τοιχώματα, κατευθυνόμενα στο θετικό ηλεκτρόδιο, όπως φαίνεται στο σχήμα 12. Οι ανιχνευτές αυτοί έχουν

ενίσχυση της τάξης των 10^5 - 10^8 και χρησιμοποιούνται κυρίως στην έξοδο των τετραπολικών αναλυτών, όπως και στους αναλυτές μαγνητικού τομέα.¹



Σχήμα 1.6: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής συνεχούς δυνάμει

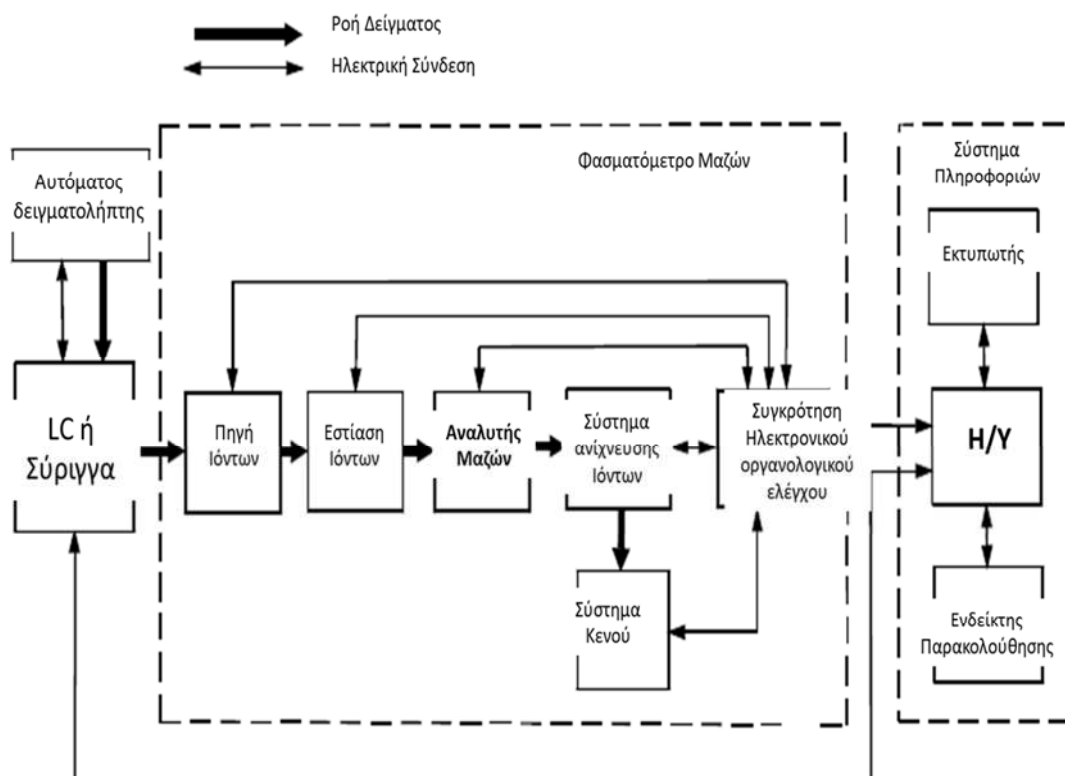
1.6 Σύζευξη υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η προσπάθεια συνδυασμού της υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (Σχήμα 1.7) ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του '60 και η συνδεσή της σε σειρά με αυτό πραγματοποιήθηκε το 1974.⁸ Η διασύνδεση υγροχρωματογράφου υψηλής απόδοσης (HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) με φασματόμετρο μαζών είναι από τεχνικής πλευράς περισσότερο σύνθετη απ' ό,τι η σύνδεση GC-MS, διότι αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούν διαλύτες που είναι συχνά υδατικοί, πράγμα που πρέπει να αποφεύγεται σε ένα φασματόμετρο μαζών. Ως επί το πλείστον χρησιμοποιούνται μικροστήλες στην HPLC όταν συνδέεται με MS, λόγω των πολύ μικρών ταχυτήτων ροής.¹

Η υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών αποτελούν ένα ιδανικό εργαλείο για ένα εργαστήριο αναλύσεων. Η τεχνική αυτή είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη και δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού μη-πτητικών ενώσεων, θερμοευαίσθητων ενώσεων (που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με GC-MS) καθώς και την καθαρότητα χρωματογραφικής κορυφής με ταυτόχρονη ταυτοποίηση δομής αγνώστων ενώσεων.

Συνεπώς, ο συνδυασμός των δύο παραπάνω τεχνικών επιτρέπει τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα σε δείγματα με περίπλοκη μήτρα, καθώς γίνεται εισαγωγή διαχωρισμένων ουσιών μίγματος στο φασματόμετρο μαζών, προσφέροντας έτσι αξιόπιστη ταυτοποίηση, ακόμα και εάν ο διαχωρισμός δεν είναι

πλήρης, διότι ουσίες με παρόμοιους χρόνους ανάσχεσης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών. Είναι ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών που επιτρέπει αρχικά τον διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ τους βάσει του χρόνου ανάσχεσης και έπειτα την ταυτοποίησή τους (m/z), καθώς αυτές εισέρχονται διαχωρισμένες στο MS.^{1,5}



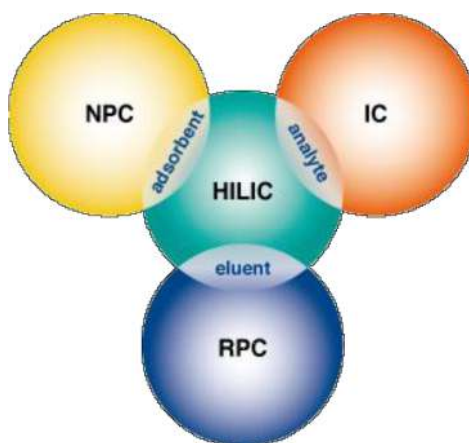
Σχήμα 1.7: Σύστημα συζευγμένης υγροχρωματογραφίας με φασματόμετρο μαζών (LC-MS)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

- HILIC

2.1 Εισαγωγή

Η υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), είναι μια τεχνική χρωματογραφικού διαχωρισμού πολικών και υδρόφιλων αναλυτών χρησιμοποιώντας υδρόφιλες στατικές φάσεις. Μολονότι η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού αναλυτών χαμηλής και μέτριας πολικότητας, παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα για υδρόφιλα μόρια και απαιτεί συχνά τη χρήση ειδικών στηλών (κατιονανταλλακτικές ή ανιονανταλλακτικές ρητίνες) ή την προσθήκη αντιδραστηρίων σχηματισμού ζευγών ιόντων. Η υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης αποτελούσε τη χρωματογραφική τεχνική επιλογής για τις παραπάνω ενώσεις, χρησιμοποιώντας μη υδατικές κινητές φάσεις. Η χρωματογραφία HILIC κατέλαβε τη θέση της HPLC κανονικής φάσης και αποτελεί πλέον μία καλή εναλλακτική λύση, με βάση την οποία η σειρά έκλουσης των αναλυτών είναι αντίστροφη από αυτή της RP-HPLC. Ουσιαστικά η χρωματογραφία HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ των κυριότερων χρωματογραφικών μεθόδων, αλλά ταυτόχρονα συμπίπτει μερικώς με κάθε μία από αυτές (Σχήμα 2.1).^{5,13}



Σχήμα 2.1: Η χρωματογραφία HILIC συνδυάζει τα χαρακτηριστικά τριών από τις κυριότερες μεθόδους υγροχρωματογραφίας

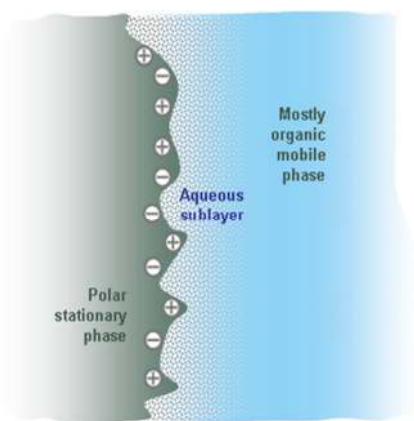
Η εφαρμογή της HILIC πολλαπλασιάζεται από το 2000 και μετά, καθώς γίνεται επιτακτική η ανάγκη διαχωρισμού πολικών αναλυτών σε εξαιρετικά πολύπλοκα

δείγματα. Με τη HILIC γίνεται εφικτό να αναλυθούν πολικά συστατικά, προσφέροντας ικανοποιητικό διαχωρισμό, χρησιμοποιώντας υδρόφιλες στατικές φάσεις, ενώ οι κινητές είναι μίγματα νερού και οργανικών διαλυτών, με τους δεύτερους να υπερτερούν στην αναλογία. Μπορεί να συνδυαστεί με πληθώρα ανιχνευτών HPLC, αλλά όταν συνδυάζεται με φασματοόμετρο μαζών (ESI/MS) ή ανιχνευτή σκεδασμού ακτινοβολίας βελτιώνεται εντυπωσιακά η ευαισθησία της μεθόδου. Η επιλογή της χρωματογραφίας HILIC σε συνδυασμό με φασματοόμετρο μαζών έχει παρατηρηθεί^{14,15} ότι αυξάνει το σήμα στο φασματοόμετρο μαζών, ειδικά στην περίπτωση του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό όπου η ευαισθησία ενισχύεται κατά 10 – 1000.¹⁶ Το γεγονός αυτό οφείλεται στο υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση που αυξάνει την επιδιαλύτωση των αναλυτών, προκαλεί μείωση της τάσης επιφάνειας, με αποτέλεσμα την ευκολότερη παραγωγή σταγονιδίων κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού γεγονός που υποβοηθά το σχηματισμό των ιόντων στην αέρια φάση.

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πληθώρα στατικών φάσεων που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της HILIC γεγονός που εξηγεί την ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή της για την ανάλυση ακόμη και των πιο πολικών μορίων.

2.2 Μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC

Η πρώτη υπόθεση για το μηχανισμό συγκράτησης των αναλυτών στη χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) διατυπώθηκε από τον Alpert το 1990¹⁷, όπου υποστηρίχθηκε ότι τα πολικά μόρια συγκρατούνται εντός της στήλης λόγω της κατανομής τους μεταξύ μίας υδατικής ψευδοστιβάδας στην επιφάνεια της στατικής φάσης που έρχεται σε άμεση επαφή με το μίγμα της κινητής φάσης, το οποίο περιέχει επίσης κάποιο ποσοστό νερού (Σχήμα 2.2)



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της υδατικής ψευδο-στιβάδας σε στατική φάση
HILIC

Ακόμη όμως και στην πρώτη αυτή θεωρία, μικρότερης βαρύτητας επιπλέον μηχανισμοί συγκράτησης πολικών αλληλεπιδράσεων αναφέρθηκαν πως μπορεί να υπάρχουν, όπως οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ο μηχανισμός συγκράτησης στη HILIC είναι περισσότερο πολύπλοκος από την απλή κατανομή μεταξύ δύο στιβάδων διαφορετικού βαθμού λιποφιλίας, καθώς παρατηρήθηκε η διαφορετική εκλεκτικότητα που εμφανίζουν στήλες HILIC με διαφορετικά μεταξύ τους πληρωτικά υλικά. Έτσι επιπλέον μηχανισμοί όπως προσρόφηση και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υποτέθηκε πως συμβάλλουν στο διαχωρισμό.^{18,19} 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 φασματόμετρο μαζών και στην ευαισθησία της μεθόδου.⁵

Ο χρόνος κατακράτησης φαίνεται τελικά πως εξαρτάται από μία πλειάδα παραγόντων. Αυτοί είναι η σύνθεση της κινητής φάσης, οι ιδιότητες των αναλυτών (πολικότητα και φορτίο) και οι ιδιότητες των λειτουργικών ομάδων της κινητής φάσης.

2.3 Είδη κινητών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC

2.3.1 Γενικά

Οι κινητές φάσεις στην υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης αποτελούνται συνήθως από μεγάλο ποσοστό οργανικού τροποποιητή, μεταξύ 40-97%. Το υπόλοιπο ποσοστό της κινητής φάσης αποτελείται από έναν πολικό διαλύτη, που είναι συνήθως το νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων βασίζεται στην αποτελεσματική ενυδάτωση των σωματιδίων του υποστρώματος. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο η κινητή φάση να αποτελείται από τουλάχιστον 3% νερό. 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.

2.3.2 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.⁵

Η εκλουστική ισχύς των διαλυτών ακολουθεί την αντίστροφη πορεία από την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης και είναι η εξής: ακετόνη < ακετονιτρίλιο < ισοπροπανόλη < αιθανόλη < μεθανόλη < νερό. Η ακετόνη διαθέτει τη μικρότερη πολικότητα, όμως εμφανίζει έντονη απορρόφηση στο ορατό-υπεριώδες (UV-Vis) και

προκαλεί παρεμπόδιση στην έκλυση των αναλυτών, γι' αυτό η συνηθέστερη επιλογή είναι το ακετονιτρίλιο. Το ακετονιτρίλιο εμφανίζει μετά την ακετόνη τη μικρότερη εκλουστική ισχύ. Η μεθανόλη αποτελεί τη δεύτερη επιλογή, ως οργανικός διαλύτης, συνήθως, όταν οι αναλύτες δε διαλύονται καλά στο ακετονιτρίλιο.²⁰

2.3.3 Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών μπορεί να επιτευχθεί αν ανάμεσα στο φορτισμένο πληρωτικό υλικό και τον αναλύτη αναπτυχθούν δευτερεύουσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στη συγκράτηση και το διαχωρισμό των αναλυτών. Το γεγονός αυτό, καθιστά επιτακτική την ανάγκη χρήσης άλατος εντός της κινητής φάσης. Για να αποφευχθεί αυτό είναι απαραίτητο να προστεθούν στην κινητή φάση ρυθμιστικοί παράγοντες που θα αλληλεπιδρούν με τις ιοντισμένες ομάδες σιλανόλης του υποστρώματος, προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τους αναλύτες από τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις. Τα καταλληλότερα ρυθμιστικά διαλύματα που προτείνονται από τους κατασκευαστές είναι το μυρμηκικό αμμώνιο και το οξικό αμμώνιο, διότι διαλύονται πλήρως σε οργανικούς διαλύτες και είναι πτητικά, γεγονός που ευνοεί το συνδυασμό της χρωματογραφίας με φασματομέτρο μαζών. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, ώστε να μην παρεμποδίζει τη διαδικασία της ανίχνευσης. Για τους περισσότερους αναλύτες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20 mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300mM²¹ ανάλογα με τη διαλυτότητα των αλάτων στην κινητή φάση. Οι αρνητικά ή θετικά φορτισμένες στατικές φάσεις τυπικά απαιτούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος από τις ουδέτερες ενώσεις ή τους αμφολύτες. Οι πολύ μεγάλες ποσότητες άλατος είναι ανεπιθύμητες, διότι αγγίζουν τα όρια τις διαλυτότητάς τους σε οργανικούς διαλύτες, αυξάνουν το πάχος της υδατικής στιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου συγκράτησης των αναλυτών και τέλος προκαλούν καταστολή του ιοντισμού (ion suppression) στη φασματομετρία μαζών.

Το μίγμα ακετονιτρίλιου με άλατα είναι ιδανικό σε αναλύσεις οργανικών αλάτων ισχυρών βάσεων, ενώ ο συνδυασμός ακετονιτρίλιου/ ρυθμιστικού διαλύματος (π.χ. μυρμηκικό οξύ/μυρμηκικό άλας) είναι κατάλληλος για ασθενή οξέα και βάσεις ή δείγματα αγνώστου σύνθεσης. Τα φωσφορικά οξέα και άλατα έχουν χρησιμοποιηθεί

επίσης, αλλά σε μικρότερη κλίμακα και απαιτούν προσοχή καθώς δεν είναι ιδιαίτερα διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες και προκαλούν κατακρήμνιση σε ορισμένα συστατικά του δείγματος. Συνήθως επιλέγονται όταν χρησιμοποιείται UV ανιχνευτής, καθώς αυξάνουν την ευαισθησία.^{22,23} Εναλλακτική επιλογή αποτελεί το υδροξείδιο του αμμωνίου όταν είναι επιθυμητό υψηλό pH ανάλυσης. Το τριφθοροξικό οξύ είναι προτιμότερο να αποφεύγεται γιατί παρεμποδίζει το μηχανισμό της HILIC και μειώνει το σήμα στο φασματομέτρο μαζών. Παρ'όλα αυτά έχει χρησιμοποιηθεί²⁴ κάποιες φορές σε κινητή φάση ως μίγμα με ακετονιτρίλιο και ανιχνευτή MS, όπως για παράδειγμα στην ανάλυση φλουκοναζόλης²⁵ και για τον προσδιορισμό ορνιθίνης.²⁶

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει άμεσα τη συγκράτηση των αναλυτών είναι η τιμή του pH της κινητής φάσης. Η ρύθμιση του συγκεκριμένου παράγοντα εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών, όπως ο βαθμός ιοντισμού και ο συντελεστής λιποφιλίας τους. Στις περιπτώσεις που ο αναλύτης είναι αδιάστατος σε μια ορισμένη τιμή pH της κινητής φάσης, η κατακράτησή 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 8, 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.

2.4 Είδη στατικών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC

Παρόλο που αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων στηλών που σχεδιάστηκαν ειδικά για τη HILIC, δεν υπάρχει σημαντική ποικιλία στη σύνθεση υποστρώματος των στατικών φάσεων.¹⁸ Οι επιλογές ωστόσο που προσφέρονται με τη HILIC όσον αφορά στις λειτουργικές ομάδες και στις ιδιότητες της στατικής φάσης πλεονεκτούν σε σύγκριση με τις υγροχρωματογραφίες κανονικής και αντίστροφης φάσης.

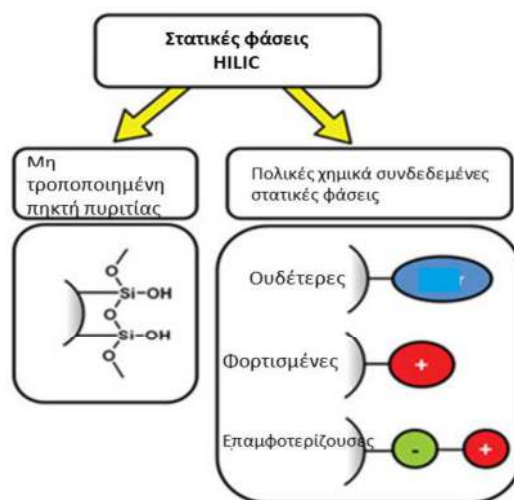
Οι στατικές φάσεις (Σχήμα 2.3) στη χρωματογραφία HILIC, ανάλογα με τα φορτία και τις λειτουργικές ομάδες που φέρουν, ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες⁸:

- 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), όπως η στήλη ZIC®-HILIC και η στήλη ZIC®-pHILIC, οι οποίες παρουσιάζουν με υψηλή εκλεκτικότητα, ασθενείς ιοντικές αλληλεπιδράσεις και είναι ανεξάρτητες από την τιμή του pH της κινητής φάσης.



Σχήμα 2.3: Κατηγορίες στατικών φάσεων στη χρωματογραφία HILIC.

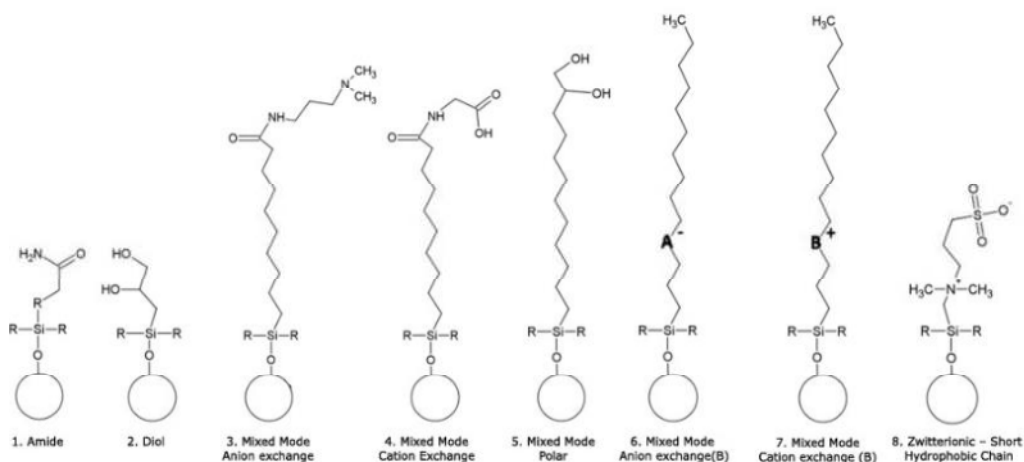
Σε αυτές τις κατηγορίες εντάσσονται και εκείνες που διαθέτουν και υποστρώματα υβριδικού τύπου, όπως η Xbridge HILIC-BEH, η ZIC-Philoc και η ZIC-cHILIC, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η αυξημένη ανθεκτικότητα τους σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH της κινητής φάσης.

2.4.1 Μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας

Ένα μεγάλο μέρος προσφάτως δημοσιευμένων εργασιών χρησιμοποιεί ακόμα τη συμβατική μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας όπως οι Betasil^{27,28,29}, Hypersil^{30,31} και Kromasil³². Η Atlantis HILIC^{33,34,35} είναι πηκτή πυριτίας που υποστηρίζεται πως φτιάχτηκε ειδικά για τη χρωματογραφία HILIC και έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις.

Η πηκτή πυριτίας αποτελεί συνηθισμένη επιλογή στη χρωματογραφία HILIC λόγω της ευρείας χρήσης της στη χρωματογραφία προσρόφησης και κατανομής. Το υπόστρωμα αποτελείται από ελεύθερες ομάδες σιλανόλης, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους αναλύτες και προκαλείται η συγκράτησή τους. Για

επαναλήψιμα αποτελέσματα είναι απαραίτητο να απενεργοποιείται το μεγαλύτερο μέρος των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης πριν την ανάλυση.



Σχήμα 2.4: Χημικές δομές ορισμένων στατικών φάσεων με βάση την πηκτή πυριτίας που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία HILIC. Amide: Αμιδίο, Diol: Διόλη, Mixed Mode Anion Exchange: Μικτής Δράσης Ανιονανταλλάκτη, Mixed Mode Cation Exchange: Μικτής Δράσης Κατιονανταλλάκτη, Mixed Mode Polar: Μικτής Δράσης Πολική Στατική Φάση, Zwitterionic - Short Hydrophobic Chain: Επαμφοτερίζουσα-Μικρή Υδρόφοβη Αλυσίδα.

Στη χρωματογραφία HILIC το νερό επιτελεί δύο ρόλους. Πρώτον απενεργοποιεί τις ομάδες σιλανόλης και δεύτερον δημιουργεί την υδατική στιβάδα στην επιφάνεια του υποστρώματος που είναι απαραίτητη για το μηχανισμό συγκράτησης. Η απενεργοποίηση των ομάδων σιλανόλης απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, διότι σε περίπτωση μη αποτελεσματικής απενεργοποίησης, παρατηρούνται μη αναστρέψιμα φαινόμενα προσρόφησης αναλυτών στην πηκτή πυριτίας. Παρόλο που το νερό καλύπτει πλήρως την επιφάνεια του υποστρώματος, ευνοεί τον ιοντισμό των ομάδων σιλανόλης με αποτέλεσμα την εμφάνιση ηλεκτροστατικής έλξης με θετικά φορτισμένα μόρια και ηλεκτροστατικής άπωσης με αρνητικά φορτισμένα μόρια. Για την αποφυγή τέτοιων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι υποχρεωτική η προσθήκη ηλεκτρολυτών στην κινητή φάση ιδιαίτερα κατά τους διαχωρισμούς βασικών αναλυτών.

Ένα πρόβλημα που μπορεί να εμφανιστεί με τη χρήση της μη τροποποιημένης πηκτής πυριτίας ως πληρωτικό υλικό είναι πως το σχήμα της κορυφής και η κατακράτηση των αναλυτών πιθανόν να διαφέρει σε στήλες από διαφορετικούς κατασκευαστές. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική καθαρότητα του πληρωτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή της στατικής φάσης

ή στα διαφορετικά στάδια παραγωγής. Έχει βρεθεί πάντως ότι το πρόβλημα της ανομοιομορφίας των κορυφών λύνεται με τη χρήση στηλών ειδικά σχεδιασμένων για χρωματογραφία HILIC.

2.4.2 Πηκτή πυριτίας με ομάδες προπυλαμίνης

Η πηκτή πυριτίας με ομάδες προπυλαμίνης ήταν η πρώτη στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε στο διαχωρισμό υδατανθράκων σε χρωματογραφία HILIC. Το πλεονέκτημά της σε σχέση με τη μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας είναι πως η ομάδα προπυλαμίνης μπορεί και περιστρέφεται με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο σχηματισμός διπλών κορυφών στην περίπτωση που υπάρχουν εναντιομερή. Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της στατικής φάσης αποτελεί η δραστικότητα της αμινομάδας που αρκετές φορές οδηγεί στη μη αναστρέψιμη προσρόφηση αναλυτών (π.χ. δημιουργία βάσης του Schiff με αλδεϋδομάδες μορίων και αλλαγή στην λειτουργικότητα της στήλης).

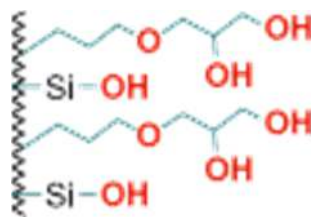
Στήλες πηκτής πυριτίας με ομάδες προπυλαμίνης χρειάζονται μεγαλύτερο χρόνο εξισορρόπησης με την προσθήκη αλάτων στην κινητή φάση (π.χ. οξικό αμμώνιο).³⁶ Έχει παρατηρηθεί επίσης μειωμένη σταθερότητα σε υδατικούς διαλύτες^{37,38}, που οδηγεί σε αποσύνθεση της προπυλαμινομάδας από το υπόστρωμα.³⁹ Για να βελτιωθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, κατασκευάζονται υποστρώματα από οργανικά πολυμερή, πάνω στα οποία συνδέονται οι προπυλαμινομάδες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όξινο και βασικό περιβάλλον.⁴⁰

Όπως και με τη μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας, τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται άμεσα από τον κατασκευαστή της στήλης γι' αυτό συνίσταται επιλογή στηλών, οι οποίες είναι εξ αρχής κατασκευασμένες ειδικά για χρωματογραφία HILIC. Στήλες εμπορικά διαθέσιμες με υπόστρωμα προπυλαμίνης είναι η Bondapak AX, YMC-Pack NH₂, Zorbax NH₂ και άλλες και χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση πεπτιδίων.^{36,41}

2.4.3 Πηκτή πυριτίας με ομάδες διόλης

Η στατική φάση πηκτής πυριτίας με ομάδες διόλης (Σχήμα 2.5), όσον αφορά την πολικότητα, εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τη μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας. Οι στατικές φάσεις με ομάδες διόλης ήταν από τις πρώτες στατικές φάσεις τροποποιημένης πηκτής πυριτίας που αναπτύχθηκαν και ένας από τους λόγους ήταν

για να αντιμετωπίσουν τα φαινόμενα προσρόφησης που παρουσιάζουν οι στατικές φάσεις μη τροποποιημένης πηκτής πυριτίας.



Σχήμα 2.5: Στατική φάση διόλης

Οι στήλες που περιέχουν ομάδες διόλης βρίσκουν εφαρμογή κυρίως στο διαχωρισμό πρωτεϊνών. Αποτελείται από πηκτή πυριτίας, στην οποία έχουν προστεθεί ομάδες υδροξυλίου.

Οι πιο συνηθισμένες χρωματογραφικές στήλες διαθέτουν τη λειτουργική ομάδα 2,3-διυδροξυπροπυλομάδα, όπου το υπόστρωμα δεν περιέχει ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν, παρά μόνο τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης. Στη συγκεκριμένη στατική φάση η συγκράτηση είναι ανεξάρτητη του pH της κινητής φάσης και δεν αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τους αναλύτες.

Λόγω της υψηλής πολικότητας των στατικών φάσεων με ομάδες διόλης καθώς και της ικανότητάς τους για δεσμούς υδρογόνου καθίστανται σχεδόν ιδανικές για εφαρμογές στη HILIC όπου οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τις ομάδες σιλανόλης δεν είναι επιθυμητές. Ωστόσο, λίγες εφαρμογές που αφορούν αυτές τις στατικές φάσεις έχουν δημοσιευθεί.

2.4.4 Πηκτή πυριτίας με ομάδα αμιδίου

Στατικές φάσεις πηκτής πυριτίας με ομάδα αμιδίου έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις όπως για το διαχωρισμό πεπτιδίων⁴² και σε μελέτες μεταβολομικής⁴³. Στήλες με αυτό το πληρωτικό υλικό βρίσκονται εμπορικά διαθέσιμες με το όνομα TSKgel Amide-80.

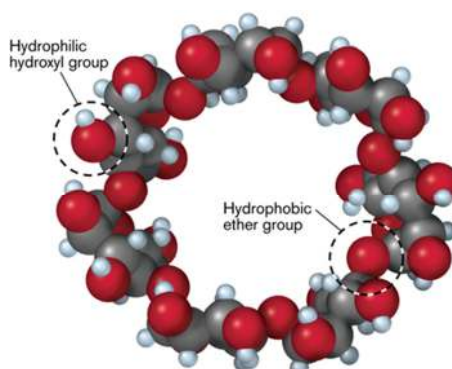
Λόγω της μικρής δραστηριότητας που εμφανίζει η αμιδική ομάδα σε σχέση με την αμίνη, φαινόμενα προσρόφησης των αναλυτών στο υπόστρωμα αποφεύγονται. Επίσης, οι στατικές φάσεις πηκτής πυριτίας με ομάδα αμιδίου είναι ανεξάρτητες από το pH.

2.4.5 Πηκτή πυριτίας με ομάδες προπιονιτριλίου

Η συγκεκριμένη στατική φάση χρησιμοποιείται ελάχιστα τόσο στη χρωματογραφία HILIC όσο στη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Αν και χαρακτηρίζεται από υψηλή πολικότητα, η αδυναμία σχηματισμού δεσμών υδρογόνου οδηγεί πολλές φορές σε μειωμένη συγκράτηση αναλυτών. Ένας ακόμα λόγος που καθιστά λιγότερο επιθυμητή αυτού του είδους τη στήλη, είναι η μικρή μηχανική σταθερότητα που παρουσιάζει.

2.4.6 Πηκτή πυριτίας με ομάδες κυκλοδεξτρίνης

Η χρωματογραφία HILIC είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος για το διαχωρισμό χειρόμορφων αναλυτών⁴⁴ γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια ώστε οι στατικές φάσεις πηκτής πυριτίας με ομάδες κυκλοδεξτρίνης να χρησιμοποιηθούν και στη χρωματογραφία HILIC με σκοπό να επιτευχθούν χειρόμορφοι διαχωρισμοί. Η δημιουργία τέτοιου υποστρώματος, επιτυγχάνεται με χρήση πηκτής πυριτίας, η οποία είναι χημικά συνδεδεμένη με ομάδες κυκλοδεξτρίνης.

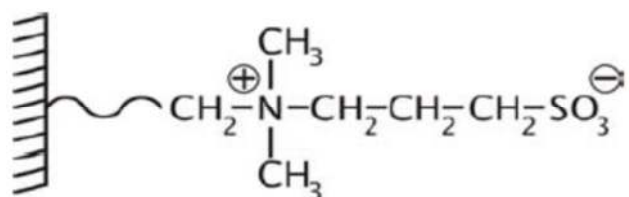


Σχήμα 2.6: Τρισδιάστατη δομή δακτυλίου α-κυκλοδεξτρίνης

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες από πέντε ή περισσότερα μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με 1,4 γλυκοσιδικό δεσμό και έχουν τη μορφή κόλουρου κώνου 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). Η κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβη και διευκολύνει το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού, ενώ τα υδροξύλια που βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα είναι πολικά, πράγμα που καθιστά τις στατικές φάσεις κυκλοδεξτρινών κατάλληλες για χρωματογραφία HILIC.

2.4.7 Πηκτή πυριτίας με ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης

Μια πρόσφατη προσθήκη στις στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία HILIC αποτελεί η πηκτή πυριτίας επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης. Οι συγκεκριμένες ομάδες συνδέονται στην πηκτή πυριτίας μέσω ενός ατόμου τεταρτοταγούς αμμωνίου, το οποίο συνδέεται μέσω μιας υδρόφοβης αλυσίδας με μια σουλφονική ομάδα. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.7, 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 με αποτέλεσμα η στήλη να αποτελείται από ουδέτερο φορτίο.

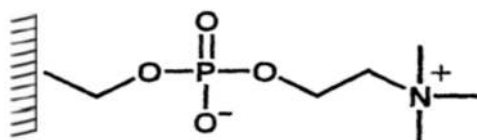


Σχήμα 2.7: Η λειτουργική ομάδα σουλφοβηταΐνης σε στήλες ZIC-HILIC και ZIC-pHILIC

Επιπλέον, οι σουλφοαλκυλοβηταΐνικοί αμφολύτες διατηρούν την ιδιότητά τους να συγκρατούν ισχυρά το νερό, δημιουργώντας το επιθυμητό για τη HILIC υδατικό στρώμα. Οι στήλες με το συγκεκριμένο υλικό είναι εμπορικά διαθέσιμες από τη Merck SeQuantTM με το όνομα ZIC-HILIC και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε εύρος τιμών pH 3 έως 8. Εκτός από τη ZIC-HILIC, η λειτουργική ομάδα της σουλφοαλκυλοβηταΐνης βρίσκει εφαρμογή σε στήλη όπου η πηκτή πυριτίας έχει αντικατασταθεί από πορώδη σωματίδια πολυμερούς και είναι εμπορικά διαθέσιμη με το όνομα ZIC-pHILIC. Λόγω του πολυμερικού υποστρώματος η στήλη είναι ανθεκτική σε εύρος τιμών pH είναι 2 έως 10. Οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου είναι σχεδιασμένες για διαχωρισμό όξινων, βασικών αλλά και ουδέτερων μορίων.

2.4.8 Πηκτή πυριτίας με ομάδες φωσφορυλο-χολίνης

Οι συγκεκριμένες στήλες διαθέτουν πληρωτικό υλικό πηκτής πυριτίας επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες φωσφορυλο-χολίνης (Σχήμα 2.8) και είναι εμπορικά διαθέσιμες με το όνομα ZIC-cHILIC. Όπως και προηγουμένως, η λειτουργική ομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορυλομάδα.

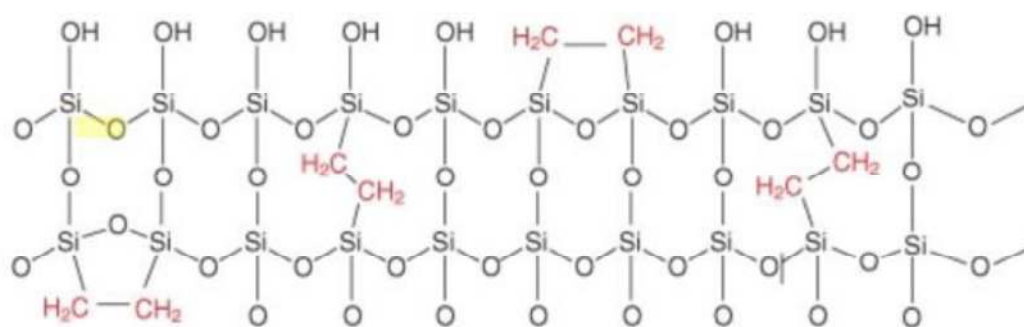


Σχήμα 2.8: Η λειτουργική ομάδα φωσφορυλο-χολίνης σε στήλες ZIC-chILIC

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

2.4.9 Πηκτή πυριτίας με με σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας (BEH)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στήλη της οποίας η στατική φάση αποτελείται από πηκτή πυριτίας με σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας (τεχνολογία BEH). Η συγκεκριμένη στήλη, που είναι εμπορικά διαθέσιμη με το όνομα XBridge HILIC, περιέχει υπόστρωμα από υβριδικά σωματίδια, τα οποία αποτελούνται από το μονομερές δις(τριαιθοξυσιλ)αιθάνιο το οποίο περιέχει δεσμό γνωστό ως "γέφυρα αιθυλενίου" (Σχήμα 2.9). Η γέφυρα αυτή έχει σαν αποτέλεσμα σε υψηλές τιμές pH να διασφαλίζεται αυξημένη ανθεκτικότητα ενάντια στην επιδιαλύτωση των πολυμερών σωματιδίων που βρίσκονται στο "σκελετό" της πηκτής πυριτίας, χωρίς ταυτόχρονα να μεταβάλλεται η δομή, η ακεραιότητα και η αποδοτικότητα των σωματιδίων της πηκτής πυριτίας.



Σχήμα 2.9: Πληρωτικό υλικό με υβριδικά σωματίδια γέφυρας αιθυλενίου.

Η τεχνολογία αυτή προσδίδει στις στήλες XBridge HILIC, πλεονεκτήματα όπως:

1. Αυξημένη ανθεκτικότητα σε υψηλές τιμές pH (1-9), εξαιτίας των επιφανειακών και εσωτερικών υβριδικών ομάδων που προσθέτουν υδροφοβικό χαρακτήρα στο πληρωτικό υλικό.

2. Αυξημένη χημική και μηχανική σταθερότητα του υποστρώματος, λόγω της διασυνδεσιμότητας που προσδίδουν οι εσωτερικές γέφυρες αιθυλενίου.
3. Μείωση της ουράς των χρωματογραφικών κορυφών των βασικών μορίων, εξαιτίας της μείωσης της συγκέντρωσης των ομάδων σιλανόλης στην επιφάνεια του υποστρώματος, λόγω των επιφανειακών υβριδικών ομάδων.

Στην τεχνική HILIC λαμβάνουν χώρα πολύπλοκοι μηχανισμοί κατανομής, προσρόφησης και δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις με το επιφανειακό πληρωτικό υλικό. Εξαιτίας των ενσωματωμένων ομάδων "γέφυρας αιθυλενίου" στην πηκτή πυριτίας, σχεδόν το 1/3 των επιφανειακών σιλανολών αντικαθίσταται και επομένως μειώνεται το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης με αυτές, που είναι υπεύθυνο για την μειωμένη συγκράτηση των αναλυτών. Επιπλέον αυτή η ομάδα σχηματίζει φυσιολογικά μια πιο αλκαλική επιφάνεια, συγκριτικά με την παραδοσιακή πηκτή πυριτίας που τείνει σε πιο όξινη επιφάνεια υποστρώματος, με συνέπεια την παροχή υποστρώματος με διαφορετικό pK_a , και ως εκ τούτου το φέρον φορτίο μπορεί να επηρεάσει την συγκράτηση.

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 συνδιασμό 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. Η αυξημένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία που εμφανίζει αυτή η κατηγορία στατικής φάσης στις στήλες HILIC, προσδίδουν βελτίωση στο σχήμα των κορυφών, καλύτερη ανάκτηση και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής συγκριτικά με τις στήλες HILIC με βάση την πηκτή πυριτίας.⁴⁵

2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρωματογραφίας HILIC

Η χρωματογραφία HILIC εφαρμόζεται σε μεγάλο βαθμό σήμερα για την ανάλυση πολικών φαρμάκων καθώς και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υλικά. Τέτοιες πολικές ενώσεις συγκρατώνται ανεπιτυχώς σε χρωματογραφία αντιστρόφου φάσας (RP) με αποτέλεσμα να εμφανίζονται στο νεκρό όγκο μαζί και με διάφορα συστατικά του μητρικού υλικού. Για να αυξηθεί ο χρόνος κατακράτησης πολικών ενώσεων

μπορεί να χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου η κινητή φάση θα βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία ως προς το οργανικό μέρος, χρωματογραφία κανονικής φάσης, ζεύγους ιόντων ή χρωματογραφία HILIC.

Όταν χρησιμοποιείται ανιχνευτής UV ή DAD τότε μπορεί να αξιοποιηθεί η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Όταν όμως χρησιμοποιείται ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS), ειδικότερα σε βιοαναλύσεις, τότε η κινητή φάση αυτής της χρωματογραφίας κρίνεται ακατάλληλη για το σύστημα LC-MS. Η χρωματογραφία κανονικής φάσης θα ήταν καλή επιλογή, όμως, λόγω του ότι χρησιμοποιούνται τοξικοί διαλύτες, αποφεύγεται. Μία άλλη επιλογή θα αποτελούσε η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων εάν δεν απαιτούνταν μεγάλος χρόνος εξισορρόπησης της στήλης.

Η χρωματογραφία HILIC πλεονεκτεί λόγω της ικανότητάς της να συγκρατεί πολικές ενώσεις χρησιμοποιώντας κινητή φάση με μεγάλη αναλογία ως προς το οργανικό μέρος. Τέτοιες κινητές φάσεις οδηγούν σε καλύτερες συνθήκες ψεκασμού στο σύστημα LC-MS, λίγες επιδράσεις μητρικού υλικού και επομένως καλύτερο σήμα και μεγαλύτερη εκλεκτικότητα.⁴⁶

Ένα μειονέκτημα της χρωματογραφίας HILIC είναι πως ορισμένες ενώσεις, όπως οι ολιγοσακχαρίτες ή οι υδρόφοβες ενώσεις, παραμένουν αδιάλυτες στην κινητή φάση. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις, η HILIC μπορεί να αντιμετωπίσει προβλήματα ως προς την ανάλυση πολικών και λιγότερο πολικών ενώσεων ταυτόχρονα. Για την επίτευξη συγκράτησης των πολικών ενώσεων θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κινητή φάση με μεγαλύτερη αναλογία ως προς το οργανικό μέρος ενώ για τις πιο άπολες ενώσεις δε χρειάζεται μεγάλη αναλογία ως προς το οργανικό μέρος. Με αυτόν τον τρόπο, για τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ αυτών των ενώσεων θα πρέπει να γίνει ένας συμβιβασμός μεταξύ των καλύτερων κινητών φάσεων ή να χρησιμοποιηθεί βαθμιδωτή έκλυση.⁴⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

3.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II

3.1.1 Εισαγωγή

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 είναι μια χρόνια διαταραχή του μεταβολισμού, που χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης (σάκχαρο) στο αίμα. Συνηθίζεται να λέγεται μη-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης διότι χαρακτηρίζεται από σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης σε αντίθεση με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 που χαρακτηρίζεται από απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης λόγω της αυτοάνοσης καταστροφής των β κυττάρων του παγκρέατος.

Φυσιολογικά, σε κατάσταση νηστείας (νηστικός), η γλυκόζη στο αίμα παραμένει κάτω από τα 100 mg dl^{-1} , ενώ μετά το φαγητό δεν ξεπερνά τα 140 mg dl^{-1} . Όταν ο μεταβολισμός του σακχάρου διαταραχθεί, οι τιμές αυτές αυξάνουν σταδιακά, μέχρι που το σάκχαρο νηστείας ξεπερνά τα 125 mg dl^{-1} ή το μεταγευματικό σάκχαρο ξεπερνά τα 200 mg dl^{-1} . Σε αυτή την περίπτωση ο ασθενής πάσχει από Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 και χρειάζεται άμεσα θεραπεία.

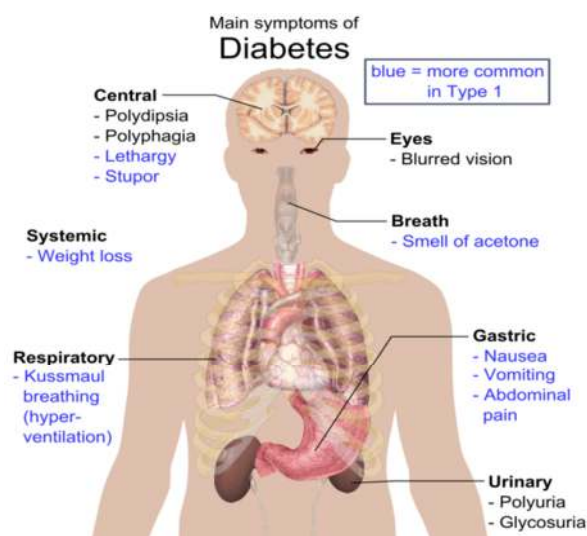
Η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 οφείλεται στο συνδυασμό γενετικών παραγόντων και τρόπου ζωής. Ενώ ορισμένοι παράγοντες, όπως η διατροφή και η παχυσαρκία είναι θέμα ελέγχου από το ίδιο το άτομο, υπάρχουν άλλοι, όπως το πέρασμα της ηλικίας, το γυναικείο φύλο και γενετικοί παράγοντες που δεν είναι δυνατόν να ελεγχθούν. Η έλλειψη ύπνου έχει συνδεθεί επίσης με το διαβήτη τύπου 2 λόγω της επίδρασής της στο μεταβολισμό. Η διατροφική κατάσταση μιας μητέρας κατά την περίοδο ανάπτυξης του εμβρύου ενδέχεται να παίζει επίσης ρόλο. Ο μηχανισμός που συμβάλλει είναι η τροποποίηση της μεθυλίωσης του DNA.

Η εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2 αυξάνεται σημαντικά τα τελευταία χρόνια σε παιδικές ηλικίες. Παιδιά και ενήλικες που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη εμφανίζουν τύπου 2 σε ποσοστό 50% και 90% αντίστοιχα. Η παθογένεση είναι πολύπλοκη και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως μέχρι και σήμερα. Η υπεργλυκαιμία αναπτύσσεται όταν η ινσουλίνη που εκκρίνεται δεν είναι ικανή να αντισταθμίσει την αντίσταση σε αυτή. Παρόλο που η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι χαρακτηριστικό των ασθενών με διαβήτη τύπου 2, υπάρχουν επίσης δεδομένα για δυσλειτουργία του β-κυττάρου και μειωμένη έκκριση ινσουλίνης,

συμπεριλαμβανομένης της εξασθενημένης έκκρισης ινσουλίνης πρώτης φάσης σε συνδυασμό με ενδοφλέβια έκχυση γλυκόζης. Η υπεργλυκαιμία υποβοηθά στην εξασθένηση της έκκρισης ινσουλίνης, διότι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης προκαλούν δυσλειτουργία των β-κυττάρων.^{48,49}

3.1.2 Συμπτώματα και ενδείξεις

Τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 είναι η πολυουρία (συχνή ούρηση), η πολυδιψία (αυξημένη δίψα), η πολυφαγία (αυξημένο αίσθημα πείνας) και η απώλεια βάρους. Άλλα κοινά συμπτώματα που διαπιστώνονται κατά τη διάγνωση συμπεριλαμβάνουν ιστορικό θολής όρασης, φαγούρας, περιφερικής νευροπάθειας, επαναλαμβανόμενα επεισόδια μολύνσεων του κόλπου και κόπωση. Πολλά άτομα, ωστόσο, δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα τα πρώτα χρόνια και η διάγνωση μπορεί να γίνει σε κάποια εξέταση ρουτίνας. Στα άτομα με διαβήτη τύπου 2 μπορεί σπανίως να εμφανιστεί υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα (μια κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής παρουσιάζει πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα παράλληλα με μείωση του επιπέδου συνείδησης και χαμηλή αρτηριακή πίεση).



Σχήμα 3.1: Τα κυριότερα συμπτώματα σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη.

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενη ή μόνιμη υπεργλυκαιμία και η διάγνωσή του γίνεται με την εμφάνιση οποιουδήποτε από τα ακόλουθα:

- Γλυκόζη νηστείας στο πλάσμα ίση ή μεγαλύτερη από $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (126 mg dl^{-1})

- Γλυκόζη πλάσματος ίση ή μεγαλύτερη από $11,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (200 mg dl^{-1}) δύο ώρες μετά από τη φόρτιση με 75 g γλυκόζης από του στόματος, όπως σε μια δοκιμασία ανοχής γλυκόζης
- Συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και τυχαία γλυκόζη πλάσματος ίση ή μεγαλύτερη από $11,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (200 mg dl^{-1})
- Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (αιμοσφαιρίνη HbA1c) ίση ή μεγαλύτερη από $6,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (το κριτήριο αυτό προτάθηκε από την Αμερικανική Διαβητολογική Ένωση το 2010, παρά το γεγονός ότι δεν έχει ακόμη υιοθετηθεί από τον ΠΟΥ).

3.1.3 Διάγνωση

Η διάγνωση του διαβήτη τύπου 2 πραγματοποιείται σε πληθυσμούς που εμφανίζουν τα συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας ή υπάρχει κίνδυνος της εμφάνισης της ασθένειας λόγω κληρονομικότητας.

Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη είναι μια ειδική εξέταση αίματος, που μετρά το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης του αίματος, στην οποία έχει προσκολληθεί γλυκόζη (το σάκχαρο). Αυτή η μέτρηση δείχνει σε τί βαθμό υπήρχε αυξημένο σάκχαρο στο αίμα τους τελευταίους 3 μήνες. Φυσιολογικά, μόνο ένα ποσοστό μικρότερο του 5,6% της αιμοσφαιρίνης εμφανίζεται γλυκοζυλιωμένη. Όταν υπάρχει προδιάθεση για σάκχαρο (προδιαβήτης), η τιμή αυξάνει μεταξύ του 5,7-6,4%. Όταν ένας ασθενής εμφανίζει Σακχαρώδη Διαβήτη η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη συνήθως ξεπερνά το 6,4%. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη αποτελεί έγκυρη εξέταση για τη διάγνωση του Σακχαρώδους Διαβήτη σε πολλές χώρες, αλλά η μέτρησή της δεν είναι πάντα αξιόπιστη στην πατρίδα μας, λόγω έλλειψης στάνταρ μέτρησης. Επίσης συχνά επηρεάζεται από παθήσεις όπως η μεσογειακή αναιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η ανεπάρκεια της βιταμίνης B12, η ανεπάρκεια του σιδήρου, η νεφρική νόσος και άλλες ασθένειες. Αν κάποιος φέρει παθολογική μέτρηση σακχάρου νηστείας ή παθολογική μέτρηση σακχάρου κατά την καμπύλη του σακχάρου, αλλά έχει φυσιολογική γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, λαμβάνονται υπόψιν περισσότερο οι μετρήσεις του σακχάρου.

Ο προληπτικός έλεγχος για διαβήτη τύπου 2 θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ανθρώπους που διαθέτουν επικίνδυνα χαρακτηριστικά για την εμφάνιση της ασθένειας όπως:

- Ηλικίες άνω των 45 ετών

- Παχυσαρκία - Ανθυγιεινός τρόπος ζωής
- Οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη
- Ιστορικό διαταραχών γλυκόζης
- Γέννηση μωρού με βάρος άνω των 4,1 κιλών
- Ιστορικό υπέρτασης ή δυσλιπιδαιμίας

Ο κίνδυνος ανάπτυξης αντίστασης στην ινσουλίνη είναι μεγάλος στους υπέρβαρους ανθρώπους λόγω υψηλού επιπέδου τριγλυκεριδίων ($\text{TGs} \geq 130 \text{ mg/dL}$), ρυθμού $\text{TGs/HDL} \geq 3,0$ και ινσουλίνης $\geq 108 \text{ pmol/L}$ ⁵⁰.

3.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι τρόποι αντιμετώπισης του διαβήτη τύπου 2 περιλαμβάνουν αλλαγές στον τρόπο ζωής (υγιεινή διατροφή και γυμναστική), χορήγηση αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων, χορήγηση ινσουλίνης ή και των δύο. Ο στόχος της θεραπείας είναι ο έλεγχος της υπεργλυκαιμίας, ώστε να μειωθούν τα συμπτώματα, ο κίνδυνος εμφάνισης επιπλοκών καθώς και τα υπεργλυκαιμικά επεισόδια. Συγκεκριμένα, η θεραπεία της νόσου πραγματοποιείται με τους εξής τρόπους:

- Υγιεινοδιαιτητικές παρεμβάσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τις αλλαγές στη διατροφή και την εντατικοποίηση της φυσικής δραστηριότητας. Η διατροφή των ασθενών πρέπει να περιλαμβάνει μικρή ποσότητα θερμίδων, συχνά γεύματα, αύξηση πρόσληψης ινών και περιορισμένη κατανάλωση επεξεργασμένων υδατανθράκων και κορεσμένων λιπών. Η σωματική άσκηση αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες αντιμετώπισης της ασθένειας. Η αερόβια και η μυϊκή άσκηση βοηθούν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης καθώς και στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Εάν οι ασθενείς εμφανίσουν υπεργλυκαιμικά επεισόδια κατά τη διάρκεια της γυμναστικής, συνίσταται να μειώσουν τη δόση της ινσουλίνης πριν την έναρξη της σωματικής άσκησης, ώστε να προκληθεί ελάχιστη αύξηση της γλυκόζης⁵¹.

Χωρίς αυτές τις αλλαγές, σχεδόν καμία θεραπευτική παρέμβαση δεν μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιτυχής. Αυτές απαιτούν αφοσίωση και συγκέντρωση από τους ασθενείς προκειμένου να επιτύχουν τα αποτελέσματα που μπορούν να φέρουν.

- Φαρμακευτική αγωγή. Διατίθενται αρκετές κατηγορίες φαρμακευτικών αγωγών κατά του διαβήτη. Τα αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα με χορήγηση από του

στόματος αποτελούν το βασικό τρόπο αντιμετώπισης του διαβήτη τύπου 2, ενώ πολλές φορές χορηγείται επιπλέον ινσουλίνη, στην περίπτωση όπου ο συνδυασμός δύο αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων δεν δίνει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα φάρμακα αυτά ενισχύσουν την έκκριση της ινσουλίνης στο πάγκρεας και ευαισθητοποιούν τους περιφερειακούς ιστούς στην ινσουλίνη.

Οι δραστικές ουσίες με αντιυπεργλυκαιμική δράση ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- ❖ Σουλφονουλουρίες (Sulfonylureas)
- ❖ Ουσίες σύντομης δράσης που αυξάνουν την έκκριση ινσουλίνης
- ❖ Διγουανίδια (Biguanides)
- ❖ Θειαζολιδινεδιόνες (Thiazolidinediones)
- ❖ Αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης
- ❖ Αναστολείς της διπεπτιδο-πεπτιδάσης 4

Τα διγουανίδια χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 μειώνοντας τη γλυκόζη στο πλάσμα ελαττώνοντας την παραγωγή της στο ήπαρ (γλυκονεογένεση). Θεωρούνται ενεργοποιητές της περιφερειακής ινσουλίνης, προκαλούν αύξηση της ευαισθησίας των β-κυττάρων στη γλυκόζη και μειώνουν τα επίπεδα του αναστολέα 1 του πλασμινογόνου ενεργοποιητή, συνεπώς εμφανίζουν αντιθρομβωτική δράση. Το μοναδικό διγουανίδιο που κυκλοφορεί στην αμερικάνικη αγορά είναι η μετφορμίνη, η οποία παρουσιάζει την ίδια δράση με τις σουλφονουλουρίες στη μείωση της γλυκόζης, ενώ προκαλεί σπάνια υπογλυκαιμίες και μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια συνδυαστικά με άλλες φαρμακευτικές ουσίες και ινσουλίνη. Επιπροσθέτως, η μετφορμίνη ελαττώνει την όρεξη και οδηγεί σε απώλεια σωματικού βάρους. Παρόλα αυτά, εμφανίζονται συγκεκριμένες αντενδείξεις όπως διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος (δυσπεψία, διάρροια) και διαταραχές στην απορρόφηση της βιταμίνης B₁₂, προκαλώντας αναιμία. Υπάρχει έντονη συζήτηση γύρω από τη συνεισφορά της μετφορμίνης στη θανάσιμη ασθένεια της λακτικής οξέωσης και για το λόγο αυτό, η ουσία δεν συνίσταται σε ασθενείς με κίνδυνο ανάπτυξης της academia (συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που πάσχουν από νεφρική ανεπάρκεια, ανεπάρκεια καρδιάς, αλκοολισμό, προβλήματα στο μεταβολισμό και αφυδάτωση).

Συχνά η χορήγηση αποκλειστικά της μετφορμίνης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 δεν είναι επαρκής και χορηγούνται επιπλέον φάρμακα.

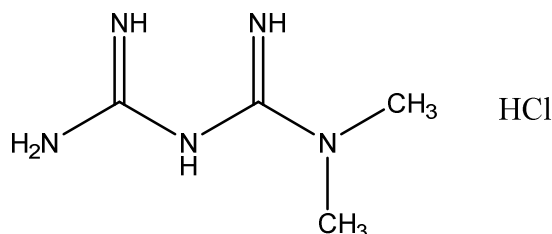
- Ινσουλίνες. Τα σωτήρια αυτά φάρμακα έχουν αρχίσει να τίθενται στο περιθώριο όσον αφορά τα αρχικά στάδια της νόσου, μιας και η πληθώρα άλλων φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες και καλύτερα αποτελέσματα στις κλινικές μελέτες και στην καθημέρα ιατρική πράξη άλλαξαν τη στρατηγική στη θεραπεία της νόσου. Όταν και αν αποτύχουν όμως οι υπόλοιπες επιλογές, τότε οι ινσουλίνες έχουν τη δυνατότητα να υποκαταστήσουν το πάγκρεας και να ρυθμίσουν ακόμα και τον πιο δύσκολο ασθενή.
- Χειρουργεία παχυσαρκίας. Όσο και αν αυτό ακούγεται τρομακτικό ή σκληρό, έχει επιβεβαιωθεί με μεγάλες και εντυπωσιακές μελέτες, ότι τα χειρουργεία παχυσαρκίας έχουν σπουδαία αποτελέσματα στη ρύθμιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2, αν βέβαια συνυπάρχει παχυσαρκία. Πολλοί ασθενείς παραμένουν χωρίς φάρμακα για χρόνια, ενώ στην χειρότερη περίπτωση ελαττώνεται σημαντικά ο αριθμός των χαπιών και οι ποσότητες της χορηγούμενης ινσουλίνης. Επίσης, αν και τα χειρουργεία αυτά έχουν σοβαρές επιπλοκές, τελικά βελτιώνουν το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών μακροχρόνια.
- Η πρόληψη και θεραπεία των επιπλοκών της νόσου. Ακριβώς επειδή ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, που επηρεάζει όλα σχεδόν τα όργανα του σώματος, ο τακτικός έλεγχος της καρδιάς, της αρτηριακής πίεσης, της χοληστερίνης, της νεφρικής και ηπατικής λειτουργίας, των οφθαλμών, των νευρών και αγγείων του σώματος, των οστών, του θυρεοειδούς, της σεξουαλικής λειτουργίας κλπ., απαιτούν μια συνολική – κεντρική αντιμετώπιση της νόσου, με τη χρήση ειδικής γνώσης, αλλά και ικανοτήτων εκ μέρους του ιατρού.

3.2 Μετφορμίνη

3.2.1 Εισαγωγή

Η μετφορμίνη είναι ένα από του στόματος λαμβανόμενο αντιδιαβητικό φάρμακο το οποίο χαμηλώνει και τη βασική και τη μεταγευματική γλυκόζη του πλάσματος. Δεν διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης και κατά συνέπεια δεν παράγει υπογλυκαιμία.⁵² Ανήκει στα διγουανίδια και αποτελεί έναν από τους κυριότερους αντιδιαβητικούς

παράγοντες καθώς χορηγείται σε περισσότερα από 120 εκατομμύρια άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) παγκοσμίως. Είναι εμπορικά διαθέσιμη υπό τη μορφή της υδροχλωρικής μετφορμίνης (Metformin Hydrochloride) με το όνομα Glucophage. Η χημική δομή της φαίνεται στο Σχήμα 3.2 και δεν εμφανίζει όμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες με τις υπόλοιπες κατηγορίες αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων.



Σχήμα 3.2: Χημική δομή υδροχλωρικής μετφορμίνης.

Η μετφορμίνη έχει εμπειρικό τύπο $C_4H_{11}N_5HCl$ και είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη, διαλύεται στο νερό, ενώ δεν διαλύεται στην ακετόνη και το χλωροφόρμιο.

3.2.2 Μηχανισμός δράσης

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης εξακολουθεί να είναι αντικείμενο έρευνας. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, η μετφορμίνη δρα αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της AMP-κινάσης. Η ενεργοποίησή της από τη μετφορμίνη, κυρίως στο ήπαρ, προκαλεί φωσφορυλίωση και επακόλουθη κυτταροπλασματική καθήλωση ενός μεταγραφικού συνδιεγέρτη, του TORC2. Αυτό οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης, φωσφοενολπυρουβική καρβοξυκινάση (PEPCK) και γλυκόζο-6-φωσφατάση (G-6-P). Έτσι η καταστολή της γλυκονεογένεσης φαίνεται να αποτελεί την κύρια αιτία της υπογλυκαιμικής δράσης μετφορμίνης. Η ηπατική ενεργοποίηση του συστήματος της AMP-κινάσης μειώνει, επίσης, την ηπατική σύνθεση των λιπαρών οξέων και των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας, ενώ παράλληλα αυξάνεται και η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Έτσι, παρουσιάζεται μείωση της ηπατικής στεάτωσης και αύξηση της ηπατικής ευαισθησίας στην ινσουλίνη.⁵³

Είναι επίσης γνωστό, ότι η ενεργοποίηση της AMP-κινάσης οδηγεί σε ταχεία αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, ιδιότητα που εξηγεί την αντικαρκινική δράση της μετφορμίνης.⁵⁴ In vitro πειράματα έχουν επιβεβαιώσει τη φαρμακευτική

επαγωγή της AMP-κινάσης από τη μετφορμίνη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού και του παγκρέατος.^{55,56} Η ενεργοποιημένη AMP-κινάσης φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TSC2, ένα μόριο που αναστέλλει την ενεργοποίηση του mTOR (mammalian target of rapamycin), ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα το οποίο ενεργοποιείται από αρκετά ογκογονίδια. Η επαγωγή της AMP-κινάσης αναστέλλει τη δράση του mTOR, παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πολλά δείγματα βιοψιών καρκίνου του μαστού εμφανίζουν αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση λόγω υπερδιέγερσης του mTOR, κάτι που έχει συνδυαστεί με κακοήγη εξαλλαγή, δυσμενή εξέλιξη και αντίσταση στη χημειοθεραπεία.⁵⁷

Πέραν της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης, η διέγερση της AMPK φαίνεται να αναστέλλει άμεσα το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Για να περάσει ένα κύτταρο στις φάσεις S, G2 και M (κυτταρική διαίρεση) απαιτείται η ενεργοποίηση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) και των κυκλινών, οι οποίες όμως βρίσκονται υπό τον ανασταλτικό έλεγχο των κινασών (CDK inhibitors) p21 και p27. Με τη σειρά τους τα δύο τελευταία μόρια τελούν υπό τον έλεγχο της πιο γνωστής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης, της p53. Η AMPK φωσφορυλιώνει τη Ser-15 της p53, γεγονός που αυξάνει τη σταθερότητά της και οδηγεί έτσι σε καταστολή της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης.⁵⁸

3.2.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα

3.2.3.1 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα

Μετά από χορήγηση δόσης μετφορμίνης από το στόμα, ο μέγιστος χρόνος απορρόφησης είναι 2,5 ώρες και η απορρόφηση είναι κορεστική και ατελής. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της μετφορμίνης ύστερα από χορήγηση δισκίου μετφορμίνης των 500 mg ή των 850 mg είναι περίπου 50-60 % στα υγιή άτομα. Ύστερα από χορήγηση δόσης από το στόμα, το μη απορροφημένο κλάσμα που ανακτάται στα κόπρανα είναι 20-30 %.

Θεωρείται ότι η φαρμακοκινητική της απορρόφησης μετφορμίνης είναι μη γραμμική. Στις συνηθισμένες δόσεις μετφορμίνης και τα συνηθισμένα προγράμματα δοσολογίας, οι σταθερές συγκεντρώσεις δυναμικής ισορροπίας στο πλάσμα επιτυγχάνονται εντός 24 έως 48 ωρών και γενικά είναι μικρότερες από 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Σε ελεγχόμενες κλινικές μελέτες, τα μέγιστα επίπεδα μετφορμίνης στο πλάσμα (C_{max}) δεν υπερέβησαν τα 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ακόμα και σε μέγιστες δόσεις.

Η τροφή μειώνει το βαθμό και καθυστερεί ελαφρώς την απορρόφηση μετφορμίνης. Ύστερα από χορήγηση δόσης 850 mg, παρατηρήθηκε μείωση κατά 40 % της μέγιστης τιμής συγκέντρωσης στο πλάσμα, μείωση κατά 25 % στην AUC (περιοχή κάτω από την καμπύλη) και παράταση χρόνου 35 λεπτών για τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης στο πλάσμα. Η κλινική σχέση αυτών των μειώσεων είναι άγνωστη.

3.2.3.2 Κατανομή

Η κατανομή της μετφορμίνης σε περιπτώσεις μονής διά στόματος χορήγησης, δόσης 850 mg, είναι 654 ± 358 λίτρα. Η δέσμευση της πρωτεΐνης στο πλάσμα είναι αμελητέα. Η μετφορμίνη καταμερίζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η μέγιστη τιμή στο αίμα είναι μικρότερη από τη μέγιστη τιμή στο πλάσμα και εμφανίζεται περίπου την ίδια στιγμή. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια πιθανότατα αποτελούν δευτερεύοντα χώρο διανομής.

3.2.3.3 Μεταβολισμός και αποβολή

Η μετφορμίνη απεκκρίνεται αναλλοίωτη στα ούρα. Κανένας μεταβολίτης δεν έχει αναγνωριστεί στον άνθρωπο.

Ύστερα από χορήγηση δόσης από το στόμα, ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα είναι περίπου 6,5 ώρες. Σε περίπτωση προσβολής της νεφρικής λειτουργίας, η νεφρική κάθαρση μειώνεται αναλογικά με την κάθαρση της κρεατινίνης και έτσι ο χρόνος ημιζωής παρατείνεται, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα μετφορμίνης στο πλάσμα.

3.2.4 Δοσολογία

Η υδροχλωρική μετφορμίνη χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 και στόχος είναι μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.

Η συνηθισμένη αρχική δοσολογία είναι 500 mg δύο φορές την ημέρα ή 850 mg μία φορά την ημέρα κατά τη διάρκεια ή στο τέλος του γεύματος. Ύστερα από 10 έως 15 ημέρες, η δοσολογία θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με τις μετρήσεις της γλυκόζης του αίματος. Μια αργή αύξηση της δόσης μπορεί να βελτιώσει τη γαστροεντερική ανεκτικότητα. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση μετφορμίνης είναι 3 g την ημέρα.

Συνδυασμός με ινσουλίνη. Η μετφορμίνη και η ινσουλίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμένη θεραπεία για να επιτύχουν καλύτερο έλεγχο της γλυκόζης του αίματος. Η μετφορμίνη δίδεται στη συνηθισμένη αρχική δόση του

ενός δισκίου των 500 mg 2-3 φορές την ημέρα, ενώ η δόση ινσουλίνης προσαρμόζεται ανάλογα με τις μετρήσεις της γλυκόζης του αίματος.

Ηλικιωμένα άτομα: Λόγω του ενδεχόμενου μείωσης της νεφρικής λειτουργίας σε ηλικιωμένους ασθενείς, η δόση μετφορμίνης πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με τη νεφρική λειτουργία. Απαιτείται τακτική εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας.

Παιδιά: Σε ηλικίες από 10 έως 16 ετών, η αρχική δόση είναι 500 mg μετφορμίνης δύο φορές την ημέρα μαζί με γεύμα, ενώ η μέγιστη ημερήσια δόση φτάνει τα 2000 mg.

Δεν έχει παρατηρηθεί υπογλυκαιμία με δόσεις μετφορμίνης μέχρι 85 g, αν και έχει συμβεί γαλακτική οξέωση υπό τέτοιες συνθήκες. Η υπέρβαση της δοσολογίας ή οι συνακόλουθοι κίνδυνοι της μετφορμίνης είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε γαλακτική οξέωση. Η γαλακτική οξέωση αποτελεί επείγον ιατρικό περιστατικό και πρέπει να αντιμετωπίζεται στο νοσοκομείο. Η αποτελεσματικότερη μέθοδος για την αφαίρεση του γαλακτικού οξέος και της μετφορμίνης είναι η αιμοκάθαρση.

3.2.5 Αντενδείξεις

- Υπερευαίσθησία στην υδροχλωρική μετφορμίνη ή σε οιοδήποτε από τα έκδοχα.
- Διαβητική κετοξέωση, διαβητικό προκώμα.
- Νεφρική ανεπάρκεια ή νεφρική δυσλειτουργία (π.χ. επίπεδα κρεατινίνης ορού > 135 $\mu\text{mol L}^{-1}$ στους άνδρες και > 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ στις γυναίκες).
- Οξείες καταστάσεις με το ενδεχόμενο αλλοίωσης της νεφρικής λειτουργίας όπως:
 - αφυδάτωση,
 - δριμεία λοίμωξη,
 - καταπληξία,
 - Ενδομυϊκή χορήγηση ιωδιούχων σκιαγραφικών μέσων
- Οξεία ή χρόνια ασθένεια η οποία μπορεί να προκαλέσει υποξία των ιστών όπως:
 - καρδιακή ή αναπνευστική ανεπάρκεια,
 - πρόσφατο έμφραγμα του μυοκαρδίου,
 - καταπληξία
- Ηπατική ανεπάρκεια, οξεία δηλητηρίαση με οινόπνευμα, αλκοολισμός
- Θηλασμός.

3.2.6 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης

Οινόπνευμα

Αυξημένος κίνδυνος γαλακτικής οξέωσης κατά την οξεία δηλητηρίαση με οινόπνευμα, ιδίως σε περίπτωση :

- νηστείας ή υποσιτισμού,
- ηπατικής ανεπάρκειας.

Αποφεύγετε τη χρήση οινόπνευματος και φαρμάκων που περιέχουν οινόπνευμα.

Ιωδιούχα σκιαγραφικά μέσα

Η ενδοαγγειακή χορήγηση ιωδιούχων σκιαγραφικών μέσων μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια, η οποία οδηγεί σε συσσώρευση μετφορμίνης και κίνδυνο γαλακτικής οξέωσης.

Η μετφορμίνη θα πρέπει να διακόπτεται πριν ή κατά τη διάρκεια της εξέτασης και να επανεισάγεται μόνο 48 ώρες μετά την εξέταση, και μόνο αφού επανεκτιμηθεί η νεφρική λειτουργία και βρεθεί φυσιολογική.

Συνδυασμοί που απαιτούν προφυλάξεις χρήσης

Τα γλυκοκορτικοειδή (συστηματικοί και τοπικοί οδοί), οι βήτα 2 αναστολείς και τα διουρητικά έχουν ενδογενή υπεργλυκαιμική δραστηριότητα. Ο ασθενής θα πρέπει να ενημερωθεί και να πραγματοποιεί πιο συχνά έλεγχο της γλυκόζης του αίματος, ιδιαίτερα στην αρχή της θεραπείας. Αν χρειαστεί, θα πρέπει να προσαρμοστεί η δοσολογία του αντιδιαβητικού φαρμάκου κατά τη θεραπεία με άλλο φάρμακο και κατά τη διακοπή του.

Οι αναστολείς ACE (MEA) μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος. Αν χρειαστεί, θα πρέπει να προσαρμοστεί η δοσολογία του αντιδιαβητικού φαρμάκου κατά τη θεραπεία με άλλο φάρμακο και κατά τη διακοπή του.

3.2.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες

- Τα γαστροεντερικά συμπτώματα όπως ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακός πόνος και απώλεια της όρεξης (>10 %) είναι πολύ συνηθισμένα: τις περισσότερες φορές συμβαίνουν κατά την εισαγωγή της θεραπείας και εξαφανίζονται αυτόματα στις περισσότερες περιπτώσεις. Για να αποτραπούν αυτά τα γαστροεντερικά συμπτώματα, συνιστάται η μετφορμίνη να λαμβάνεται σε 2 ή 3 δόσεις την ημέρα

κατά τη διάρκεια του γεύματος ή μετά το γεύμα. Μια αργή αύξηση της δόσης μπορεί να βελτιώσει τη γαστροεντερική ανεκτικότητα.

- Η μεταλλική γεύση (3 %) είναι συνηθισμένη.
- Έχει αναφερθεί ήπιο ερύθημα σε ορισμένα υπερευαίσθητα άτομα. Η συχνότητα τέτοιων ενεργειών θεωρείται πολύ σπάνια (<0.01 %).
- Έχει παρατηρηθεί μείωση απορρόφησης της βιταμίνης B12 με μείωση των επιπέδων γλυκόζης του ορού σε ασθενείς που θεραπεύονται μακροπρόθεσμα με μετφορμίνη, και γενικά φαίνεται να είναι χωρίς καμία κλινική σημασία (<0.01 %).
- Η γαλακτική οξέωση (0.03 περιπτώσεις/1000 ασθενείς-χρόνο) είναι πολύ σπάνια

3.3 Δυσλιπιδαιμία

3.3.1 Εισαγωγή

Η χοληστερίνη ή χοληστερόλη είναι στερόλη που βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων όλων των ιστών του σώματος, και στο πλάσμα του αίματος όλων των ζώων⁵⁹. Δεσμεύεται με πρωτεΐνες στις λιποπρωτεΐνες και βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ιστούς που είτε την παράγουν είτε έχουν πυκνές μεμβράνες, για παράδειγμα στο συκώτι, τη σπονδυλική στήλη και τον εγκέφαλο, όπως επίσης και στα αθηρώματα. Η χοληστερίνη από τις τροφές δεν επαρκεί για τις ανάγκες του οργανισμού με αποτέλεσμα να συνθέτει το μεγαλύτερο ποσοστό στο συκώτι. Τα λιπίδια του οργανισμού προέρχονται αφενός από την εξωγενή πρόληψη αυτών μέσω των τροφών και αφετέρου από την ενδογενή σύνθεση αυτών από το ήπαρ. Προκειμένου τα λιπίδια να διαλυτοποιηθούν και να μεταφερθούν στο υδατικό περιβάλλον του οργανισμού μας από και προς το συκώτι χρησιμοποιούν οχήματα μεταφορικά που ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. Κύριο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι λιποπρωτεΐνες LDL που κύριος ρόλος τους είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ προς τους ιστούς και άρα τις αρτηρίες όπου όταν είναι σε περίσσεια δημιουργούν αθηρώματα –δηλαδή πλάκες που στενεύουν και φράζουν τον αυλό τους- εξ’ ού και ο όρος «κακή χοληστερίνη» και η HDL που εκτελεί την αντίστροφη διαδρομή και άρα σε περίσσεια αποτρέπει τη δημιουργία αθηρωμάτων –εξ’ ού και ο όρος «καλή χοληστερίνη».

Τα τριγλυκερίδια είναι από τα βασικά λιπίδια που βρίσκονται στα τρόφιμα. Τα τριγλυκερίδια του λίπους των τροφών διασπώνται στο έντερο και στη συνέχεια μεταφέρονται με τα χυλομικρά στην περιφέρεια, όπου υφίστανται εκτενή επεξεργασία πριν φτάσουν στο ήπαρ. Συγκεκριμένα αποδίδουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία είτε χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας είτε αποθηκεύονται ως λίπος στο σώμα.

Ως δυσλιπιδαιμία ορίζεται η διαταραχή των λιπιδίων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα. Η διαταραχή αυτή είναι ποσοτική (LDL, VLDL χυλομικρών, ελάττωση HDL) αλλά και ποιοτική στην μετατροπή των λιποπρωτεϊνών που μεταφέρουν τα λιπίδια.

3.3.2 Αιτίες εμφάνισης της ασθένειας

Η δυσλιπιδαιμία διακρίνεται σε πρωτοπαθή όταν είναι γονιδιακής (κληρονομικής) αιτιολογίας και σε δευτεροπαθή όταν είναι απότοκος άλλων παθολογικών καταστάσεων ή και κακής διατροφής.⁶⁰ Επίσης ανάλογα προς την προεξάρχουσα διαταραχή χαρακτηρίζεται ως υπερχοληστερολαιμία (αύξηση της χοληστερόλης), υπερτριγλυκεριδαιμία (αύξηση των τριγλυκεριδίων) και μικτή δυσλιπιδαιμία (αύξηση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων).

Οι πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες είναι σπανιότερες από τις δευτεροπαθείς, χαρακτηρίζονται από σημαντικές διαταραχές στα επίπεδα των λιπιδίων και δύνανται να παρουσιάζουν συχνότερα σε σχέση με τις δευτεροπαθείς χαρακτηριστικά κλινικά ευρήματα. Ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την εμφάνιση ισχαιμικών καρδιαγγειακών νοσημάτων σε μικρότερες ηλικιακές ομάδες (3η και 4η δεκαετία της ζωής).

Οι δευτεροπαθείς δυσλιπιδαιμίες σχετίζονται με κακή διατροφή καθώς και με άλλα συνοδά νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ο υποθυρεοειδισμός, το νεφρωσικό σύνδρομο, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η παχυσαρκία ή φάρμακα (πχ. διουρητικά).

Η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού δυσλιπιδαιμίας (πχ. γονείς με αυξημένη χοληστερόλη), επηρεάζει την εμφάνιση δυσλιπιδαιμίας και άρα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Ωστόσο η κακή διατροφή και ο καθιστικός τρόπος ζωής είναι εξίσου σημαντικοί για την εκδήλωση δυσλιπιδαιμίας. Συγκεκριμένα τόσο η καθιστική ζωή με την έλλειψη καθημερινής άσκησης όσο και άλλες βλαβερές

συνήθειες όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση πολλών κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου.

3.3.3 Συμπτώματα της νόσου

Συνήθως, η δυσλιπιδαιμία δε συνοδεύεται από εντυπωσιακά συμπτώματα ή εμφανή σημεία στο ανθρώπινο σώμα και έτσι ύπουλα και αθόρυβα συνεχίζει για πολλά χρόνια τη βλαπτική επίδρασή της στα αγγεία.

Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να συνοδεύεται από εμφάνιση ξανθελασμάτων (κιτρινωπά σημεία κάτω από το δέρμα γύρω από τα βλέφαρα), ξανθωμάτων (απόθεση κίτρινων πλούσιων σε χοληστερόλη υλικών) στους τένοντες, ειδικά των δακτύλων, και γεροντότοξου (άσπρος ή γκρι αποχρωματισμός στην περιφέρεια της κόρης) στα μάτια. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εμφανή συμπτώματα, η δυσλιπιδαιμία μπορεί να αυξήσει σε μεγάλο βαθμό τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της νόσου των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν την καρδιά (στεφανιαία νόσος), τον εγκέφαλο (αγγειακή εγκεφαλική νόσος), και τα άκρα (περιφερική αγγειακή νόσος). Αυτές οι νόσοι μπορεί με τη σειρά τους να οδηγήσουν σε πόνο στο στήθος, διαλείπουσα χωλότητα (πόνο κατά τη βάρδια) καρδιακή προσβολή, εγκεφαλικό επεισόδιο, και άλλα προβλήματα. Λόγω του αυξημένου κινδύνου, συχνά συνιστάται θεραπεία στα άτομα με δυσλιπιδαιμία.

3.3.4 Διάγνωση

Η διάγνωση της δυσλιπιδαιμίας γίνεται εργαστηριακά με εξέταση αίματος όπου μετριοούνται τα επίπεδα των διαφορετικών λιπιδίων που υπάρχουν στο αίμα (LDL, HDL, τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη).

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Αθληροσκλήρωσης προληπτικός έλεγχος συστήνεται να γίνεται σε:

- άνδρες άνω των 40 ετών και μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες
- άτομα με αθηροσκλήρωση ανεξάρτητα από την ηλικία ή με κλινικά ευρήματα ενδεικτικά δυσλιπιδαιμίας
- ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ανεξάρτητα από την ηλικία
- ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο

- άτομα με οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου
- άτομα με αρτηριακή υπέρταση
- άτομα με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα (όπως ο ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση ή το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας – AIDS)
- ενήλικες καπνιστές
- ενήλικες με σεξουαλική δυσλειτουργία
- υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα με δείκτη μάζας σώματος (BMI) $>27 \text{ kg/m}^2$
- συγγενείς ατόμων με κληρονομικές διαταραχές των λιπιδίων
- παιδιά με κληρονομικό ιστορικό υπερλιπιδαιμίας ή καρδιαγγειακής νόσου ή άλλους παράγοντες κινδύνου

Εκτός της εργαστηριακής μέτρησης του λιπιδαιμικού προφίλ, χρήσιμος είναι και ο προσδιορισμός άλλων δεικτών όπως για παράδειγμα ορμονικός έλεγχος θυρεοειδούς και επίπεδα σακχάρου στο αίμα, κρεατινίνη, έλεγχος νεφρικής λειτουργίας έλεγχος υπατικής λειτουργίας και γενική ούρων.

3.3.5 Αντιμετώπιση

3.3.5.1 Βελτίωση τρόπου ζωής

Προτείνεται όλοι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία να εφαρμόσουν τα ακόλουθα:

- Διακοπή καπνίσματος.
- Υπολιπιδαιμική διαίτα (πτωχή σε ζωικά λίπη και trans λιπαρά οξέα, αυξημένη σε φυτικές ίνες) – τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, περιορισμένα σε κορεσμένα λίπη και αποφυγή των trans λιπαρών.
- Τρόφιμα πλούσια σε φυτικές ίνες, που είναι καλό για πρόσληψη σε σημαντικές ποσότητες, όπως είναι για παράδειγμα τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια και τα δημητριακά ολικής άλεσης.
- Παραδείγματα τροφίμων πλούσια σε ζωικό λίπος που πρέπει να καταναλώνονται σε μικρές σχετικά ποσότητες είναι το λιπαρό κρέας, το βούτυρο, τα πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα.
- Τρόφιμα που είναι πλούσια σε trans λιπαρά και θα πρέπει να αποφεύγονται, είναι για παράδειγμα τα πατατάκια, τα μπισκότα, το επεξεργασμένο κρέας (όπως αλλαντικά, λουκάνικα κ.α.).
- Περιορισμός της κατανάλωσης αλκοόλ.

- Κατανάλωση τροφών πλούσιων με φυτικές στερόλες/στανόλες (αναμένεται να μειώσουν την LDL χοληστερόλη κατά περίπου 10%). Παραδείγματα τροφών που είναι πλούσια σε φυτικές στερόλες/στανόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, η μαργαρίνη και ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.
- Σε υπέρβαρους, απώλεια βάρους (μείωση κατά 10% μέσα σε 6 μήνες, για παράδειγμα απώλεια 7-8 κιλά για έναν μέσο άνθρωπο 75 κιλών). Κατά μέσο όρο ένα κιλό απώλειας βάρους μπορεί να ελαττώσει την LDL χοληστερόλη κατά $0,8 \text{ mg dL}^{-1}$.
- Σωματική άσκηση (για παράδειγμα γρήγορο βάδισμα 30–60 λεπτά την ημέρα για τις περισσότερες ημέρες της εβδομάδας).
- Στην περίπτωση της δυσλιπιδαιμίας που οφείλεται σε άλλες νόσους ή παράγοντες (δευτεροπαθής δυσλιπιδαιμία), σημαντική είναι η αντιμετώπιση της νόσου ή του παράγοντα που έχει οδηγήσει στην απορρύθμιση των επιπέδων των λιπιδίων.

3.3.5.2 Φαρμακευτική αντιμετώπιση

Εάν τα ανωτέρω δεν οδηγήσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα μέσα σε ένα διάστημα 3-6 μηνών, τότε ο θεράπων ιατρός θα συστήσει φαρμακευτική αγωγή αφού υπολογίσει τον κίνδυνο του κάθε ασθενή για καρδιαγγειακά νοσήματα. Στις φαρμακευτικές ουσίες που χορηγούνται συμπεριλαμβάνονται οι στατίνες, η εζετιμίμη και η νιασίνη. Ανάλογα με τον κίνδυνο, οι στόχοι μείωσης της χοληστερόλης μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο αυστηροί.

Πέρα από την αυξημένη LDL, ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων που συχνά παρουσιάζονται σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία. Παρά το γεγονός ότι τα υψηλά τριγλυκερίδια δεν θεωρείται ότι ενέχουν τον ίδιο κίνδυνο για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου όσο η LDL χοληστερόλη, αποτελούν επιβαρυντικό παράγοντα για την υγεία του ανθρώπου και συστήνεται θεραπεία, εφόσον:

- έχουν πολύ υψηλά επίπεδα (> 500 έως 1000 mg dL^{-1} ή $5,65$ έως $11,3 \text{ mmol L}^{-1}$) – σε αυτή την περίπτωση οι ασθενείς κινδυνεύουν να εκδηλώσουν μια επικίνδυνη φλεγμονή του παγκρέατος που καλείται οξεία παγκρεατίτιδα
- έχουν ταυτόχρονα υψηλή χοληστερόλη LDL ή χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης

- έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου ή άλλους παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο.

Η υπολιπιδαιμική θεραπεία είναι μια διά βίου διαδικασία. Παρά το γεγονός ότι τα φάρμακα μπορεί γρήγορα να μειώσουν τα επίπεδα, συχνά χρειάζονται 6 έως 12 μήνες πριν να είναι αισθητή η επίδραση των τροποποιήσεων στον τρόπο ζωής. Ένα αποτελεσματικό σχέδιο θεραπείας που αποφέρει αποτελέσματα είναι σημαντικό να διατηρηθεί καθώς η διακοπή της θεραπείας συνήθως οδηγεί και πάλι στην αύξηση των επιπέδων των λιπιδίων.

3.3.5.3 Άλλοι τρόποι αντιμετώπισης

Η θεραπεία της διαβητικής δυσλιπιδαιμίας πρέπει πάντα να περιλαμβάνει βελτίωση του τρόπου ζωής του ασθενούς και χορήγηση στατινών με σκοπό τη μείωση της LDL χοληστερόλης⁶¹. Η μετφορμίνη μειώνει τα τριγλυκερίδια και για το λόγο αυτό επιλέγεται ως φάρμακο ανάμεσα στα αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα για την αντιμετώπιση του διαβήτη. Τα αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα δεν θα πρέπει να επιλέγονται αντί των φαρμάκων που μειώνουν τα λιπίδια για την αντιμετώπιση λιπιδικών ανωμαλιών σε ασθενείς με διαβήτη, μπορούν όμως να είναι χρήσιμα βοηθήματα. Το επίπεδο των λιπιδίων θα πρέπει να παρακολουθείται τακτικά μετά την έναρξη της θεραπείας. Συνεπώς πραγματοποιούνται μετρήσεις κάθε δύο με τρεις μήνες στην αρχή της θεραπείας ή μετά την αλλαγή της, ενώ αφού σταθεροποιηθούν τα επίπεδα των λιπιδίων, οι μετρήσεις γίνονται μία με δύο φορές το χρόνο.

3.3.6 Πρόληψη της νόσου

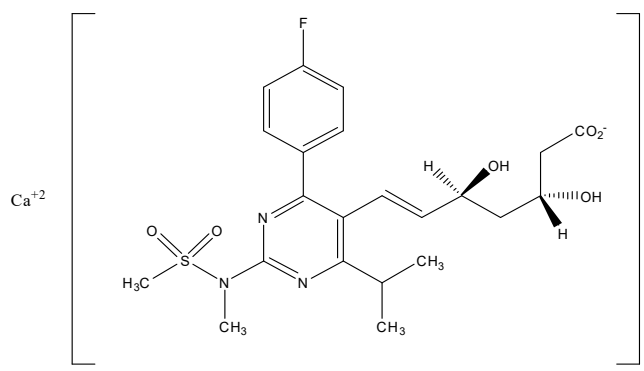
Η υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα της LDL («κακής») χοληστερόλης, είναι παράγοντας που συμβάλλει στη συγκέντρωση λιπιδίων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, οδηγώντας στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Η παρουσία της πλάκας περιορίζει τη διάμετρο των αιμοφόρων αγγείων, οδηγώντας σταδιακά στη στένωση ως και την πλήρη απόφραξή τους. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση της νόσου. Για την πρόληψη ή την καθυστέρηση εμφάνισης της νόσου, σημαντικό ρόλο παίζουν η ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή καθώς και η σωματική άσκηση.

Κατά τη θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας με ένα συνδυασμό διατροφής, απώλειας βάρους, άσκησης και φαρμάκων, τα επίπεδα των λιπιδίων μπορεί σχεδόν πάντα να μειωθούν. Καθώς τα επίπεδα των λιπιδίων πέφτουν, το ίδιο μειώνεται και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της νόσου των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν την καρδιά, τον εγκέφαλο και τα άκρα. Σε ασθενείς που δεν έχουν εμφανίσει κάποιο καρδιακό ή εγκεφαλικό επεισόδιο, η θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας μειώνει τον κίνδυνο για καρδιακή προσβολή ή εγκεφαλικό επεισόδιο (πρωτογενής πρόληψη). Ωστόσο, ακόμα και αν οι ανωτέρω παθήσεις είναι ήδη παρούσες, δεν είναι πολύ αργά, καθώς η θεραπεία μείωσης των λιπιδίων μπορεί να είναι σωτήρια και να μειώσει τους θανάτους από καρδιαγγειακά νοσήματα (δευτερογενής πρόληψη).

3.4 Ροσουβαστατίνη

3.4.1 Εισαγωγή

Επικρατέστερη επιλογή φαρμάκων για την αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας αποτελούν οι στατίνες. Οι στατίνες είναι αναστολείς της HMG-CoA αναγωγάσης, ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση σύνθεσης της χοληστερόλης. Ταξινομούνται σε φυσικές και συνθετικές και διαφέρουν ως προς τις φαρμακοκινητικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη στατίνη ήταν η μεβαστατίνη (mevastatin). Λόγω όμως της τοξικότητάς της αντικαταστάθηκε από τη λοβαστατίνη (lovastatin). Η ατορβαστατίνη (atorvastatin) και η σεριβαστατίνη (cerivastatin) ανήκουν στις πρώτες συνθετικές στατίνες, οι οποίες εμφανίστηκαν στην αγορά το 1996 και 1997 αντίστοιχα. Το 2003 παρουσιάστηκε μία νέα συνθετική στατίνη, η ροσουβαστατίνη, με το εμπορικό όνομα CRESTOR. Η ροσουβαστατίνη αντιμετωπίζει με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα τη μείωση της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων καθώς και την αύξηση της HDL χοληστερόλης, σε σύγκριση με τις άλλες στατίνες. Η ροσουβαστατίνη απαντάται υπό τη μορφή άλατος ασβεστίου και η δομή της φαίνεται στο Σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3: Χημική δομή ροσουβαστατίνης ως *rosuvastatin calcium*

Ο εμπειρικός τύπος είναι $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$. Είναι λευκή άμορφη σκόνη, η οποία διαλύεται ελάχιστα στο νερό και στη μεθανόλη. Η ροσουβαστατίνη είναι υδρόφιλο μόριο με συντελεστή κατανομής (οκτανόλη/νερό) 0,13 σε pH 7⁶².

3.4.2 Μηχανισμός δράσης

Η ροσουβαστατίνη είναι ένας εκλεκτικός και ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης, η οποία αποτελεί το ένζυμο που ρυθμίζει την ταχύτητα μετατροπής του 3-υδροξυ-3 μεθυλ-γλουταρυλικού συνενζύμου Α σε μεβαλονικό οξύ, μια πρόδρομη ουσία της χοληστερόλης. Η κύρια περιοχή δράσης της ροσουβαστατίνης είναι το ήπαρ, το όργανο στόχος για τη μείωση της χοληστερόλης. Η ροσουβαστατίνη αυξάνει τον αριθμό των ηπατικών LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, ενισχύοντας την πρόσληψη και τον καταβολισμό της LDL και αναστέλλει την ηπατική σύνθεση της VLDL, μειώνοντας έτσι το συνολικό αριθμό των σωματιδίων VLDL και LDL. Η ροσουβαστατίνη ελαττώνει την αυξημένη LDL-χοληστερόλη, την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια και αυξάνει την HDL-χοληστερόλη. Επίσης, μειώνει την απολιποπρωτεΐνη Β (ApoB), non HDL-C, VLDL-C, VLDL-TG και αυξάνει την Apo AI. Η ροσουβαστατίνη επίσης ελαττώνει τα κλάσματα LDL -C/HDL-C, ολική C/HDL-C, nonHDL-C/HDL-C και ApoB/ApoA-I.

3.4.3 Φαρμακοκινητικά δεδομένα

3.4.3.1 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα

Τα μέγιστα επίπεδα της ροσουβαστατίνης στο πλάσμα επιτυγχάνονται περίπου 5 ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα είναι περίπου 20%.

3.4.3.2 Κατανομή

Η ροσουβαστατίνη συγκεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ που είναι η κύρια περιοχή σύνθεσης της χοληστερόλης και αποβολής της LDL-χοληστερόλης. Ο όγκος κατανομής της ροσουβαστατίνης είναι περίπου 134 L. Περίπου το 90% της ροσουβαστατίνης είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως με τη λευκωματίνη.

3.4.3.3 Μεταβολισμός

Η ροσουβαστατίνη υπόκειται σε περιορισμένο μεταβολισμό (περίπου 10%). Μελέτες μεταβολισμού *in vitro* με χρήση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, υποδηλώνουν ότι η ροσουβαστατίνη είναι φτωχό υπόστρωμα του μεταβολισμού που βασίζεται στο κυτόχρωμα P450. Το CYP2C9 ήταν το κυρίως ισόενζυμο που εμπλέκεται, ενώ τα 2C19, 3A4 και 2D6 εμπλέκονται σε μικρότερο βαθμό. Οι κύριοι μεταβολίτες που προσδιορίζονται είναι ο N-απομεθυλιωμένος μεταβολίτης και οι λακτονικοί μεταβολίτες. Ο N-απομεθυλιωμένος μεταβολίτης είναι κατά περίπου 50% λιγότερο δραστικός από την ροσουβαστατίνη, ενώ η λακτονική μορφή θεωρείται κλινικά ανενεργή. Η ροσουβαστατίνη επηρεάζει περισσότερο από το 90% της ανασταλτικής δραστικότητας της κυκλοφορούσης στο αίμα HMG-CoA αναγωγάσης.

3.4.3.4 Απέκκριση

Περίπου 90% της δόσης της ροσουβαστατίνης απεκκρίνεται αμετάβλητη στα κόπρανα (αποτελούμενη από προσροφημένη και μη δραστική ουσία) και το υπόλοιπο ποσοστό αποβάλλεται στα ούρα. Ποσοστό περίπου 5% απεκκρίνεται αμετάβλητο από τα ούρα. Η ημιπερίοδος ζωής της απομάκρυνσης της ροσουβαστατίνης από το πλάσμα είναι 19 ώρες. Η ημιπερίοδος ζωής της απομάκρυνσης δεν αυξάνεται σε υψηλότερες δόσεις. Η μέση γεωμετρική κάθαρση από το πλάσμα είναι περίπου 50 λίτρα/ώρα (συντελεστής μεταβλητότητας 21,7%).

Όπως και με τους άλλους αναστολείς της HMG-CoA αναγωγάσης, η πρόσληψη της ροσουβαστατίνης από το ήπαρ εμπλέκει τον μεμβρανικό μεταφορέα OATP-C. Ο μεταφορέας αυτός είναι σημαντικός για την ηπατική απέκκριση της ροσουβαστατίνης.

3.4.4 Δοσολογία

Το φαρμακευτικό προϊόν που περιέχει τη ροσουβαστατίνη είναι εμπορικά διαθέσιμο με την ονομασία CRESTOR, υπό τη μορφή δισκίου σε δόσεις των 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg. Μπορεί να λαμβάνεται οποιαδήποτε ώρα της ημέρας, με ή χωρίς τροφή.

Πριν την έναρξη της θεραπείας, ο ασθενής θα πρέπει να τεθεί στην καθιερωμένη υποχοληστερολαιμική δίαιτα, την οποία πρέπει να συνεχίζει κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η δόση πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με το στόχο της θεραπείας και την ανταπόκριση του ασθενή, λαμβάνοντας υπόψη τις ισχύουσες συναινετικές, θεραπευτικές οδηγίες.

Η συνιστώμενη δόση έναρξης είναι 5 ή 10 mg από του στόματος εφάπαξ ημερησίως τόσο για τους ασθενείς που δεν έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία με στατίνες όσο και για τους ασθενείς που μετατάσσονται από θεραπεία με άλλους αναστολείς της HMG-CoA αναγωγής. Για την επιλογή της δόσης έναρξης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα επίπεδα χοληστερόλης κάθε ασθενή και ο μελλοντικός καρδιαγγειακός κίνδυνος καθώς και ο ενδεχόμενος κίνδυνος ανεπιθύμητων ενεργειών. Ρύθμιση στη μέγιστη δόση των 40 mg, θα πρέπει να εξετάζεται μόνο σε ασθενείς με σοβαρή υπερχοληστερολαιμία και υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο (ιδιαίτερα σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία), που δεν επιτυγχάνουν το θεραπευτικό τους στόχο με 20 mg, και στους οποίους θα πρέπει να διενεργείται περιοδικός έλεγχος.

Παιδιατρική χρήση

Σε παιδιά και εφήβους ηλικίας 10 με 17 ετών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η συνήθης δόση έναρξης είναι 5 mg ημερησίως. Το σύνηθες εύρος δόσης είναι 5-20 mg από του στόματος μια φορά ημερησίως. Στα παιδιά και στους εφήβους πρέπει να εφαρμόζεται καθιερωμένη υπερχοληστερολαιμική δίαιτα πριν την έναρξη της θεραπείας με ροσουβαστατίνη και η δίαιτα θα πρέπει να συνεχιστεί κατά τη διάρκεια της θεραπείας με το φάρμακο αυτό. Το δισκίο των 40 mg δεν είναι κατάλληλο για χρήση σε παιδιατρικούς ασθενείς. Επίσης, η θεραπεία με ροσουβαστατίνη δε συνιστάται για χρήση σε παιδιά κάτω των 10 ετών.

Χορήγηση σε ηλικιωμένους

Συνιστάται δόση έναρξης 5 mg για τους ασθενείς ηλικίας > 70 ετών. Δεν απαιτείται άλλη προσαρμογή της δοσολογίας σε σχέση με την ηλικία.

Δοσολογία σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια

Η συνιστώμενη δόση έναρξης για τους ασθενείς με ήπια έως μετρίου βαθμού νεφρική δυσλειτουργία (κάθαρση κρεατινίνης < 60 mL min⁻¹) είναι 5 mg. Η δόση των 40 mg αντενδείκνυται για τους ασθενείς με μέτρια νεφρική ανεπάρκεια. Η χρήση του Crestor σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια αντενδείκνυται για όλες τις δόσεις.

Φυλή

Η συνιστώμενη δόση έναρξης είναι 5 mg για τους ασθενείς Κινέζικης και Ιαπωνικής καταγωγής, ενώ η δόση των 40 mg αντενδείκνυται.

Δοσολογία σε ασθενείς με παράγοντες που προδιαθέτουν σε μυοπάθεια

Η συνιστώμενη δόση έναρξης για τους ασθενείς με παράγοντες που προδιαθέτουν σε μυοπάθεια είναι 5 mg ενώ η δόση των 40 mg αντενδείκνυται σε αυτούς τους ασθενείς.

Υπερδοσολογία

Σε περίπτωση υπερδοσολογίας, ο ασθενής πρέπει να αντιμετωπίζεται συμπτωματικά και να εφαρμόζονται τα απαιτούμενα υποστηρικτικά μέτρα. Πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας και των επιπέδων κρεατινικής φωσφοκινάσης (CK). Η αιμοδιάλυση είναι απίθανο να επιφέρει κάποιο όφελος.

3.4.5 Αντενδείξεις

Το Crestor αντενδείκνυται :

- σε ασθενείς με υπερευαισθησία στη ροσουβαστατίνη ή σε κάποιο από τα έκδοχα.
- σε ασθενείς με ενεργό ηπατική νόσο, συμπεριλαμβανομένων ανεξήγητων, επίμονων αυξήσεων των τρανσαμινασών του ορού και οποιασδήποτε αύξησης των τρανσαμινασών του ορού που υπερβαίνει το τριπλάσιο του ανώτατου ορίου της φυσιολογικής τιμής.
- σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία (κάθαρση κρεατινίνης < 30 mL min⁻¹).
- σε ασθενείς με μυοπάθεια.

- σε ασθενείς που λαμβάνουν ταυτόχρονα κυκλοσπορίνη.
 - κατά την κύηση και γαλουχία και σε γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία που δε λαμβάνουν κατάλληλα μέτρα αντισύλληψης.
- Η δόση των 40 mg αντενδείκνυται σε ασθενείς με παράγοντες που προδιαθέτουν σε μυοπάθεια/ραβδομύωση. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται:
- μετρίου βαθμού νεφρική ανεπάρκεια (κάθαρση κρεατινίνης $< \text{mL min}^{-1}$)
 - υποθυροειδισμός
 - ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό κληρονομικών μυϊκών διαταραχών
 - προηγούμενο ιστορικό μυϊκής βλάβης με χρήση άλλου αναστολέα της HMG-CoA αναγωγάσης ή φιβράτης
 - κατάχρηση αλκοόλ
 - καταστάσεις, όπου μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων στο πλάσμα
 - Ιάπωνες και Κινέζους ασθενείς
 - ταυτόχρονη χορήγηση φιβρατών

3.4.6 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης

Η ροσουβαστατίνη εμφανίζει αλληλεπίδραση όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα και άλλα φαρμακευτικά προϊόντα όπως κυκλοσπορίνες, ανταγωνιστές της βιταμίνης K, γεμφιβροζίλη και άλλα υπολιπιδαιμικά φάρμακα, αντιόξινα, ερυθρομυκίνη καθώς και από του στόματος χορηγούμενα αντισυλληπτικά για τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.⁶³

3.4.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται με χορήγηση ροσουβαστατίνης είναι συνήθως ήπιες και παροδικές. Η συχνότητα εμφάνισης των ανεπιθύμητων ενεργειών ταξινομείται ως εξής: συχνές ($>1/100$, $<1/10$), όχι συχνές ($>1/1.000$, $1/100$), σπάνιες ($>1/10.000$, $<1/1.000$).

Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος

Σπάνιες: Αντιδράσεις υπερευαισθησίας, συμπεριλαμβανομένου αγγειοοιδήματος.

Διαταραχές του νευρικού συστήματος

Συχνές: κεφαλαλγία, ζάλη

Διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος

Συχνές: δυσκοιλιότητα, ναυτία, κοιλιακό άλγος

Διαταραχές του δέρματος και του υποδορίου ιστού

Όχι συχνές: κνησμός, εξάνθημα και κνίδωση

Διαταραχές του μυοσκελετικού συστήματος, συνδετικού ιστού και των οστών

Συχνές: μυαλγία

Σπάνιες: μυοπάθεια και ραβδομυόλυση

Γενικές διαταραχές:

Συχνές: αδυναμία

Όπως και με άλλους αναστολείς της HMG-CoA αναγωγάσης, η συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών τείνει να είναι δόσοεξαρτώμενη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

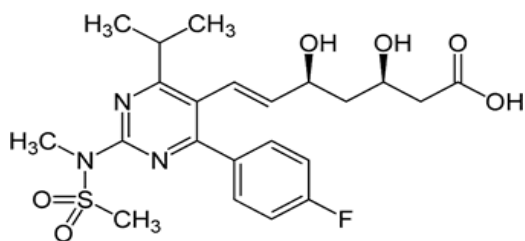
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (HILIC-ESI/MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΣΟΥΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

4.1 Εισαγωγή

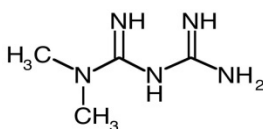
Η μετφορμίνη είναι ένας αντιυπεργλυκαιμικός παράγοντας, ο οποίος χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2, μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η ροσουβαστατίνη είναι ένα ισχυρό αντιλιπιδαιμικό φάρμακο που χορηγείται με στόχο τη μείωση της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Είναι αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης, ένα ένζυμο το οποίο μετατρέπει το HMG-CoA στο πρόδρομο μόριο της χοληστερόλης. Λόγω της εξαιρετικής αποτελεσματικότητας των φαρμάκων αυτών αλλά και λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων τους, όπως αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ροσουβαστατίνη και η μετφορμίνη συνταγογραφούνται συχνά μαζί για την καταπολέμηση της δυσλιπιδαιμίας και του διαβήτη τύπου 2, δύο ασθένειες οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συννοσηρότητα.

Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει πληθώρα εφαρμογών στον προσδιορισμό των παραπάνω αναφερθέντων φαρμάκων σε βιολογικά υγρά.^{64,65,66,67,68} Επίσης, υπάρχει σχετική αναφορά⁶⁹ στον προσδιορισμό μετφορμίνης με χρήση υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης. Εντούτοις, δεν υπάρχει αναφορά σχετική με τη χρήση υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης για τον προσδιορισμό ροσουβαστατίνης και μετφορμίνης σε ανθρώπινο πλάσμα.

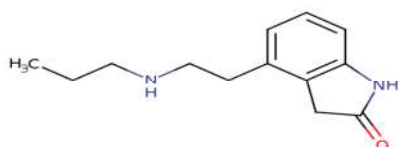
Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών σε ανθρώπινο πλάσμα η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς και ρύθμιση της δοσολογίας τους. Οι χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.1.



Ροσουβαστατίνη,
Ακριβής μάζα: 481,539 g mol⁻¹
Μοριακός τύπος: C₂₂H₂₈FN₃O₆S
Log P= 0,13 (pH 7.0)
pKa: 4 (Strongest Acidic)
pKa: -2.8 (Strongest Basic)



Μετφορμίνη,
Ακριβής μάζα: 129,167 g mol⁻¹
Μοριακός τύπος: C₄H₁₁N₅
Log P= -0.5
pKa = 12.4



N-Despropyl Ropinirole,
Ακριβής μάζα: 218,2948 g mol⁻¹
Μοριακός τύπος: C₁₃H₁₈N₂O
Log P= 1,54
pKa: 13,24 (Strongest Acidic)
pKa: 10,26 (Strongest Basic)

Σχήμα 4.1: Χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.

Λαμβάνοντας υπόψη τις χαμηλές συγκεντρώσεις των προς ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών στο ανθρώπινο πλάσμα και την πολύπλοκη σύσταση του παραπάνω βιολογικού υγρού, κρίθηκε αναγκαία η χρησιμοποίηση του συστήματος LC/MS, που χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. 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 εφαρμόστηκε σε δείγματα πλάσματος ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε μία από τις παραπάνω ενώσεις.

4.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία

4.2.1 Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των αναλυτών αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρίας SpectraSeries, μοντέλο

P100 (SP ThermoSeparation products, UK) και από σύστημα έγχυσης Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής δείγματος 20 μL . Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η XBridge-HILIC, 150x2.1, μεγέθους σωματιδίων 3.5 μm , 135Å (Water's, Milford, MA, USA). Προσθήκη XBridge-HILIC χρησιμοποιήθηκε στο μεγαλύτερο μέρος της εργασίας για να παραταθεί η διάρκεια ζωής της στήλης. Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα 15mM μυρμηκικού αμμωνίου και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 88:12 (v/v). Η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1} . Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και ο χρόνος της ανάλυσης για κάθε ένεση ήταν 14 λεπτά.

4.2.2 Φασματόμετρο Μαζών

Ως ανιχνευτής στο χρωματογραφικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών Finnigan, το μοντέλο AQA (ThermoQuest, 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 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 (version 1.2) της εταιρείας IBM (IBM data system) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή IBM Pentium III.

Για τον προσδιορισμό των αναλυτών επιλέχθηκε η παραγωγή και ανίχνευση των θετικά φορτισμένων μοριακών ιόντων, $[M+H]^+$, όλων των αναλυτών. Οι παράμετροι που αφορούν τη βέλτιστη λειτουργία της πηγής ιοντισμού ήταν οι εξής: τάση τριχοειδούς 4,8kV, θερμοκρασία 260°C, δυναμικό πηγής (AQA max) 20 V. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM).

4.2.3 Προκατεργασία Δείγματος

Η τεχνική που επιλέχθηκε για τον καθαρισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά του πλάσματος ήταν εκείνη της κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή

φυγοκέντρου της εταιρείας Hettich μοντέλο Universal 32R, και για τη διήθηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν φιλτράκια Millipore Hydrophilic PTFE 0.45μm. Η απαραίτητη απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρα νάϊλον μεγέθους πόρων 0,45 μm. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν δισαπιονισμένο και υψηλής καθαρότητας παραγόμενο από συσκευή Milli-Q Plus, Millipore Ltd.

4.2.4 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 ασβεστιούχος ροσουβαστατίνη, φαρμακευτικής καθαρότητας, αγοράστηκε από την εταιρία MSN Laboratories Private Limited (Rudraram, Telengana, India). Η υδροχλωρική μετφορμίνη, φαρμακευτικής καθαρότητας, αγοράστηκε από την εταιρία Wanbury Limited (BSEL Tech Park, Maharashtra, India). Η πρόσμιξη D της ροπινιρόλης, 6-[2-(Di-n-propylamino) ethyl]-2-nitrophenyl-acetic acid hydrochloride, αγοράστηκε από την εταιρία Vitalife Chemipharma Pvt. Ltd (Mumbai, Maharashtra, India).

4.3 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

4.3.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Πρότυπο διάλυμα Α: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 12,8 mg υδροχλωρικού άλατος της μετφορμίνης (που αντιστοιχούν σε 10 mg μετφορμίνης) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20ml.

Πρότυπο διάλυμα Β: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10,4 mg άλατος ασβεστίου της ροσουβαστατίνης (που αντιστοιχούν σε 5 mg ροσουβαστατίνης) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.

Ακολούθησε διάλυση σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με ακετονιτρίλιο ώστε να παρασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης Α και Β συγκέντρωσης $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε μετφορμίνη και $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε ροσουβαστατίνη αντίστοιχα.

Διαλύματα παρακαταθήκης Γ, Δ και Ε: Με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 (v/v) των πρότυπων διαλυμάτων Α και Β παρασκευάστηκαν τα διαλύματα παρακαταθήκης Γ και Δ αντίστοιχα τα οποία περιείχαν $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ του αντίστοιχου αναλύτη. Με διαδοχική αραιώση 1:50 (v/v) του διαλύματος παρακαταθήκης Δ παρασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης Ε συγκέντρωσης $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Πρότυπο διάλυμα εσωτερικού προτύπου: Χρησιμοποιήθηκε έτοιμο διάλυμα παρακαταθήκης N-Despropyl Ropinirole $190 \mu\text{g mL}^{-1}$. Με διαδοχική αραιώση 1:50 (v/v) αυτού του διαλύματος παρασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης $3,80 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αμέσως μετά την παρασκευή τους μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια και φυλάσσονταν στο σκοτάδι και στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4°C όπου διατηρούνταν σταθερά για αρκετές βδομάδες.

4.3.2 Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης σε ακετονιτρίλιο παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα εργασίας που περιείχαν και τις δύο αναλυόμενες ουσίες σε εύρος συγκεντρώσεων $62,5\text{-}5000 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη μετφορμίνη και $2,0\text{-}100 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη ροσουβαστατίνη.

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν, εκ νέου, κάθε δεύτερη βδομάδα και φυλάσσονταν στο σκοτάδι και στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 4°C .

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι αραιώσεις που έλαβαν χώρα για την παρασκευή των μικτών διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 4.1: Αραιώσεις για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας της μετφορμίνης (Met) και της ροσουβαστατίνης (Ros)							
Αρχικό Διάλυμα	Όγκος (μL)	Διαλύτης	Τελικός Όγκος (mL)	Συντελεστής Αραίωσης	Τελική Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)		Ονομασία διαλύματος
					Met	Ros	
Διάλυμα εργασίας (III)	500	ACN	2	1:4	62,5		Διάλυμα εργασίας (I)
Διάλυμα εργασίας (V)	200	ACN	2	1:10	100	2	Διάλυμα εργασίας (II)
Διάλυμα εργασίας (VI)	200	ACN	2	1:10	250	5	Διάλυμα εργασίας (III)
Διάλυμα εργασίας (VI)	400	ACN	2	1:5	500	10	Διάλυμα εργασίας (IV)
Δ/μα εργασίας (VII)	400	ACN	2	1:5	1000	20	Διάλυμα εργασίας (V)
Δ/μα (Γ) Δ/μα (Ε)	100 100	ACN	2	1:20	2500	50	Διάλυμα εργασίας (VI)
Δ/μα (Γ) Δ/μα (Ε)	500 500	ACN	5	1:10	5000	100	Διάλυμα εργασίας (VII)

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν, εκ νέου, κάθε δεύτερη βδομάδα και φυλάσσονταν στο σκοτάδι και στην ψύξη, σε θερμοκρασία -4°C.

Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας (Πίνακας 4.1) 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 την καμπύλη αναφοράς:

Τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος των αναλυτών προκύπτουν από την προσθήκη ακριβώς 100 μL του εκάστοτε διαλύματος εργασίας και αραιώνονται με 100 μL ανθρώπινου πλάσματος. Τα εμβολιασμένα διαλύματα που παρασκευάστηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 62,5 έως 5000 ng mL^{-1} για τη μετφορμίνη και 2 έως 100 ng mL^{-1} για τη ροσουβαστατίνη χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς και για τις μελέτες σταθερότητας.

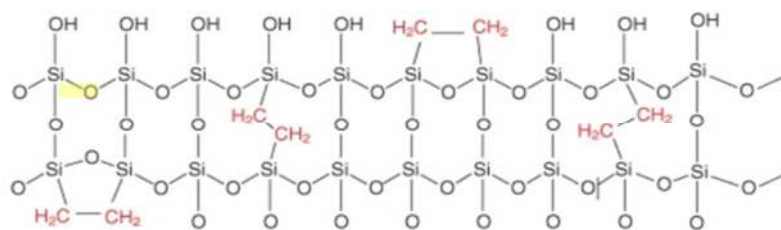
Εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (Quality Control samples):

Για την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 62,5, 500 και 5000 ng mL^{-1} για τη μετφορμίνη και 2, 10 και 100 ng mL^{-1} για τη ροσουβαστατίνη. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν από διαφορετικές ζυγίζεις προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών.

4.4 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC

4.4.1 Επιλογή στατικής φάσης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC με διαστάσεις 2,1 x 150 mm και μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm . Η συγκεκριμένη στήλη 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 4.2).



Σχήμα 4.2: Σχηματικό διάγραμμα του πληρωτικού υλικού της στήλης BEH - XBridge®-HILIC

Για την ανάπτυξη ανθεκτικών μεθόδων με χρωματογραφία HILIC, είναι σημαντική η κατανόηση του κυρίαρχου μηχανισμού που διέπει το χρωματογραφικό διαχωρισμό. 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 από 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.

Ένας αξιόλογος αριθμός στατικών φάσεων χρωματογραφίας HILIC έχει παρασκευαστεί μέχρι σήμερα γεγονός που συνέβαλε στη σημαντική αύξηση των εφαρμογών της τεχνικής. Η στατική φάση της στήλης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τις στήλες HILIC με βάση την πηκτή πυριτίας, ενώ έχει αυξημένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία.

4.4.2 Επιλογή κινητής φάσης

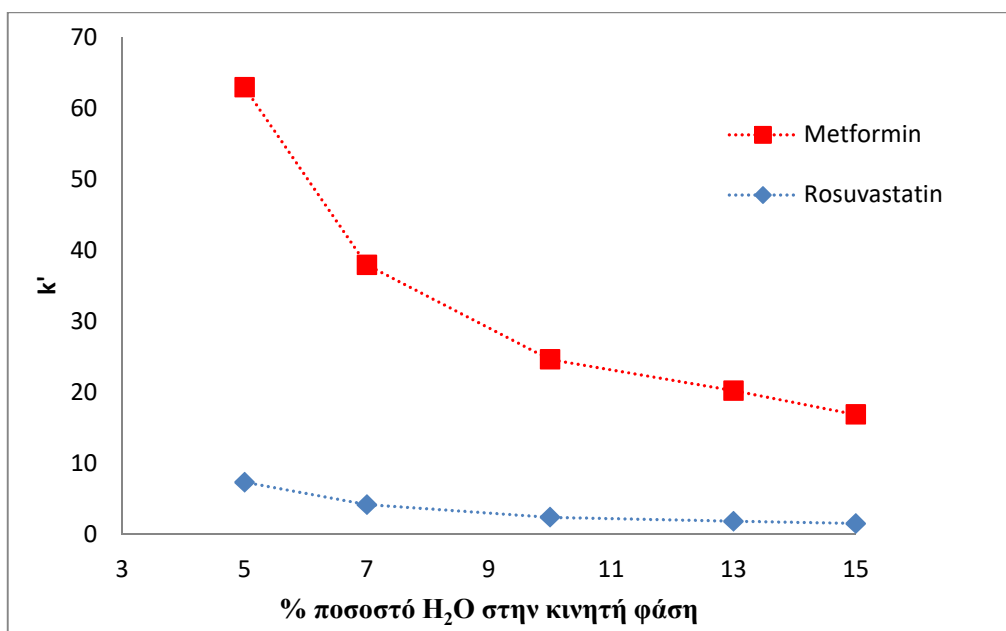
Για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης ελήφθησαν υπόψη αρκετοί παράγοντες:

- οι αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο να μην εκκλούνται 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.
- Επειδή το νερό ευνοεί τη διάσταση των ομάδων της στήλης Xbridge HILIC, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος στη συγκράτηση των αναλυτών.
- Η χρήση υψηλού ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, λόγω της χρωματογραφίας HILIC, επηρεάζει την απόκριση του ανιχνευτή προκαλώντας αύξηση του ιοντισμού των αναλυτών με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού.

Με σκοπό να διερευνηθεί η συμπεριφορά των αναλυτών στην αναλυτική στήλη BEH XBridge®-HILIC πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της

σύνθεσης της κινητής φάσης στη συγκράτηση των αναλυτών και στο μετρούμενο σήμα από το φασματόμετρο μαζών αναλύοντας εμβολιασμένα δείγματα ακετονιτριλίου. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλοταν ένας παράγοντας ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να προσδιοριστούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Μελετήθηκε η επίδραση του ακετονιτριλίου, που αποτελεί οργανικό τροποποιητή πρώτης επιλογής σε χρωματογραφία HILIC καθώς διαλύει τους περισσότερους αναλύτες και προσφέρει ικανοποιητική συγκράτηση. Το ακετονιτρίλιο είναι ένας πολύ συμβατός διαλύτης με το χρωματογραφικό μηχανισμό συγκράτησης της HILIC καθώς στερεί τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δεν ανταγωνίζεται τους αναλύτες για την αλληλεπίδραση με το πληρωτικό υλικό. Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του παράγοντα χωρητικότητας (k') για τους αναλύτες σε σχέση με το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση. Η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης διατηρήθηκε σταθερή σε 0,05 mmoles μυρμηκικού αμμωνίου.

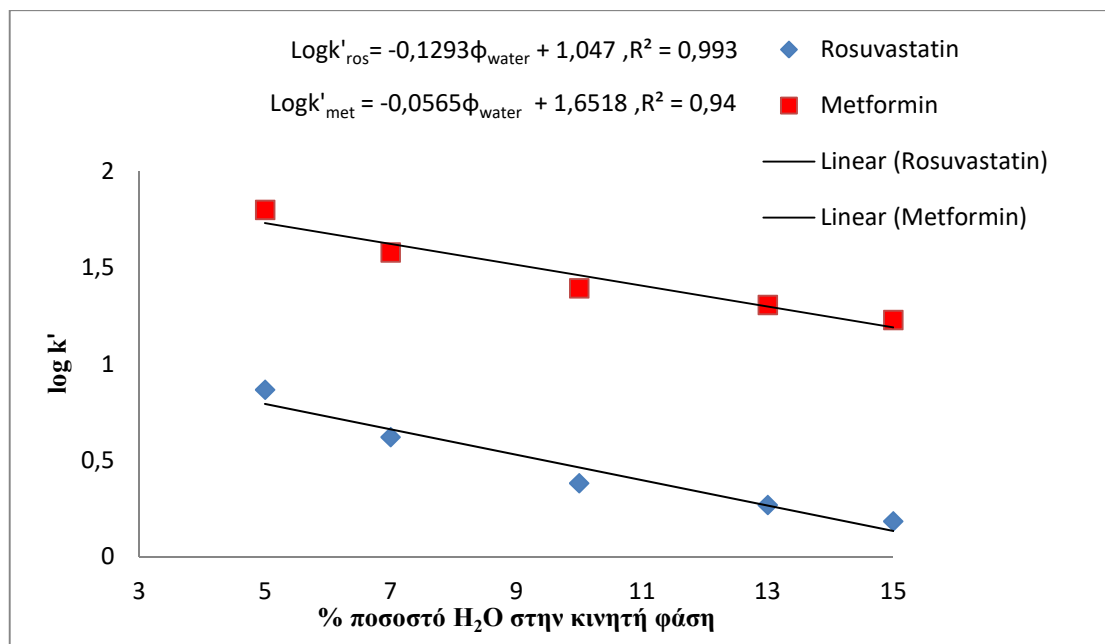


Σχήμα 4.3: Διάγραμμα της επίδρασης του % ποσοστού του νερού της κινητής φάσης στον παράγοντα χωρητικότητας των αναλυτών

Το νερό αποτελεί ισχυρό εκλουστικό μέσο στη χρωματογραφία HILIC. Από τα αποτελέσματα του παραπάνω σχήματος φαίνεται ότι η αύξηση του επί τοις εκατό ποσοστού του νερού στην κινητή φάση προκαλεί μείωση του χρόνου συγκράτησης άρα και μείωση του παράγοντα χωρητικότητας. Συγκεκριμένα, αυξάνοντας την

ποσότητα του νερού στην κινητή φάση ο παράγοντας χωρητικότητας της ροσουβαστατίνης μειώνεται ελάχιστα σε αντίθεση με τον παράγοντα χωρητικότητας τη μετφορμίνης που μειώνεται σε μεγάλο βαθμό. Σε κάθε περίπτωση, πρώτη εκλούεται η ροσουβαστατίνη και ακολουθεί στη συνέχεια η μετφορμίνη.

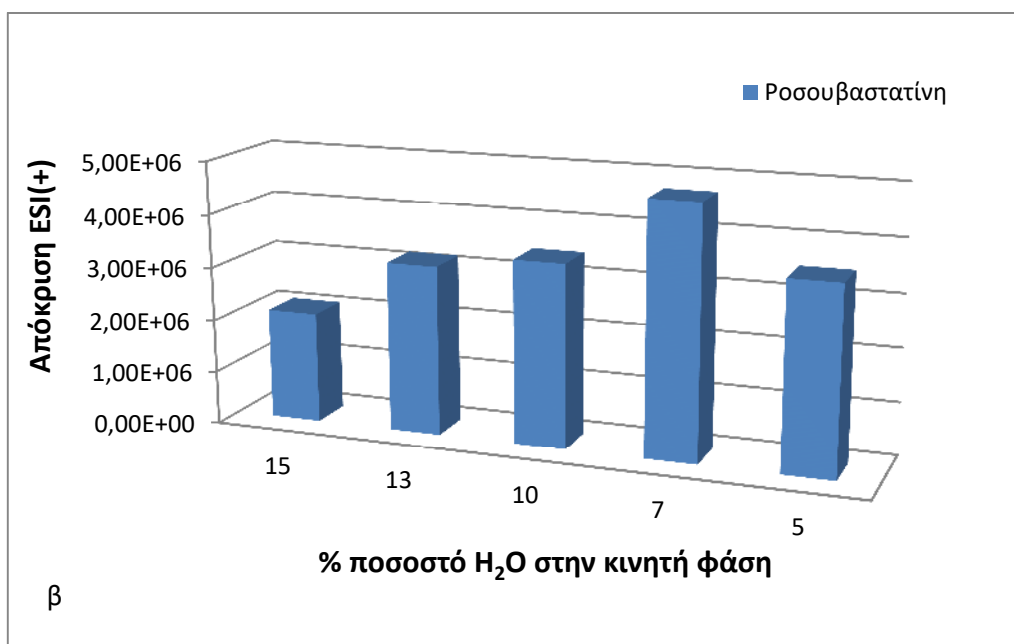
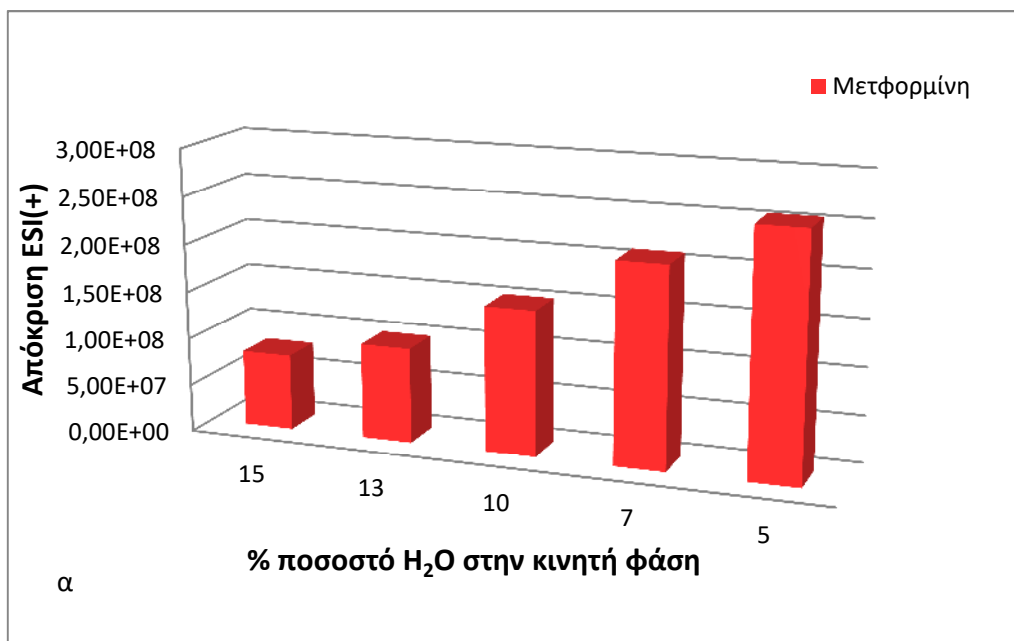
Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση του $\log k'$ για τους αναλύτες σε σχέση με το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση.



Σχήμα 4.4: Διάγραμμα της επίδρασης του % ποσοστού του νερού της κινητής φάσης στον παράγοντα χωρητικότητας $\log k'$ των αναλυτών

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στην τιμή $\log k'$ των αναλυτών σε σχέση με το ποσοστό νερού της κινητής φάσης (ϕ_{water}). Η γραμμικότητα που παρατηρείται επιβεβαιώνει πειραματικά πως για την κατακράτηση αυτών των αναλυτών στη στήλη παίζουν ρόλο φαινόμενα κατανομής. Ωστόσο, πιθανή είναι και η ύπαρξη ιοντικών αλληλεπιδράσεων των αναλυτών με τις ιοντισμένες ομάδες σιλανόλης της στατικής φάσης BEH-HILIC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Στο Σχήμα 4.5 (α,β) απεικονίζεται διαγραμματικά η μεταβολή που παρατηρήθηκε στα λαμβανόμενα σήματα των αναλυτών (εκφρασμένα ως απόκριση του ανιχνευτή, abundance) κατά τη μεταβολή του ποσοστού του νερού στην κινητή φάση.

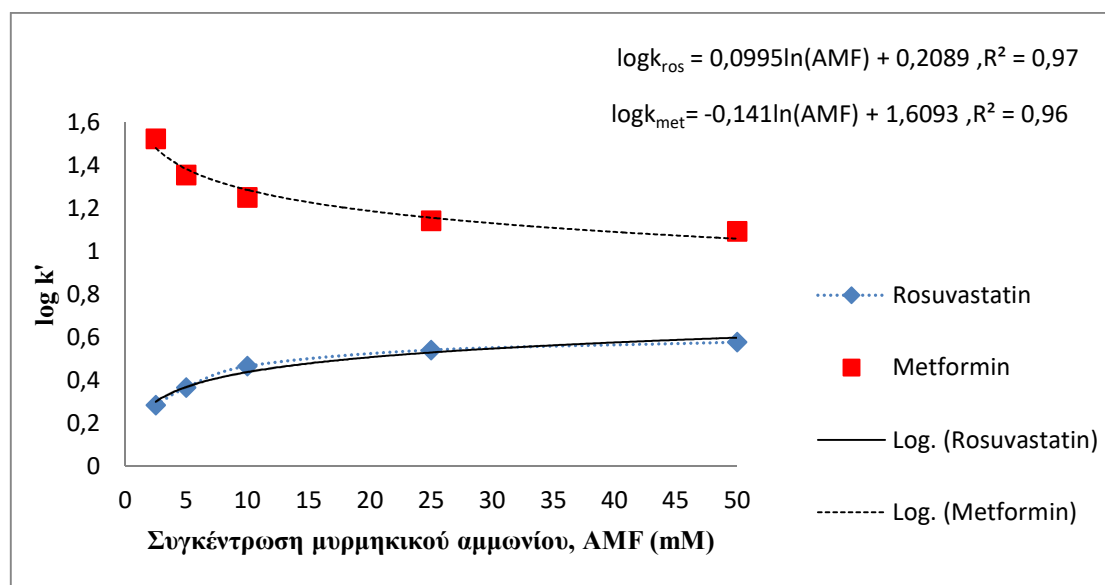


Σχήμα 4.5 (α,β): Διάγραμμα της επίδρασης του % ποσοστού νερού της κινητής φάσης στην απόκριση του φασματομέτρου μαζών για τη μετφορμίνη (α) και τη ροσουβαστατίνη (β).

Το ποσοστό του νερού της κινητής φάσης επηρεάζει σημαντικά το σήμα των αναλυτών όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.5. Συγκεκριμένα, αύξηση του ποσοστού του νερού της κινητής φάσης προκαλεί, όπως ήταν αναμενόμενο, ελάττωση του σήματος των μετρούμενων ιόντων στο φασματόμετρο μαζών. Όπως είναι φανερό η βέλτιστη τιμή σήματος για τη μετφορμίνη επιτυγχάνεται όταν το νερό αποτελεί το 5% σε αναλογία στην κινητή φάση ενώ για τη ροσουβαστατίνη όταν αποτελεί το 7%. Λόγω

όμως της πολύ μεγάλης αύξησης του χρόνου κατακράτησης της μετφορμίνης (45 λεπτά σε ποσοστό 5% και 21 λεπτά σε ποσοστό 7%) επιλέχθηκε η 90:10 (ν/ν) αναλογία ακετονιτριλίου – νερό για τα επόμενα πειράματα μελέτης μεθόδου.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη συγκράτηση και το σήμα των αναλυτών στη χρωματογραφία HILIC είναι η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης που καθορίζεται από το είδος και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος. 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 στην υδατική συνιστώσα της κινητής φάσης 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. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του μυρμηκικού αμμωνίου στη χρωματογραφία. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης, σε εύρος συγκεντρώσεων 2,5 έως 50 mM, ενώ το ποσοστό του νερού παρέμενε σταθερό στο 10%. Στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στον παράγοντα χωρητικότητας ($\log k'$) των αναλυτών.

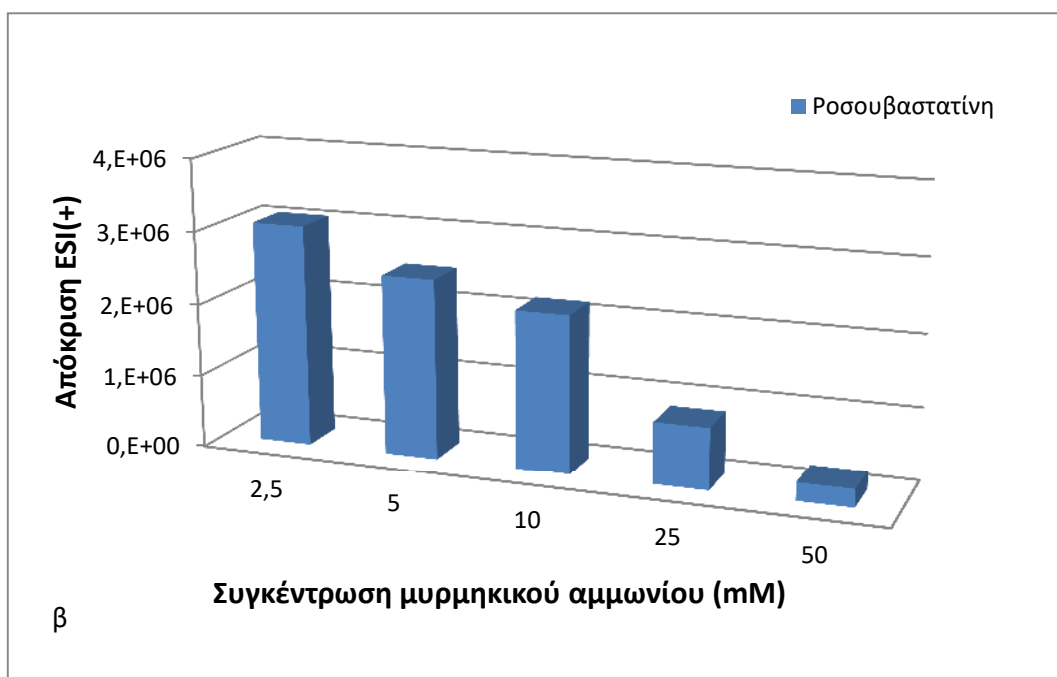
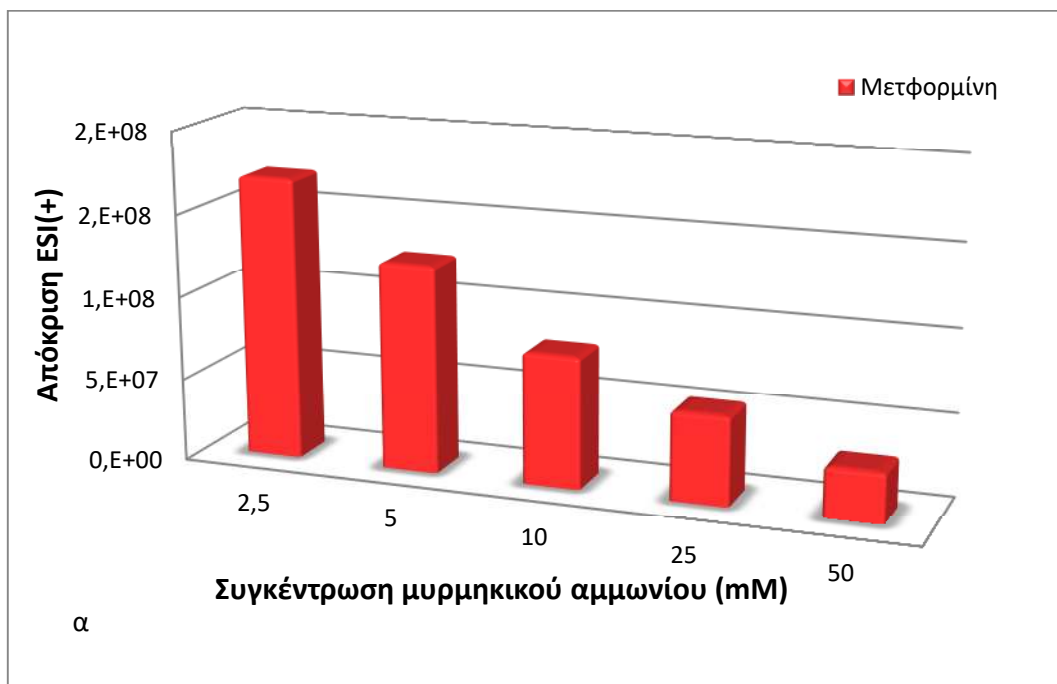


Σχήμα 4.6: Διάγραμμα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης στον παράγοντα χωρητικότητας $\log k'$ των αναλυτών

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η συγκράτηση της ροσουβαστατίνης αυξάνεται ελαφρώς με αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, ενώ παρατηρείται μείωση στη συγκράτηση της μετφορμίνης γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ιοντικών αλληλεπιδράσεων των αναλυτών με τυχόν ιοντισμένες ομάδες σιλανόλης της στατικής φάσης BEH-HILIC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αυτό είναι λογικό καθώς το υδατικό μέρος την κινητής φάσης έχει $pH=6,7$ με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης της στατικής φάσης να είναι αρνητικά φορτισμένες και ως εκ τούτου αναπτύσσονται απωστικές αλληλεπιδράσεις με το αρνητικά φορτισμένο μόριο της ροσουβαστατίνης σε αυτό το pH ενώ αντίθετα αναπτύσσονται ελκτικές αλληλεπιδράσεις με το θετικά φορτισμένο μόριο της μετφορμίνης. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του άλατος μειώνονται οι απωστικές αλληλεπιδράσεις για τη ροσουβαστατίνη επομένως εκλούεται πιο αργά ενώ αντίθετα μειώνονται οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις για τη μετφορμίνη επομένως εκλούεται πιο νωρίς.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται επίσης από την ύπαρξη λογαριθμικής σχέσης ανάμεσα στο $\log k'$ των δύο αναλυτών και το λογάριθμο της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου.

Στο Σχήμα 4.7 (α,β) απεικονίζεται διαγραμματικά η μεταβολή που παρατηρήθηκε στα λαμβανόμενα σήματα των αναλυτών (εκφρασμένα ως απόκριση του ανιχνευτή, abundance) κατά τη μεταβολή της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στην υδατική συνιστώσα της κινητής φάσης.



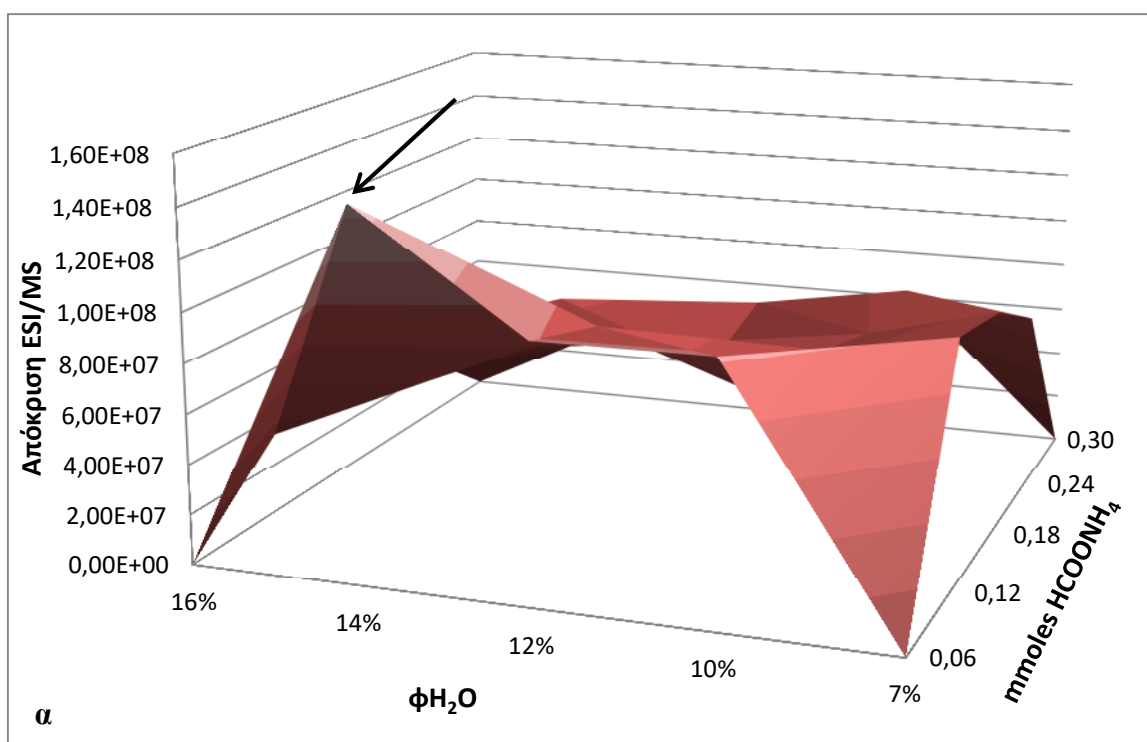
Σχήμα 4.7 (α,β): Διάγραμμα της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης στην απόκριση του φασματομέτρου μαζών για τη μετφορμίνη (α) και τη ροσουβαστατίνη (β).

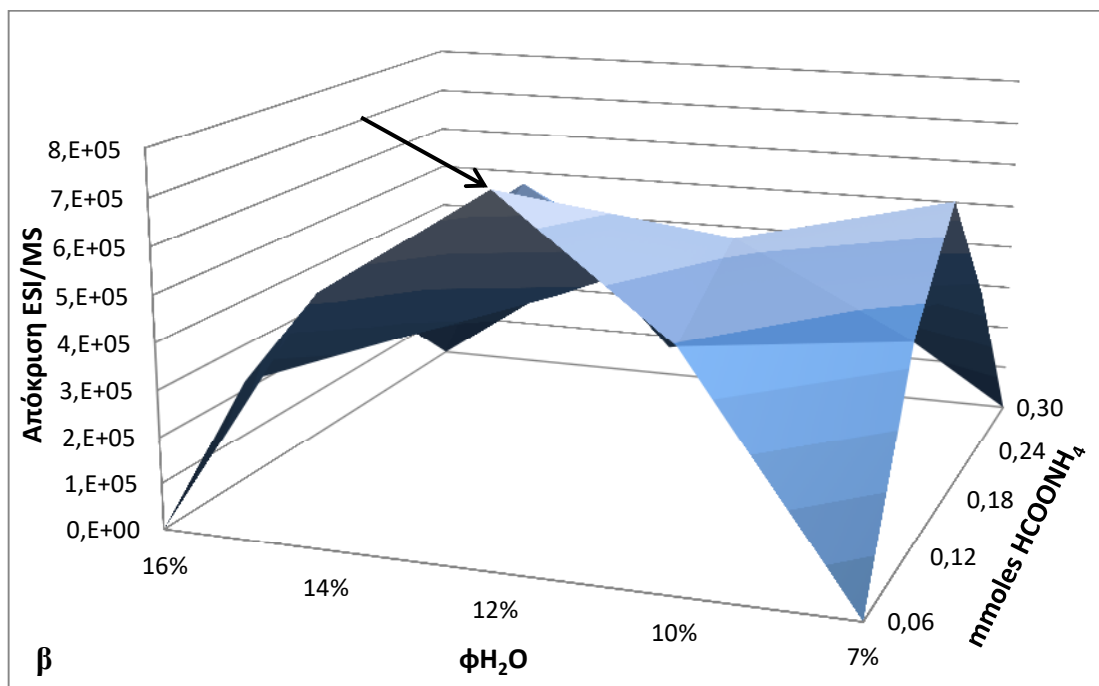
Όπως είναι φανερό από το Σχήμα 4.7, αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση προκαλεί μείωση του σήματος στο φασματομέτρο μαζών, λόγω του φαινομένου της ιοντικής καταστολής (ion suppression).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι προηγούμενες βέλτιστες συνθήκες (ακετονιτρίλιο-ποσοστό νερού με 5 mM μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 90:10

και ροή $0,25 \text{ mL min}^{-1}$) για την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος. Παρατηρήθηκε πως ο χρόνος της ανάλυσης έφτανε τα 30 λεπτά. Για να μειωθεί αυτός ο χρόνος αυξήθηκε η ροή σε $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες συνθήκες. Παρατηρήθηκε πως η ανάλυση έφτασε τα 21 λεπτά αλλά μειώθηκε πάρα πολύ το σήμα των αναλυτών στο φασματόμετρο μαζών. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μελέτες αναλύοντας μόνο εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος. Χρησιμοποιήθηκαν 21 κινητές φάσεις με τις οποίες μελετήθηκε η επίδραση του ποσοστού του νερού μεταβάλλοντας κάθε φορά τη συγκέντρωση του άλατος. Η ποσότητα του άλατος μυρμηκικού αμμωνίου μελετήθηκε σε εύρος $0,06 - 0,30 \text{ mmol}$ ενώ το ποσοστό του νερού μελετήθηκε σε εύρος $7 - 16 \%$.

Στο παρακάτω Σχήμα 4.8 (α,β) παρουσιάζεται το διαγράμμα επιφανείας για τη μελέτη της ταυτόχρονης επίδρασης της συγκέντρωσης του άλατος καθώς και του % ποσοστού του νερού στο σήμα του φασματομέτρου μαζών και για τους δύο αναλύτες.





Σχήμα 4.8: Διάγραμμα επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης και του % ποσοστό του νερού στην απόκριση του φασματομέτρου μαζών για τη μετφορμίνη (α) και τη ροσουβαστατίνη (β).

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, η μετφορμίνη παρουσιάζει τοπικό μέγιστο σε αναλογία κινητής φάσης ακετονιτρίλιου διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου 0,06 mmoles 86:14 ενώ η ροσουβαστατίνη παρουσιάζει τοπικό μέγιστο σε αναλογία κινητής φάσης ακετονιτρίλιου διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου 0,06 mmoles 88:12. Επιλέχθηκε η κινητή φάση στην οποία η ροσουβαστατίνη παρουσιάζει μεγαλύτερο σήμα και αυτό διότι βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ($C_{\max} \approx 25 \text{ ng mL}^{-1}$). Επίσης, προκειμένου να βελτιωθεί το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών όλων των αναλυτών, η συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου αυξήθηκε στα 15 mM. Τελικά, ως βέλτιστη κινητή φάση επιλέχθηκε η εξής:

Ακετονιτρίλιο : Νερό (15 mM μυρμηκικού αμμωνίου) σε αναλογία 88:12 (v/v)
και ταχύτητα ροής της κινητής φάσης: **0,25 mL min⁻¹**.

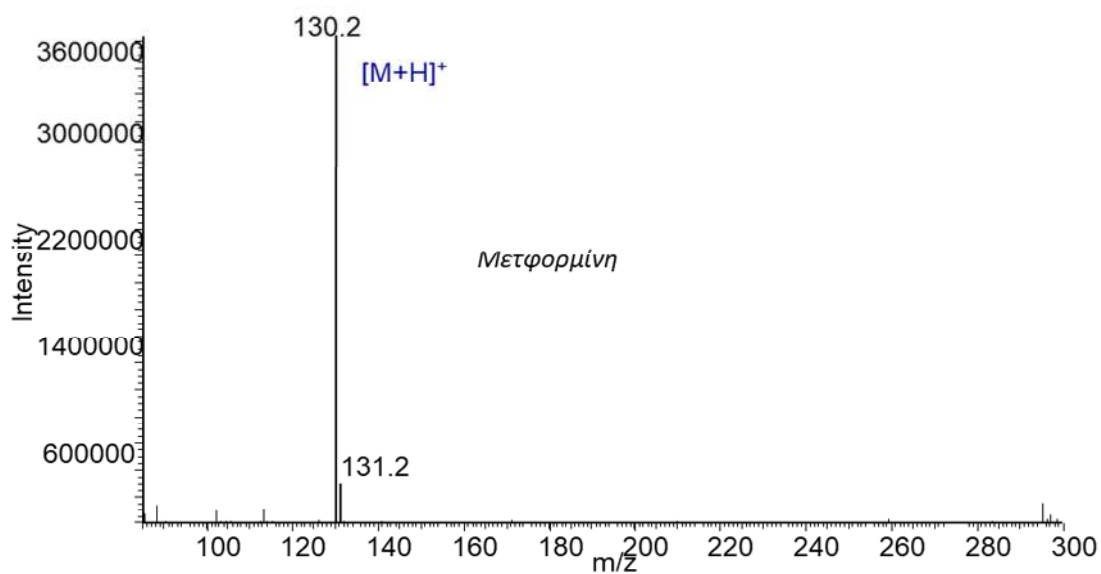
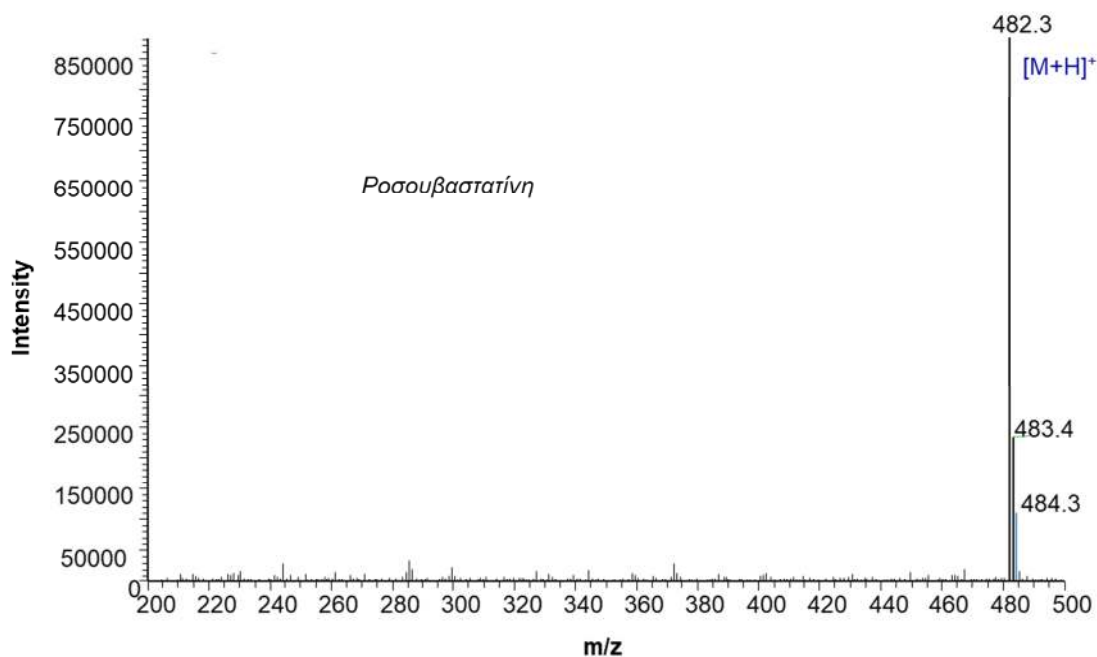
4.5 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών, έτσι ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη δυνατή αφθονία των μοριακών ιόντων για τους αναλύτες. Για τις μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκε απευθείας έκχυση (infusion) στο φασματόμετρο μαζών διαλυμάτων των ουσιών

συγκέντρωσης 5000 ng mL^{-1} . Για την απαραίτητη αραίωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση και η ροή εισαγωγής τους στο φασματόμετρο μαζών ήταν 250 mL min^{-1} . Για τον ιοντισμό των αναλυτών στο φασματόμετρο μαζών επιλέχθηκε η τεχνική του ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης (electrospray ionization, ESI). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το είδος του ιοντισμού (θετικός ή αρνητικός ιοντισμός, positive ή negative ion mode), η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού (ESI probe temperature), η τάση του τριχοειδούς (capillary voltage), και το δυναμικό της πηγής ιοντισμού (cone voltage, AQAmax).

Η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίστηκε στους 260°C , στη μικρότερη δηλαδή δυνατή τιμή που αντιστοιχεί σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανή θερμοδιάσπαση των αναλυόμενων ουσιών. Βρέθηκε ότι η τάση του τριχοειδούς επηρεάζει τη συμπεριφορά των αναλυτών αυξάνοντας το σήμα τους στο φασματογράφο μαζών και έτσι ρυθμίστηκε στην τιμή 4.8 kV . Ως τελευταίος παράγοντας μελετήθηκε η συμπεριφορά των αναλυτών 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. Παρατηρήθηκε, στην περίπτωση και των δύο αναλυτών, πως μεγαλύτερη αφθονία των μοριακών ιόντων ($[M+H]^+$) ελήφθησαν όταν ο ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος να παράγει και να μετρά θετικά ιόντα (ESI positive ionization mode). Γι'αυτό το λόγο, ως βέλτιστη τεχνική παρακολούθησης επιλέχθηκε η τεχνική του θετικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για όλες τις ενώσεις.

Υπό τις παραπάνω συνθήκες, ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των αναλυτών μεταβάλλοντας την τάση της πηγής ιοντισμού (AQAmax). Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη αφθονία των θετικά φορτισμένων ιόντων των αναλυτών εμφανίστηκε όταν το δυναμικό της πηγής ρυθμίστηκε στα 20V . 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 δύο αναλυτών παρουσιάζονται στα σχήματα 4.9A και 4.9B.

A**B**

Σχήμα 4.9: Φάσματα μαζών της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης σε συνθήκες esi (+).

Στον Πίνακα 4.2 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 4.2: Μέθοδος μέτρησης της ροσουβαστατίνης, της μετφορμίνης και του εσωτερικού προτύπου, χρησιμοποιώντας την Τεχνική Παρακολούθησης Προεπιλεγμένου Ιόντος (SIM)

Χρονικό Παράθυρο (min)	Ουσία	Μηχανισμός Ιοντισμού	Τάση Πηγής Ιοντισμού	Τάση Τριχοειδούς	Ιόντα Παρακολούθησης [M+H] ⁺	Εύρος Μαζών (mass span)
0 – 14	Ροσουβαστατίνη	ESI (+)	20V	4,8kV	482,3	0,1
0 – 14	Μετφορμίνη	ESI (+)	20V	4,8kV	130,2	0,1
0 – 14	N-Despropyl Ropinirole	ESI (+)	20V	4,8kV	219,1	0,1

Συγκεκριμένα, η ανίχνευση της ροσουβαστατίνης και της μετφορμίνης γίνεται με παρακολούθηση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος, [M+H]⁺, σε τιμή m/z 482,3 και 130,2 αντίστοιχα. Για το εσωτερικό πρότυπο ως ιόν παρακολούθησης επιλέχθηκε το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν [M+H]⁺, σε τιμή m/z 219,1. 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. Η τελική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιείται με κατεργασία των αποτελεσμάτων με Gaussian=7 και polynomial=3 για όλους τους αναλύτες.

4.6 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC/MS

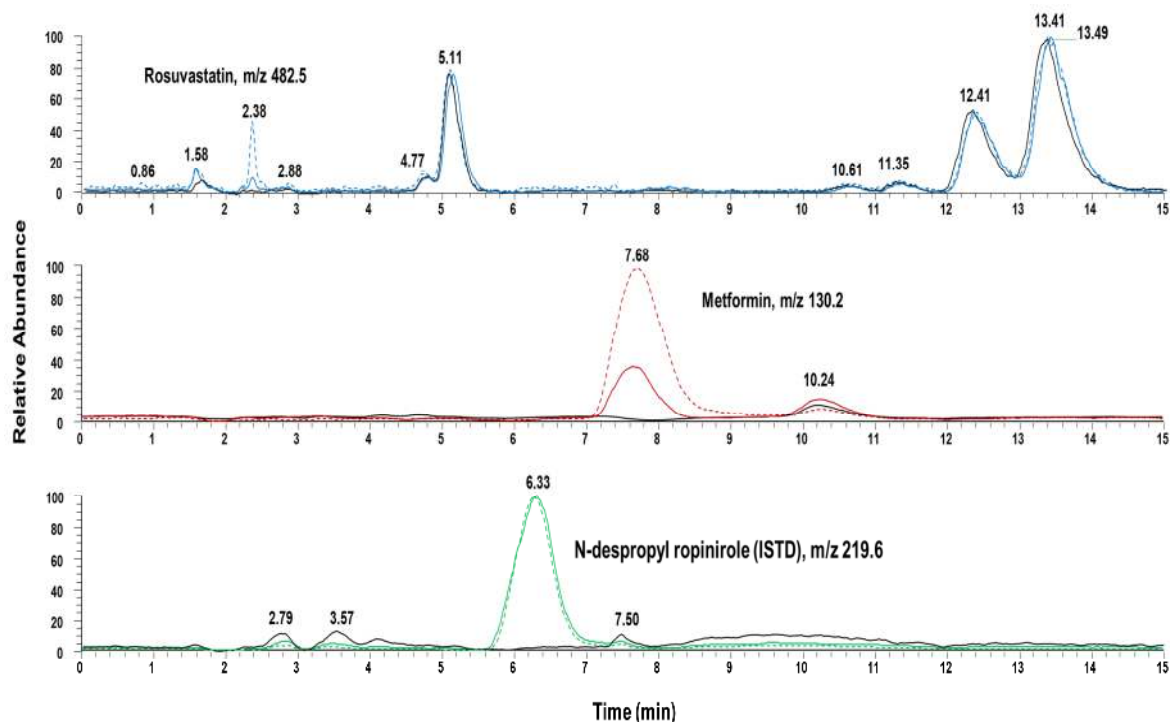
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης τόσο του υγροχρωματογραφικού συστήματος, όσο και του φασματομέτρου μαζών καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών:

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης 14 λεπτά, ο βρόχος εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 μL.

- **Στατική Φάση:** Χρωματογραφική στήλη HILIC-BEH, 150x2.1, μεγέθους σωματιδίων 3.5μm.
- **Κινητή Φάση:** Υδατικό διάλυμα 15mM μυρμηκικού αμμωνίου σε ακετονιτρίλιο σε αναλογία 12:88, v/v.
- **Ταχύτητα ροής:** 0,25 ml min⁻¹

- **Ανιχνευτής:** Φασματόμετρο μαζών ρυθμισμένο να μετρά με την τεχνική SIM τα μοριακά ιόντα των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου που παράγονται με θετικό ιοντισμό και μηχανισμό ηλεκτροδιάχυσης. Η πηγή ιοντισμού λειτουργούσε σε θερμοκρασία 260 °C, η τάση (AQAmx) της πηγής ρυθμίστηκε στα 20 V, ενώ το δυναμικό του τριχοειδούς στα 4,8kV.

Στο Σχήμα 4.10 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό ιοντικό χρωματογράφημα που προήλθε από την ανάλυση ενός δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με 20 ng mL⁻¹ ροσουβαστατίνης, 1000 ng mL⁻¹ μετφορμίνης και 3850 ng mL⁻¹ εσωτερικού προτύπου και ενός άλλου δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με 2 ng mL⁻¹ ροσουβαστατίνης, 100 ng mL⁻¹ μετφορμίνης και 3850 ng mL⁻¹ εσωτερικού προτύπου. Το χρωματογράφημα ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS με την τεχνική Παρακολούθησης Προεπιλεγμένου Ιόντος (SIM), σε διαφορετικά χρονικά παράθυρα (Πίνακας 4.2).



Σχήμα 4.10: Χρωματογράφημα λευκού δείγματος πλάσματος (μαύρη γραμμή) αλληλοεπικαλυμένο με χρωματογραφήματα μαζών που προέκυψαν από εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος με 2 ng mL⁻¹ (διακεκομμένη γραμμή) και 20 ng mL⁻¹ (συνεχής γραμμή) ροσουβαστατίνης (μπλέ γραμμή), 100 ng mL⁻¹ (διακεκομμένη γραμμή) and 1000 ng mL⁻¹ (συνεχής γραμμή) μετφορμίνης (κόκκινη γραμμή) και 3800 ng mL⁻¹ εσωτερικού προτύπου (πράσινη γραμμή)

Με τις παραπάνω συνθήκες ο χρόνος έκλουσης για τη ροσουβαστατίνη είναι 2,4 λεπτά και για τη μετφορμίνη 7,7 λεπτά ενώ το εσωτερικό πρότυπο εκλούεται στα 6,3 λεπτά.

4.7 Εφαρμογή της μεθόδου HILIC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων Ροσουβαστατίνη, Μετφορμίνη σε ανθρώπινο πλάσμα.

4.7.1 Ανθρώπινο πλάσμα

Το αίμα είναι ένα ιξώδες υγρό, κόκκινου χρώματος, με καθορισμένο pH (7,40), που περιέχει όλες τις ενδογενείς ουσίες του οργανισμού και κυτταρικά στοιχεία 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.

Ο ορός του αίματος είναι ένα υποκίτρινο, σχετικά διαυγές υγρό, που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση του αίματος χωρίς τη χρήση αντιπηκτικού.

Το πλάσμα αποτελεί το χωρίς κύτταρα μέρος του ανθρώπινου αίματος (εξωκυττάριο υγρό). Είναι το υπερκείμενο κιτρινωπό υγρό, που λαμβάνεται μετά από προσθήκη αντιπηκτικού (EDTA, ηπαρίνη, κιτρικά) 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.

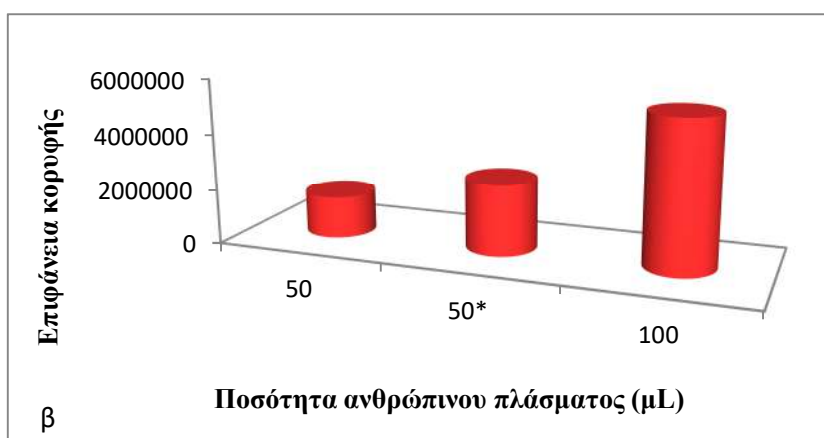
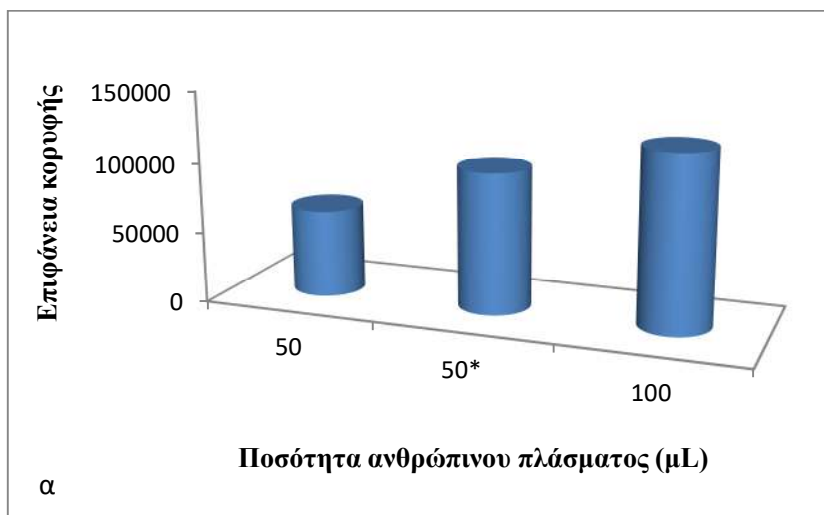
4.7.2 Προετοιμασία βιολογικού δείγματος

Στην παρούσα εργασία ως μέθοδος κατεργασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται συνήθως διαλύματα μεθανόλης, ακετονιτρίλιου ή οξέος σε αναλογία μεγαλύτερη από 3:1 (v/v) με το πλάσμα και περιλαμβάνει έντονη ανακίνηση για λίγα λεπτά και φυγοκέντρηση. Πρόκειται για μια σχετικά ατελή μέθοδο καθαρισμού, διότι δεν απομακρύνονται πολλά ενδογενή συστατικά, όμως είναι ιδιαίτερα γρήγορη, απλή και οικονομική σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους κατεργασίας βιολογικών υγρών.

Με σκοπό να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες κατεργασίας, σχεδιάστηκε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου και της επίδρασης της αναλογίας του ακετονιτρίλιου με το πλάσμα στη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Επίσης, μελετήθηκαν πολλά φίλτρα διήθησης του βιολογικού δείγματος. Αναλυτικά, μελετήθηκαν οι ακόλουθες αναλογίες διαλυμάτων με σκοπό την κατεργασία του βιολογικού δείγματος:

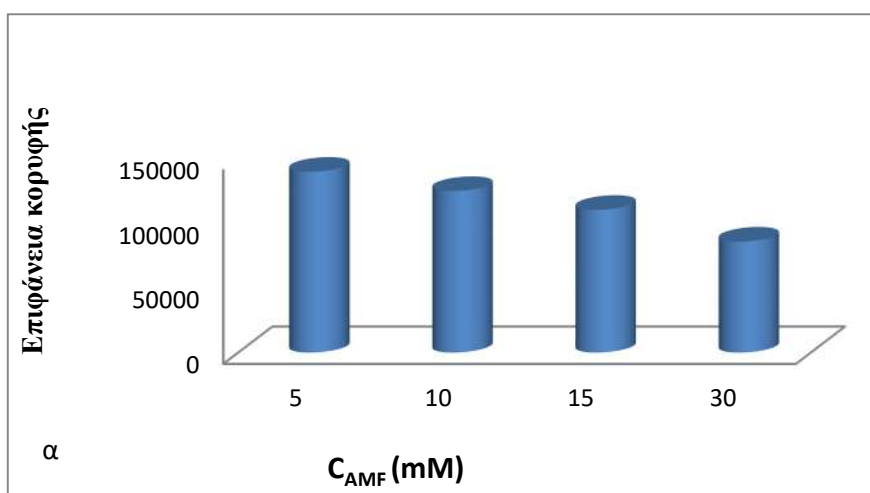
1. 50 μL πλάσμα + 50 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 5,0 mM HCOONH_4 + 820 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
2. 50 μL πλάσμα + 50 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 5,0 mM HCOONH_4 + 720 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση δύο φορές και μετά ένεση
3. 100 μL πλάσμα + 100 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 5,0 mM HCOONH_4 + 720 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
4. 100 μL πλάσμα + 100 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 10,0 mM HCOONH_4 + 720 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
5. 100 μL πλάσμα + 100 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 15,0 mM HCOONH_4 + 720 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
6. 100 μL πλάσμα + 100 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 30 μL 30,0 mM HCOONH_4 + 720 μL ακετονιτρίλιο $\rightarrow$ Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση

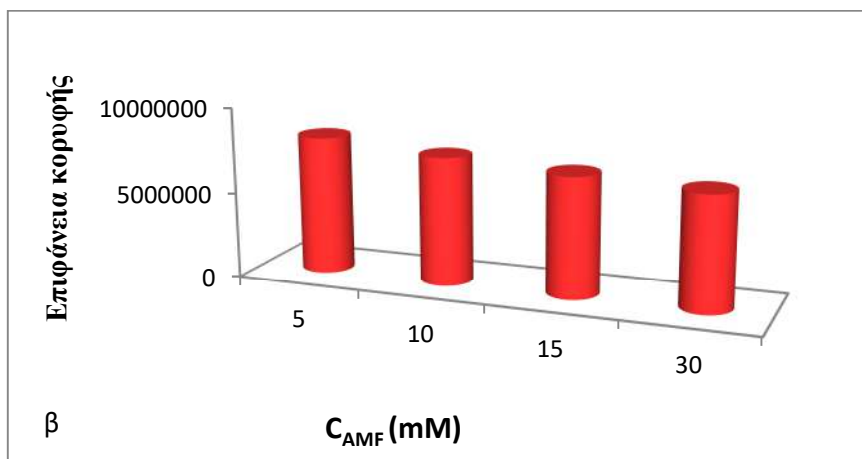
Στα πειράματα 1 – 3 (Σχήμα 4.11 α,β) παρατηρείται πως με αύξηση της ποσότητας του πλάσματος στα 100 mL οι αναλύτες έχουν μεγαλύτερο σήμα.



Σχήμα 4.11: Διάγραμμα της επίδρασης της ποσότητας του πλάσματος στην απόκριση του φασματομέτρου μαζών για τη ροσουβαστατίνη (α) και τη μετφορμίνη (β).

Στα πειράματα 3 – 6 (Σχήμα 4.12 α,β) παρατηρείται πως με αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου προκαλείται μείωση σήματος στο φασματομέτρο μαζών και για τους δύο αναλύτες.





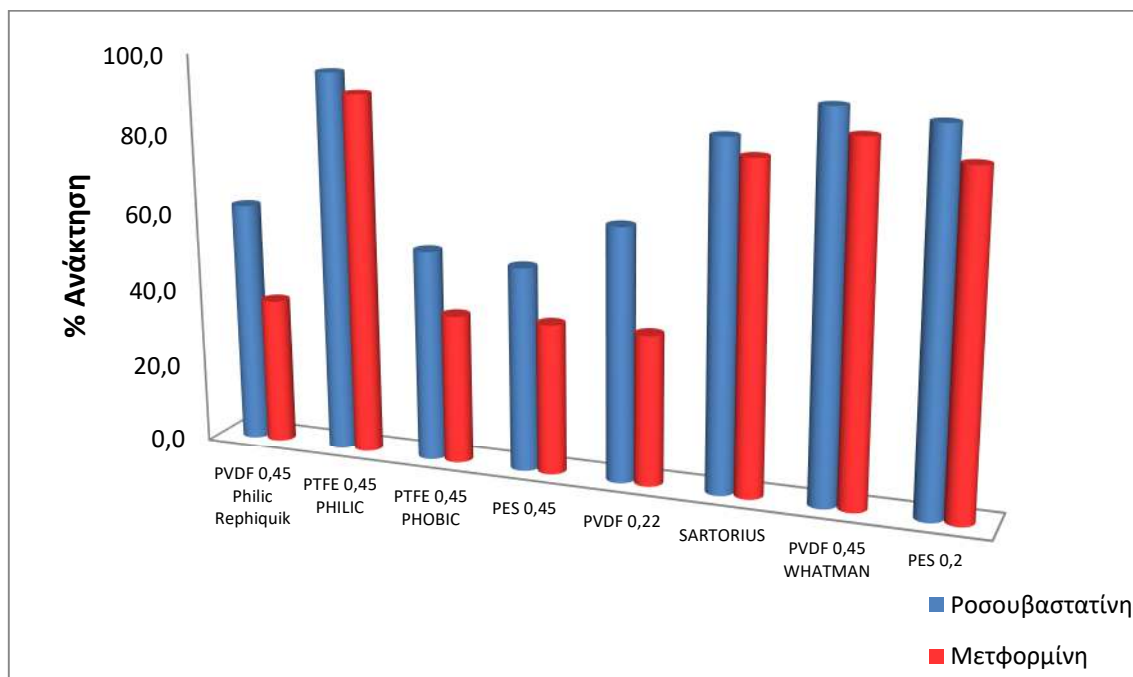
Σχήμα 4.12: Διάγραμμα της επίδρασης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης στην απόκριση του φασματομέτρου μαζών για τη μετφορμίνη (α) και τη ροσουβαστατίνη (β).

Επομένως, με σκοπό να προσδιοριστούν όλοι οι αναλύτες η δοκιμασία 3 κρίθηκε η πλέον κατάλληλη.

Δοκιμάστηκαν πολλά φίλτρα διήθησης με σκοπό την εύρεση εκείνου όπου οι αναλύτες θα παρουσίαζαν ικανοποιητική ανάκτηση και χρωματογραφική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εξής φίλτρα:

- PTFE 0,45 μm Hydrophilic Millipore
- PTFE 0,45 μm Hydrophobic Rephiquik
- PVDF 0,45 μm Philic Rephiquik
- PVDF 0,22 μm
- PVDF 0,45 μm Whatman
- PES 0,45 μm
- PES 0,22 μm
- Sartorius 0,45 μm RC

Στο παρακάτω Σχήμα 4.13 παρουσιάζεται το διάγραμμα της επι τοις εκατό ανάκτησης των αναλυτών σύμφωνα με τα διηθητικά φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 4.13: Διάγραμμα της επίδρασης διαφορετικών διηθητικών φίλτρων στην %ανάκτηση της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης.

Από τα φίλτρα που δοκιμάστηκαν καλύτερα αποδείχθηκαν τα μικροφίλτρα Millipore PTFE Hydrophilic 0,45μm. Αναλυτικά η πορεία της κατακρήμνισης πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Σε ακριβώς 100 μL πλάσματος προστίθενται 50 μL διαλύματος N-Despropyl Ropinirole ($3,80 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL μικτού δείγματος εργασίας των αναλυτών, 30 μL διαλύματος άλατος 5 mM HCOONH_4 και 720 μL ακετονιτριλίου. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex για ένα λεπτό και φυγοκέντρηση στους 25°C με 16000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά. Ακολουθεί παραλαβή του υπερκείμενου υγρού, διήθηση με φίλτρα Millipore PTFE 0,45μm και εισαγωγή στο σύστημα LC-MS.

4.8 Αξιολόγηση της μεθόδου

4.8.1 Έλεγχος γραμμικότητας- καμπύλες αναφοράς

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρεις καμπύλες αναφοράς σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες σε περίοδο τριών εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος που παρασκευάζονται με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε. Κάθε ένα από αυτά τα δείγματα ενίεται δύο φορές στο σύστημα LC-MS. Σε κάθε μέτρηση υπολογίζονται οι λόγοι των επιφανειών των κορυφών του κάθε αναλύτη προς την επιφάνεια της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (Area Ratio).

Στους Πίνακες 4.3 και 4.4 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάθε εργαστηριακής ημέρας για κάθε μία από τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Σε κάθε πίνακα παρουσιάζεται η θεωρητική τιμή της συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη, η μέση τιμή του λόγου των επιφανειών, η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, καθώς και το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα γραφικών παραστάσεων με τις καμπύλες αναφοράς της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης που προέκυψαν μετά από ανάλυση της πρώτης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.14.

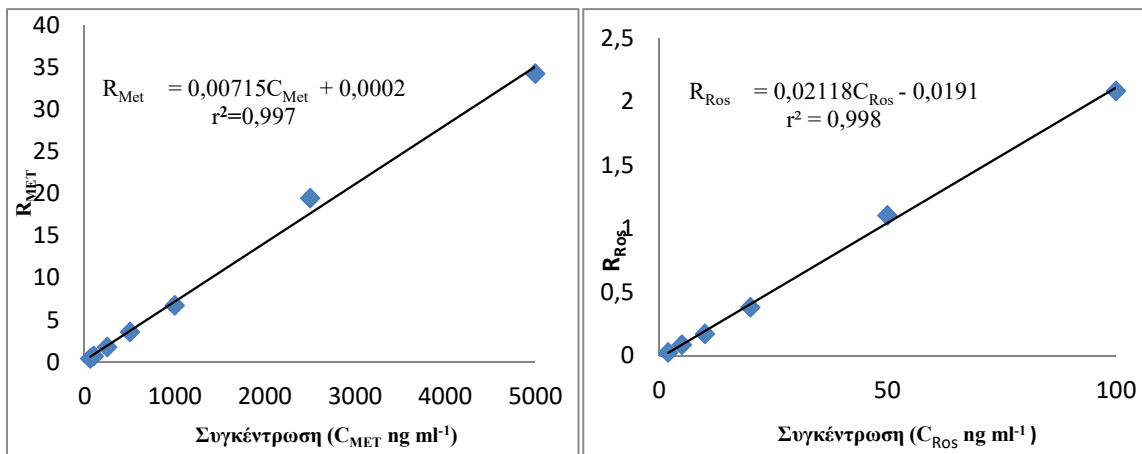
Πίνακας 4.3 Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών αναφοράς της μετφορμίνης

Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειών x 10 _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
62,5	0,43937	61,5	-1,6
	0,57831	65,8	5,2
	0,56607	66,5	6,5
100	0,73016	102,1	2,1
	0,75847	91,3	-8,7
	0,73177	89,5	-10,5
250	1,81754	254,2	1,7
	1,99274	266,1	6,4
	2,05438	272,4	1,0
500	3,59988	503,5	0,7
	4,03017	554,7	10,9
	4,11595	557,5	11,5
1000	6,75540	944,8	-5,5
	6,56212	913,3	-8,7
	6,59610	900,6	-9,9
2500	19,4712	2723,3	8,9
	19,1207	2692,2	7,7

	19,6975	2712,7	8,5
	34,2537	4790,7	-4,2
5000	33,7762	4768,0	-4,6
	34,5407	4765,7	-4,7

Πίνακας 4.4 Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών αναφοράς της ροσουβαστατίνης

Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειών x 100 _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
	0,02653	2,2	7,7
2	0,02372	2,3	14,3
	0,02567	2,0	-1,1
	0,06660	5,1	1,1
5	0,06498	4,7	-5,9
	0,07320	4,7	-5,6
	0,17141	9,0	-10,1
10	0,13755	8,7	-12,9
	0,13969	9,9	-0,7
	0,38043	18,9	-5,7
20	0,32305	19,2	-4,1
	0,32006	22,5	12,5
	1,10404	53,0	6,1
50	0,96075	55,2	10,3
	0,69833	48,9	-2,2
	2,08329	99,3	-0,7
100	1,71568	97,8	-2,2
	1,42132	99,3	-0,7



Σχήμα 4.14: Χαρακτηριστικό παράδειγμα γραφικών παραστάσεων με τις καμπύλες αναφοράς της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης που προέκυψαν μετά από ανάλυση της πρώτης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος.

Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS ver. 22.0. Σε όλες τις καμπύλες αναφοράς εφαρμόζεται ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, ως συντελεστής στατιστικού βάρους για τη μετφορμίνη χρησιμοποιείται ο όρος $w=1/\gamma^2$ (όπου γ είναι ο λόγος των επιφανειών πολλαπλασιαζόμενος με τον αντίστοιχο αριθμητικό όρο) και ο όρος $w=1/\gamma$ για τη ροσουβαστατίνη. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5. Για κάθε μία υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης r , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης αναφοράς S_r , η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου καθώς και η τυπική απόκλιση της κλίσης. Επιπλέον πραγματοποιείται στατιστικός έλεγχος των καμπυλών αναφοράς για να ελεγχθεί αν ο σταθερός όρος για κάθε καμπύλη είναι διάφορος ή όχι του μηδενός. Για το σκοπό, αυτό εφαρμόζεται η δοκιμασία Student (t - test). Όπως παρατηρούμε στον πίνακα για τις καμπύλες των αναλυτών, $t_{πειρ} < t_{θεωρητικού} = 2,36$. Ο όρος $t_{θεωρητικού}$ αντιστοιχεί στη θεωρητική τιμή της δοκιμασίας για $f=n-2=5$ βαθμούς ελευθερίας (df) και στάθμη εμπιστοσύνης 95 % (σύμφωνα με τους πίνακες two - tailed t - test). Επομένως, η τιμή του σταθερού όρου για όλες τις καμπύλες αναφοράς δε διαφέρει σημαντικά από το μηδέν.

Στον Πίνακα 4.5 που ακολουθεί, παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του αναλύτη για κάθε εργαστηριακή ημέρα. Παρατηρούμε ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από

γραμμικότητα και για την προσδιοριζόμενη ουσία και για τις τρεις σειρές μετρήσεων. Η μέση τιμή του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient, r) για τη μετφορμίνη είναι 0,996 και για τη ροσουβαστατίνη είναι 0,998.

Πίνακας 4.5 Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς της μετφορμίνης και ροσουβαστατίνης 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		
Μετφορμίνη	62,5 - 5000	$R_{Met} = 0,00715 \times C_{Met} - 0,0002$	0,998	0,00018	0,025	0,051	0,01
		$R_{Met} = 0,00706 \times C_{Met} + 0,114$	0,995	0,00031	0,049	0,086	2,33
		$R_{Met} = 0,00723 \times C_{Met} + 0,085$	0,993	0,00017	0,056	0,10	1,51
Ροσουβαστατίνη	2 - 100	$R_{Ros} = 0,02118 \times C_{Ros} - 0,0191$	0,999	0,00054	0,0083	0,046	2,30
		$R_{Ros} = 0,01772 \times C_{Ros} - 0,0168$	0,997	0,00067	0,0085	0,062	1,98
		$R_{Ros} = 0,01434 \times C_{Ros} - 0,0027$	0,999	0,00034	0,0047	0,034	0,56

^a Λόγοι του εμβαδού κορυφής της μετφορμίνης, R_{Met} και της ροσουβαστατίνης, R_{Ros} σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της μετφορμίνης, C_{Met} και της ροσουβαστατίνης, C_{Ros} .

^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 = 7 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,36.

Πίνακας 4.6 Μέση τιμή των αποτελεσμάτων της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς των αναλυτών 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		
Μέση τιμή των καμπυλών αναφοράς							
Μετφορμίνη	62,5 - 5000	R _{Met} = 0,00715 × C _{Met} + 0,066	≥ 0,996	0,00022	0,043	≤ 0,10	≤ 2,33
Ροσουβαστατίνη	2 - 100	R _{Ros} = 0,01775 × C _{Ros} - 0,0129	≥ 0,998	0,00052	0,0072	≤ 0,062	≤ 2,30

^a Λόγοι του εμβαδού κορυφής της μετφορμίνης, R_{Met} και της ροσουβαστατίνης, R_{Ros}, σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της μετφορμίνης, R_{Met} και της ροσουβαστατίνης, R_{Ros}.

^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 = 7 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,36.

4.8.2 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 επικύρωση των μεθόδων αυτών. Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη. Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Er). Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

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 διά των ημερών (between days ή inter day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (quality control samples) που παρασκευάσθηκαν όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4 και τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών αναφοράς. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) και για τους δύο αναλύτες. Για τη μετφορμίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις $62,5 \text{ ng mL}^{-1}$, 500 ng mL^{-1} και 5000 ng mL^{-1} ενώ για τη ροσουβαστατίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 2 ng mL^{-1} , 10 ng mL^{-1} και 100 ng mL^{-1} . Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάσθηκαν 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).

Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD), ενώ ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (%Er). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver. 22.0. Για την εξαγωγή των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιείται η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA) η οποία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver. 22.0.

Πιο συγκεκριμένα οι παράμετροι που υπολογίζονται είναι οι ακόλουθες:

- η ολική μέση τιμή των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων
- η εντός της ημέρας σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{intra day})
- η μεταξύ των ημερών σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{inter day})
- το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα (%E_r)

Οι υπολογισμοί για κάθε ουσία γίνονται για 15 βαθμούς ελευθερίας που αντιστοιχούν στις 15 αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης (n=15).

Στον Πίνακα 4.7 και 4.8 παρουσιάζονται οι πειραματικά υπολογιζόμενες τιμές συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη και οι τιμές των παραπάνω στατιστικών παραμέτρων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, όπως αυτές υπολογίζονται μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων εφαρμόζοντας τη μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA).

Πίνακας 4.7: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου LC-ESI/MS για τον προσδιορισμό της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης σε ανθρώπινο πλάσμα

Μετφορμίνη	Συγκέντρωση (ng ml ⁻¹)		
Θεωρητική συγκέντρωση	62,5	500	5000
Σειρά 1 (mean ± S.D)	63,9 ± 6,1	489,1 ± 29	504,5 (x10) ± 35
Σειρά 2 (mean ± S.D)	64,3 ± 5,1	516,5 ± 43	469,8 (x10) ± 14
Σειρά 3 (mean ± S.D)	60,1 ± 6,0	488,2 ± 39	476,8 (x10) ± 23
Αριθμός μετρήσεων (n)	15	15	15
Ολική Μέση Τιμή (overall mean)	62,7	497,9	4837,4
Μέσο τετράγωνο intra day (MS intra)	32,896	1417,509	66163,757
Μέσο τετράγωνο inter day (MS inter)	26,829	1290,006	168038,981
Εντός της ημέρας %σχετική τυπική απόκλιση (% RSD intra day)	9,1	7,6	5,3
Μεταξύ των ημερών %σχετική τυπική απόκλιση (% RSD inter day)	1,8	1,0	3,0
%Σχετικό σφάλμα (%Er)	0,4	-0,4	-3,3

Πίνακας 4.8: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου LC-ESI/MS για τον προσδιορισμό της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης σε ανθρώπινο πλάσμα			
Ροσουβαστατίνη	Συγκέντρωση (ng ml⁻¹)		
Θεωρητική συγκέντρωση	2	10	100
Σειρά 1 (mean ± S.D)	2,3 ± 0,2	9,4 ± 0,3	104,0 ± 6,6
Σειρά 2 (mean ± S.D)	2,1 ± 0,2	9,6 ± 0,9	96,5 ± 5,7
Σειρά 3 (mean ± S.D)	2,0 ± 0,2	10,8 ± 0,5	96,2 ± 9,0
Αριθμός μετρήσεων (n)	15	15	15
Ολική Μέση Τιμή (overall mean)	2,1	9,9	98,9
Μέσο τετράγωνο intra day (MS intra)	0,033	0,371	52,701
Μέσο τετράγωνο inter day (MS inter)	0,078	2,834	96,339
Εντός της ημέρας %σχετική τυπική απόκλιση (% RSD intra day)	8,5	6,2	7,3
Μεταξύ των ημερών %σχετική τυπική απόκλιση (% RSD inter day)	4,4	7,1	3,0
%Σχετικό σφάλμα (%Er)	7,0	-1,0	-1,1

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η εντός της ημέρας η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται για τη μετφορμίνη μεταξύ των τιμών 5,3 έως 9,1 και για τη ροσουβαστατίνη από 6,2 έως 8,5. Η μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση για τη μετφορμίνη κυμαίνεται από 1,0 έως 3,0 και για τη

ροσουβαστατίνη από 3,0 έως 7,1. Τέλος, η ορθότητα της μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα βρέθηκε να κυμαίνεται από -1,6 έως 0,3 για τη μετφορμίνη και από -0,1 έως 1,0 για τη ροσουβαστατίνη.

4.8.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του ICH Topic Q2B.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση (1):

$$LOD = 3.3 \frac{SD}{b} \quad (1)$$

όπου SD είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των y , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς (standard deviation of the y -intercept) και b είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς (slope).

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση (5):

$$LOQ = 10 \frac{SD}{b} \quad (5)$$

όπου SD είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των y , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς (standard deviation of the y -intercept) και b είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς (slope).

Όπως αποδείχθηκε και από τον έλεγχο της ακρίβειας και επαναληψιμότητας της μεθόδου, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα που ελήφθησαν μεταξύ διαφορετικών ημερών. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός αυτό, ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα από μια σειρά μετρήσεων.

Η εξισώσεις των καμπύλων αναφοράς που ελήφθησαν μετά από ανάλυση της δεύτερης σειράς εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος και εφαρμογή της ζυγισμένης γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης είναι για τη μετφορμίνη (Met) και τη ροσουβαστατίνη (Ros) οι ακόλουθες:

$$\text{➤ } (\text{Area Ratio})_{\text{Met}} = 0,00715 \times C_{\text{Met}} - 0,0002 \quad SD_{\text{Met}} = 0,025 \quad \textbf{(6)}$$

$$\text{➤ } (\text{Area Ratio})_{\text{Ros}} = 0,01921 \times C_{\text{Ros}} - 0,0191 \quad SD_{\text{Ros}} = 0,0021 \quad \textbf{(7)}$$

Με αντικατάσταση των παραπάνω τιμών στην εξίσωση (4) υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για καθέναν από τους τρεις αναλύτες:

$$\text{✦ } LOD_{\text{Met}} = 3,3 \times 0,025 / 0,00715 \quad \Rightarrow \textbf{LOD}_{\text{Met}} = \textbf{11,4 ng mL}^{-1}$$

$$\text{✦ } LOD_{\text{Ros}} = 3,3 \times 0,0083 / 0,02118 \quad \Rightarrow \textbf{LOD}_{\text{Ros}} = \textbf{0,36 ng mL}^{-1}$$

Με αντικατάσταση των τιμών SD και b από τις εξισώσεις (6), (7) και (8) στην εξίσωση (5) υπολογίζεται το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου για τη βεναζεπρίλη, τη βεναζεπριλάτη και το υδροχλωροθειαζίδιο ως εξής:

$$\text{✦ } LOQ_{\text{Met}} = 10 \times 0,025 / 0,00715 \quad \Rightarrow \textbf{LOQ}_{\text{Met}} = \textbf{34,5 ng mL}^{-1}$$

$$\text{✦ } LOQ_{\text{Ros}} = 10 \times 0,0083 / 0,02118 \quad \Rightarrow \textbf{LOQ}_{\text{Ros}} = \textbf{1,1 ng mL}^{-1}$$

4.8.4 Έλεγχος επίδρασης φαινομένου καταστολής σήματος (ion suppression phenomenon) στη μέθοδο

Ένα από τα σημαντικότερα κατά τη χρησιμοποίηση των συστημάτων LC-MS αποτελεί το φαινόμενο καταστολής σήματος (ion suppression phenomenon). Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται το φαινόμενο της μείωσης του μετρούμενου σήματος του αναλύτη λόγω της πολύπλοκης σύστασης των αναλυόμενων δειγμάτων και της ύπαρξης παρεμποδίζουσων ουσιών.

Σημαντικότερη αιτία του προβλήματος της ιοντικής καταστολής είναι η παρουσία οργανικών ή ανόργανων ουσιών στο δείγμα, οι οποίες μεταφέρονται και στο τελικό εκχύλισμα που ενίεται στο σύστημα LC-MS. Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται ιοντικά μόρια (π.χ. ανόργανοι ηλεκτρολύτες και άλατα), υψηλής πολικότητας ουσίες (π.χ. φαινόλες) και διάφορα οργανικά μόρια, όπως υδρογονάνθρακες, αμίνες, ουρία, λιπίδια, πεπτίδια και ουσίες ή μεταβολίτες παραπλήσιας δομής με τα αναλυόμενα

μόρια. Επομένως, μια μεγάλη ποικιλία ουσιών μπορούν να προκαλέσουν καταστολή του σήματος, ιδιαίτερα όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο εκχύλισμα και όταν εκλύονται στο ίδιο χρονικό παράθυρο με τον αναλύτη. Μια άλλη αιτία του προβλήματος είναι η παρουσία εξωγενών ουσιών, δηλαδή μορίων που προέρχονται από διάφορες εξωτερικές πηγές κατά την προκατεργασία του δείγματος, όπως υπολείμματα πλαστικών και πολυμερών υλικών, φθαλικά ιόντα, υπολείμματα και προϊόντα διάσπασης απορρυπαντικών, αντιδραστήρια σχηματισμού ζεύγους ιόντων, ρυθμιστικά και προϊόντα που προέρχονται από την εκχυλιστική διαδικασία ή τη χρωματογραφική στήλη.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την εξήγηση του φαινομένου καταστολής σήματος. Ένας από αυτούς αναφέρεται στη μείωση της απόδοσης της εξάτμισης. Η παρουσία των παρεμποδίζουσων ουσιών σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να αυξήσει την πυκνότητα και την επιφανειακή τάση των σταγονιδίων που σχηματίζονται κατά τον ιονισμό με ηλεκτροδιάχυση ή με την τεχνική APCI, ελαττώνοντας έτσι τη μεταφορά του αναλύτη στην αέριο φάση. Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός είναι ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα μόρια του αναλύτη και στα συνυπάρχοντα μόρια για το μέγιστο αποτέλεσμα ιονισμού. Ολική συγκέντρωση 10^{-5} M είναι η μέγιστη τιμή για έναν αποτελεσματικό ιονισμό μέσω ηλεκτροδιάχυσης. Τέλος ένας άλλος μηχανισμός αναφέρεται σε διαδικασίες αποφόρτισης των ιόντων του αναλύτη που αποδίδονται στη βασικότητα των παρεμποδίζουσων ουσιών ή σε προβλήματα σταθερότητας των σχηματιζόμενων ιόντων στην αέριο φάση.

Το φαινόμενο καταστολής σήματος έχει πολλές αρνητικές συνέπειες στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Η μείωση του σήματος του αναλύτη οδηγεί σε δραστική μείωση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου. Επίσης έχει αρνητική επίδραση στην επαναληψιμότητα, καθώς η ένταση του φαινομένου μπορεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από το ένα δείγμα στο άλλο, γεγονός που επιδρά επίσης στη γραμμικότητα και στον ποσοτικό προσδιορισμό. Τέλος μπορεί να εμποδίσει την ανίχνευση μιας υπάρχουσας ουσίας ή στην υποτίμηση της πραγματικής της συγκέντρωσης (κίνδυνος ψευδώς -αρνητικού αποτελέσματος), ενώ αν το φαινόμενο επηρεάζει περισσότερο το εσωτερικό πρότυπο παρά τον αναλύτη μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του αναλύτη ((κίνδυνος ψευδώς-θετικού αποτελέσματος).

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 ακετονιτρίλιο. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη. Συγκεκριμένα, για τη μετφορμίνη 1000 και 5000 ng mL⁻¹, για τη ροσουβαστατίνη 20 και 100 ng mL⁻¹ και για το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 3800 ng mL⁻¹. Υπολογίστηκε ο παράγοντας υποστρώματος (matrix factor) από το λόγο της απόκρισης (εμβαδόν κορυφής) της κάθε ουσίας στα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα μετά την κατεργασία προς την απόκριση της κάθε ουσίας στα εμβολιασμένα διαλύματα σε ακετονιτρίλιο. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 4.9. 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 λήφθηκαν βρέθηκαν ότι είναι: 59,9 ± 1,0 και 63,7 ± 1,3 για τη μετφορμίνη, 84,5 ± 7,1 και 81,3 ± 2,0 για τη ροσουβαστατίνη και 61,8 ± 1,8 για το εσωτερικό πρότυπο.

4.8.5 Έλεγχος ανάκτησης της μεθόδου (recovery)

Για τον έλεγχο της ανάκτησης της πορείας κατεργασίας, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα για τη μετφορμίνη 1000 και 5000 ng mL⁻¹ και για τη ροσουβαστατίνη 20 και 100 ng mL⁻¹. Ταυτόχρονα, κατεργάσθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και αναλύθηκαν δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος (προερχόμενα από διαφορετικές πηγές) τα οποία εμβολιάσθηκαν μετά την κατεργασία με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 1000 και 5000 ng mL⁻¹ για τη μετφορμίνη, 20 και 100 ng mL⁻¹ για τη ροσουβαστατίνη και 3800 ng mL⁻¹ για το εσωτερικό πρότυπο. 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. Στον

πίνακα 4.9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης της πορείας κατεργασίας δείγματος.

Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης της ιοντικής καταστολής και υπολογισμός της ανάκτησης της πορείας κατεργασίας δείγματος.

Αναλύτης	Επίπεδα συγκέντρωσης (ng mL ⁻¹)	
	1000	5000
Μετφορμίνη		
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	92,6 ± 2,5	93,9 ± 1,4
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	59,9 ± 1,0	63,7 ± 1,3
Ροσουβαστατίνη	20	100
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	96,6 ± 2,1	95,8 ± 4,1
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	84,5 ± 7,1	81,3 ± 2,0
(IS)	3800	
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	91,7 ± 3,8	
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	61,8 ± 1,8	

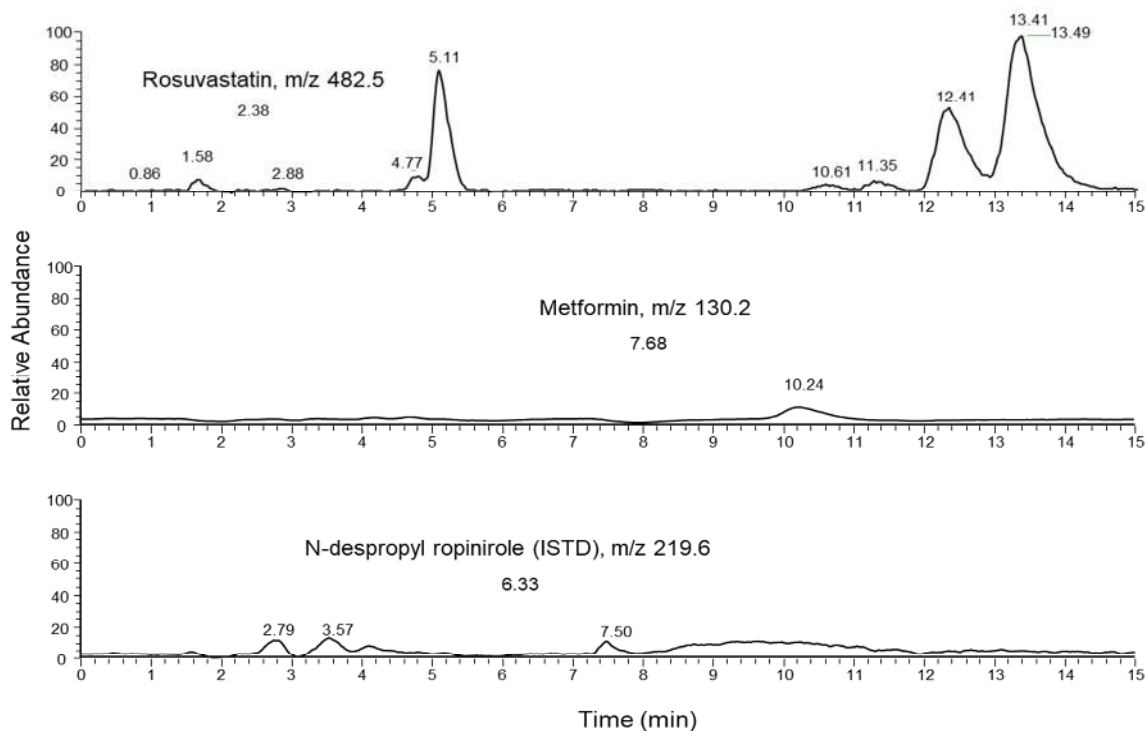
Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η μετφορμίνη ανακτάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 92,6% και η ροσουβαστατίνη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95,8%. Επιπλέον το εσωτερικό πρότυπο ανακτάται στο ποσοστό 91,7%, που παραμένει ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα.

4.8.6 Έλεγχος ειδικότητας (specificity)

Μετά από ανάλυση έξι λευκών δειγμάτων πλάσματος, από έξι διαφορετικές πηγές, δεν παρατηρήθηκαν στα ιοντικά χρωματογραφήματα συνεκλουσθείσες κορυφές με εμβαδό μεγαλύτερο από το 20 % του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη στο όριο ανίχνευσης.

Όπως φαίνεται από το παρακάτω χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος (Σχήμα 4.15), στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών δεν παρατηρείται έκλυση των συστατικών του πλάσματος. Ο χρόνος της ανάλυσης ανέρχεται στα 15,00 λεπτά. Η ανάλυση του τυφλού δείγματος πραγματοποιήθηκε μέχρι τα 45,00 λεπτά προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων που μπορεί να εκλούνται μετά

τα 15 λεπτά. Τα ιοντικά χρωματογράφημα ελήφθησαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS με την τεχνική Παρακολούθησης Προεπιλεγμένου Ιόντος (SIM)



Σχήμα 4.15: Τυπικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος ανθρώπινου πλάσματος που έχει ληφθεί υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC-MS με την τεχνική SIM. Στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών δεν παρατηρείται έκλυση συστατικών του πλάσματος

4.8.7 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 αναλύτων στα δείγματα που ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα να είναι 2,5, 25 και 50 ng mL⁻¹ για τη ροσουβαστατίνη και 50, 1250 και 2500 ng mL⁻¹ για τη μετφορμίνη. Για κάθε μια από τις μελετούμενες συνθήκες φύλαξης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 3 δείγματα ανά συγκέντρωση. Μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών για σύντομο χρονικό διάστημα (short-term stability), δηλαδή μετά από παραμονή των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν την έναρξη της κατεργασίας τους. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν 8 εμβολιασμένα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Από αυτά, 4 δείγματα από κάθε επίπεδο συγκέντρωσης αφήνονται στον πάγκο εργασίας και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 ώρες και στη συνέχεια κατεργάζονται, αναλύονται και αξιολογούνται συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα που κατεργάστηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας για μεγάλο χρονικό διάστημα (long-term stability), δηλαδή μετά από αποθήκευση των εμβολιασμένων δειγμάτων για μια εβδομάδα στους -20 °C, για δύο εβδομάδες στους -20 °C, για τρεις εβδομάδες στους -20 °C και για τέσσερις εβδομάδες στους -20 °C. Για την εκτίμηση της σταθερότητας μαζί με τα δείγματα που είχαν παραμείνει στην κατάψυξη κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν πρόσφατα παρασκευασμένα εμβολιασμένα δείγματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της σταθερότητας μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης - απόψυξης (freeze and thaw cycles), κατά τους οποίους τα δείγματα ψύχονται στους -20 °C και κάθε 7 ημέρες αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς θέρμανση) και επανακαταψύχονται. Μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών μετά από δυο, τρεις και τέσσερις κύκλους ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων. Μαζί με τα δείγματα που ακολούθησαν τους κύκλους ψύξης - απόψυξης, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν πρόσφατα παρασκευασμένα εμβολιασμένα δείγματα και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματά τους. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα ελέγχου σταθερότητας (stability samples) υπολογίστηκαν συγκρίνοντας το λόγο της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη προς την επιφάνεια της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (area ratio) που προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στις εκάστοτε

συνθήκες φύλαξης (4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 1, 2, 3 και 4 εβδομάδες στους -20 °C και 2, 3 και 4 κύκλους ψύξης/απόψυξης) με τον αντίστοιχο λόγο επιφανειών που λαμβάνεται μετά από χρωματογραφική ανάλυση φρέσκων εμβολιασμένων δειγμάτων της αντίστοιχης συγκέντρωσης. Κάθε ένας από τους αναλύτες μπορεί να θεωρηθεί σταθερός στο βιολογικό δείγμα εάν η συγκέντρωσή του δε διαφέρει περισσότερο από $\pm 20\%$ της αρχικής συγκέντρωσης.

Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας, όπου παρατίθενται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου σταθερότητας, οι τυπικές αποκλίσεις αυτών και 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:

$$\%Er = 100 \times (C_{a \text{ κύκλους ψύξης / απόψυξης}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$

Πίνακας 4.10 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος και σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.

Αναλύτης	Συνθήκες αποθήκευσης / χρόνος							
	25°C 4 ώρες		-20 °C /28 μέρες		-20°C/3κύκλους ψύξης/απόψυξης		-20°C/4κύκλους ψύξης/απόψυξης	
Επίπεδα Συγκέντρωσης (ng mL ⁻¹)	Μέση τιμή λόγου ^a	%E _r ^a	Μέση τιμή λόγου	%E _r ^a	Μέση τιμή λόγου	%E _r ^a	Μέση τιμή ± s.d.(n=3)	%E _r ^a
Μετφορμίνη								
50	50,4 ± 1,9	0,9	49,7 ± 2,1	-0,6	49,8 ± 2,9	-0,4	51,2 ± 0,8	2,4
1250	1271,5 ± 8,2	1,7	1260,1 ± 0,8	0,8	1255,1 ± 32,3	0,4	1282,3 ± 2,6	2,6
2500	2522 ± 138	0,01	2412 ± 18	-0,04	2642 ± 24	0,1	2386 ± 24	-0,05
Ροσουβαστατίνη								
2,5	2,509 ± 0,089	0,4	2,457 ± 0,045	-1,7	2,461 ± 0,055	-1,6	2,435 ± 0,030	-2,6
25	24,72 ± 0,11	-1,1	24,53 ± 0,15	-1,9	24,44 ± 0,065	-2,2	24,94 ± 0,42	-0,2
50	49,5 ± 3,4	-0,9	49,5 ± 3,4	-0,9	50,2 ± 3,2	0,4	49,5 ± 3,5	-1,0

^a Μέση τιμή των λόγων του αναλύτη ως προς το εσωτερικό πρότυπο

^b %σχετικό τυπικό σφάλμα = (λόγος δείγματος σταθερότητας-λόγο φρέσκου δείγματος) / (λόγο φρέσκου δείγματος) × 100

Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 4.10 συμπεραίνεται ότι οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα ελέγχου της σταθερότητας μετά από 28 μέρες στους -20°C δεν διαφέρουν περισσότερο από 1,7% από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των πρόσφατα εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος. Επιπλέον, τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος μετά από 3 κύκλους ψύξης- απόψυξης δεν διαφέρουν περισσότερο από 1,6%, ενώ μετά από 4 κύκλους ψύξης- απόψυξης δεν διαφέρουν περισσότερο από 2,6%, σε σχέση με τα φρέσκα παρασκευασμένα δείγματα. Με βάση τα παραπάνω μπορεί να θεωρηθεί ότι οι αναλύτες σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος μπορούν να θεωρηθούν σταθεροί για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 28 ημέρες στους -20°C και μετά από 3 κύκλους ψύξης – απόψυξης (21 ημέρες στους -20°C), χωρίς σημαντική αποικοδόμηση. Αυτό αποτελεί χρήσιμη πληροφορία για το χειρισμό και την αποθήκευση των κλινικών δειγμάτων.

4.9 Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού σε δείγματα πλάσματος ασθενών στους οποίους χορηγήθηκαν τα αναλυόμενα φάρμακα

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάλυση δείγματος πλάσματος τριών ασθενών. Κατά την περίοδο της συλλογής του δείγματος οι ασθενείς ελάμβαναν παράλληλα και άλλες δραστικές ουσίες. Για τη λήψη του πλάσματος, το δείγμα αίματος φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 4000 στροφές στους 4°C . Η ανάλυση του δείγματος πλάσματος του κάθε ασθενή πραγματοποιήθηκε μια ημέρα αργότερα μετά από αποθήκευση του στους -20°C . Για τον προσδιορισμό των αναλυτών κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν τρία δείγματα πλάσματος του κάθε ασθενούς.

Την ίδια ημέρα όπου αναλύθηκαν τα δείγματα πλάσματος των ασθενών παρασκευάστηκε η τρίτη σε σειρά καμπύλη αναφοράς, επομένως, η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έγινε με αυτή την καμπύλη.

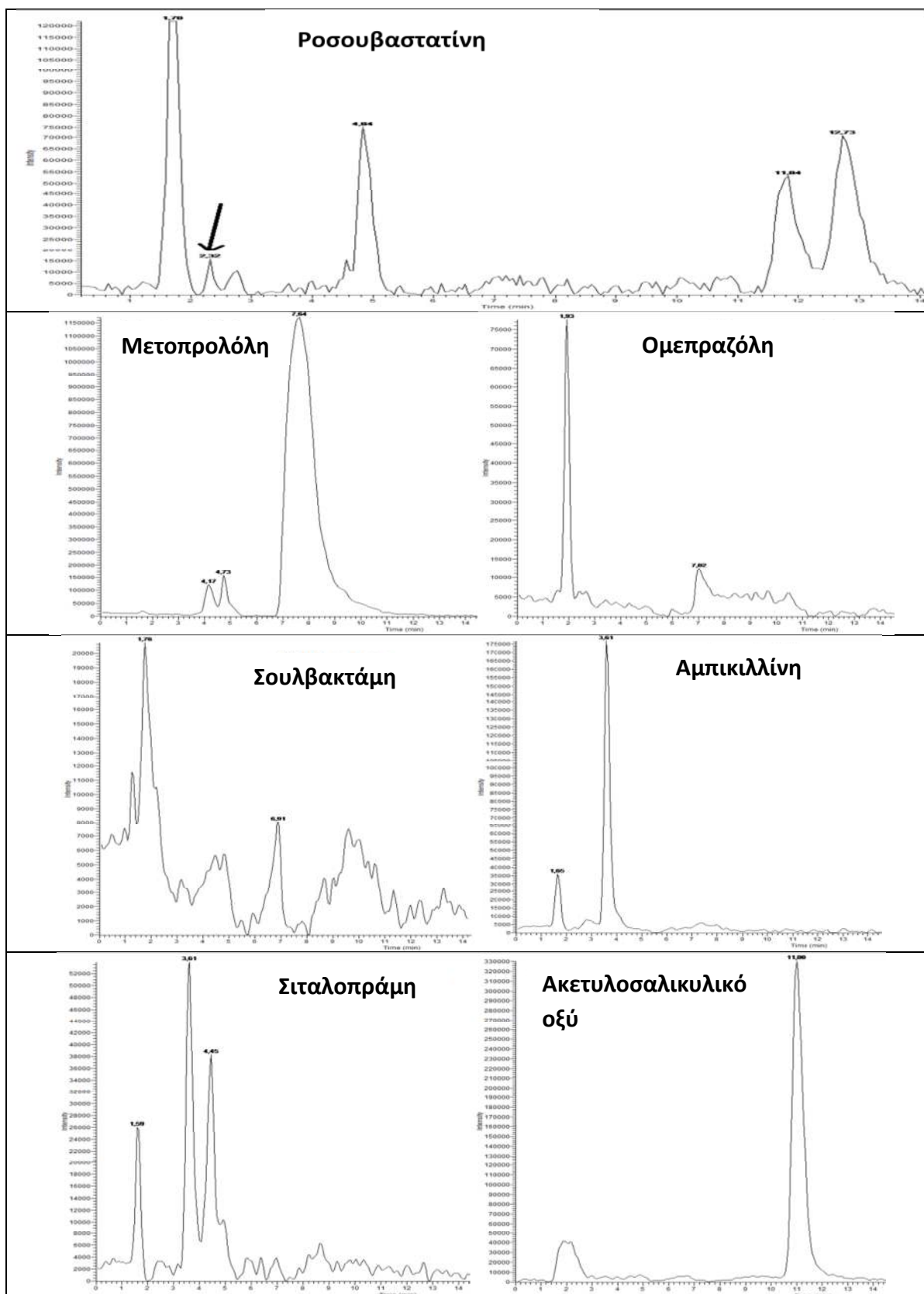
Στον Πίνακα 4.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αγνώστων δειγμάτων.

Πίνακας 4.12 Αποτελέσματα από την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων ασθενών

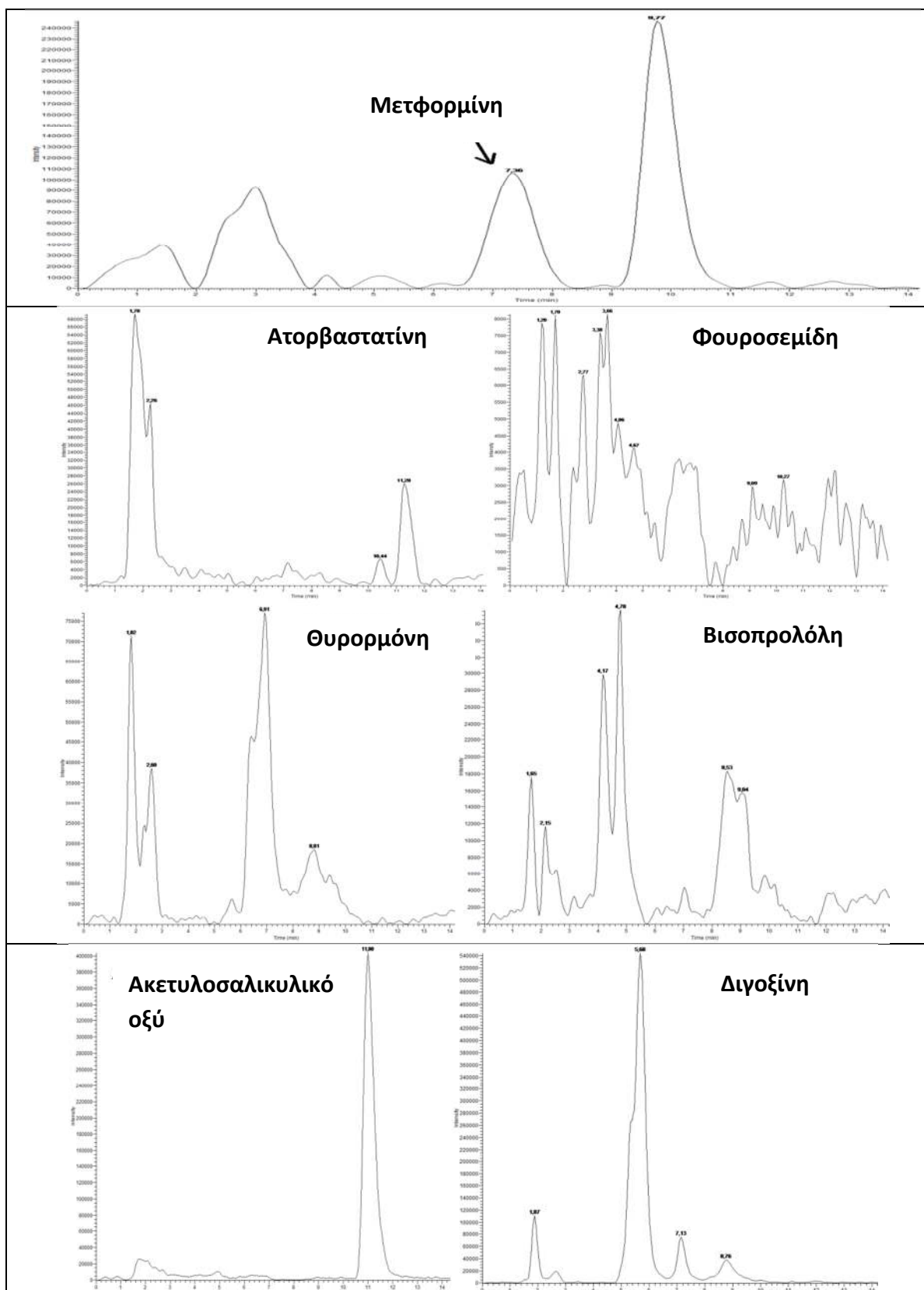
α/α, Φύλο, Ηλικία	Χρόνος από τη λήψη (hr)	Φάρμακο/ δοσολογία (mg)	C (ng mL ⁻¹) Μέση τιμή ± sd _(n=3)	Συγχωρηγούμενα φάρμακα
1, ♂, 63	16	Ροσουβαστατίνη/ 20 x 1 x 30 ημέρες	9,21 ± 0,39	Nadroparin 5700 anti-ha 1x1 subcutaneous, omeprazole caps 20 mg 1x1, metoprolol tb 25 mg 1x2, sulbactam 1g & ampicillin i.v. 1 x 3 x 5 days, acetyl salicylic acid 100 mg E.C.tb 1x1, atalopram 20 mg 1x1.
2, ♀, 88	12	Μετφορμίνη/ 850 x 1 x 30 ημέρες	1676 ± 60	Atorvastatin tb 40 mg 1x1 , furosemide 20 mg i.v. 2 x3, bisoprostol 10 mg 1x1, insuline glarine 100 iu/ml 10IU x1 night subcutaneous, thyromone 100 mg 1x1, acetyl salicylic acid 100 mg E.C.tb 1x1, digoxin tb 0,25 mg ½ x 1.
3, ♀, 88	16	Μετφορμίνη/ 850 x 1 x 30 ημέρες	226 ± 12	Atorvastatin tb 40 mg 1x1 , furosemide 20 mg i.v. 2 x3, insuline glarine 100 iu/ml 10IU x1 night subcutaneous, thyromone 100 mg 1x1, digoxin tb 0,25 mg ½ x 1, acetyl salicylic acid 100 mg E.C. tb 1x1.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.12 η συγκέντρωση της ροσουβαστατίνης στο δείγμα του ασθενούς που βρίσκονταν σε αγωγή με το συγκεκριμένο φάρμακο βρέθηκε να είναι $9,21 \pm 0,39 \text{ ng mL}^{-1}$. Η συγκέντρωση της μετφορμίνης στο δείγμα των δύο ασθενών που βρίσκονταν σε αγωγή με το συγκεκριμένο φάρμακο βρέθηκε να είναι $1676 \pm 60 \text{ ng mL}^{-1}$ και $226 \pm 12 \text{ ng mL}^{-1}$ αντίστοιχα.

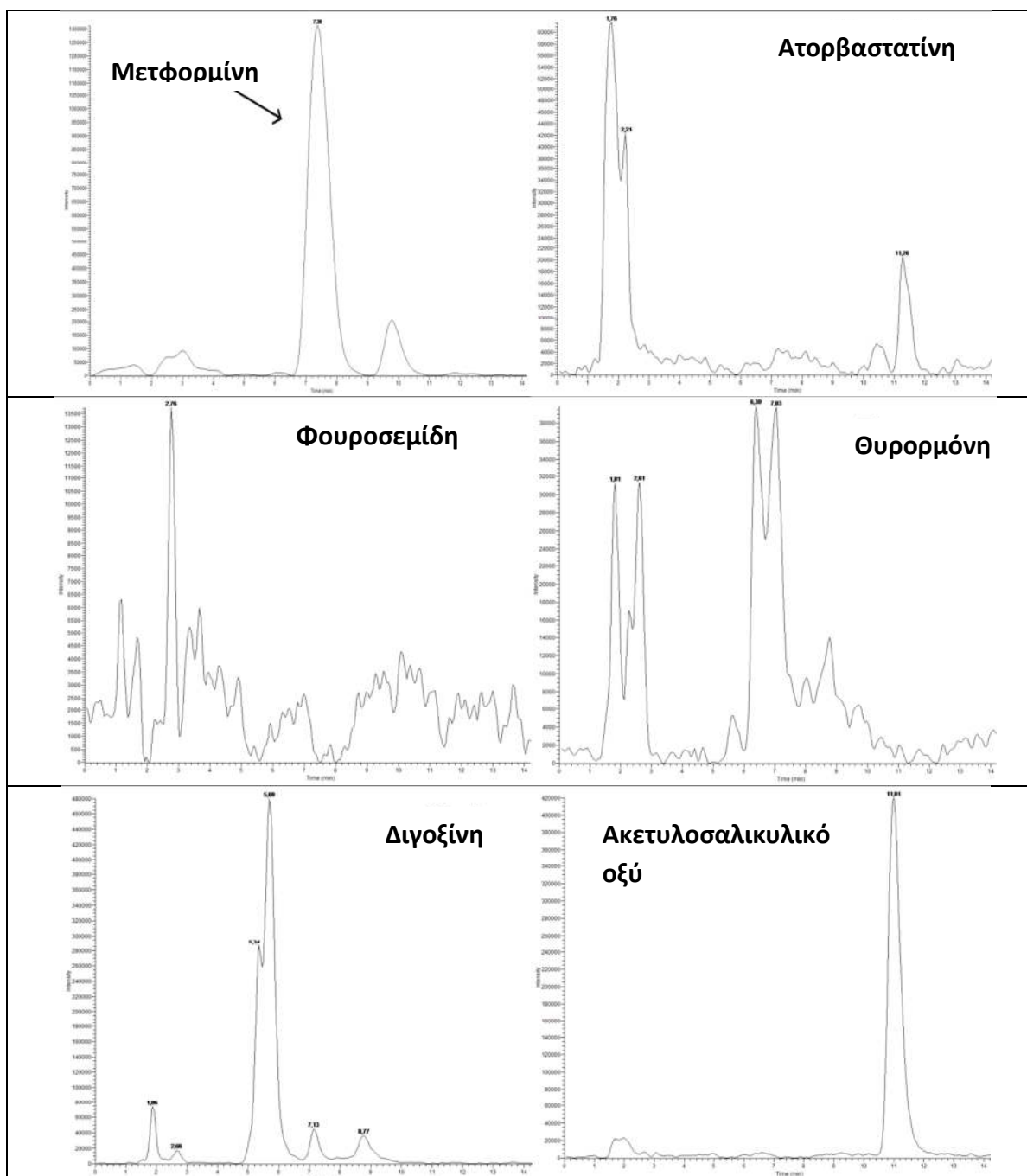
Προκειμένου να μελετηθεί η παρεμπόδιση της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης από άλλους αναλύτες η ανάλυση έγινε με παρακολούθηση του $[M+H]^+$ των συγχωρηγούμενων φαρμάκων. Στα Σχήματα 4.16, 4.17, 4.18 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα όλων των αναλυτών μετά από κατεργασία και ανάλυση των δειγμάτων πλάσματος του κάθε ασθενούς.



Σχήμα 4.16: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος για τον ασθενή #1. Το δείγμα κατεργάστηκε μια ημέρα μετά την δειγματοληψία με την προτεινόμενη μεθοδολογία και αναλύθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC-MS με την τεχνική SIM παρακολουθώντας το πρωτονιομένο μοριακό ιόν, $[M+H]^+$ και των άλλων αναλυτών.



Σχήμα 4.17: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος για τον ασθενή #2. Το δείγμα κατεργάστηκε μια ημέρα μετά την δειγματοληψία με την προτεινόμενη μεθοδολογία και αναλύθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC-MS με την τεχνική SIM παρακολουθώντας το πρωτονιομένο μοριακό ιόν, $[M+H]^+$ και των άλλων αναλυτών.



Σχήμα 4.18: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος που προκύπτει μετά από ανάλυση για τον ασθενή #3. Το δείγμα κατεργάστηκε μια ημέρα μετά την δειγματοληψία με την προτεινόμενη μεθοδολογία και αναλύθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες του συστήματος LC-MS με την τεχνική SIM παρακολουθώντας το πρωτονιομένο μοριακό ιόν, $[M+H]^+$ και των άλλων αναλυτών

4.10 Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος επιτρέπει τον αξιόπιστο και εκλεκτικό ποσοτικό προσδιορισμό της μετφορμίνης και της ροσουβαστατίνης σε ανθρώπινο πλάσμα. Ο χρόνος της ανάλυσης δεν ξεπερνούσε τα 15 λεπτά. Η μέθοδος περιλαμβάνει μια

απλή πορεία κατακρήμνισης πρωτεϊνών για την προκατεργασία του δείγματος. Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνθηκε με υγροχρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας στήλη XBridge-HILIC, 135Å, 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. Η μέθοδος HILIC-ESI/MS αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος και βρέθηκε γραμμική, ακριβής και επαναλήψιμη. Όλα τα παραπάνω καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες με στόχο την παρακολούθηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς και ρύθμιση της δοσολογίας τους.

Βιβλιογραφία

-
- ¹ Skoog., Holler., Nieman., **(2005)**. Principles of instrumental Analysis, Fifth Edition. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 17, 577-615.
- ² Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Μ.Α. Κουμπάρης **(2000)**, Ενόργανη Ανάλυση, Ε.Κ.Π.Α.
- ³ Ν. Θωμαΐδης, **(2008)**, Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές, Ε.Κ.Π.Α., Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.
- ⁴ W. M. A. Niessen, **(2006)**, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Taylorand Francis Group, Third Edition.
- ⁵ Παντερή Ειρήνη, Παρίση-Πούλου Μαρία, **(2015)**, Σημειώσεις Προχωρημένης Φαρμακευτικής Ανάλυσης, 125-215, 200-210.
- ⁶ E. Hoffmann, V. Stroobant, **(2007)**, Mass Spectrometry Principles and Applications, Third Edition, WILEY.
- ⁷ J. T. Watson, O. D. Sparkman, **(2007)**, Introduction to Mass Spectrometry, Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, fourth edition, WILEY.
- ⁸ P. J. Sjöberg, C. Bylund, D. Bookman, K. Markides, **(2001)**, Factors influencing the determination of analyte ion surface partitioning coefficients in electrosprayed droplets, Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 12 1002-1010.
- ⁹ A. Kot-Wasik, J. Debska, J. Namiesnik, **(2007)**, Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products Trac-Trends in Analytical Chemistry, 26, 557-568.
- ¹⁰ R. Dams, A.M. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, **(2003)**, Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 14, 1290-1294.
- ¹¹ Π. Παπαγιαννακόπουλος, Γ. Γ. Λαζάρου, “Φασματοσκοπία Μάζας”, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο φωτοχημείας και κινητικής.
- ¹² R. E. Ardrey, **(2003)**, Liquid chromatography-Mass spectrometry: An introduction John Wiley and Sons, UK.

-
- ¹³ Perry G. Wang, Weixuan He, **(2011)**, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications, 2-27
- ¹⁴ J. Bengtsson, B. Jansson and M. Hammarlund-Udenaes, **(2005)**, 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, 2116-2122
- ¹⁵ W. Naidong, **(2003)**, Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases, *Journal Chromatogr. B*, 796, 209–224
- ¹⁶ W. Z. Shou, W. Naidong, **(2005)**, 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, *Journal Chromatogr. B*, 825, 186–192
- ¹⁷ A. J. Alpert, **(1990)**, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.*, 499, 177
- ¹⁸ H. Petrus, K. Irgum, **(2006)**, Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 29, 1784-1821
- ¹⁹ Y. Guo, S. Gaiki. **(2011)**, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218, 5920
- ²⁰ M. Rezaee, Y. Yamini, S. Shariati, A. Esrafil, M. Samsipur, **(2009)**, Dispersive liquid - liquid microextraction combined with high - performance liquid chromatography - UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples, *Journal Chromatogr. A.*, 9, 1511- 1514,
- ²¹ A.P.Schellinger, P.W.Carr, **(2004)**, Column Care for the Long Haul—Considerations for Column Storage, *LCGC North America*, Volume 22, Number 6.
- ²² B. A. Olsen, **(2001)**, Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities, *Journal Chromatogr. A*, 913, 113-122.

-
- ²³ C. T. Mant, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, **(1998)**, Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of cyclic peptides, *Journal Chromatogr. A*, 816, 79-88.
- ²⁴ B. Dejaegher, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, **(2008)**, Method development for HILIC assays, *Journal Separation Science*, 31, 1438-1448.
- ²⁵ A. Eerkes, W. Z. Shou, W. Naidong, **(2003)**, Liquid/liquid extraction using 96 - well plate format in conjunction with hydrophilic interaction liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the analysis of fluconazole in human plasma, *Journal Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 917-928.
- ²⁶ J. Martens-Lobenhoffer, S. Postel, U. Tröger, S. M. Bode-Böger, **(2007)** Determination of ornithine in human plasma by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal Chromatogr. B*, 855, 271-275.
- ²⁷ Eerkes, A., Shou, W. Z., Naidong, W., **(2003)**, Liquid/liquid extraction using 96-well plate format in conjunction with hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of fluconazole in human plasma *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 917–928.
- ²⁸ Naidong, W., Eerkes, A., **(2004)**, Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma *Biomed. Chromatogr.*, 18, 28–36.
- ²⁹ Pan, J. W., Song, Q., Shi, H. H., King, M., et al., **(2004)**, Development, validation and transfer of a hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the analysis of the tobacco-specific nitrosamine metabolite NNAL in human plasma at low picogram per milliliter concentrations, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2549–2557.
- ³⁰ Li, W. K., Li, Y. H., Francisco, D. T., Naidong, W., **(2005)**, Hydrophilic interaction liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of atenolol in human plasma *Biomed. Chromatogr.*, 19, 385–393.
- ³¹ Hsieh, Y. S., Chen, J. W., **(2005)**, Simultaneous determination of nicotinic acid and its metabolites using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 3031–3036.

-
- ³² Junxiong Huang, Li Ruiping, **(2005)**, Isolation and Purification of Epirubicin from Raw Product by Preparative Chromatography on a Silica Column with Aqueous-Rich Mobile Phase Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 28, 2737–2751.
- ³³ Paek, I. B., Moon, Y., Ji, H. Y., Kim, H. H., et al., **(2004)**, Hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry of donepezil in human plasma: Application to a pharmacokinetic study of donepezil in volunteers J. Chromatogr. B, 809, 345–350.
- ³⁴ Iwasaki Y, Inoue K, Ito R, Yoshimura Y, Saito K, Nakazawa **(2005)**, H. Hydrophilic Interaction Chromatography / Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Allantoin in Human Biological Samples, Bunseki Kagaku, 54:135–142.
- ³⁵ Su, J., Hirji, R., Zhang, L., He, C., et al., **(2006)**, Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in transgenic rice as a strategy for producing the stress-protectant glycine betaine, J. Exp. Bot., 57, 1129–1135.
- ³⁶ Valette, J. C., Demesmay, C., Rocca, J. L., Verdon, E., **(2004)**, Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase, Chromatographia, 59, 55–60.
- ³⁷ Wonnacott, D. M., Patton, E. V., **(1987)**, Hydrolytic stability of aminopropyl stationary phases used in the size-exclusion chromatography of cationic polymers J. Chromatogr., 389, 103–113.
- ³⁸ Bj_rklund, M., Hearn, M. T. W., **(1996)**, Synthesis of silica-based heparin-affinity adsorbents J. Chromatogr. A, 728, 149–169.
- ³⁹ Lafosse, M., Herbreteau, B., Dreux, M., Morinallorym, **(1989)**, Control of some high-performance liquid chromatographic systems by using an evaporative light scattering detector L., J. Chromatogr., 472, 209–218.
- ⁴⁰ Pisano, R., Breda, M., Grassi, S., James, C. A., **(2005)**, Hydrophilic interaction liquid chromatography-APCI-mass spectrometry determination of 5-fluorouracil in plasma and tissues. J. Pharm. Biomed. Anal., 38, 738–745.

-
- ⁴¹ M.D.Wonnacott, V.E.Patton, **(1987)**, Hydrolytic stability of aminopropyl stationary phases used in the size-exclusion chromatography of cationic polymers J. Chromatogr, 389: 103–113.
- ⁴² Tatsunari Yoshida **(2004)**, Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review, Journal of Biochemical and Biophysical methods, Vol. 60, 3, 265-280
- ⁴³ Vladimir V. Tostikov and Oliver Fiehn **(2002)**, Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, Analytical Biochemistry 301, 298-307
- ⁴⁴ Donald S. Risley and Mark A. Strege **(2000)**, Chiral Separations of Polar Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection, Anal. Chem. 72, 1736-1739.
- ⁴⁵ E. S. Grumbach, D. M. Diehl, U. D. Neue, **(2008)**, The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography, Journal Separation Science, 31, 1511-1518.
- ⁴⁶ Bieke Dejargher, Yvan Vander Heyden **(2010)**, HILIC methods in pharmaceutical analysis, J. Sep. Sci, 33, 698-715
- ⁴⁷ Pavel Jandera **(2017)**, Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques, 39-87
- ⁴⁸ Erika F. Brutsaert, **(2010)**, Diabetes Mellitus(DM): Diabetes Mellitus and Disorders of Carbohydrate Metabolism:Merck Manual Professional, Merck Publishing.
- ⁴⁹ Geneva : World Health Organization, **(1999)**, Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and it's Complications, WHO/NCD/NCS/99.2 59 p.
- ⁵⁰ N.Sarwar, P.Gao, S.R.Seshasai, R.Gobin, S.Kaptoge, E.Di Angelantonio, E.Ingelsson, A.D.Lawlor, E.Selvin, M.Stampfer, C.D.Stehouwer, S.Lewington, L.Pennells, A.Thompson, N.Sattar, I.R.White, K.K.Ray, J.Danesh, **(2010)**, The Lancet, 375(9733):2215-22.
- ⁵¹ U.Riserus, W.C.Willett, F.B.Hu, **(2009)** Progress in Lipid Research, 48(1):44-51.
- ⁵² Bailey CJ, Turner, **(1996)**, RC: Metformin. N Engl J Med; 334: 574-579.

-
- ⁵³ Towler M, Hardie G., **(2007)**, AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action *Circulation Res*, 100: 328-341
- ⁵⁴ Zhou G, Myers G, Li Y et al., **(2001)**, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Inv*; 108 :1167-1174.
- ⁵⁵ Zakikhani M, Dowling R, Fantus G et al., **(2006)**, Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*; 66: 10269-10273.
- ⁵⁶ Wang LW, Li ZS, Zou DW et al., **(2008)**, Metformin induces apoptosis of pancreatic cells. *World J Gastroenterol*; 14: 7192-7198.
- ⁵⁷ Morgenszterm D, McLeod H., **(2005)**, PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy, *Anticancer Drugs*; 16: 797-803.
- ⁵⁸ Jones R, Plas D, Kubek S et al., **(2005)**, AMP-activated protein kinase induces a p53 dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*; 18: 283-293.
- ⁵⁹ I.Hanukoglu, **(1992)**, Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(8): 779-804.
- ⁶⁰ Executive Summery of the third Report of the National Cholesterol Education Program expert panel, *Journal of the American Medical Association*, **(2001)**, 285(19): 2486-2497.
- ⁶¹ American Diabetes Association, **(1998)**, *Diabetes Care*, 2(1):179-182.
- ⁶² . U.Laufsa, K.Gertz, K.Dirnagl, M.Bohma, G.Nickeniga, M.Endres **(2002)**, *Brain Research*, 942 :23–30.
- ⁶³ . U.S. Food and Drug Administration, **(2003)**, CRESTOR (Rosuvastatin Calcium tablets) Label Information.
- ⁶⁴ Himal Paudel Chhetri, Panna Thapa, Ann Van Schepdael, **(2014)**, Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22, 483-487
- ⁶⁵ Pawan K. Porwal, Gokul S. Talele, **(2017)**, Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glipenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55, 129-139

-
- ⁶⁶ Raniah Q Gabr, Raj S. Padwal and Dion R. Brocks, **(2010)**, Determination of Metformin in Human Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography Using Small Sample Volume and Conventional Octadecyl Silane Column, *J Pharm Sci*, 13(4), 486-494
- ⁶⁷ Yasar Shah, Zafar Iqbal, Lateef Ahmad, Abad Khan, Muhammad Imran Khan, Shabnam Nazir, Fazli Nasir, **(2011)**, Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human plasma using RP-HPLC detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters, *Journal of Chromatography B*, 879, 557-563
- ⁶⁸ Dong-Hang Xu, Zou-Rong Ruan, Quan Zhou, Hong Yuan and Bo Jiang, **(2006)**, Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapin Commun. Mass Spectrom.* 20, 2369-2375
- ⁶⁹ Roberto Pontarolo, Ana Carolina Gimenez et al., **(2014)**, Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by HILIC-MS/MS method, *Journal of Chromatography B*, 965, 133-141