



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ (FPSE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΕΝΤΕ
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΠΑΡΑΤΑΞΗΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ**

ΕΙΡΗΝΗ ΖΙΛΦΙΔΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ (FPSE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΕΝΤΕ
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΠΑΡΑΤΑΞΗΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ**

ΕΙΡΗΝΗ ΖΙΛΦΙΔΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ (FPSE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΕΝΤΕ
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΠΑΡΑΤΑΞΗΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ**

ΕΙΡΗΝΗ ΖΙΛΦΙΔΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ ΒΙΚΤΩΡΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ ΒΙΚΤΩΡΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν πέντε αντικαταθλιπτικά φάρμακα, η βενλαφαξίνη, η παροξετίνη, η φλουοξετίνη, η αμιτριπυλίνη και η κλομιπραμίνη. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας απλής και γρήγορης μεθόδου για την ταυτόχρονη εκχύλιση και τον προσδιορισμό των πέντε ενώσεων σε ορό ανθρώπινου αίματος, χρησιμοποιώντας τη νέα τεχνική της Εκχύλισης Προσρόφησης σε Υφασμάτινο Μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE), η οποία επιστρατεύει την τεχνολογία επικάλυψης λύματος-πηκτής (sol-gel). Τα δείγματα του ορού αίματος, αφού εκχυλίστηκαν, αναλύθηκαν με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με Ανιχνευτή Παράταξης Φωτοδίοδων (Photodiode Array Detector, PDA).

Η διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος παρέχονται πληροφορίες για την κατάθλιψη και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα, την τεχνική HPLC, ορισμένες τεχνικές προκατεργασίας και την εφαρμοζόμενη τεχνική FPSE, τα βιολογικά υποστρώματα και συγκεκριμένα το αίμα. Επίσης, περιλαμβάνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων που αναφέρονται στον προσδιορισμό των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο ανθρώπινο αίμα (από το έτος 2000 και έπειτα), καθώς και στον προσδιορισμό διάφορων φαρμακευτικών ουσιών με την τεχνική της FPSE. Στο πειραματικό μέρος δίνονται όλα τα στάδια της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της τεχνικής προκατεργασίας για την εκχύλιση των αντικαταθλιπτικών σε δείγματα ορού αίματος, η οργανολογία, οι χρωματογραφικές συνθήκες για τον προσδιορισμό των ενώσεων, καθώς επίσης και η διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου.

Το πειραματικό μέρος της εργασίας εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο πλαίσιο του Διδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας». Το Δ.Π.Μ.Σ δημιουργήθηκε και λειτουργεί μετά από συνεργασία των Τμημάτων Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α) και του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κα. Βικτωρία Σαμανίδου για την ανάθεση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας και την εμπιστοσύνη που έδειξε σχετικά με την παρουσία μου στον χώρο του εργαστηρίου. Επίσης, την ευχαριστώ για τη συνεχή

και άμεση επιστημονική της καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της και την αμέριστη στήριξή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, καθώς και για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ ακόμα τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Παπαδογιάννη και τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Θεοδωρίδη, για το χρόνο τους προκειμένου να μελετήσουν την παρούσα εργασία, καθώς και για τις παρατηρήσεις και την καθοδήγησή τους κατά τη συγγραφή της.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που συμμετείχαν στις διαλέξεις των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος για τις γνώσεις και τις χρήσιμες συμβουλές που μου μετέδωσαν, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το άψογο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την αδιάκοπη στήριξη και την αγάπη της, γνωρίζοντας πως τα μέλη της υπήρξαν αφανείς ήρωες σε ό,τι έχω καταφέρει μέχρι σήμερα.

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ	2
2. ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	3
2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ	3
2.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ	4
2.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ, ΔΡΑΣΗ, ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	5
2.3.1. Αναστολείς Οξειδάσης Μονοαμίνης (MAOIs)	5
2.3.2. Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (TCAs)	6
2.3.3. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs)	7
2.3.4. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης (SNRIs)	8
3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ	11
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
3.2. ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	11
3.2.1. Χρωματογραφία προσρόφησης	11
3.2.2. Χρωματογραφία κατανομής	12
3.2.3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	13
3.2.4. Χρωματογραφία συγγένειας	13
3.2.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή διάχυσης πηκτής	13
3.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC	13
3.3.1. Κινητή φάση	14
3.3.2. Σύστημα παροχής κινητής φάσης (Σύστημα άντλησης)	14
3.3.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος	15
3.3.4. Χρωματογραφικές στήλες	16
3.3.5. Ανιχνευτές	16
3.4. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ HPLC	17
4. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	19
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
4.2. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
4.2.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού	20
4.2.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης	21

4.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ	22
4.3.1. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης	22
4.3.1.1. Μικροεκχύλιση με τη χρήση κρεμάμενης μικροσταγόνας	23
4.3.1.2. Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά.....	23
4.3.2. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης	24
4.3.3. Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης	26
4.4. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΛΥΜΑΤΟΣ-ΠΗΚΤΗΣ	27
4.5. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ (FPSE)	28
4.5.1. Stir FPSE	30
4.5.2. Stir bar-FPSE	30
4.5.3. Δυναμική FPSE.....	31
4.5.4. Αυτοματοποιημένη FPSE.....	31
5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	34
5.1. ΑΙΜΑ.....	34
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	36
6.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΑΙΜΑ	36
6.2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE ...	47
7. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
8. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΥΛΙΚΑ	58
8.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC	58
8.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	58
8.3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΥΛΙΚΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	59
9. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	61
9.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	61
9.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	62
9.2.1. Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης	62
9.2.2. Επιλογή κινητής φάσης	62
9.2.3. Τελικές χρωματογραφικές συνθήκες	62
10. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΙΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	63
10.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	63
10.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	63

10.2.1. Πυκνά πρότυπα διαλύματα	63
10.2.2. Πρότυπα διαλύματα εργασίας.....	63
10.3. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	64
10.4. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ	65
11. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ	
ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	66
11.1. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	66
11.2. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ	
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ	
ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE	66
11.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ	
FPSE	67
11.3.1. Επιλογή του προσροφητικού μέσου FPSE	67
11.3.1.1. Μελέτη του πολυεστερικού μέσου FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-	
PDMS-PCL.....	69
11.3.2. Χρόνος εκχύλισης και χρόνος έκλουσης των ενώσεων	70
11.3.3. Ανάδευση κατά την εκχύλιση και την έκλουση των ενώσεων	72
11.3.4. Διαλύτης έκλουσης των ενώσεων	73
11.3.5. Βελτιστοποίηση των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας.....	74
11.3.6. Αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος.....	75
11.4. ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ	
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ	
ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE	77
11.5. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ	
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	77
11.6. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ	79
11.7. ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	79
11.8. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (intra-day	
repeatability)	80
11.9. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (inter-day precision).....	81
11.10. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ – YOUDEN & STEINER TEST	82
11.11. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	85
11.11.1. Σταθερότητα κύκλων ψύξης-απόψυξης	85

11.11.2. Μακροπρόθεσμη σταθερότητα	87
11.12. ΕΠΑΝΑΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ FPSE	87
11.13. ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE: ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log K_{ow}$	88
11.14. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.....	92
12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	103
ABSTRACT	105

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

WHO	World health organization	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας
MAOIs	Monoamine oxidase inhibitors	Αναστολείς οξειδάσης μονοαμίνης
TCA	Tricyclic antidepressants	Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά
SSRIs	Selective serotonin reuptake inhibitors	Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης
SNRIs	Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors	Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης
HPLC	High pressure/performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης/απόδοσης
UV-Vis	Ultraviolet-visible detector	Ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους
DAD	Diode array detector	Ανιχνευτής παράταξης διόδων
PDA	Photodiode array detector	Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων
MS	Mass spectrometry	Φασματομετρία μάζας
FD	Fluorescence detector	Φθορισμομετρικός ανιχνευτής
LLE	Liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρού-υγρού
SPE	Solid-phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
LPME	Liquid phase microextraction	Μικροεκχύλιση υγρής φάσης
SDME	Single-Drop microextraction	Μικροεκχύλιση με την χρήση κρεμάμενης σταγόνας
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction	Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά
SPME	Solid phase microextraction	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
MSPE	Magnetic solid-phase extraction	Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης
MPs	Magnetic particles	Μαγνητικά σωματίδια
UA	Ultrasound assisted	Εκχύλιση με βοήθεια υπερήχων
ILs	Ionic liquids	Ιονικά υγρά
MIPs	Molecular imprinted polymers	Μοριακώς εντυπωμένα πολυμερή
FPSE	Fabric phase sorptive extraction	Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο

SFPSE	Stir fabric phase sorptive extraction	Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο υπό μαγνητική ανάδευση
DFPSE	Dynamic fabric phase sorptive extraction	Δυναμική εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο
FI	Flow injection	Έγχυση σε ροή
FDSE	Fabric disk sorptive extraction	Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με τη μορφή δίσκων
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με ατομοποιητή φλόγας
UHPLC	Ultra high-pressure liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής πίεσης
GC	Gas chromatography	Αέρια χρωματογραφία
CE	Capillary electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
DVP	Differential pulse voltammetry	Διαφορική παλμική βολταμμετρία
FID	Flame ionization detection	Ανίχνευση ιονισμού φλόγας
MEPS	Microextraction by packed sorbent	Μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό
HF-LPME	Hollow fiber-based liquid phase microextraction	Μικροεκχύλιση υγρής φάσης κοίλης ίνας
LOD	Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of quantification	Όριο ποσοτικής αποτίμησης
RSD	Relative standard deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
DBS	Dried blood spot	Ξηρή κηλίδα αίματος
API-ES	Atmospheric pressure ionization-electrospray	Ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση-ηλεκτροψεκασμός
DPX	Disposable pipette extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά σε ακροφύσιο πιπέτας
μSPE	Dispersive micro solid phase extraction	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά
CAE	Coacervative microextraction	Συνεχής μικροεκχύλιση

ADLLM	Air-dispersed liquid-liquid microextraction	Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά σταγονιδίων
MCM	Mesoporous molecular	Μοριακό μεσοπορώδες
MSD	Mass selective detector	Εκλεκτικός ανιχνευτής μάζας
NDP	Nitrogen-phosphorus detector	Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου
ECD	Electron capture detector	Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων
EME	Electromembrane extraction	Εκχύλιση ηλεκτρομεμβράνης
TOF	Time of flight	Αναλυτής χρόνου πτήσης
CPE	Carbon paste electrode	Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα
PEG	Poly ethylene glycol	Πολυ αιθυλενο γλυκόλη
PEG-PPG-PEG	Poly (ethylene glycol)- <i>block</i> -poly(propylene glycol)- <i>block</i> -poly(ethylene glycol)	Πολυ(αιθυλενο γλυκόλη)- <i>block</i> -πολυ(προπυλενο γλυκόλη)- <i>block</i> -πολυ(αιθυλενο γλυκόλη)
PTHF	Polytetrahydrofuran	Πολυτετραϋδροφουράνιο
VEN	Venlafaxine	Βενλαφαζίνη
PAR	Paroxetine	Παροξετίνη
FLU	Fluoxetine	Φλουοξετίνη
AMIT	Amitriptyline	Αμιτριπτυλίνη
CLO	Clomipramine	Κλομιπραμίνη
PDMDPS	Poly(dimethyldiphenylsiloxane)	Πολυ(διμεθυλοδιφαινυλοσιλοξάνιο)
PDMS	Poly(dimethylsiloxane)	Πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο)
PCL-PDMS-PCL	Polycaprolactone-dimethylsiloxane-polycaprolactone	Πολυκαπρολακτόνη-διμεθυλοσιλοξάνιο-πολυκαπρολακτόνη
C ₁₈ -3MPTMS	C ₁₈ -(3-mercaptopropyl)trimethoxysilane	C ₁₈ -(3-μερκαπτοπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο
PEO-PPO-PEO	Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)	Πολυ(αιθυλενοξείδιο)-πολυ(προπυλενοξείδιο)-πολυ(αιθυλενοξείδιο)
SD	Standard deviation	Τυπική απόκλιση
CV	Coefficient of variance	Συντελεστής διακύμανσης

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

Ο όρος «κατάθλιψη» προέρχεται από το ρήμα καταθλίβω που σημαίνει πιέζω-καταπιέζω κάτι έως ότου συνθλιβεί-συντριβεί. Στην περίπτωση της καταθλιπτικής διαταραχής εκείνο που συνθλιβεται είναι οι ψυχικές δυνάμεις ή αλλιώς τα ψυχικά αποθέματα του ατόμου. Η κατάθλιψη είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές και διαδεδομένες διανοητικές διαταραχές. Προκαλείται από την αλληλεπίδραση και τη συσχέτιση διαφόρων κοινωνικών, ψυχολογικών και βιολογικών παραγόντων, οι οποίοι συμμετέχουν στην εκδήλωση της διαταραχής σε διαφορετικό ποσοστό ανά περίπτωση. Η κατάθλιψη εμφανίζεται μέσω μιας σειράς συμπτωμάτων που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ατόμου σε πολλούς τομείς της ζωής του. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων διαφέρει σε κάθε άτομο, αλλά διαφοροποιείται και στο ίδιο άτομο με την πάροδο του χρόνου. Τα κυριότερα από αυτά είναι η καταθλιπτική διάθεση, η απώλεια της ευχαρίστησης και η μείωση του ενδιαφέροντος για διάφορες δραστηριότητες, το άγχος, η διαταραχή ύπνου και όρεξης, η κόπωση και η εξάντληση, η δυσκολία στη συγκέντρωση, καθώς και τα αισθήματα ενοχής συνοδευόμενα από χαμηλή αυτοεκτίμηση, οδηγώντας σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και στην αυτοκτονία. Το 2018, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) ανέφερε ότι παγκοσμίως, πάνω από 300 εκατομμύρια άνθρωποι όλων των ηλικιών ζούσαν με κατάθλιψη. Συνεπώς, η αντιμετώπιση της εν λόγω διαταραχής κρίνεται μείζονος σημασίας και συνήθως διεξάγεται με το συνδυασμό τόσο της ψυχοθεραπείας, όσο και της φαρμακευτικής αγωγής, ενώ σε περιπτώσεις που οι φαρμακευτικές και ψυχοθεραπευτικές παρεμβάσεις αντενδείκνυνται ή δεν είναι αποτελεσματικές, δύναται να χρησιμοποιηθεί η ηλεκτροσπασμοθεραπεία [1–3].

2. ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ

Επιστημονικές έρευνες έδειξαν πως η κατάθλιψη προκαλείται από την έλλειψη ροής πληροφοριών μεταξύ των εγκεφαλικών κυττάρων ή νευρώνων σε ορισμένα μέρη του εγκεφάλου. Οι νευρώνες ανταλλάσσουν τις πληροφορίες ο ένας με τον άλλον, μέσω χημικών ουσιών που αποκαλούνται νευροδιαβιβαστές. Αυτοί ορίζονται ως βιογενείς αμίνες που βρίσκονται στον εγκέφαλο, όπως η νορεπινεφρίνη (NE) ή νοραδρεναλίνη, η ντοπαμίνη (DA), η επινεφρίνη, η ινδολαμίνη, η σεροτονίνη ή 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) και οι κατεχολαμίνες. Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία μεταβάλλουν τις χημικές ανισορροπίες των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, συμβάλλοντας στη μείωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης.

Ειδικότερα, οι νευροδιαβιβαστές δρουν στο διάκενο μεταξύ των νευρικών κυττάρων (σύναψη). Ο προσυναπτικός νευρώνας διαθέτει τους υποδοχείς στην επιφάνειά του, οι οποίοι λειτουργούν όπως οι «κλειδαριές», για τις οποίες το κατάλληλο «κλειδί» είναι οι νευροδιαβιβαστές. Όταν αρκετοί από τους νευροδιαβιβαστές έχουν κλειδωθεί σε αυτούς τους υποδοχείς, μια ώθηση ξεκινά στο νέο νευρώνα, και έτσι το μήνυμα μεταφέρεται από τον ένα νευρώνα στον άλλο, δημιουργώντας έναν διάυλο επικοινωνίας. Μετά από τη δράση τους, το μεγαλύτερο μέρος του νευροδιαβιβαστή απορροφάται εκ νέου από το προσυναπτικό κύτταρο, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «επαναπρόσληψη». Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα λειτουργούν με την αύξηση του ποσού των ενεργών νευροδιαβιβαστών στη σύναψη και κατά συνέπεια την ενίσχυση της νευρωνικής δραστηριότητας και τη βελτίωση της διάθεσης. Τα πιο σύγχρονα αντικαταθλιπτικά αναστέλλουν την επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών μέσω επιλεκτικών υποδοχέων και αυξάνουν τη συγκέντρωση του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή γύρω από τα νεύρα στον εγκέφαλο. Επομένως, τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο και το κεντρικό νευρικό σύστημα και επιτυγχάνουν την επιθυμητή λειτουργία τους [4].

2.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ

Πριν την ανακάλυψη των ψυχοδραστικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, οι ασθενείς με κατάθλιψη και άγχος στέλλονταν σε μέρη για ξεκούραση, ή άσυλα, με αποτέλεσμα στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ο αριθμός των ασύλων να αυξηθεί σημαντικά. Το 1940, το πρώτο ψυχοδραστικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντισταμινικό, καθώς είχε παρατηρηθεί η ηρεμιστική του ιδιότητα. Τη δεκαετία του 1950, η ρεσερπίνη, που εξάγεται από το φυτό *Serpentina Rauwolfia*, εφαρμοζόταν για τη θεραπεία της αγγειακής υπέρτασης (hypertensive vascular disease). Ωστόσο, βρέθηκε ότι σε ορισμένους ασθενείς επιτάχυνε την κατάθλιψη, ενώ προκαλούσε την εν λόγω διαταραχή και σε ζώα. Με την κατάλληλη έρευνα, διαπιστώθηκε ότι η ρεσερπίνη αναστέλλει τους μεταφορείς μονοαμίνης, με αποτέλεσμα την εξάντληση των μονοαμινών εγκεφάλου, όπως η σεροτονίνη και οι κατεχολαμίνες. Έτσι, ήρθαν στο φως οι πρώτες ενδείξεις για το ρόλο της σεροτονίνης, της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης στην κατάθλιψη [5].

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950, ξεκίνησε μια πραγματική επανάσταση στους τομείς της ψυχοφαρμακολογίας, με την εισαγωγή των κύριων ομάδων ψυχοδραστικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα. Συγκεκριμένα, η ιπρονιαζίδη που κυκλοφόρησε το 1958 για τη θεραπεία της φυματίωσης, αποτέλεσε την πρώτη επιτυχημένη φαρμακευτική θεραπεία για την κατάθλιψη, ανήκοντας στην κατηγορία των αναστολέων μονοαμινοξειδάσης (Monoamine Oxidase Inhibitors, MAOIs). Ένα χρόνο αργότερα, η ιμιπραμίνη εγκρίθηκε ως το πρώτο φάρμακο της οικογένειας των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών (Tricyclic Antidepressants, TCAs). Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, η ανακάλυψη των μεταφορέων μονοαμίνης και οξειδάσεων μονοαμίνης ως στόχων στην αντικαταθλιπτική θεραπεία, η αναγνώριση της σημασίας του σεροτονινεργικού συστήματος στην παθοφυσιολογία και τη θεραπεία της κατάθλιψης, και η αυξανόμενη ανάγκη για φάρμακα με καλύτερη ανθεκτικότητα και ασφάλεια οδήγησε στην παραγωγή μιας νεότερης γενιάς αντικαταθλιπτικών. Το 1974 δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά η φλουοξετίνη ως εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), ενώ το 1993 εισήχθη στην αγορά της Αμερικής η βενλαφαξίνη ως εκλεκτικός αναστολέας της επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης (Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI). Άλλες κατηγορίες αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι τα τετρακυκλικά (TeCAs), οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης-ντοπαμίνης (SDRIs), οι αναστρέψιμοι αναστολείς της οξειδάσης μονοαμίνης A (RIMAs), οι αναστολείς επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης-

ντοπαμίνης (NDRIs), οι ανταγωνιστές και οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SARI), και τα νοραδρενεργικά και ειδικά σεροτονεργικά αντικαταθλιπτικά (NaSSAs) [5,6].

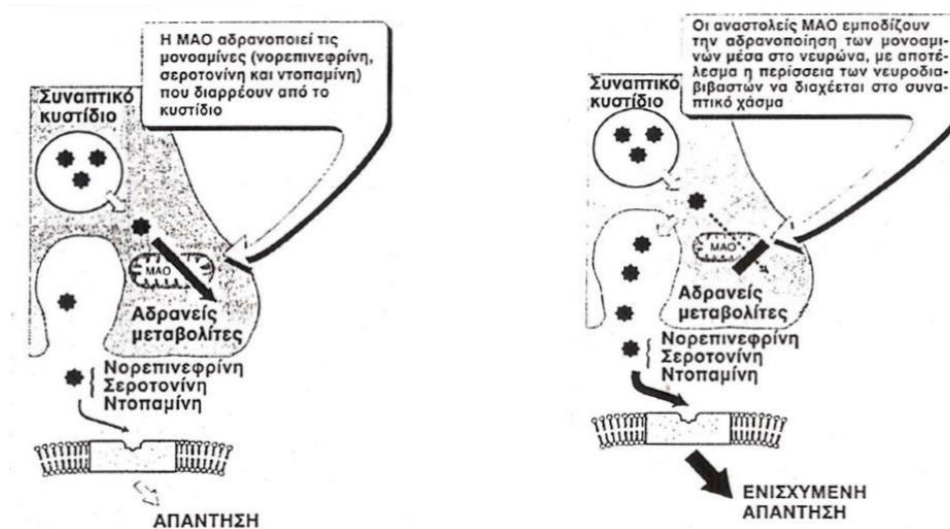
2.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ, ΔΡΑΣΗ, ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

2.3.1. Αναστολείς Οξειδάσης Μονοαμίνης (MAOIs)

Οι οξειδάσες μονοαμίνης είναι φλαβοένζυμα που βρίσκονται εντός της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και διακρίνονται σε δύο ισομορφές: MAO-A και MAO-B. Το ένζυμο αδρανοποιεί μέσω οξείδωσης νευροδιαβιβαστές, όπως η σεροτονίνη, η νορεπινεφρίνη και η ντοπαμίνη, με αποτέλεσμα την έκλυση μεγαλύτερης ποσότητας νευροδιαβιβαστή στη συναπτική σχισμή [7].

Οι αναστολείς μονοαμινοξειδάσης αναστέλλουν μη αντιστρεπτά και μόνιμα τη δράση του ενζύμου μονοαμινοξειδάση, με συνέπεια ο οργανισμός να το παράγει εκ νέου. Με αυτόν τον τρόπο, αποτρέπεται η αδρανοποίηση των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης και αυξάνεται η διαθεσιμότητά τους. Ο μηχανισμός δράσης των MAOIs φαίνεται στο σχήμα 2.1. Ωστόσο, το ένζυμο αυτό έχει και άλλες σημαντικές λειτουργίες, όπως η διάσπαση της τυραμίνης που περιέχεται σε μεγάλο αριθμό τροφών. Η αναστολή της λειτουργίας αυτού έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγάλης ποσότητας τυραμίνης, επιφέροντας αύξηση αρτηριακής πίεσης, κεφαλαλγία, ταχυκαρδία και ενδεχομένως εγκεφαλικό επεισόδιο. Επιπλέον, οι MAOIs προκαλούν και διάφορες παρενέργειες, όπως ηπατική δυσλειτουργία, διαταραχές του ύπνου, νευρικότητα, δυσκολία στην ούρηση και στυτική δυσλειτουργία. Γενικότερα, οι MAOIs έχουν αντικατασταθεί από άλλα αντικαταθλιπτικά φάρμακα, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις αναποτελεσματικότητας των υπόλοιπων κατηγοριών. Η φενελζίνη, η ισοκαρβοξαζίδη και η τρανυλοκυπρομίνη ανήκουν στην κατηγορία των αντικαταθλιπτικών MAOI.

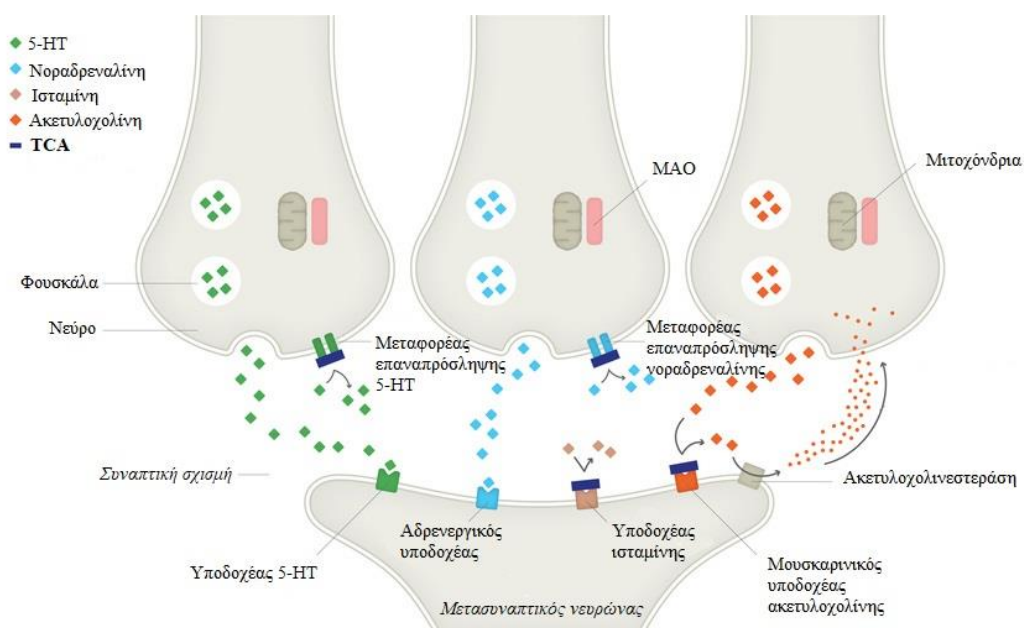
Σε μία προσπάθεια εξάλειψης των επιπλοκών των MAOIs, αναπτύχθηκαν οι εκλεκτικοί και αναστρέψιμοι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης A (RIMAs). Αυτοί θεωρούνται περισσότερο ασφαλείς και δεν παρουσιάζουν τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις των κλασικών αναστολέων της MAO. Το μοκλοβεμίδιο είναι ένα εκ των φαρμάκων RIMAs [8].



Σχήμα 2.1. Μηχανισμός δράσης των MAOIs [9].

2.3.2. Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (TCAs)

Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Tricyclic Antidepressants, TCAs) αποτελούσαν την κύρια φαρμακευτική θεραπεία για την κατάθλιψη μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '80. Γενικά, πρόκειται για μια ομάδα φαρμάκων με πανομοιότυπη χημική δομή αποτελούμενη από τρεις δακτυλίους, ενώ διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Οι τριτοταγείς αμίνες (αμιτριπτυλίνη και ιμιπραμίνη) είναι φάρμακα που παρουσιάζουν διπλή δράση αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης, ενώ οι δευτεροταγείς αμίνες (νορτριπτυλίνη και δεσιπραμίνη) εμποδίζουν την επαναπρόσληψη της νορεπινεφρίνης. Στο σχήμα 2.2. παρουσιάζεται ο μηχανισμός δράσης των TCAs. Διάφορες ανεπιθύμητες παρενέργειες που οφείλονται στην ιδιότητα των TCAs να μπλοκάρουν υποδοχείς σεροτονινεργικούς (5-HT₂), α₁-αδρενεργικούς, ισταμινεργικούς (H₁) και μουσκαρινικούς είναι η υπνηλία, η ξηροστομία, η ταχυκαρδία, οι διαταραχές όρασης, η ορθοστατική υπόταση, η ζάλη, ενώ η υπερδοσολογία TCAs μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Η μεγαλύτερη ασφάλεια, ανθεκτικότητα και θεραπευτική δράση των νεότερων φαρμάκων είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των TCAs ως πρώτη γραμμή θεραπείας της κατάθλιψης. Εντούτοις, οι ενώσεις αυτές εξακολουθούν να διαδραματίζουν πιο περιορισμένο, αλλά εξίσου σημαντικό ρόλο στην ψυχοφαρμακολογία [10].



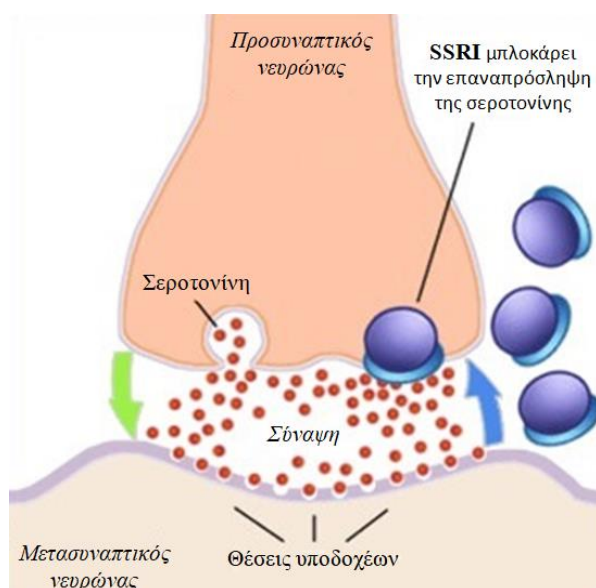
Σχήμα 2.2. Μηχανισμός δράσης των TCAs [11].

2.3.3. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs)

Στις μέρες μας, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φάρμακα στη θεραπεία καταθλιπτικών και αγχωδών διαταραχών. Όπως αναπαριστάται στο σχήμα 2.3., δρουν αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης ή 5-υδροξυτριπταμίνης (5-HT) από το μεταφορέα της 5-HT (SERT), ο οποίος εντοπίζεται στον προσυναπτικό νευρώνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της 5-HT στη συναπτική σχισμή και τη διαφοροποίηση της σηματοδότησης. Επίσης, οι SSRIs δρουν στους υποδοχείς της 5-HT επηρεάζοντας άμεσα την απελευθέρωση της 5-HT. Παραδείγματα τέτοιων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι η φλουοξετίνη, η παροξετίνη, η σετραλίνη, η φλουβοξαμίνη και η σιταλοπράμη.

Οι SSRIs χαρακτηρίζονται για την ελάχιστη τάση τους προς μουσκαρινικούς, χολινεργικούς, α-αδρενεργικούς και ισταμινικούς υποδοχείς και έτσι, δεν εμφανίζουν τις αρνητικές επιδράσεις που προκύπτουν με τα τρικυκλικά φάρμακα. Αυτό συμβαίνει καθώς διαθέτουν εκλεκτικό τρόπο δράσης, αναστέλλοντας μόνο την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης στον προσυναπτικό σεροτονινεργικό νευρώνα χωρίς να έχουν αξιοσημείωτη επίδραση σε άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι SSRIs είναι εξίσου αποτελεσματικοί με τα TCAs στη θεραπεία της κατάθλιψης, παρέχοντας όμως, για την πλειονότητα των ασθενών, μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και ασφάλεια σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας. Επιπρόσθετα, δεν εμφανίζουν σημαντικές αντιχολινεργικές και καρδιακές παρενέργειες, σε αντίθεση με τα TCAs [10,12]. Κατά τη μακροχρόνια

θεραπεία με SSRIs, οι σοβαρότερες δυσμενείς επιδράσεις είναι η σεξουαλική δυσλειτουργία, τα γαστρεντερικά συμπτώματα, η αύξηση του βάρους και η διαταραχή του ύπνου [13].



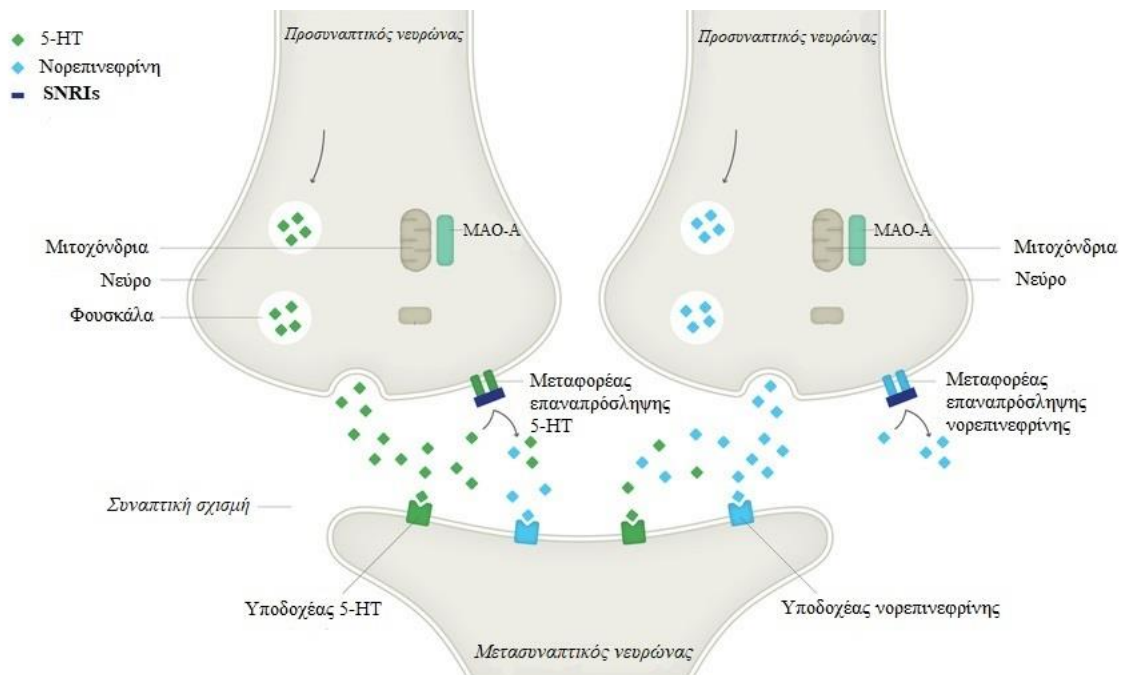
Σχήμα 2.3. Μηχανισμός δράσης των SSRIs [14].

2.3.4. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης (SNRIs)

Οι SNRIs εισήχθησαν στα τέλη του 20^{ου} αιώνα ως μια νέα κατηγορία αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με «διπλή» δράση. Αυτοί οι παράγοντες, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 2.4., εμποδίζουν την επαναπρόσληψη τόσο της 5-HT, όσο και της NE, καθώς αναστέλλουν τους μεταφορείς SERT και μεταφορείς NE (NET). Οι SNRIs χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της κατάθλιψης, ενώ χορηγούνται και σε διαταραχές πόνου (νευροπάθεια και ινομυαλγία), άγχος και ακράτεια ούρων, λόγω άγχους και αγγειοκινητικά συμπτώματα μετά από εμμηνόπαυση. Έρευνες έδειξαν πως τα φάρμακα «διπλής» δράσης πλεονεκτούν έναντι αυτών με «μονή» δράση για τη θεραπεία ασθενών σε ύφεση, ενώ προτιμώνται σε χρόνιες και οδυνηρές παθήσεις. Ενδεικτικά, τέτοια φάρμακα είναι η βενλαφαζίνη, η δεσβενλαφαζίνη (μεταβολίτης της βενλαφαζίνης), η ντουλοξετίνη και η μιλνασιπράνη [15].

Η «διπλή» δράση των SNRIs είναι παρόμοια με αυτή των TCAs, όμως η εκλεκτικότητα και η απουσία επίδρασης των SNRIs σε άλλους υποδοχείς, προκαλούν λιγότερες σοβαρές παρενέργειες, όπως συμβαίνει και με τους SSRIs. Ορισμένες από αυτές είναι η αϋπνία και η ανησυχία, η πιθανή σεξουαλική δυσλειτουργία και οι πονοκέφαλοι.

Σε σύγκριση με τους SSRIs, οι SNRIs τείνουν να προκαλούν περισσότερη ναυτία, ξηρότητα στο στόμα και, πιο σπάνια, αυξημένη αρτηριακή πίεση [16].



Σχήμα 2.4. Μηχανισμός δράσης των SNRIs [17].

Πίνακας 2.1. Αντικαταθλιπτικά φάρμακα – τάξη, εμπορικό όνομα και συχνότητα χρήσης [16,18].

Ταξινόμηση	Ένωση	Εμπορικό όνομα	Παρενέργειες-Χρήση
MAOI	Ισοκαρβοξαζίδη	Marplan	Όχι πρώτη γραμμή
	Φενελζίνη	Nardil	θεραπείας εξαιτίας του
	Τρανυλκυπρομίνη	Parnate	σεροτονικού συνδρόμου
	Σελεγκιλίνη	Eldepryl, Zelapar	και υπέρτασικών κρίσεων
TCA	Ιμιπραμίνη	Tofranil	Όχι πρώτη γραμμή
	Αμιτριπυλίνη	Saroten, Elavil	θεραπείας εξαιτίας των
	Ντοξεπίνη	Adapin, Sinequan	αυξημένων
	Δεσιπραμίνη	Norpramin, Pertofrane	αντιχολινεργικών και
	Νορτριπυλίνη	Pamelor	καρδιοτοξικών
	Κλομιπραμίνη	Anafranil	παρενεργειών
SSRI	Φλουοξετίνη	Zinovat, Prozac	Συχνά, η πρώτη γραμμή θεραπείας εξαιτίας των λιγότερων παρενεργειών που προκαλούν
	Παροξετίνη	Seroxat	
	Σερτραλίνη	Zoloft, Lustral	
	Σιταλοπράμη	Celexa, Cipramine	
	Εσκιταλοπραμη	Lexapro, Cipralex	
SNRI	Βενλαφαξίνη	Effexor	Παρόμοιες, αλλά ίσως πιο συχνές παρενέργειες σε σχέση με τους SSRI
	Δεσβενλαφαξίνη	Pristiq	
	Ντουλοξετίνη	Cymbalta	
	Λεβομιλνασιπράνη	Fetzima	

Στον πίνακα 2.1. συνοψίζονται ορισμένα αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Η έρευνα για τη σύνθεση καινοτόμων, πιο εξελιγμένων, αντικαταθλιπτικών σκευασμάτων οδήγησε, και συνεχίζει να οδηγεί στις μέρες μας, στην ανακάλυψη δραστικών ουσιών με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, και συνεπώς διαφορετική φαρμακευτική ταξινόμηση για τη θεραπεία της κατάθλιψης. Αυτό, σε συνδυασμό με τη δραματική αύξηση κατανάλωσης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων τα τελευταία χρόνια, ενέτεινε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη νέων τεχνικών προκατεργασίας δειγμάτων και αναλυτικών μεθόδων, με σκοπό την απομόνωση και τον προσδιορισμό των φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα.

3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος χρωματογραφία αναφέρεται σε μια ομάδα αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται για το διαχωρισμό των ενώσεων ενός μίγματος. Μια χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει την κινητή φάση, η οποία ρέει και μεταφέρει τις διαχωριζόμενες ενώσεις μέσω της στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτυγχάνεται μέσω του διαφορετικού βαθμού αλληλεπίδρασης τους με τις δύο φάσεις, σύμφωνα με τη φυσικοχημική συγγένεια που εμφανίζουν προς την κάθε φάση.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης/απόδοσης (high pressure/performance liquid chromatography, HPLC) είναι μια διαχωριστική αναλυτική τεχνική. Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα προσδιοριζόμενα συστατικά κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων, μετακινούνται με την μορφή ζωνών σε διαφορετικές ταχύτητες και εξέρχονται διαδοχικά από τη στήλη. Η HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής υγρής χρωματογραφίας στήλης. Συγκεκριμένα, η κινητή φάση ρέει με την εφαρμογή υψηλών πιέσεων και όχι με την επίδραση της βαρύτητας, ενώ ως στατική φάση χρησιμοποιείται μια στήλη που αποτελείται από υλικό πλήρωσης πολύ μικρής διαμέτρου. Συνεπώς, επιτυγχάνεται ταχύτερος και μεγαλύτερης απόδοσης διαχωρισμός των μορίων, ενώ μειώνεται και το απαιτούμενο μέγεθος της χρησιμοποιούμενης στήλης [19,20].

3.2. ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε διάφορα είδη ανάλογα με το μηχανισμό που αλληλεπιδρούν οι προσδιοριζόμενες ενώσεις με τη στατική φάση. Στην HPLC μπορούν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο υλικό πλήρωσης της στήλης και τον κατάλληλο διαλύτη έκλουσης.

3.2.1. Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption chromatography)

Η χρωματογραφία προσρόφησης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη χρωματογραφία. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση το διαφορετικό βαθμό προσρόφησης τους στη στατική φάση. Η προσρόφηση λαμβάνει χώρα μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων, κυρίως διπόλου-διπόλου, δεσμούς υδρογόνου και van der Waals. Αυτή

η κατηγορία χρωματογραφίας βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοια δομή, αλλά διαφορετική πολικότητα.

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης:

α) Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal phase chromatography)

Η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση. Η στατική φάση αποτελείται από υλικά πλήρωσης, όπως το διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3), και η κινητή φάση συνίσταται από μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο. Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των χημικών ενώσεων που δε διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται (και συνεπώς δε συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον) και εφαρμόζεται συνήθως στο διαχωρισμό ισομερών ουσιών.

β) Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed phase chromatography)

Η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση και αποτελείται από SiO_2 συζευγμένο με διάφορες ομάδες που της προσδίδουν τον ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α. Τέτοια μόρια είναι και οι υδρογονάνθρακες, που αποτελούνται από 8 ή 18 άτομα άνθρακα, οδηγώντας στις στήλες C_8 ή C_{18} που εφαρμόζονται για το διαχωρισμό μικρών μορίων. Η κινητή φάση συνίσταται από μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, αφού χρησιμοποιείται στο 80% περίπου των αναλυτικών εφαρμογών.

3.2.2. Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography ή Liquid liquid chromatography)

Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης. Η χρωματογραφία κατανομής διαιρείται σε δύο υποομάδες, ανάλογα με τον τρόπο που η στατική φάση συγκρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης: τη χρωματογραφία υγρού-υγρού, όπου η υγρή στατική φάση συγκρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση, και τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, όπου η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό ομολόγων, μη ιοντικών πολικών ενώσεων χαμηλού ή μετρίου μοριακού βάρους.

3.2.3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Ion exchange chromatography)

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιοντικών ενώσεων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν το διαχωρισμό στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας στη στατική φάση, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

3.2.4. Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography)

Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά με υποκαταστάτες που είναι ακινητοποιημένοι στη στατική φάση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η χρωματογραφία εναντιομερών (chiral chromatography), η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των εναντιομερών μορφών των ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία.

3.2.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή διάχυσης πηκτής (Size exclusion chromatography ή Gel permeation chromatography)

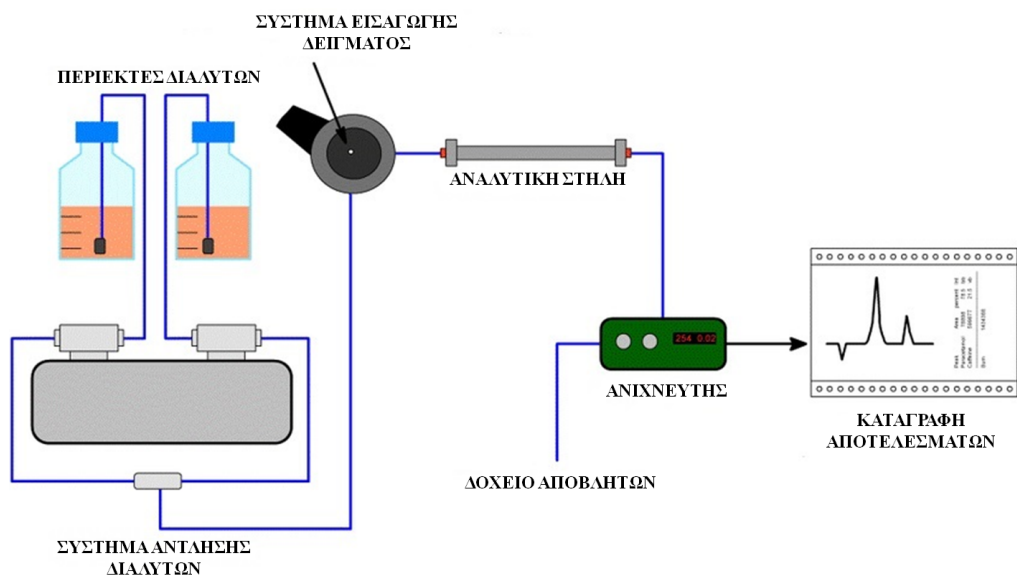
Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων τους. Συγκεκριμένα, τα μόρια με μέγεθος πολύ μικρότερο από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης εισέρχονται στο δίκτυό τους, με αποτέλεσμα να καθυστερούν και να εκλούνται τελευταία από την στήλη. Τα μεγάλα μόρια δε συγκρατούνται στους πόρους και εξέρχονται πρώτα από τη στήλη. Τέλος, τα μόρια με ενδιάμεσο μέγεθος εισέρχονται στο δίκτυο των πόρων και διαχωρίζονται κλασματικά με βάση το σχήμα και τη διάμετρό τους. Αυτή η τεχνική χρωματογραφίας εφαρμόζεται κυρίως για τον προσδιορισμό ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους, καθώς και την ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών [19,20].

3.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC

Μία διάταξη HPLC περιλαμβάνει τα εξής μέρη:

- ✓ Περιέκτες διαλυτών.
- ✓ Σύστημα άντλησης διαλυτών.
- ✓ Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
- ✓ Αναλυτική στήλη.
- ✓ Ανιχνευτής.
- ✓ Σύστημα συλλογής, καταγραφής και αποθήκευσης αποτελεσμάτων.

Στο σχήμα 3.1. αναπαριστάται μια τυπική διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.



Σχήμα 3.1. Τυπική διάταξη ενός συστήματος HPLC [21].

3.3.1. Κινητή φάση

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως εκλουστικό σύστημα στην HPLC πρέπει να εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Υψηλή καθαρότητα και χρήση ειδική για HPLC.
- ✓ Σταθερότητα.
- ✓ Χαμηλή τοξικότητα.
- ✓ Μη απορρόφηση στο UV.
- ✓ Μη καταστροφή του δείγματος.
- ✓ Μη πτητικότητα.
- ✓ Χαμηλό ιξώδες και πίεση επαναφοράς, καθώς και καλή ικανότητα διαχωρισμού.
- ✓ Σχετικά χαμηλό κόστος αγοράς.

Ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των ενώσεων ενός μίγματος εξαρτάται από τη σύσταση της κινητής φάσης. Όταν η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, λαμβάνει χώρα ισοκρατική έκλυση, ενώ όταν μεταβάλλεται με το χρόνο, συμβαίνει βαθμωτή έκλυση.

3.3.2. Σύστημα παροχής κινητής φάσης (Σύστημα άντλησης)

Το σύστημα άντλησης περιλαμβάνει τους περιέκτες των διαλυτών, τα διάφορα φίλτρα και τις αντλίες. Οι περιέκτες διαλυτών είναι ειδικές φιάλες που αποθηκεύουν την κινητή φάση του συστήματος. Συνήθως, οι φιάλες συνοδεύονται με το φίλτρο αναρρόφησης των διαλυτών και το φίλτρο παροχής αερίου απαέρωσης. Το διαλυμένο

οξυγόνο και άζωτο δημιουργούν φυσαλίδες, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν θόρυβο και διεύρυνση των κορυφών στο χρωματογράφημα, ενώ μειώνουν την απόδοση της στήλης. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιείται το ήλιο ως αέριο απαέρωσης, το οποίο απομακρύνει το οξυγόνο και το άζωτο, χωρίς το ίδιο να διαλύεται στους διαλύτες.

Οι αντλίες μεταφέρουν την κινητή φάση υπό υψηλές πιέσεις από το δοχείο της στο εσωτερικό της αναλυτικής στήλης μέχρι και το δοχείο συλλογής αποβλήτων του συστήματος. Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης στην HPLC περιλαμβάνουν:

- ✓ Λήψη ακριβή όγκου διαλυτών.
- ✓ Σταθερή ταχύτητα ροής και σταθερή πίεση.
- ✓ Ροή χωρίς παλμούς για την αποφυγή θορύβου στον ανιχνευτή.
- ✓ Αδρανή υλικά κατασκευής και τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση (φλάτζες από ανοξείδωτο χάλυβα ή Teflon).

Οι αντλίες διακρίνονται σε δύο τύπους, τις αντλίες σταθερής ροής και τις αντλίες σταθερής πίεσης. Με τη σειρά τους, οι αντλίες σταθερής ροής διακρίνονται σε αντλίες παλινδρόμησης, αντλίες τύπου σύριγγας και αντλίες διαφράγματος.

3.3.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η μονάδα εισαγωγής δείγματος παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με τρεις τρόπους:

- ✓ Απευθείας με μικροσύριγγα στην κορυφή της στήλης: είναι ο παλαιότερος και πιο απλός τρόπος έγχυσης του δείγματος στο σύστημα. Παρατηρείται πολύ χαμηλή επαναληψιμότητα στον όγκο έγχυσης με την σύριγγα, ενώ η διακοπή της ροής κατά την εισαγωγή προκαλεί αστάθεια στη βασική γραμμή του χρωματογραφήματος.
- ✓ Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος: αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τρόπο εισαγωγής του δείγματος στην HPLC. Η βαλβίδα αποτελείται από το βρόχο μεταβλητού όγκου (έως 500 μ L) και από έξι θέσεις. Το δείγμα εισάγεται στο βρόχο και στη συνέχεια οδηγείται στη στήλη με περιστροφή της βαλβίδας και με βοήθεια της κινητής φάσης.
- ✓ Αυτόματος Δειγματολήπτης: αποτελείται από τη βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο, τη μικροσύριγγα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα και βρίσκονται πάνω σε έναν περιστρεφόμενο δίσκο. Ο δίσκος περιστρέφεται, η μικροσύριγγα λαμβάνει ορισμένη ποσότητα δείγματος μέσα από το φιαλίδιο και τη μεταφέρει στο βρόχο της βαλβίδας.

3.3.4. Χρωματογραφικές στήλες

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην HPLC κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με τις διαστάσεις τους:

- ✓ Προστατευτικές στήλες ή Προ-στήλες.
- ✓ Αναλυτικές στήλες.
- ✓ Ημι-παρασκευαστικές και παρασκευαστικές.

Οι αναλυτικές στήλες απαρτίζονται από το εξωτερικό ευθύγραμμο κυλινδρικό περίβλημα και το υλικό πλήρωσης. Κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, και πιο σπάνια από γυαλί, έχουν μήκος από 10-30 cm και εσωτερική διάμετρο από 4-10 mm, ενώ το μέγεθος των κόκκων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm. Η αναλυτική στήλη αποτελεί την «καρδιά» ενός χρωματογραφικού συστήματος και πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, ώστε να παρέχει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Εκτός από την αναλυτική στήλη, υπάρχει και η προστατευτική στήλη ή προ-στήλη, η οποία είναι μικρή σε μέγεθος και τοποθετείται πριν την αναλυτική στήλη. Η χρήση της έχει σκοπό να απομακρύνει τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από τους διαλύτες και τα ακατέργαστα δείγματα, καθώς και τα συστατικά που συνδέονται μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση.

Οι παρασκευαστικές στήλες είναι οι στήλες μεγάλων διαστάσεων, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ενώσεων ενός μίγματος σε ποσότητα της τάξης των μιλιγραμμάρων.

3.3.5. Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές κατατάσσονται στις εξής δύο κατηγορίες:

- ✓ Γενικοί ανιχνευτές (bulk property detectors): αποκρίνονται στην αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των προσδιοριζόμενων συστατικών (π.χ. οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης και αγωγιμότητας).
- ✓ Ειδικοί ανιχνευτές (solute property detectors): αποκρίνονται στην αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων συστατικών, όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης (π.χ. οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους, φθορισμού και οι πολαρογραφικοί ανιχνευτές). Η κινητή φάση δεν πρέπει να διαθέτει αυτήν την ιδιότητα.

Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται σε μια διάταξη HPLC είναι οι εξής:

- ✓ Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (Ultraviolet-visible Detector, UV-Vis).

- ✓ Ανιχνευτές παράταξης διόδων (Diode Array Detector, DAD).
- ✓ Ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector, PDA).
- ✓ Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector).
- ✓ Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector).
- ✓ Φασματογράφοι μάζας (Mass spectrometry Detector, MS).
- ✓ Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector).
- ✓ Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector, FD).
- ✓ Ανιχνευτές ραδιενέργειας.
- ✓ Ανιχνευτές σκεδασμού του φωτός.
- ✓ Ανιχνευτές φλόγας,
 - Ανιχνευτές ιονισμού φλόγας,
 - Φωτομετρικοί ανιχνευτές,
 - Ανιχνευτές εκπομπής.

Κάθε ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να διαθέτει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως:

- ✓ Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής.
- ✓ Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα.
- ✓ Μειωμένα επίπεδα θορύβου.
- ✓ Μικρό χρόνο απόκρισης.
- ✓ Μικρό νεκρό όγκο για αποφυγή διεύρυνσης των κορυφών.
- ✓ Μη επιρροή από στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής.
- ✓ Ευελιξία σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης.
- ✓ Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
- ✓ Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών προσδιοριζόμενων ενώσεων.
- ✓ Μη καταστροφή του δείγματος [19,20].

3.4. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια αναλυτική τεχνική που παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές.

Ενδεικτικά, χαρακτηρίζεται από:

- ✓ Ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
- ✓ Χαμηλά όρια ανίχνευσης.
- ✓ Σύντομες αναλύσεις (μερικά λεπτά).
- ✓ Απλότητα, ευκολία, και ευελιξία εφαρμογής.
- ✓ Δυνατότητα προσδιορισμού ενώσεων ευρέος φάσματος για διάφορους σκοπούς.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι μια από τις πλέον εφαρμοζόμενες διαχωριστικές τεχνικές, στην οποία δύναται να χρησιμοποιηθεί μια μεγάλη ποικιλία από τα υλικά πλήρωσης των στηλών και τους ανιχνευτές, ενώ μπορούν να εφαρμοστούν ποικίλες συνθήκες στο σύστημα έκλουσης. Ως εκ τούτου, η HPLC μπορεί να εφαρμοστεί για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και αμινοξέων, υδατανθράκων, υδρογονανθράκων, νουκλεϊκών οξέων, φαρμακευτικών σκευασμάτων, φυτοφαρμάκων και ανόργανων ενώσεων. Η ισχύς της τεχνικής αξιοποιείται κυρίως στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, συνήθως σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εντούτοις, πριν την εισαγωγή τους στο χρωματογράφο απαιτείται προκατεργασία των δειγμάτων [20,22].

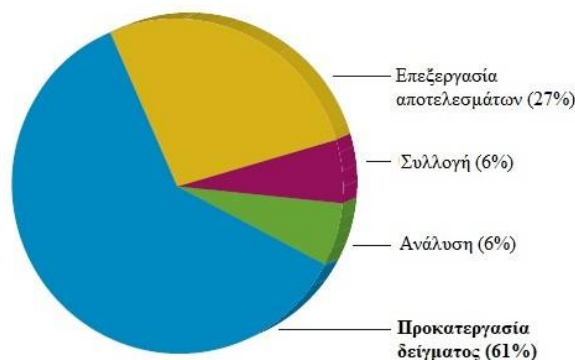
4. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προκατεργασία του δείγματος αποτελεί το σημαντικότερο βήμα κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου, καθώς παρέχει ένα αντιπροσωπευτικό, αναπαραγώγιμο και ομοιογενές δείγμα για ανάλυση. Η προκατεργασία έχει ως στόχο:

1. να τροποποιήσει το υπόστρωμα,
2. να απομακρύνει τις προσμίξεις και τις παρεμποδίσεις, και
3. να πετύχει προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιείται συνήθως χειροκίνητα, με αποτέλεσμα, να καταλαμβάνει το 60% του συνολικού χρόνου ανάλυσης, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1. Συνεπώς, ενδέχεται να περιλαμβάνει πολλά στάδια και τελικά να αποτελέσει ένα απαιτητικό, χρονοβόρο και πολύπλοκο κομμάτι στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου. Παράλληλα, πρόκειται για το πιο επιρρεπές σε λάθη βήμα κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας, καθώς συμβάλλει κατά 30% στις πηγές λαθών που επηρεάζουν την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της ανάλυσης (π.χ. λάθη κατά την αραιώση ή τη ζύγιση).



Σχήμα 4.1. Το χρονοδιάγραμμα σε μια τυπική χρωματογραφική ανάλυση [23].

Στην HPLC, ο διαλύτης του δείγματος θα πρέπει να διαλύεται στην κινητή φάση, χωρίς να επηρεάζεται η ανάλυση και χωρίς να προκαλεί παρεμβολές στην ανίχνευση. Με άλλα λόγια, το δείγμα μετά την προκατεργασία θα πρέπει να είναι συμβατό με το όργανο ή τον ανιχνευτή. Επίσης, επιδιώκεται η προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων και/ή η παραγωγοποίησή τους για καλύτερο διαχωρισμό και βελτιωμένη ανίχνευση.

Μια μέθοδος προκατεργασίας θεωρείται αποτελεσματική, όταν κατορθώνει την εκλεκτική και επαναλήψιμη απομόνωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων και την πλήρη

απομάκρυνση των παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα. Επίσης, θα πρέπει να είναι εύκολη, γρήγορη, με χαμηλό κόστος αγοράς και φιλική προς το περιβάλλον, καταναλώνοντας μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών. Τέλος, επιδιώκεται η δυνατότητα αυτοματοποίησης και προσαρμογής στις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας [23,24].

Εκτός από τις κλασικές τεχνικές προκατεργασίας, όπως η εκχύλιση υγρού - υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης, υπάρχουν και άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Με την πάροδο του χρόνου, η ανάγκη και η σπουδαιότητα της προκατεργασίας των δειγμάτων σε μια χημική ανάλυση, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα να ερευνώνται και να εφαρμόζονται τόσο νέες τεχνικές προκατεργασίας, όσο και παραλλαγές των ήδη υπάρχουσών. Τέτοιες τεχνικές είναι η μικροεκχύλιση με τη χρήση κρεμάμενης σταγόνας, η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, η μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης, η εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς υποστρώματος, η μικροεκχύλιση μέσω πακτωμένου προσροφητικού κ.α. Στη συνέχεια περιγράφονται ενδεικτικά ορισμένες από τις ευρέως εφαρμοζόμενες τεχνικές εκχύλισης.

4.2. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ

4.2.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού

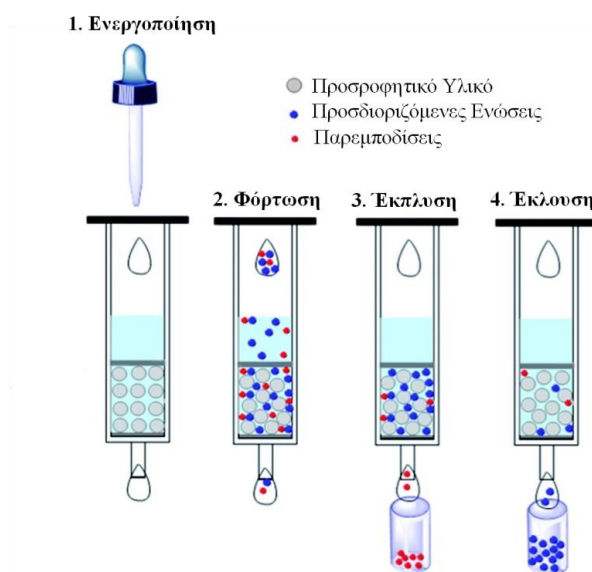
Στην κλασική τεχνική εκχύλισης υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) ο διαλύτης του δείγματος έρχεται σε επαφή με ένα μη αναμίξιμο διαλύτη, και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης, σύμφωνα με τις ιδιότητές τους. Αφού διαχωριστούν οι δύο μη αναμίξιμες φάσεις, αυτή που περιέχει τις εκχυλισμένες ενώσεις απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα που χρησιμοποιείται. Στην κλασική της μορφή, η εκχύλιση γίνεται σε ένα διαχωριστικό χωνί ή μια στήλη.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού παρουσιάζει κάποια αναπόφευκτα προβλήματα, όπως η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, ο αυξημένος χρόνος της τεχνικής προκατεργασίας, λόγω της απαιτούμενης εξάτμισης των οργανικών διαλυτών, καθώς και το αυξημένο κόστος της, ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά την εκχύλιση, η έκθεση σε τοξικούς και εύφλεκτους διαλύτες και η συνεκχύλιση ορισμένων συστατικών με

παραπλήσιες ιδιότητες που παρεμποδίζουν την ανάλυση, λόγω μη εκλεκτικότητας των διαλυτών [24,25].

4.2.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE) έγινε γνωστή το 1970 και αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προκατεργασία των δειγμάτων. Η αρχή της βασίζεται στην κατανομή των συστατικών του δείγματος ανάμεσα στη στερεή φάση, που αποτελεί το προσροφητικό υλικό, και την υγρή φάση, που περιλαμβάνει το υπόστρωμα. Μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων, της στερεής και της υγρής φάσης αναπτύσσονται διαμοριακές δυνάμεις που επιτρέπουν τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων. Συνεπώς, οι ενώσεις παρουσιάζουν ισχυρή συγγένεια με τις ενεργές ομάδες του προσροφητικού υλικού, συγκρατούνται στην επιφάνειά του και διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Η παραλαβή των ενώσεων από το υλικό επιτυγχάνεται με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλυσης. Στο σχήμα 4.2. δίνονται τα στάδια που ακολουθούνται κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης.



Σχήμα 4.2. Στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης [26].

Οι κύριες εμπορικά διαθέσιμες διατάξεις για την SPE είναι οι μικροστήλες σύριγγας, οι μικροστήλες σε μορφή φυσιγγίου, οι μικροστήλες με τεχνολογία δίσκων και τα συστήματα εκχύλισης 96 θέσεων (πλάκες 96-well). Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού εξαρτάται από τις ιδιότητες της προσδιοριζόμενης ένωσης, τη

φύση του υποστρώματος και τις πιθανές παρεμποδίσεις που υπάρχουν στο υπόστρωμα του αναλυόμενου δείγματος [24,27].

Η εκχύλιση στερεάς φάσης απαιτεί σχετικά μικρό χρόνο διεξαγωγής και χαμηλή κατανάλωση διαλυτών, ενώ πραγματοποιεί ικανοποιητικό καθαρισμό του δείγματος και προσυγκέντρωση των ενώσεων. Παράλληλα, η SPE προσφέρει αυξημένη ευαισθησία, καλή επαναληψιμότητα και υψηλά ποσοστά ανάκτησης. Τέλος, δύναται να συνδυαστεί online με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας, καθώς και να αυτοματοποιηθεί. Εντούτοις, οι πολλές επιλογές των διαλυτών και των συνθηκών pH κατά την εκχύλιση, καθώς και τα πολλά στάδια που λαμβάνουν χώρα, καθιστούν τη μέθοδο πολύπλοκη. Επίσης, απαιτείται μεγαλύτερο κόστος ανά δείγμα σε σύγκριση με την τεχνική LLE [24,25].

4.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας να περιορίσει τα μειονεκτήματα των κλασικών τεχνικών προκατεργασίας των δειγμάτων οδήγησε στην εισαγωγή ποικίλων παραλλαγών των ήδη εφαρμοζόμενων τεχνικών εκχύλισης, καθώς και σε νέες τεχνικές μικροεκχύλισης, οι οποίες συμμορφώνονται με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας [28].

4.3.1. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) χρησιμοποιεί μια υγρή φάση εκχύλισης, της τάξης των μικρολίτρων, και εισήχθη ως τροποποίηση της LLE με σκοπό να εκμεταλλευτεί τα πλεονεκτήματα της LLE, αλλά παράλληλα να μειώσει τα μειονεκτήματά της. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις της LPME:

- Η LPME δύο φάσεων, όπου η φάση εκχύλισης είναι σε άμεση επαφή με το διάλυμα του δείγματος, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διαδικασία της εκχύλισης. Ωστόσο, μειώνεται η εκλεκτικότητα και η καθαρότητα του δείγματος, ενώ περιορίζεται ο διαλύτης εκχύλισης σε οργανικά υγρά μη αναμίξιμα με το νερό.
- Η LPME τριών φάσεων, όπου το διάλυμα του δείγματος και ο διαλύτης εκχύλισης διαχωρίζονται μέσω ενός τρίτου διαλύτη που είναι μη αναμίξιμος και με τις δύο φάσεις. Με αυτόν τον τρόπο, βελτιώνεται η εκλεκτικότητα της μεθόδου και γίνεται δυνατή η χρήση υδατικού διαλύτη εκχύλισης.

Ένα από τα κύρια προβλήματα στην LPME είναι η σταθεροποίηση της υγρής φάσης εκχύλισης. Συνεπώς, έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι σταθεροποίησής της και νέες

διατάξεις της LPME, προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα και η ταχύτητα της εκχύλισης [29].

4.3.1.1. Μικροεκχύλιση με τη χρήση κρεμάμενης μικροσταγόνας

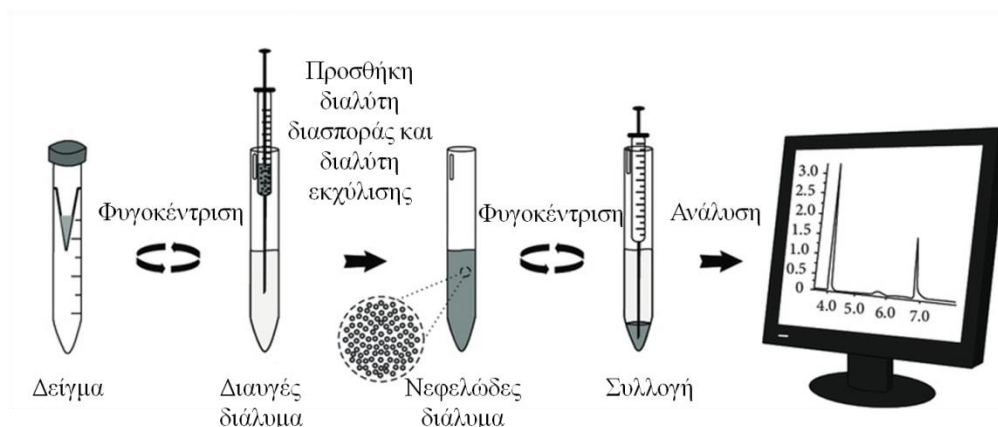
Η μικροεκχύλιση με τη χρήση κρεμάμενης μικροσταγόνας (Single-Drop Microextraction, SDME) εισήχθη το 1995. Βασίζεται στην κατανομή των προσδιοριζόμενων ενώσεων μεταξύ του διαλύματος του δείγματος και της σταγόνας του μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη εκχύλισης, η οποία βρίσκεται στο άκρο μιας βελόνας μικροσύριγγας, με αποτέλεσμα να περιορίζει κατά πολύ τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης. Κατά την προκατεργασία λοιπόν, μια μικρή σταγόνα της φάσης εκχύλισης κρεμάμενη στην άκρη της βελόνας της σύριγγας με τριχοειδή δύναμη εκτίθεται στο υπόστρωμα του δείγματος. Μόλις επέλθει ισορροπία στην εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων, η σταγόνα του διαλύτη αναρροφάται πίσω στη βελόνα της σύριγγας και στη συνέχεια εισέρχεται σε ένα σύστημα χρωματογραφίας ή ηλεκτροφόρησης για ανάλυση. Αναλόγως με το αν ο διαλύτης εκχύλισης έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα του δείγματος ή εκτίθεται στο χώρο του δείγματος, η SDME διακρίνεται στις παρακάτω διαφορετικές διατάξεις, οι οποίες αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες εκ των δημοσιευμένων τροποποιήσεών της:

- SDME στον υπερκείμενο χώρο (headspace SDME, HS-SDME).
- SDME με απευθείας εμβάπτιση (direct immersion SDME, DI-SDME).

Η SDME είναι απλή, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό, χρησιμοποιεί μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών και επιδέχεται αυτοματοποίησης. Από την άλλη πλευρά, το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής είναι η αστάθεια των σταγονιδίων [27,29].

4.3.1.2. Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά

Η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) έγινε γνωστή το 2006 και πραγματοποιείται με τη χρήση ενός διαλύτη εκχύλισης, ο οποίος είναι διασκορπισμένος στο υδατικό διάλυμα δείγματος με τη βοήθεια ενός δεύτερου διαλύτη, γνωστού ως διαλύτη διασποράς. Τα στάδια της εκχύλισης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.3.



Σχήμα 4.3. Στάδια μικροεκχύλισης υγρού-υγρού με διασπορά [30].

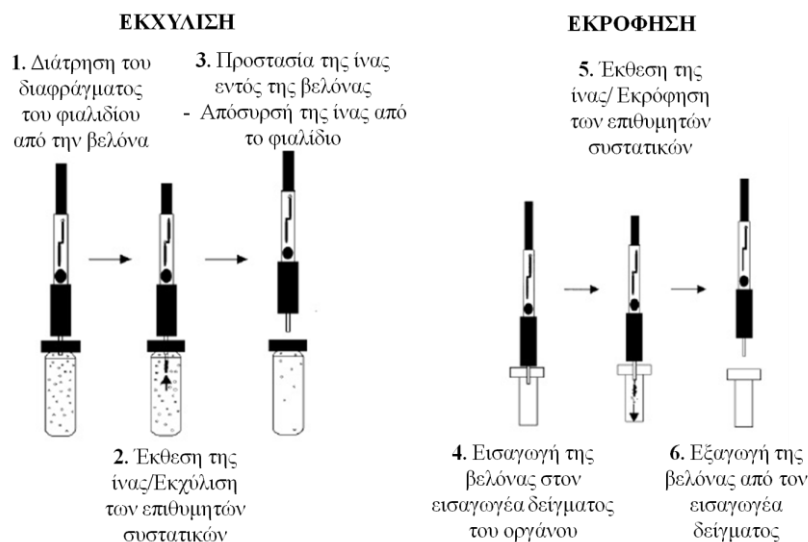
Η υψηλή επιφάνεια επαφής του διαλύτη εκχύλισης με το δείγμα οδηγεί σε γρήγορη και αποτελεσματική εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Έχουν προταθεί διάφορες τροποποιήσεις της τεχνικής, όπως:

- DLLME υποβοηθούμενη από υπερήχους (ultrasound-assisted DLLME),
- DLLME με ιοντικά υγρά (ionic liquid-DLLME),

Η DLLME είναι μια απλή, φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική εκχύλισης, καθώς χρησιμοποιεί μειωμένες ποσότητες οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, εμφανίζει συχνά περιορισμούς σχετικά με την επιλογή του διαλύτη διασποράς και του διαλύτη εκχύλισης. Επίσης, ο μηχανισμός εκχύλισης δύο σταδίων από το διάλυμα του δείγματος στη φάση εκχύλισης μειώνει σημαντικά την καθαρότητα του δείγματος και καθιστά δύσκολη την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων [29,31,32].

4.3.2. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase microextraction, SPME) εισήχθη το 1990 και αποτελεί μια από τις πιο δημοφιλείς «πράσινες» τεχνικές προκατεργασίας των δειγμάτων. Η SPME είναι ένα είδος SPE, η οποία ωστόσο περιορίζει σε μεγάλη κλίμακα δύο σημαντικά προβλήματα της δεύτερης, που είναι ο χρόνος προκατεργασίας και κυρίως η ανάγκη για χρήση οργανικών διαλυτών. Η προκατεργασία του δείγματος με SPME περιγράφεται στο σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4. Στάδια μικροεκχύλισης στερεάς φάσης [33].

Η ίνα που χρησιμοποιείται είναι από διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2) επικαλυμμένη από ένα πολυμερές υλικό υψηλής εκλεκτικότητας, λόγω της οποίας συνήθως δεν απαιτείται ενδιάμεσος καθαρισμός κατά την προκατεργασία. Το πέρας της εκχύλισης λαμβάνει χώρα όταν έχει επέλθει ισορροπία στη συγκέντρωση της ένωσης μεταξύ του υποστρώματος του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας, και πλέον η ποσότητα που έχει εκχυλιστεί είναι σταθερή, εντός του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητη του επιπλέον χρόνου εκχύλισης. Ανάλογα με τη θέση της ίνας σε σχέση με το δείγμα, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- SPME με απευθείας εμβάπτιση (direct immersion), DI-SPME: η ίνα βυθίζεται απευθείας μέσα στο διάλυμα του δείγματος
- SPME στον υπερκείμενο χώρο (headspace), HS-SPME: η ίνα εκτίθεται στο χώρο εντός κλειστού φιαλιδίου δειγματοληψίας πάνω από το διάλυμα του δείγματος.

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης ενσωματώνει τη δειγματοληψία, την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε ένα μόνο βήμα. Δεν απαιτείται σύνθετος εξοπλισμός και κατανάλωση οργανικών διαλυτών, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται το κόστος της διαδικασίας, ενώ χρειάζεται μικρός όγκος δείγματος. Οι ίνες SPME είναι μικρές και επιτρέπουν τη δειγματοληψία *in situ*, ενώ μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Η προκατεργασία παρέχει υψηλή ευαισθησία (ανίχνευση σε επίπεδο συγκέντρωσης ppt), είναι απλή και γρήγορη, μπορεί να αυτοματοποιηθεί, αλλά και να συζευχθεί με αναλυτικές τεχνικές, τόσο on-line όσο και off-line [24,25]. Από την άλλη πλευρά, η προκατεργασία διεξάγεται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ η

απευθείας εισαγωγή της ίνας SPME στο υπόστρωμα του δείγματος, συμβάλλει στη μείωση του χρόνου «ζωής» της. Επίσης, υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών εκχυλίσεων και μεταξύ διαφορετικών παρτίδων ίνας [32].

4.3.3. Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης

Η μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (Magnetic Solid-Phase Extraction, MSPE), εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1999. Στην MSPE χρησιμοποιούνται σωματίδια με μαγνητικές ιδιότητες (Magnetic Particles, MPs), τα οποία είναι επικαλυμμένα με διάφορες οργανικές ενώσεις, ενώ κατάλληλες λειτουργικές ομάδες μπορούν να ακινητοποιηθούν στην επιφάνειά τους. Αυτά τα τροποποιημένα σωματίδια εφαρμόζονται ως προσροφητικά των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Στο σχήμα 4.5. αναπαρίστανται τα βήματα μιας διαδικασίας MPSE, στην οποία δεν απαιτούνται πρόσθετες διαδικασίες, όπως φυγοκέντρηση, καταβύθιση ή διήθηση του δείγματος.



Σχήμα 4.5. Βήματα μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης [25].

Ο μηχανισμός εκχύλισης των επιθυμητών ουσιών εξαρτάται από τον τύπο του προσροφητικού, και όπως στην κλασική εκχύλιση στερεάς φάσης, συνδέεται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιθυμητών ουσιών και των επιφανειακών λειτουργικών ομάδων στο μαγνητικό πυρήνα. Ως μέσο εκχύλισης στα επικαλυμμένα μαγνητικά νανοσωματίδια (Magnetic nanoparticles, MNPs) έχουν χρησιμοποιηθεί τα ιονικά υγρά (Ionic liquids, ILs), ενώ η τελευταία εξέλιξη είναι η χρήση μοριακώς εντυπωμένων πολυμερών (Molecular imprinted polymers, MIPs).

Η χρήση των MPs ως προσροφητικά στην MSPE απλοποιεί τη διαδικασία προκατεργασίας σε σύγκριση με την κλασική SPE, διότι δε χρησιμοποιούνται προσροφητικά σε στήλες, αλλά ο διαχωρισμός των φάσεων γίνεται εύκολα και γρήγορα με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Επιπλέον, η MSPE μπορεί να μειώσει την κατανάλωση των οργανικών διαλυτών και, κατά συνέπεια, το σχηματισμό τοξικών και επικίνδυνων αποβλήτων [25,34].

4.4. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΛΥΜΑΤΟΣ-ΠΗΚΤΗΣ

Η τεχνολογία λύματος-πηκτής (sol-gel) έχει συμβάλει σημαντικά στην παρασκευή νέων υλικών και κατά συνέπεια, στην εξέλιξη της μικρο/νανο- προκατεργασίας του δείγματος. Συνοπτικά, η διεργασία sol-gel περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προκατεργασία του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί ως το υπόστρωμα, με σκοπό την αύξηση των διαθέσιμων ενεργών υδροξυλομάδων (-OH).
2. Παραγωγή ενός υγρού κολλοειδούς διαλύματος (sol solution).
3. Σχηματισμός της επίστρωσης sol-gel πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος.
4. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού.

Η διαδικασία sol-gel περιλαμβάνει τη μεταφορά του κολλοειδούς διαλύματος σε ένα στερεό υπόστρωμα πηκτής (solid gel matrix), κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνουν χώρα δύο αντιδράσεις:

1. Υδρόλυση της/των πρόδρομης/ων sol-gel ένωσης/ων
2. Πολυσυμπύκνωση των υδρολυμένων προϊόντων και άλλων sol-gel ενεργών ενώσεων, οι οποίες υπάρχουν στο σύστημα.

Η sol-gel υδρόλυση ξεκινά όταν μια ανόργανη ή οργανικά τροποποιημένη ανόργανη πρόδρομη ουσία αναμιγνύεται με νερό και διαλύτη παρουσία ενός όξινου ή βασικού ή φθοριούχου καταλύτη. Κατά τη διάρκεια της πολυσυμπύκνωσης, τα ενεργά οργανικά μόρια ενσωματώνονται τυχαία στο αναπτυσσόμενο ανόργανο δίκτυο. Επιπλέον, το υβριδικό πολυμερικό δίκτυο μπορεί να προσδεθεί χημικά στο υπόστρωμα μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης, με τις sol-gel ενεργές θέσεις που υπάρχουν στην επιφάνειά του.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υβριδικών sol-gel οργανικών-ανόργανων προσροφητικών είναι οι εξής:

- ✓ Η φύση και το είδος των πρόδρομων ενώσεων.
- ✓ Η αναλογία πρόδρομης ένωσης-νερού.
- ✓ Οι καταλύτες και η συγκέντρωσή τους.
- ✓ Το pH του κολλοειδούς διαλύματος.

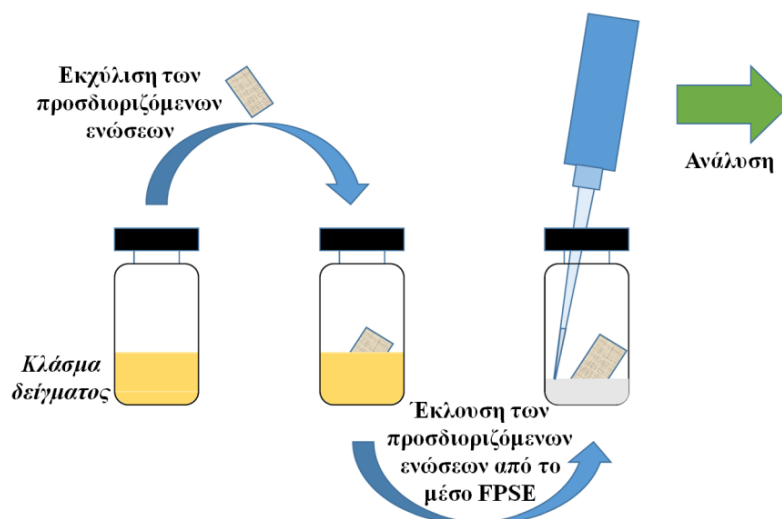
- ✓ Το είδος του οργανικού διαλύτη και η αναλογία του ως προς την πρόδρομη ουσία.
- ✓ Οι συνθήκες αντίδρασης (π.χ. θερμοκρασία, υγρασία).
- ✓ Οι συνθήκες μετά τη ζελατινοποίηση.

Η δομή του τελικού sol-gel υποστρώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον καταλύτη που χρησιμοποιείται στο κolloειδές διάλυμα. Η υδρόλυση με όξινο καταλύτη παρέχει ένα γραμμικό ή τυχαία διακλαδισμένο δίκτυο sol-gel, ενώ η υδρόλυση με βασικό καταλύτη προσφέρει ένα διακλαδισμένο και συμπυκνωμένο δίκτυο.

Η τεχνολογία sol-gel είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τη σύνθεση υλικών σε διάφορα μεγέθη, σχήματα και μορφές, όπως μεμβράνες, ίνες και σωματίδια, τα οποία εφαρμόζονται ως επιφάνειες επίστρωσης (coating). Με αυτό τον τρόπο, εισάγεται μια ποικιλία νέων φάσεων εκχύλισης με μοναδικά χαρακτηριστικά προσρόφησης, όπως η ομοιογένεια, η καθαρότητα, το πορώδες και η εκλεκτικότητα. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της διεργασίας sol-gel στη μικροεκχύλιση ενώσεων είναι η ισχυρή προσκόλληση της επίστρωσης στο υπόστρωμα, λόγω του χημικού δεσμού, καθώς και η μείωση του απαιτούμενου χρόνου για να επέλθει ισορροπία κατά την εκχύλιση και συνεπώς η ταχύτητα της διαδικασίας εκχύλισης, λόγω του πορώδους των υλικών [35,36].

4.5. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ

Η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική προκατεργασίας του δείγματος, η οποία εισήχθη το 2014 από τους Kabir και Furton. Η FPSE χρησιμοποιεί ένα φυσικό ή συνθετικό διαπερατό και εύκαμπτο υφασμάτινο μέσο (π.χ. βαμβάκι, πολυεστέρα, μίγμα βαμβακιού-πολυεστέρα) ως υπόστρωμα, το οποίο είναι χημικώς επικαλυμμένο με sol-gel υβριδικό οργανικό-ανόργανο προσροφητικό σε μια μορφή λεπτής επίστρωσης. Κατά την προκατεργασία με FPSE, το προσροφητικό μέσο εισάγεται απευθείας στο δοχείο που περιέχει το αρχικό δείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Εν συνεχεία, το μέσο βυθίζεται σε ένα άλλο δοχείο που περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη, προκειμένου να γίνει η έκλυση των ενώσεων. Τέλος, το έκλυσμα εισάγεται στο όργανο για ανάλυση. Τα στάδια της τεχνικής FPSE περιγράφονται στο σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.6. Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο [37].

Η τεχνική της FPSE έχει ενσωματώσει τις τεχνικές SPME και SPE σε μια ενιαία πλατφόρμα τεχνολογίας, συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματά τους. Αφενός, η φάση εκχύλισης παραμένει βυθισμένη στο δείγμα ή στο υδατικό διάλυμα, το οποίο περιέχει την προσδιοριζόμενη ένωση, γεγονός που θυμίζει πολύ την τεχνική SPME. Αφετέρου, η διαπερατότητα του υποστρώματος και το πορώδες δίκτυο του sol-gel προσροφητικού οδηγούν σε ένα σύστημα ροής παρόμοιο με αυτό της τεχνικής SPE.

Σε αντίθεση με τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην SPE και στην SPME, αυτά που χρησιμοποιούνται στην FPSE δεν είναι αδρανή, καθώς είναι είτε υδρόφιλα (κυτταρίνη), είτε υδρόφοβα (πολυεστέρας) ή συνδυασμός αυτών και συμβάλλουν στην εκλεκτικότητα και στη συνολική πολικότητα του μέσου FPSE. Ο ισχυρός χημικός δεσμός μεταξύ του υποστρώματος και του προσροφητικού προσδίδουν στο υλικό υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα. Κατά συνέπεια, το υλικό FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές, χωρίς να παρατηρηθεί απώλεια στην προσροφητική του ικανότητα, καθώς και να εκτεθεί σε οποιοδήποτε οργανικό διαλύτη έκλυσης. Από τη μια πλευρά, το εύκαμπτο και διαπερατό μέσο FPSE επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική εκχύλιση των ενώσεων απευθείας από το δείγμα, ελαχιστοποιώντας τα βήματα στην προκατεργασία του δείγματος, όπως διήθηση, καταβύθιση πρωτεϊνών ή φυγοκέντρηση. Από την άλλη πλευρά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρός όγκος οργανικού διαλύτη για την έκλυση των ενώσεων, επιτυγχάνοντας την υψηλή προσυγκέντρωσή τους, με αποτέλεσμα να μην απαιτούνται μετέπειτα στάδια κατεργασίας του δείγματος, όπως η εξάτμιση του διαλύτη και η επανασύσταση του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο, απλοποιείται η διαδικασία

προκατεργασίας του δείγματος, μειώνεται ο κίνδυνος απώλειας της προσδιοριζόμενης ένωσης, αποφεύγονται τυχόν πειραματικά σφάλματα και ελαχιστοποιείται η κατανάλωση οργανικών διαλυτών, καθιστώντας την τεχνική FPSE οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον [38,39].

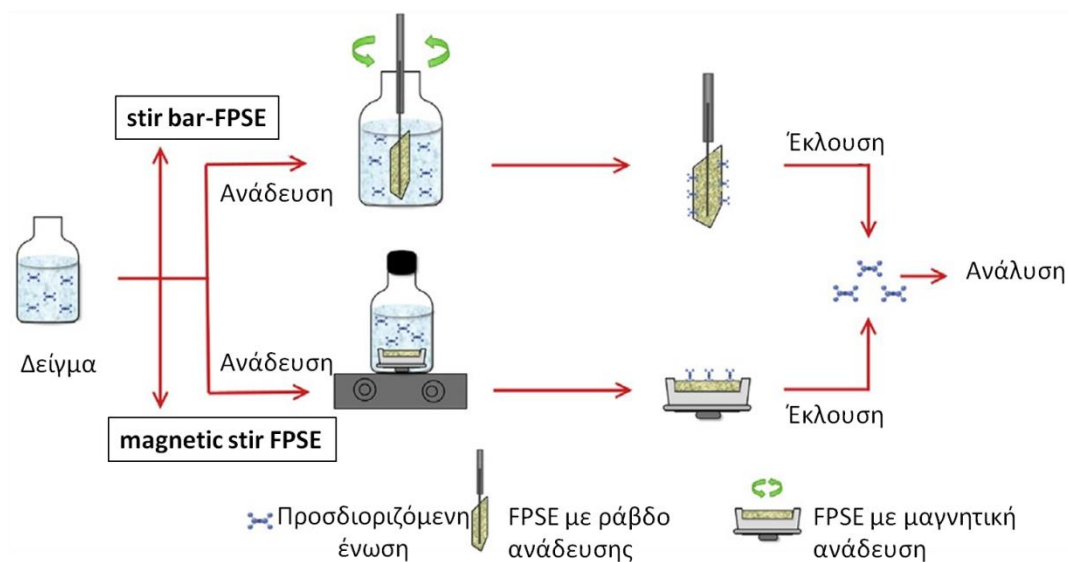
Η πολυπλοκότητα των δειγμάτων και η προσπάθεια αυτοματοποίησης των τεχνικών προκατεργασίας οδήγησε στην εισαγωγή και εφαρμογή νέων εναλλακτικών διατάξεων της FPSE, όπως είναι η stir FPSE, η stir-bar FPSE, η δυναμική FPSE και η αυτοματοποιημένη on-line FPSE.

4.5.1. Stir FPSE

Στη συμβατική τεχνική FPSE, η εκχύλιση των ενώσεων μπορεί να ευνοηθεί με τη μαγνητική ανάδευση του διαλύματος κατά την εκχύλιση. Στην Stir Fabric Phase Sorptive Extraction (SFPSE) [40], χρησιμοποιείται ένα επικαλυμμένο sol-gel υβριδικό οργανικό-ανόργανο μέσο FPSE και ένας μαγνητικός μηχανισμός ανάδευσης, προκειμένου να επιτευχθεί η ανάδευση του συνολικού συστήματος εκχύλισης. Για την κατασκευή της συσκευής SFPSE χρησιμοποιείται κάποιο τμήμα ενός φυσιγγίου SPE από πολυπροπυλένιο, ένα FPSE μέσο για τη διαδικασία της εκχύλισης και ένα σύρμα σιδήρου για να επιτραπεί η μαγνητική ανάδευση της συσκευής. Η συγκεκριμένη διάταξη εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για τον προσδιορισμό επτά ζιζανιοκτόνων τριαζίνης σε νερό. Το σύστημα ανάδευσης βελτίωσε την αποτελεσματικότητα και μείωσε το χρόνο της εκχύλισης, καθώς προσέφερε μεγάλη επιφάνεια επαφής και γρήγορη διάχυση των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

4.5.2. Stir bar-FPSE

Στο πλαίσιο της ανάδευσης του μέσου FPSE, εκτός από την προαναφερόμενη διάταξη, σχεδιάστηκε και μια δεύτερη καινοτόμα συσκευή εκχύλισης για τον προσδιορισμό τριών βρωμιούχων ρύπων σε δείγματα νερού [41]. Για την κατασκευή της stir bar-FPSE συσκευής, το μέσο FPSE κόπηκε σε σχήμα «σπιτιού» και προσαρμόστηκε κατάλληλα χρησιμοποιώντας μια ράβδο ανάδευσης, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 4.7.



Σχήμα 4.7. Απεικόνιση της εκχύλισης με τις συσκευές *stir bar-FPSE* και *magnetic stir FPSE* [41].

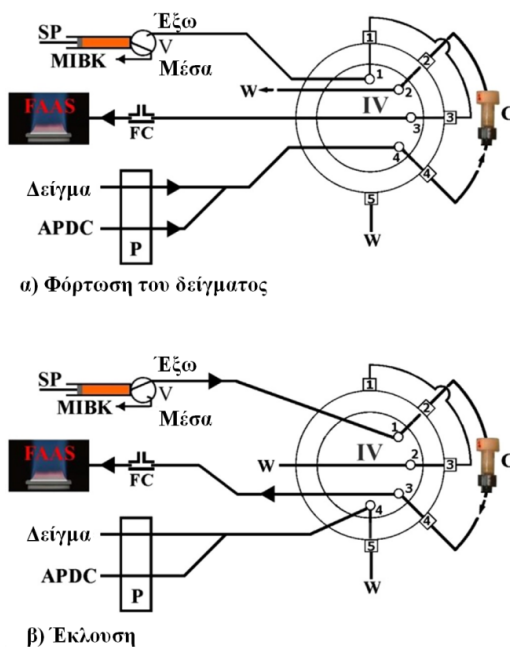
4.5.3. Δυναμική FPSE

Ο χρόνος εκχύλισης είναι αρκετά μεγάλος σε ορισμένες προκατεργασίες με βάση την τεχνική προκατεργασίας FPSE (έως και τέσσερις ώρες). Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, ο Lakade και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν για πρώτη φορά τη Dynamic Fabric Phase Sorptive Extraction (DFPSE), για την εκχύλιση φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας από δείγματα ποταμών και λυμάτων [42]. Η DFPSE χρησιμοποιεί κυκλικούς δίσκους από το μέσο FPSE, διαμέτρου 47 mm, οι οποίοι είναι εγκατεστημένοι σε μια συσκευή διήθησης. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις εκχυλίζονται στους FPSE δίσκους και εκλύονται με τη διάλυση του κατάλληλου διαλύτη έκλυσης μέσω της ίδιας συσκευής διήθησης. Με την προτεινόμενη δυναμική λειτουργία της FPSE αποδείχθηκε ότι μειώνεται εξαιρετικά ο χρόνος εκχύλισης και παρέχονται υψηλότερες ανακτήσεις σε σύγκριση με την κλασική FPSE.

4.5.4. Αυτοματοποιημένη FPSE

Οι ερευνητές στον κλάδο της αναλυτικής χημείας προσπαθούν όλο και περισσότερο να εισάγουν μεθόδους, οι οποίες να παρέχουν βελτιωμένα αναλυτικά αποτελέσματα και να είναι σύμφωνες με τις αρχές της πράσινης χημείας. Οι τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων με βάση την έγχυση σε ροή (Flow Injection, FI) χρησιμοποιούνται για το χειρισμό των ρευστών και την on-line προκατεργασία δειγμάτων και προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις «batch» τεχνικές

προκατεργασίας, όπως η χαμηλή κατανάλωση διαλυτών και η σημαντική βελτίωση της επαναληψιμότητας στη διαδικασία εκχύλισης. Πρόσφατα, ο Anthemidis και η ομάδα του [43] πρότειναν για πρώτη φορά την αυτοματοποίηση της τεχνικής FPSE σε on-line μικροστήλες προσυγκέντρωσης. Η νέα on-line flow injection τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με τη μορφή δίσκων (Fabric Disk Sorptive Extraction, FDSE) σε συνδυασμό με το φασματομέτρο ατομικής απορρόφησης με ατομοποιητή φλόγας (Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό μολύβδου και καδμίου σε δείγματα φυσικών νερών. Η μικρο-στήλη πληρώθηκε με το μέσο FPSE σε μορφή δίσκων και ενσωματώθηκε στο σύστημα FI, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 4.8. Στην παρούσα αυτοματοποιημένη τεχνική, οι μικρο-στήλες προσέφεραν ακόμα μεγαλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων και των προσροφητικών, οδηγώντας σε μια αποτελεσματικότερη εκχύλιση. Επίσης, η νέα πλατφόρμα FDSE παρείχε υψηλή αναπαραγωγιμότητα, σύντομους κύκλους ανάλυσης και καλή ευαισθησία σε σύγκριση με τη «batch» μορφή της FPSE. Η αυτοματοποιημένη τεχνική FI-FDSE-FAAS, με τη χρήση διαφορετικού προσροφητικού μέσου, εφαρμόστηκε δύο χρόνια αργότερα από την ίδια επιστημονική ομάδα για τον προσδιορισμό τοξικών στοιχείων σε βιολογικά δείγματα [44].



Σχήμα 4.8. Διάγραμμα του συστήματος FI-FDSE-FAAS. APDC: υδατικό διάλυμα 0.2% (m/v) διθειοκαρβαμιδικό αμμώνιο πυρρολιδίνης, MIBK: μεθυλο-ισοβουτυλο κετόνη, W: απόβλητα, P: περισταλτική αντλία, SP: αντλία σύριγγας, IV: βαλβίδα έγχυσης στη θέση φόρτωσης ή έκλυσης, V: βαλβίδα δύο θέσεων, FC: μονάδα αντιστάθμισης ροής, C: FDSE στήλη [43].

Τα τελευταία χρόνια, η FPSE έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας που ασχολείται με την προκατεργασία δείγματος. Λαμβάνοντας υπόψη τις μεθόδους εκχύλισης που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία, η FPSE έχει εφαρμοστεί για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό ενώσεων κυρίως σε περιβαλλοντικά δείγματα, σε δείγματα τροφίμων και λιγότερο σε βιολογικά δείγματα [38].

5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Τα βιολογικά υποστρώματα προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, τα ζώα, τα φυτά και οι μικροοργανισμοί, ή παράγονται με βιοτεχνολογικές μεθόδους. Το αίμα και τα ούρα λειτουργούν ως δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο, συνήθως τις τελευταίες δύο μέρες πρόσληψής του, και αποτελούν τα ευρέως χρησιμοποιούμενα βιολογικά δείγματα. Τα περισσότερα εργαστήρια προτιμούν τα εν λόγω υποστρώματα, λόγω της εύκολης δειγματοληψίας τους, καθώς και της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους.

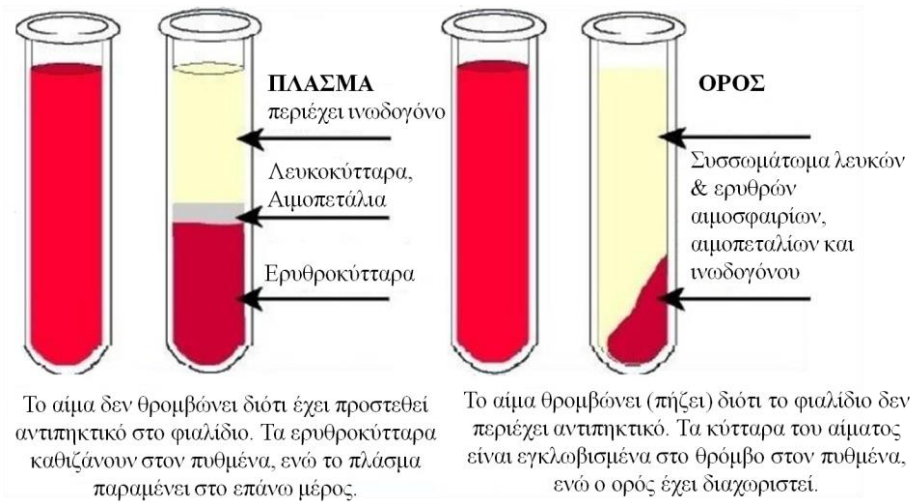
5.1. ΑΙΜΑ

Το αίμα είναι το βιολογικό υπόστρωμα που παρέχει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης μίας ουσίας και της δόσης που λήφθηκε. Ως ολικό αίμα χαρακτηρίζεται το αίμα που συνδυάζεται με έναν αντιπηκτικό παράγοντα κατά τη διαδικασία της συλλογής και θεωρείται ένα ειδικά τυποποιημένο προϊόν για μετάγγιση ή για περαιτέρω επεξεργασία για αναλυτικούς σκοπούς. Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα, μέσα στο οποίο περιέχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα και τα θραύσματα κυττάρων ή αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα. Επίσης, περιέχει αέρια, όπως το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο, και μεταφέρει σε μικρές ποσότητες μια μεγάλη ποικιλία από διαλυμένες χημικές ουσίες, όπως οι υδατάνθρακες (π.χ. γλυκόζη), οι πρωτεΐνες (π.χ. λευκώματα), οι ορμόνες, τα λίπη, οι ανόργανοι ηλεκτρολύτες και οι αζωτούχες ενώσεις.

Το πλάσμα αίματος είναι ένα κίτρινο, υγρό, άμορφο συστατικό του αίματος, το οποίο αποτελεί τη βάση του συνδετικού ιστού του κυκλοφορικού συστήματος. Προκύπτει με την επίδραση αντιπηκτικού παράγοντα στο αίμα, με τον οποίο απομακρύνονται τα κύτταρα του αίματος. Το πλάσμα αποτελεί το 55% του συνολικού όγκου αίματος και περιλαμβάνει περίπου 90% νερό, 8% πρωτεΐνες, γλυκόζη, αμινοξέα, ιχνοστοιχεία κ.α.

Αν το ολικό αίμα τοποθετηθεί σε ένα φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό και αφεθεί για κάποιο χρονικό διάστημα, το αίμα πήζει. Τότε τα κύτταρα του αίματος, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και οι πρωτεΐνες (ινωδογόνο) καθιζάνουν, δημιουργώντας ένα συσσωμάτωμα στον πυθμένα. Με αυτόν τον τρόπο, παραμένει στο υπερκείμενο το διαυγές, υποκίτρινο υγρό συστατικό του αίματος που ονομάζεται ορός. Ο ορός αίματος είναι ουσιαστικά το πλάσμα, απαλλαγμένο από το ινωδογόνο. Σε πολλές αναλύσεις προτιμάται ο ορός, διότι τα αντιπηκτικά στο πλάσμα

ενδέχεται να παρεμποδίζουν τα αποτελέσματα. Στο σχήμα 5.1. παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ του πλάσματος και του ορού αίματος [24,45].



Σχήμα 5.1. Διαφορές σύστασης μεταξύ πλάσματος και ορού [45].

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν επιστημονικές εργασίες που αναφέρονται στον προσδιορισμό των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (βενλαφαζίνη, παροξετίνη, φλουοξετίνη, αμιτριπυλίνη και κλομιπραμίνη) στο ανθρώπινο αίμα, καθώς και στον προσδιορισμό διάφορων φαρμακευτικών ουσιών με την τεχνική της FPSE.

6.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΑΙΜΑ

Η βενλαφαζίνη, η παροξετίνη, η φλουοξετίνη, η αμιτριπυλίνη και η κλομιπραμίνη ανήκουν στα ευρέως γνωστά και χρησιμοποιούμενα αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Συνεπώς, ο προσδιορισμός τους σε διάφορα βιολογικά δείγματα έχει απασχολήσει πολλά ερευνητικά εργαστήρια ανά τον κόσμο. Γι' αυτόν το λόγο, έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων που έχουν δημοσιευτεί από το 2000 και έπειτα, σχετικά με τον προσδιορισμό των εν λόγω φαρμάκων στο ανθρώπινο αίμα, με αποτέλεσμα να βρεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός επιστημονικών εργασιών και μεθόδων. Στον πίνακα 6.1. παρουσιάζονται ενδεικτικά, ορισμένες τεχνικές προκατεργασίας που έχουν εφαρμοστεί, κατηγοριοποιημένες ανά τις διάφορες μεθόδους ανάλυσης που ακολούθησαν, ξεκινώντας από τις χρονολογικά πιο πρόσφατες για την κάθε κατηγορία.

Οι τεχνικές ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, με αναφορές στην υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής πίεσης (UHPLC) και η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), ενώ έχουν εφαρμοστεί και άλλες τεχνικές, όπως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) και η διαφορική παλμική βολταμμετρία (Differential Pulse Voltammetry, DVP). Η ανίχνευση των ενώσεων γίνεται κυρίως με MS ή MS/MS. Η φασματοσκοπία μαζών προσφέρει άριστη ικανότητα ανίχνευσης και ταχύτητα στην ανάλυση. Εντούτοις, πολλά αναλυτικά εργαστήρια αδυνατούν να την εφαρμόσουν διότι απαιτείται οργανολογία ιδιαίτερα υψηλού κόστους και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό για το χειρισμό του οργάνου. Έτσι, αναφέρεται και η χρήση άλλων ανιχνευτών, όπως οι ανιχνευτές UV, DAD, PDA, FD και FID.

Οι τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί για την προκατεργασία του αίματος (ολικό αίμα, πλάσμα ή ορός αίματος) και τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι

αρκετές. Η πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η SPE, με αναφορές κυρίως στην SPME αλλά και την MSPE και τη μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό (Microextraction by Packed Sorbent, MEPS). Επίσης, εξίσου συχνά χρησιμοποιείται η LPME, σε διατάξεις, όπως η HF-LPME και η DLLME, ενώ παρατηρείται και η εφαρμογή της LLE. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε μια από αυτές τις τεχνικές παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα, όσο και κάποια μειονεκτήματα. Συνεπώς, η κατάλληλη τεχνική επιλέγεται με βάση το στόχο και τις συνθήκες της ανάλυσης.

Πίνακας 6.1. Μέθοδοι προσδιορισμού των αντικαταθλιπτικών στο ανθρώπινο αίμα.

Ένωση	Υπόστρωμα	Τεχνική προκατεργασίας	Προσροφητικό	Διαλύτης έκλουσης	Ανίχνευση	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	RSD%	Αναφορά/ Χρον/γία
LC									
Φλουοξετίνη						34	99		
Παροξετίνη						18	52		
Αγομελατίνη	Ολικό αίμα	DBS	Γυαλί με επικάλυψη πολυ(στυρένιο-διβινυλοβενζόλιο)	2% Οξικό οξύ σε μεθανόλη	MS/API-ES	33	96	<6	[46]/2018
Βουπροπρόνη						32	95		
Σιταλοπράμη						19	61		
Μιρταζαπίνη						38	100		
Τραζοδόνη						18	53		
Αμιτριπυλίνη									
Κλομιπραμίνη						1,41	10		
Φλουοξετίνη						1,55	10		
Παροξετίνη						1,74	10		
Βενλαφαξίνη						0,80	10		
Αγομελατίνη	Ολικό αίμα	IL-DLLME	Ιονικό υγρό: 1-βουτυλο-3 μεθυλιμιδαζολιο εξαφθοροφωσφορικό	-	MS/MS	1,10	10	<20 ^a	[47]/2018
Βουπροπρόνη						1,63	10		
Ντοσουλεπίνη						0,99	10		
Ντοξεπίνη						1,26	10		
Ντουλοξετίνη						1,04	10		
Εσκιταλοπράμη						0,78	10		
Ιμιπραμίνη						1,08	10		
Μαπροτιλίνη						1,04	10		
Μιανσερίνη						1,38	10		

Μιρταζαπίνη						1,41	10		
Νορτριπυλίνη						1,68	10		
Ρεβοξετίνη						1,26	10		
Τραζοδόνη						35,15	250		
Φλουοξετίνη	Πλάσμα	DPX	Πολυανιλίνη/Στυρένιο- διβινυλοβενζόλιο	Ακετονιτρίλιο	FD		10		[48]/2015
Νορφλουοξετίνη						-	80	-	
HPLC									
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	MSPE	Fe ₃ O ₄ @TMU-10	Ακετονιτρίλιο	UV (220 nm)	4	8	3,6-5,2	[49]/2018
Ιμιπραμίνη									
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	UA-IL-DLLME	1-οκτυλο-3-μεθυλο ιμιδαζόλιο εξα- φθοροφωσφορικό	-	DAD (240 nm για αμιτρ., 226 nm για βενλαφ.)	0,8		<5	[50]/2018
Βενλαφαξίνη						0,5	-		
Φλουοξετίνη	Πλάσμα	SBSE	Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο	Μεθανόλη- Ακετονιτρίλιο (75:25 v/v)	FD	9,80	32,67	<16	[51]/2018
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	UA-dμSPE-CAE	Υδροφοβα MNPs	Ακετονιτρίλιο	UV (250 nm)	1,4	4,8	<5	[52]/2016
Νορτριπυλίνη						0,76	2,5		
Ντοξεπίνη						0,51	1,7		
Παροξετίνη						1,50	5,00		
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	in-tube SPME	Υβριδικό οργανικό- ανόργανο μονολιθικό πυρίτιο με λειτουργικές ομάδες κυανοαιθυλίου	Ακετονιτρίλιο- Οξικό νάτριο (40:60 v/v) (κινητή φάση)	MS/ESI	0,07	0,23	<16,5	[53]/2010
Φλουοξετίνη						0,09	0,30		
Κλομιπραμίνη						0,10	0,35		
Τραζοδόνη						0,10	0,34		
Κλοζαπίνη						2,95	9,83		

Σιταλοπράμη						0,15	0,49		
Ντοοξεπίνη						0,23	0,77		
Φλουβοξαμίνη						0,66	2,19		
Σερτραλίνη						2,87	9,56		
R-Φλουοξετίνη							10		
S-Φλουοξετίνη	Πλάσμα	In tube-SPME	Επικάλυψη τριχοειδούς με πολυπυρρόλη	Μεθανόλη	FD	5	10	<8	[54]/2009
R- Νορφλουοξετίνη							15		
S- Νορφλουοξετίνη							15		
Αμιτριπυλίνη		Καταβύθιση πρωτεϊνών από τον ορό και αραίωση του υπερκείμενου με νερό				4,0	10		
Δεσιπραμίνη	Ορός		-	-	MS/MS	5,4	14	-	[55]/2009
Ιμιπραμίνη						2,5	19		
Νορτριπυλίνη						5,5	21		
Φλουοξετίνη	Πλάσμα	Τριών φάσεων HF-LPME	n-εξυλαιθέρας	Υδροχλωρικό οξύ	FD	-	5	-	[56]/2009
Νορφλουοξετίνη									
Αμιτριπυλίνη				Υδατικό διάλυμα		0,5	1,7		
Ιμιπραμίνη	Πλάσμα	HF-LPME	n-δωδεκάνιο	(pH 2,1 με H ₃ PO ₄)	UV (215 nm)	0,5	1,7	2-12	[57]/2007
Σερτραλίνη						0,7	2,3		

Φλουοξετίνη Νορφλουοξετίνη	Πλάσμα	SPME	Ένα από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο- διβινυλοβενζόλιο	Ακετονιτρίλιο	UV (227 nm)	1 ^β 5 ^β	25	<20	[58]/2007
Φλουοξετίνη Σιταλοπράμη Παροξετίνη Βενλαφαζίνη	Πλάσμα	SPE	Waters Oasis HLB 1cc	HAc-Μεθανόλη	MS/ESI	0,5 0,3 0,3 0,1	-	<15	[59]/2005
Φλουοξετίνη Νορφλουοξετίνη	Πλάσμα	SPE	Oasis HLB, Μακροπορώδες πολυμερές από διβινυλοβενζόλιο και N-βινυλο πυρρολιδόνη	Μεθανόλη	DAD (230 nm)	15	30	1,9-3,2	[60]/2004
Παροξετίνη	Πλάσμα	LLE	Εξάνιο-ισοαμυλική αλκοόλη (99:1 v/v)	-	UV (205 nm)	-	5	<10	[61]/2003
Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη Δεσιπραμίνη Δοξεπίνη Ιμιπραμίνη Οπιπραμόλη	Ολικό αίμα	LLE	Εξάνιο-ισοαμυλική αλκοόλη (99:1 v/v)	-	DAD (254 και 220 nm)	250 50 50 50 50 125 ^γ	-	<12	[62]/2003

UHPLC

Φλουοξετίνη						5	20		
Παροξετίνη	Πλάσμα	MEPS	C ₈	Μεθανόλη με 1% μυρμηκικό οξύ	FD	1	5	-	[63]/2017
Νορφλουοξετίνη						5	20		
Βενλαφαξίνη							3		
O-δισμεθυλοβενλαφαξίνη	Πλάσμα	MISPE	Μικροδίσκοι Sterile CA Syringe Filter RC	Μεθανόλη	MS/MS	-	5	-	[64]/2016
N-δισμεθυλοβενλαφαξίνη							3		
Βενλαφαξίνη						4	13		
Φλουοξετίνη						5	17		
Μιρταζαπίνη	Πλάσμα	UA-DLLME	Χλωροφόρμιο	-	PDA	4	12	<8,1	[65]/2016
Εσκιταλοπράμη						5	17		
Φλουβοξαμίνη						5	17		
Σερτραλίνη						4	13		
GC									
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	ADLLM	Τολουόλιο	-	FID	2	20	3,6-5,4	[66]/2018
Δοξεπίνη									
Αμιτριπυλίνη			Ακετονιτρίλιο			1	3		
Κλομιπραμίνη	Πλάσμα	LLLE DLLME	n-εξάνιο	1,2- Διβρωμοαιθάνιο	FID	2	6	3,9-7,5	[67]/2018
Ιμιπραμίνη			Οξικό οξύ 0,07 M			3	11		
Αμιτριπυλίνη	Πλάσμα	M-μ-SPE	Fe ₃ O ₄ -MCM-41	Ακετονιτρίλιο	MS	0,020 0,028	0,060 0,084	4,1-9,9	[68]/2017
Χλωρπρομαζίνη									

Κλομπραμίνη						3,75	12,50		
Βουπροπίονη	Ορός			Διχλωρομεθάνιο:		6,25	20,83		
Μιρταζαπίνη	Πλάσμα	SPE	Chem Elut	2-προπανόλη	MS	2,50	8,33	<13	[69]/2016
Σερτραλίνη	Ολικό αίμα			(90:10 v/v)		7,50	25,00		
Σιταλοπράμη						4,69	15,63		
Φλουοξετίνη						7,1	21,6		
Βενλαφαξίνη						9,3	28,3		
Αμιτριπυλίνη						4,0	12,1		
Κλομπραμίνη						7,1	21,5		
Παροξετίνη						9,3	28,2		
Τριμιπραμίνη						3,1	9,4		
Νορτριπυλίνη						5,2	15,6		
Μιανσερίνη	Ολικό αίμα	SPE	Oasis HLB® 3cc	Μεθανόλη	MS/MS	3,9	11,7	8,1-16,6	[70]/2016
Ιμιπραμίνη						3,3	9,9		
Μιρταζαπίνη						3,3	10,0		
Σερτραλίνη						9,7	29,3		
Δοθιεπίνη						5,2	15,9		
Σιταλοπράμη						5,0	15,2		
N-						6,8	20,7		
Δεσμεθυλοκλομπραμίνη									

Αμιτριπτυλίνη						4,39	13,31		
Ιμιπραμίνη					MSD	0,50	1,53	1,25-5,47	
Σιταλοπράμη						0,54	1,64		
Φλουοξετίνη	Ολικό αίμα	SPE	Bond Elut Certify	Διχλωρομεθάνιο- ισοπροπανόλη- αμμωνία (78:20:2)	NDP	20,07	60,82		[71]/2013
Σερτραλίνη						1,08	3,28	0,78-2,36	
					μECD	8,36	25,32		
						5,03	15,25		
Αμιτριπτυλίνη						0,7	2,00		
Κλομιπραμίνη						1,5	5,00		
Φλουοξετίνη						0,3	1,00		
Παροξετίνη		SPE,		Οξικός		1,5	5,00		
Βενλαφαζίνη		παραγωγοποίηση		αιθυλεστέρας:		1,5	5,00		
Μαπροτιλίνη	Ολικό αίμα	με επαφθορο	Bond Elut Certify LRC	ισοπροπανόλη:	MS	0,3	1,00	<11,7	[72]/2012
Μιρταζαπίνη		βουτυρικό		υδροξείδιο		0,7	2,00		
Νορτριπτυλίνη		ανυδρίτη		αμμωνίου (85: 15:		0,3	1,00		
Σερτραλίνη				3 v v /v)		0,3	1,00		
Φλουβοξαμίνη						0,7	2,00		
Σιταλοπράμη						0,7	2,00		
Κλομιπραμίνη			HF Υποστηριζόμενη			0,8			
Ιμιπραμίνη	Πλάσμα	EME	υγρή μεμβάνη-2- νιτροφαινυλο οκτυλο αιθέρας	Υδατικό διάλυμα pH 2	FID	0,5	-	<11,9	[73]/2012

						39	128		
						70	231		
			Chem Elut	Διχλωρομεθάνιο- ισοπροπανόλη (85:15 v/v)		67	222	<20	
Βενλαφαξίνη						103	340		
Βιλοξαζίνη						153	504		
Ιμιπραμίνη	Ολικό αίμα	SPE			NDP	62	204		
Δεσιπραμίνη				Ακετόνη- διχλωρομεθάνιο (1:1),		24	79		[74]/2002
Σερτραλίνη						23	76		
Αμοξαπίνη			Bond Elut Certify	Διχλωρομεθάνιο- ισοπροπανόλη- αμμωνία (78:14:8)		21	70	<11	
						39	130		
						100	330		
						42	140		
CE									
Αμιτριπτυλίνη									
Κλομιπραμίνη									
Παροξετίνη									
Φλουοξετίνη									
Βνελαφαξίνη									
Ιμιπραμίνη	Πλάσμα	SPE	Oasis HLB	Μεθανόλη	TOF-MS	0,5-1	1-5	<14	[75]/2010
Νορτριπτυλίνη									
Δεσιπραμίνη									
Λοφεπραμίνη									
Τριμιπραμίνη									
Αμοξαπίνη									

Μαπροτιλίνη										
Μιανσερίνη										
Σετιπιλίνη										
Φλουβοξαμίνη										
Σερτραλίνη										
Σιταλοπράμη										
Μιλνασιπράνη										
Σουλπιρίδη										
Τραζοδόνη										
Αμιτριπυλίνη							20	30		
Ιμιπραμίνη	Πλάσμα	LLE	Εξάνιο-ισοαμλική αλκοόλη (99:1 v/v)	-	DAD (214 nm)		30	50	1,2-14,1	[76]/2004
Δεσιπραμίνη							30	50		
Νορτριπυλίνη							20	30		
DVP										
			Μεθακρυλικό οξύ και							
Φλουοξετίνη	Πλάσμα	MIP-CPE	βινυλοβενζόλιο ως μονομερή	-	-	0,0015 ^δ	-	-		[77]/2016

^α εκτός από την φλουβοξαμίνη, για την οποία το RSD είναι <22

^β το LOD καθορίστηκε ως η συγκέντρωση, όπου η κορυφή της ένωσης ήταν δύο φορές υψηλότερη από τον θόρυβο της βασικής γραμμής

^γ το LOD αναφέρεται για 254 nm, ενώ τα υπόλοιπα αναφέρονται για 220 nm

^δ το LOD σε μM

6.2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE

Η τεχνική προκατεργασίας FPSE είναι μια απλή, γρήγορη και «πράσινη» τεχνική προκατεργασίας των δειγμάτων, η οποία εισήχθη πρόσφατα στο χώρο της επιστήμης και απασχολεί τους ερευνητές μόλις από το 2014. Παρά το μικρό χρονικό διάστημα των 5 ετών που έχει μεσολαβήσει από τότε, η FPSE έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό ποικίλων χημικών ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα (57.14%), σε δείγματα τροφίμων (25%) και σε βιολογικά δείγματα (17.86%) από διάφορα εργαστήρια σε διεθνές επίπεδο [38].

Ειδικότερα, η FPSE έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για την εκχύλιση ποικίλων φαρμακευτικών ουσιών, με σκοπό τον προσδιορισμό τους σε δείγματα διαφορετικού τύπου. Συνεπώς, προς μελέτη της εφαρμογής της FPSE σε φαρμακευτικές ουσίες και προς ενδιαφέρον της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων προσδιορισμού των εν λόγω ουσιών σε συνδυασμό με την τεχνική προκατεργασίας των δειγμάτων FPSE.

Μελετώντας τα αποτελέσματα της ανασκόπησης, η FPSE έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών, μεταξύ των οποίων είναι τα αντικαταθλιπτικά, τα αντικαρκινικά, τα αντιφλεγμονώδη, τα αντιβιοτικά, τα κυτταροστατικά και τα ορμονικά φάρμακα, καθώς επίσης και τα μυκητοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα φάρμακα.

Σχετικά με τη μέθοδο ανάλυσης, είναι εμφανές πως στις περισσότερες περιπτώσεις η τεχνική FPSE έχει εφαρμοστεί σε συνδυασμό με την HPLC σε συστοιχία με ανιχνευτή DAD. Εντούτοις, οι εκχυλισμένες φαρμακευτικές ουσίες έχουν αναλυθεί και με LC, UHPLC και GC, χρησιμοποιώντας ανιχνευτές όπως MS, MS/MS, PDA, UV ή FD.

Στην πλειονότητα των τεχνικών που βρέθηκαν, το βέλτιστο προσροφητικό μέσο FPSE έχει ως υπόστρωμα την κυτταρίνη, ενώ η επικάλυψη sol-gel έχει γίνει με πολυαιθυλενο γλυκόλη (poly ethylene glycol, PEG). Επίσης, υπάρχουν αναφορές, στις οποίες έχει γίνει επικάλυψη με ιοντικό υγρό, γραφένιο, πολυ(αιθυλενο γλυκόλη)-*block*-πολυ(προπυλενο γλυκόλη)-*block*-πολυ(αιθυλενο γλυκόλη) (poly (ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol), PEG-PPG-PEG) ή πολυτετραϋδροφουράνιο (polytetrahydrofuran, PTHF). Ο διαλύτης που φαίνεται να εφαρμόζεται για την έκλυση των εκχυλισμένων ενώσεων είναι κυρίως η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο ή ένα μίγμα μεθανόλης-ακετονιτρίλιου σε διάφορες αναλογίες, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και ο οξικός αιθυλεστέρας.

Στον πίνακα 6.2. παρουσιάζονται οι τεχνικές FPSE που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία, κατηγοριοποιημένες ανά τις διάφορες μεθόδους ανάλυσης που ακολούθησαν, ξεκινώντας από τις χρονολογικά πιο πρόσφατες τεχνικές για την κάθε κατηγορία.

Πίνακας 6.2. Μέθοδοι προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών με την τεχνική προκατεργασίας δείγματος FPSE.

Τύπος Ένωσης	Ένωση	Δείγμα	Υπόστρωμα	Sol-gel επικάλυση	Διαλύτης έκλουσης	Ανίχνευση	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	RSD%	Αναφορά/ Χρον/γία		
FPSE - LC												
Φάρμακα- Προϊόντα περιποίησης	Μεθυλοπαραμπένιο											
	Καρβαμαζεπίνη						0,01	0,05				
	Προπυλοπαραμπένιο						0,01	0,05				
	2,4- διϋδροξυβενζοφαινόνη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη	MS/MS	0,002	0,02	<18	[78]/2015		
	Βενζυλοπαραμπένιο						0,001	0,02				
	2,2-διϋδροξυ-4- 4μεθοξυβενζοφαινόνη	λυμάτων, Νερό ποταμού					0,002	0,02				
	Δικλοφαινάκη						0,001	0,02				
	3-βενζοφαινόνη						0,002	0,02				
	Τρικλοκαρβάνη						0,003	0,01				
	Τρικλοσάνη						0,05	0,2				
FPSE – HPLC												
Αντικαταθλιπτικά	Βενλαφαξίνη Παροξετίνη Φλουοξετίνη Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη	Ούρα	Κυτταρίνη	Γραφένιο	Μεθανόλη- Ακετονιτρίλιο (50:50 v/v)	DAD	150	500			<14	[79]/2019

Αντικαρκινικά	Αναστροζόλη	Ολικό αίμα	Κυτταρίνη	PEG-PPG-PEG	Μεθανόλη	DAD	20	50	3,1-12,8	[80]/2018
	Λετροζόλη	Πλάσμα					100	250	2,7-11,2	
	Εξεμεστάνη	Ούρα					30	100	1,4-11,9	
Αντιφλεγμονώδη	Σιπροφλοξίνη	Ολικό αίμα	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη	PDA	20	50	2,5-11,6	[81]/2018
	Σουλφασαλαζίνη	Πλάσμα					100	250	1,8-11,2	
	Κορτιζόνη	Ούρα					30	100	0,8-12,3	
Αντιβιοτικά- Πενικιλίνες	Βενζυλοπενικιλίνη	Βοδινό γάλα	Κυτταρίνη	PEG	Ακετονιτρίλιο	DAD	3,0 ^α	10,0 ^β	1,8-16,1	[82]/2017
	Κλοξακιλίνη						6,0 ^α	20,0 ^β		
	Δικλοξακιλίνη						7,5 ^α	25,0 ^β		
	Οξακιλίνη						9,0 ^α	30,0 ^β		
Μυκητοκτόνα	Αζοχυστροβίνη	Τσάι	Βαμβάκι	1-εξυλο- 3- μεθυλμιδαζόλιο δισ τριφθορο μεθανο σουλφονιμίδιο (ιονικό υγρό)	Ακετονιτρίλιο	DAD	0,9-0,11	0,3-0,37	1,8-7,3	[83]/2017
	Χλωροθαλονίλη						0,18-0,23	0,6-0,77		
	Κυπροντινίλη						0,12-0,17	0,4-0,57		
	Τριφλοξυστροβίνη						0,10-0,12	0,33-0,40		

Αντιμικροβιακά - Αζόλες	Κετοконаζόλη Τερκοναζόλη Βορικοναζόλη Διφοναζόλη Κλοτριμαζόλη Θειοκοναζόλη Εικοναζόλη Βουτοκοναζόλη Μικοναζόλη Ποσακοναζόλη Ραβουκοναζόλη Αντιτρακοναζόλη	Πλάσμα Ούρα	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη	PDA	30	100	<14	[84]/2016
Βενζοδιαζεπίνες	Βρομαζεπάμη Διαζεπάμη Λοραζεπάμη Αλπραζολάμη	Ορός αίματος	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη- Ακετονιτρίλιο (50:50 v/v)	DAD	10	30	<13,6	[85]/2015
Αντιβιοτικά- Σουλφοναμίδια	Σουλφαμεθαζίνη Σουλφισοξαζόλη Σουλφαδιμεθοξίνη	Γάλα	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη, Ακετονιτρίλιο	UV	-	-	<6,8	[86]/2015
Αντιβιοτικά- Αμφενικόλες	Χλωραμφενικόλη Φλορφενικόλη Θειαμφενικόλη	Γάλα	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη	DAD	-	-	<14,1	[87]/2015

		Υπόγειο Νερό Νερό ποταμού Πόσιμο νερό					0,042	0,139		
Οιστρογόνα	Δισφαινόλη Α β-εστραδιόλη 17α-αιθθυλεστραδιόλη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και Νοσοκομείο Ούρα	Κυτταρίνη	PTHF	Μεθανόλη	FD	0,020	0,066	<3,2	[88]/2014
							0,036	0,199		
FPSE - UHPLC										
Μυκητοκτόνα Εντομοκτόνα	Πυρμεθανίλη Κυπροδινίλη Αμετοκτραδίνη Μεταλαξύλη Πενκοναζόλη Μυκλοβουτανίλη Τριαδιμενόλη Φενεξαμίδη Τεβουκοναζόλη Φλουσιλαζόλη Ιπροβαλικάρβη Βεναλαχύλη Προπικοναζόλη Βοσκαλίδη Διμεθόμφη	Κρασί	Κυτταρίνη	PEG	Ακετονιτρίλιο -Μεθανόλη (80:20 v/v)	MS/MS	-	0,07-0,3	-	[89]/2019

	Πυρακλοστροβίνη									
	Αζοξυστροβίνη									
	Διφαινοκοναζόλη									
	Τριφλοξυστροβίνη									
	Μεθιοκάρβη									
	Μεθυλο- Χλωροπυριφος									
	Χλωροπυριφος									
Κυτταροστατικά	Ετοποσίδη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, Νοσοκομειακά απόβλητα	Κυτταρίνη	M-PEG	Μεθανόλη	MS/MS	0,0074	0,0246	3,96-12,5	[90]/2017
	Κυκλοφωσφαμίδιο						0,0038	0,0127		
	Βινκριστίνη						0,0980	0,3268		
	Βινβλαστίνη						0,0399	0,1328		
	Ταμοξιφαίνη						0,00009	0,0003		
Ανδρογόνα Προγεσταγόνα	Νορεθιστερόνη						0,0335			
	Νοργεστρέλη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων Νοσοκομειακά απόβλητα Νερό βρύσης	Κυτταρίνη	PTHF	Μεθανόλη	MS/MS	0,0017		<22,8	[91]/2016
	Μεγεστρόλη						0,0214			
	Προγεστερόνη						0,0069			
	Βολντενόνη						0,0469	-		
	Νανδρολόνη						0,0507			
	Τεστοστερόνη						0,0022			
	Δεϋδροεπιανδροστερόνη						0,264			
	Ανδροστερόνη						0,0636			
Ανδροστενεδιόνη	0,0194									

							0,0352			
							0,1323			
							0,0111			
							0,0128			
		Ούρα					0,0379	-	<20	
							0,0501			
							0,0089			
							0,1106			
							0,0800			
							0,0256			

FPSE - GC

Μη στεροϊδή αντιφλεγμονώδη	Ιβουπροφαίνη Ναπροξένη Κετοπροφαίνη Δικλοφαινάκη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, Νερού ποταμού	Κυτταρίνη	PEG	Οξικός αιθυλεστέρας	MS	0,0008	0,003	3,5-18	[92]/2015
							0,002	0,005		
							0,005	0,015		
							0,002	0,007		

Εναλλακτικές FPSE σε συνδυασμό με LC/UHPLC

Dynamic FPSE - LC

Φάρμακα- Προϊόντα περιποίησης	Μεθυλοπαραμπένιο									
	Καρβαμαζεπίνη						0,004	0,05		
	Προπυλοπαραμπένιο						0,004	0,05		
	2,4- διϋδροξυβενζοφαινόνη	Απόβλητα από εγκαταστάσεις					0,002	0,05		
	Βενζυλοπαραμπένιο	επεξεργασίας	Κυτταρίνη	PEG	Οξικός αιθυλεστέρας	MS/MS	0,002	0,05	2-20	[42]/2016
	2,2-διϋδροξυ-4-4- μεθοξυβενζοφαινόνη	λυμάτων, Νερό ποταμού					0,002	0,02		
	Δικλοφαινάκη						0,002	0,1		
	3-βενζοφαινόνη						0,008	0,05		
	Τρικλοκαρβάνη						0,02	0,1		
	Τρικλοσάνη									

Stir FPSE - UHPLC

Ζιζανιοκτόνα	Σιμαζίνη						0,14	0,46		
	Ατραζίνη						0,24	0,79		
	Σεκβουμετόνη						0,08	0,26		
	Τερβουμετόνη	Νερό ποταμού	Κυτταρίνη	PEG	Μεθανόλη	DAD	0,08	0,26	1,4-11,8	[40]/2014
	Προπαζίνη						0,11	0,36		
	Προμετρίνη						0,47	1,5		
Τερβουτρίνη						0,08	0,26			

^α LOD σε µg/kg

^β LOQ σε µg/kg

7. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας απλής και αποτελεσματικής μεθόδου προκατεργασίας του ορού ανθρώπινου αίματος με την τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction), για την ταυτόχρονη εκχύλιση πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, της βενλαφαζίνης, της παροξετίνης, της φλουοξετίνης, της αμιτριπτυλίνης και της κλομιπραμίνης, καθώς και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography) και τον ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector).

Με τη χρήση των βέλτιστων συνθηκών για το διαχωρισμό και την έκλουση των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο σύστημα HPLC, έγινε επικύρωση της χρωματογραφικής μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα. Εν συνεχεία, η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος. Διαφορετικά μέσα προσρόφησης FPSE με ποικίλες επιστρώσεις, σύμφωνα με την τεχνολογία επίστρωσης sol-gel, μελετήθηκαν για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Ακολούθως, έγινε βελτιστοποίηση της προκατεργασίας των δειγμάτων, με τη μελέτη διαφορετικών παραμέτρων, όπως ο χρόνος εκχύλισης και έκλουσης των ενώσεων, η ανάδευση κατά την εκχύλιση και την έκλουση και ο διαλύτης έκλουσης. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση της αποπρωτεΐνωσης του ορού αίματος στην εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Η επικύρωση της διαδικασίας έγινε με τον έλεγχο της γραμμικότητας, της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας, της επαναληψιμότητας, της ενδιάμεσης πιστότητας και της ανθεκτικότητας (τεστ Youden & Steiner) της μεθόδου, ενώ μελετήθηκε η σταθερότητα των εμβολιασμένων δειγμάτων σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, καθώς και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του επιλεγμένου μέσου προσρόφησης FPSE. Τέλος, μελετήθηκε το μαθηματικό μοντέλο για το επιλεγμένο μέσο FPSE, με στόχο την πρόβλεψη της απόδοσής του για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, χρησιμοποιώντας τις $\log K_{ow}$ τιμές τους.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΥΛΙΚΑ

8.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης που χρησιμοποιήθηκε (σχήμα 8.1.) ήταν της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan) και αποτελούνταν από:

- ✓ Αντλία LC-10AD_{VP}.
 - ✓ Βαλβίδα μίξης διαλυτών FCV-10AL_{VP}.
 - ✓ Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής όγκου 20 μ L (Rheodyne LP, Cotati, California, USA)
 - ✓ Αναλυτική στήλη LiChroCART-LiChrospher®100 RP-8e (5 μ m, 250 \times 4 mm) (Merck, Darmstadt, Germany).
 - ✓ Ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων SPD-M10A_{VP}
 - ✓ Σύστημα ελέγχου SCL-10AL_{VP}
 - ✓ Λογισμικό ελέγχου και καταγραφής αποτελεσμάτων LabSolutions-LC solutions
- Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φιάλη ηλίου και μονάδα απαέρωσης διαλυτών DGU-10B, καθώς και φιάλες αποθήκευσης διαλυτών των 1000 mL.



Σχήμα 8.1. Σύστημα HPLC-PDA για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε ορό αίματος.

8.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ✓ Efexor XR κάψουλες που περιέχουν 150 mg βενλαφαξίνης (VEN) (Pfizer Hellas, Athens, Greece).
- ✓ Seroxat δισκία που περιέχουν 20 mg παροξετίνης (PAR) (GlaxoSmithKline, Athens, Greece).

- ✓ Zinovat διάλυμα (5 mL) που περιέχει 20 mg φλουοξετίνης (FLU) (Uni-Pharma, Athens, Greece).
- ✓ Saroten κάψουλες που περιέχουν 25 mg αμιτριπυλίνης (AMIT) (Gerolymatos Medical Athens, Greece).
- ✓ Anafranil δισκία που περιέχουν 10 mg κλομιπραμίνης (CLO) (Novartis Hellas, Athens, Greece).
- ✓ Μεθανόλη (Chem-Lab, Zedelgem, Belgium) καθαρότητας HPLC.
- ✓ Ακετονιτρίλιο (Fisher Scientific, Leicestershire, UK) καθαρότητας HPLC.
- ✓ Οξικό αμμώνιο (Merck, Darmstadt, Germany) αναλυτικής καθαρότητας.
Το δις-απιονισμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε, προήλθε από στήλες εγκατεστημένες στο χώρο του εργαστηρίου.

8.3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΥΛΙΚΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ Αναλυτικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$ g Shimadzu AUX120.
- ✓ Γυάλινο σύστημα διήθησης διαλυτών υπό κενό (Altech Associates Inc, Deerfield, Illinois, USA).
- ✓ Φυγόκεντρος Hermle Z-230 (Hermle AG, Gosheim, Germany).
- ✓ Λουτρό υπερήχων Transonic 460/H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany)
- ✓ Συσκευή vortex (Glasscol, Terre Haute, Indiana, USA).
- ✓ Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Gerhardt, Bonn, Germany).
- ✓ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 20-200 μ L (CappAero ecoripette Single, EU).
- ✓ Μικροσύριγγα εισαγωγής δείγματος 100 μ L (Innovative Labor Systems GmbH).
- ✓ Φιαλίδια Eppendorf
- ✓ Φίλτρα μεμβράνης νιτρικής κυτταρίνης διαμέτρου 0.2 μ m (Whatman Inc, Clifton, New Jersey, USA).
- ✓ Προσροφητικά μέσα FPSE με υπόστρωμα κυτταρίνης:
 - sol-gel poly(ethylene glycol) (sol-gel PEG)
 - sol-gel poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol) (sol-gel PEG-PPG-PEG)
 - sol-gel poly(tetrahydrofuran) (sol-gel PTHF)
 - sol-gel C₈
 - sol-gel C₁₈

- sol-gel poly(dimethyldiphenylsiloxane) (sol-gel PDMDPS)
 - sol-gel poly(dimethylsiloxane) short chain (sol-gel PDMS short chain)
 - sol-gel poly(diphenylsiloxane)
 - sol-gel poly(caprolactone-dimethylsiloxane-caprolactone) (sol-gel PCL-PDMS-PCL)
 - sol-gel graphene
 - sol-gel C₁₈-(3-mercaptopropyl) trimethoxysilane (sol-gel C₁₈-3MPTMS)
 - sol-gel poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (sol-gel PEO-PPO-PEO).
- ✓ Προσροφητικά μέσα FPSE με υπόστρωμα πολυεστέρα:
- sol-gel PDMDPS
 - sol-gel PDMS short chain
 - sol-gel poly(diphenylsiloxane)
 - sol-gel PCL-PDMS-PCL
 - sol-gel chitosan
 - negatively charged

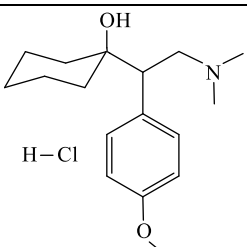
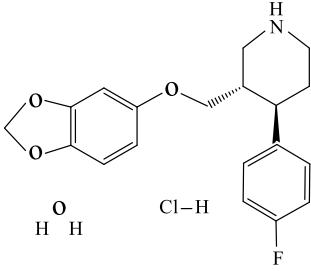
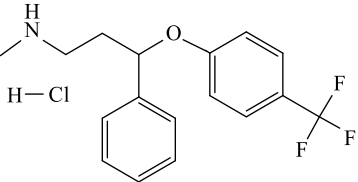
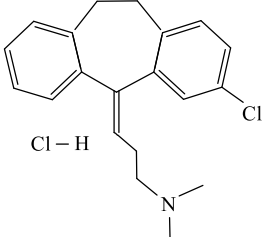
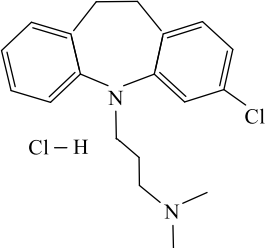
Όλα τα προσροφητικά μέσα FPSE που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν στο Διεθνές Πανεπιστήμιο της Φλόριντα.

9. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

9.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι δραστικές ενώσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία δίνονται στον πίνακα 9.1. Όλες οι προσδιοριζόμενες ενώσεις βρίσκονται στα φάρμακα ως υδροχλωρικές, ενώ η PAR είναι και ημι-ένυδρη.

Πίνακας 9.1. Προσδιοριζόμενες ενώσεις και ιδιότητες [93,94].

Ένωση	Χημική δομή	Κατηγορία	$\log K_{ow}$	pKa	Δότης δεσμού υδρογόνου	Δέκτης δεσμού υδρογόνου
VEN		SNRI	3,2	10,09	1	3
PAR		SSRI	3,6	9,77	3	6
FLU		SSRI	4,05	9,8	1	5
AMIT		TCA	4,92	9,76	0	1
CLO		TCA	5,19	9,2	0	2

9.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

9.2.1. Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης

Τα φάσματα απορρόφησης UV των προσδιοριζόμενων ενώσεων (VEN, PAR, FLU, AT, CLO) μελετήθηκαν και επιλέχθηκε το βέλτιστο μήκος κύματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κάθε ένωσης, που ήταν τα 235 nm. Οι ενώσεις ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων.

9.2.2. Επιλογή κινητής φάσης

Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε για την έκλουση των προσδιοριζόμενων ενώσεων ήταν ένα μίγμα των διαλυτών CH₃CN:CH₃COONH₄ (0,05 M). Ο βέλτιστος διαχωρισμός των ενώσεων επετεύχθη με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης διάρκειας 15 λεπτών, που περιγράφεται στον πίνακα 9.2. Τόσο το πρόγραμμα έκλουσης, όσο και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (1,2 mL/min) επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη ερευνητική εργασία [79].

9.2.3. Τελικές χρωματογραφικές συνθήκες

Ο βέλτιστος διαχωρισμός των αντικαταθλιπτικών ουσιών επετεύχθη με τις συνθήκες του χρωματογραφικού συστήματος που παρουσιάζονται στον πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2. Τελικές χρωματογραφικές συνθήκες.

	Χρόνος (min)	CH ₃ COONH ₄ (0,05 M) (%)	CH ₃ CN (%)
Σύστημα βαθμωτής έκλουσης	0,01	65	35
	5	50	50
	8	35	65
	15(stop)	35	65
Ταχύτητα ροής	1,2 mL/min		
Πίεση	120-190 bar		
Εισαγόμενος όγκος	20 μL		
Ανιχνευτής	PDA SPD-M10A _{VP} , λ=235 nm		

10. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

10.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ

Για την παρασκευή διαλύματος $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 M, ζυγίστηκαν 0,9635 g της ουσίας, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, το διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ διηθήθηκε υπό κενό, προκειμένου να καταστεί κατάλληλο για χρήση στο σύστημα HPLC.

10.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

10.2.1. Πυκνά πρότυπα διαλύματα

Πυκνά μεθανολικά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν για την κάθε προσδιοριζόμενη ένωση και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου (4°C). Οι συγκεντρώσεις αυτών των διαλυμάτων ήταν 100 ng/μL για την VEN, 400 ng/μL για την PAR, 80 ng/μL για την FLU, 500 ng/μL για την AMIT και 200 ng/μL για την CLO.

Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των VEN, PAR, AMIT και CLO έγινε από δισκία, ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Λειοτρίβηση του δισκίου σε ιγδίο πορσελάνης.
- ✓ Ποσοτική μεταφορά του κονιοποιημένου δισκίου σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, παραλαμβάνοντας τη σκόνη με μεθανόλη.
- ✓ Προσθήκη μεθανόλης στην ογκομετρική φιάλη, αλλά όχι μέχρι τη χαραγή.
- ✓ Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης στο λουτρό υπερήχων για περίπου 15 min προς πλήρη διάλυση του φαρμάκου.
- ✓ Προσθήκη μεθανόλης μέχρι την χαραγή.
- ✓ Διήθηση του διαλύματος για την απομάκρυνση των εκδόχων που δε διαλύθηκαν και μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε καθαρή ογκομετρική φιάλη.

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος της FLU χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα (5 mL) από τη Zinovat που περιέχει 20 mg φλουοξετίνης. Κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα αραιώθηκε με μεθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL.

10.2.2. Πρότυπα διαλύματα εργασίας

Πρότυπα υδατικά διαλύματα εργασίας, που περιείχαν και τα πέντε αντικαταθλιπτικά φάρμακα σε διάφορες συγκεντρώσεις μεταξύ 0,5 και 15 ng/μL,

παρασκευάζονταν στο εργαστήριο με αραιώση των πυκνών διαλυμάτων, προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλες μετρήσεις.

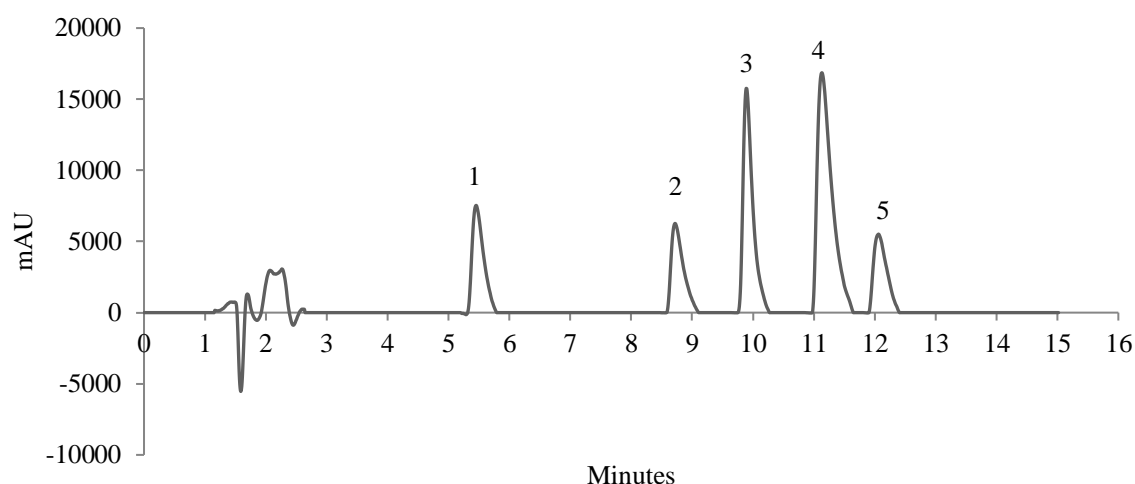
10.3. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Παρασκευάστηκαν έξι πρότυπα υδατικά διαλύματα, τα οποία περιλάμβαναν τα πέντε αντικαταθλιπτικά φάρμακα σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, 10 και 15 ng/μL. Για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, προκειμένου να μελετηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου. Ως μέτρο γραμμικότητας χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2), ο οποίος κυμάνθηκε από 0,9919 έως 0,9979. Στον πίνακα 10.1. παρουσιάζονται οι εξισώσεις για κάθε καμπύλη αναφοράς, όπου y είναι το εμβαδόν της κορυφής της κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης και x είναι η συγκέντρωση της ένωσης σε ng/μL, καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού.

Πίνακας 10.1. Καμπύλες αναφοράς των πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων για τα πρότυπα υδατικά διαλύματα.

Προσδιοριζόμενη ένωση	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	Συντελεστής προσδιορισμού (r^2)
VEN	$y = 8882x - 887,28$	0,9979
PAR	$y = 8522,2x - 5653,2$	0,9939
FLU	$y = 15773x - 5215,5$	0,9979
AMIT	$y = 25306x - 16378$	0,9919
CLO	$y = 6823,6x + 751,34$	0,9956

Ένα τυπικό χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος εργασίας συγκέντρωσης 10 ng/μL που ελήφθη σύμφωνα με τις εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζεται στο σχήμα 10.1.



Σχήμα 10.1. Χρωματογράφημα για υδατικό πρότυπο διάλυμα των αντικαταθλιπτικών συγκέντρωσης 10 ng/μL. (1) VEN 5,429 min, (2) PAR 8,693 min, (3) FLU 9,888 min, (4) AMIT 11,075 min και (5) CLO 12,062 min.

10.4. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantification, LOQ), ορίζονται ως η μικρότερη συγκέντρωση μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά αντίστοιχα, με βεβαιότητα 95%. Τα μεγέθη LOD και LOQ δίνονται από τις σχέσεις:

$$\text{LOD} = 3.3 \times \frac{S}{N} \quad (10.1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S}{N} \quad (10.2)$$

όπου S είναι το σήμα και N είναι ο θόρυβος. Στην παρούσα εργασία, το όριο ποσοτικής αποτίμησης των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών για τα πρότυπα διαλύματά τους ήταν 0,5 ng/μL, ενώ το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση που ποσοτικοποιήθηκε διά του 3, δηλαδή 0,16 ng/μL.

11. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

11.1. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Οι αιμοδότες ήταν εθελοντές, υγιείς μεταπτυχιακοί φοιτητές, οι οποίοι δεν λάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή, γνώριζαν το σκοπό της αιμοληψίας και ήταν σύμφωνοι με τη διαδικασία. Η αιμοληψία γινόταν στο εργαστήριο Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. από εξειδικευμένο προσωπικό.

Μετά την παραλαβή του αίματος σε καλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα, το αίμα αφηνόταν να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 - 30 min. Έπειτα, ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 10 min, με αποτέλεσμα να αφαιρεθεί ο θρόμβος. Το προκύπτον υπερκείμενο υγρό, που αποτελούσε τον ορό αίματος, μεταφερόταν με τη χρήση πιπέτας μέσα σε καθαρά erpendorf και αποθηκευόταν στο ψυγείο.

11.2. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE

Το αρχικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την προκατεργασία του ανθρώπινου ορού αίματος με την τεχνική προκατεργασίας FPSE, μετά τον εμβολιασμό του με πρότυπο διάλυμα, βασίστηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία [79] και έχει ως εξής:

Στάδιο 1^ο: Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE

- ✓ Εμβάπτιση του μέσου FPSE σε 2 mL διαλύματος CH₃OH:CH₃CN (50:50 v/v) για 5 min, για την απομάκρυνση τυχόν ανεπιθύμητων ακαθαρσιών από το υλικό και την ενεργοποίηση του μέσου για την εκχύλιση.
- ✓ Έκπλυση του μέσου FPSE με 2 mL απιονισμένου νερού.

Στάδιο 2^ο: Εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων

- ✓ Προσθήκη 50 μL ορού αίματος, 500 μL μεθανολικού πρότυπου διαλύματος των ενώσεων και 450 μL απιονισμένου νερού σε γυάλινο φιαλίδιο.
- ✓ Τοποθέτηση ενός μαγνήτη ανάδευσης με επικάλυψη από τεφλόν και του μέσου FPSE με ειδική λαβίδα μέσα στο φιαλίδιο.
- ✓ Ισχυρή ανάδευση για 15 min.
- ✓ Παραλαβή του μέσου με ειδική λαβίδα.

Στάδιο 3^ο: Έκλυση των προσδιοριζόμενων ενώσεων

- ✓ Έκπλυση του μέσου με απιονισμένο νερό και ξήρανση πάνω σε διηθητικό χαρτί για 5 min.
- ✓ Προσθήκη 500 μL $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v) σε γυάλινο φιαλίδιο.
- ✓ Τοποθέτηση του μέσου με ειδική λαβίδα μέσα στο φιαλίδιο για 15 min.
- ✓ Παραλαβή του εκλούσματος και διήθηση σε σύριγγα με φίλτρο, εάν απαιτείται.
- ✓ Έγχυση του εκλούσματος στο σύστημα HPLC.

Στάδιο 4^ο: Επανάληψη του 1^{ου} σταδίου, ξήρανση για 5 min σε διηθητικό χαρτί και αποθήκευση του μέσου FPSE για επόμενη χρήση.

11.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE

Προς βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας του δείγματος για την εκχύλιση των αντικαταθλιπτικών, εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν διάφοροι πειραματικοί παράγοντες. Ο κάθε παράγοντας μελετήθηκε διατηρώντας τους υπόλοιπους σταθερούς. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν είναι οι εξής: το προσροφητικό μέσο FPSE, ο χρόνος εκχύλισης και η ανάδευση κατά την εκχύλιση, ο διαλύτης έκλυσης, ο χρόνος έκλυσης και η ανάδευση κατά την έκλυση, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας και η αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος. Η βελτιστοποίηση δεν έγινε σε πρότυπο διάλυμα των ενώσεων, γιατί είχε γίνει ήδη σε προηγούμενη ερευνητική εργασία [79]. Έτσι, η βελτιστοποίηση διεξήχθη απευθείας με τη χρήση ορού αίματος που εμβολιάστηκε με πρότυπο διάλυμα των ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/ μL .

11.3.1. Επιλογή του προσροφητικού μέσου FPSE

Προκειμένου να βρεθεί το βέλτιστο προσροφητικό μέσο FPSE για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από τον ορό αίματος, χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος εμβολιασμένος αρχικά με μεθανολικό πρότυπο διάλυμα των ενώσεων συγκέντρωσης 10 ng/ μL . Σύμφωνα με το αρχικό πρωτόκολλο της τεχνικής προκατεργασίας, έγιναν δοκιμές σε δεκαοκτώ διαφορετικά μέσα FPSE, τα οποία αναφέρονται στον πίνακα 11.1.

Πίνακας 11.1. Τα εξεταζόμενα προσροφητικά μέσα FPSE και οι ιδιότητές τους.

Επικάλυψη sol-gel	Υπόστρωμα	Sorbent loading (mg/5 cm ²)
sol-gel PEG 300	Κυτταρίνη (Κ/νη)	N.A.
sol-gel PEG-PPG-PEG	Κυτταρίνη	28,4
sol-gel PTHF	Κυτταρίνη	19,8
sol-gel C ₈	Κυτταρίνη	11,64
sol-gel C ₁₈	Κυτταρίνη	24,4
sol-gel PDMDPS	Κυτταρίνη	25,10
sol-gel PDMDPS	Πολυεστέρας (Π/ρας)	9,65
sol-gel PDMS short chain	Κυτταρίνη	22,8
sol-gel PDMS short chain	Πολυεστέρας	N.A.
sol-gel poly(diphenylsiloxane)	Κυτταρίνη	N.A.
sol-gel poly(diphenylsiloxane)	Πολυεστέρας	N.A.
sol-gel PEO-PPO-PEO	Κυτταρίνη	N.A.
sol-gel graphene	Κυτταρίνη	N.A.
sol-gel C ₁₈ -3MPTMS	Κυτταρίνη	N.A.
sol-gel chitosan	Κυτταρίνη	N.A.
negatively charged	Πολυεστέρας	N.A.
sol-gel PCL-PDMS-PCL	Κυτταρίνη	30,7
sol-gel PCL-PDMS-PCL	Πολυεστέρας	N.A.

N.A.: Not available (Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία)

Από τις δοκιμές στα διαφορετικά προσροφητικά μέσα, υπολογίστηκαν οι απόλυτες ανακτήσεις % των αντικαταθλιπτικών από το δείγμα, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 11.2. Όπως εξάγεται από τα αποτελέσματα, το υφασμάτινο μέσο FPSE από πολυεστέρα με επικάλυψη sol-gel πολυκαπρολακτόνης-διμεθυλοσιλοξανίου-πολυκαπρολακτόνης (sol-gel PCL-PDMS-PCL) έδωσε τις καλύτερες απόλυτες ανακτήσεις % για τα πέντε αντικαταθλιπτικά φάρμακα, κυμαινόμενες μεταξύ 5,6 και 45,6%, οπότε και επιλέχθηκε ως βέλτιστο για τις περαιτέρω δοκιμές. Επίσης, έγιναν δοκιμές εκχύλισης τόσο με δύο πολυεστερικά μέσα sol-gel PCL-PDMS-PCL ταυτόχρονα, όσο και με συνδυασμό ενός πολυεστερικού sol-gel PCL-PDMS-PCL με το μέσο που έδωσε τα αμέσως επόμενα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή το sol-gel C₁₈. Εντούτοις, δεν προέκυψε σημαντική αύξηση στις ανακτήσεις των ενώσεων.

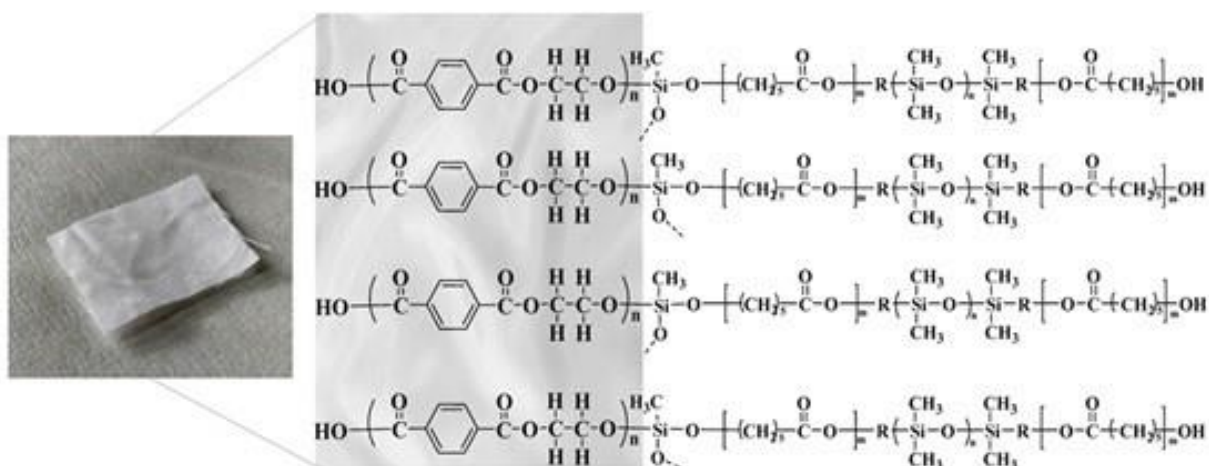
Πίνακας 11.2. Απόλυτες ανακτήσεις % των προσδιοριζόμενων ενώσεων κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου με δοκιμές σε διαφορετικά προσροφητικά μέσα FPSE.

Επικάλυψη sol-gel	Απόλυτη ανάκτηση %				
	VEN	PAR	FLU	AMIT	CLO
sol-gel PEG 300 (K/vη)	6,7	16,1	22,2	34,8	42,9
sol-gel PEG-PPG-PEG (K/vη)	3,3	4,8	13,7	26,3	39,2
sol-gel PTHF (K/vη)	5,2	6,6	17,7	36,4	40,6
sol-gel C ₁₈ (K/vη)	6,3	11,4	18,4	35,5	42,6
sol-gel C ₈ (K/vη)	6,1	12,3	14,1	25,8	33,0
sol-gel PDMDPS (K/vη)	1,4	6,2	7,5	14,0	16,5
sol-gel PDMDPS (Π/ρας)	27,2	6,3	6,4	19,1	19,3
sol-gel PDMS short chain (K/vη)	5,8	12,0	12,7	28,9	25,3
sol-gel PDMS short chain (Π/ρας)	0	2,3	1,9	1,4	2,2
sol-gel poly(diphenylsiloxane) (K/vη)	4,3	6,0	8,7	11,4	8,5
sol-gel poly(diphenylsiloxane) (Π/ρας)	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
sol-gel PEO-PPO-PEO (K/vη)	1,6	4,8	7,2	23,6	25,0
sol-gel graphene (K/vη)	4,0	2,2	7,8	6,9	3,9
sol-gel C ₁₈ -3MPTMS(K/vη)	4,8	3,6	6,2	6,4	9,2
sol-gel chitosan (K/vη)	2,1	3,0	5,5	6,4	8,4
negatively charged (Π/ρας)	0,0	4,8	0,6	9,1	3,8
sol-gel PCL-PDMS-PCL (K/vη)	3,6	8,5	14,6	34,6	39,7
sol-gel PCL-PDMS-PCL (Π/ρας)	5,6	23,8	27,6	35,8	45,6

11.3.1.1. Μελέτη του πολυεστερικού μέσου FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL

Στην τεχνική προκατεργασίας FPSE, τόσο το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στο προσροφητικό μέσο FPSE, όσο και η sol-gel επίστρωση είναι μείζονος σημασίας, καθώς συμβάλλουν στην τελική εκλεκτικότητα και στην πολικότητα του μέσου εκχύλισης, ανάλογα με την υδρόφοβη ή την υδρόφιλη φύση τους. Οι εξεταζόμενες ενώσεις είναι μετρίως πολικές ή μη πολικές ($\log K_{ow} > 3$). Ως εκ τούτου, ένα υδρόφοβο υπόστρωμα θα ήταν κατάλληλο προκειμένου να επιταχυνθεί η εκχύλιση των ενώσεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο πολυεστέρας που είναι ένα υδρόφοβο συνθετικό πολυμερές, φαίνεται να

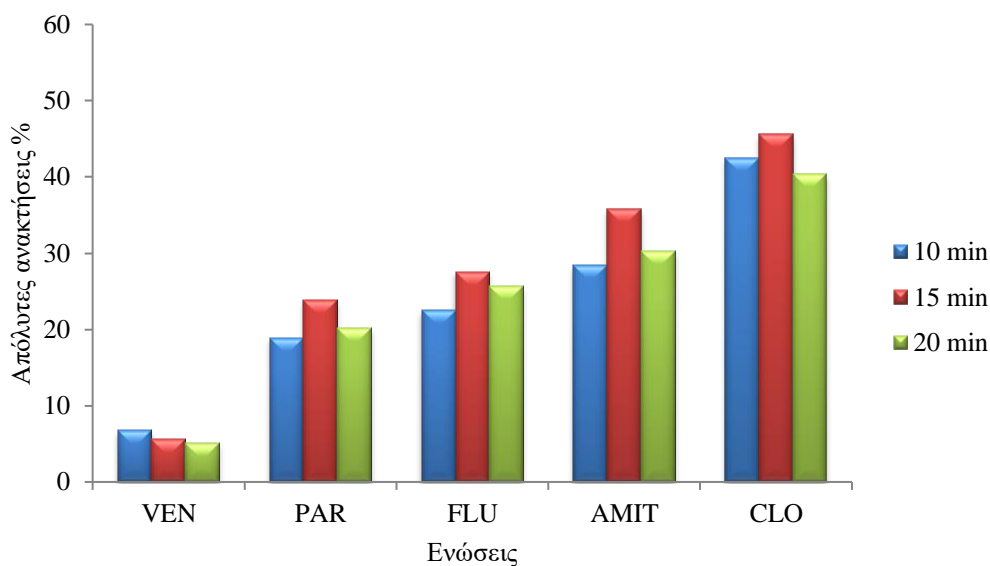
πλεονεκτεί έναντι της υδρόφιλης κυτταρίνης. Το πολυεστερικό μέσο FPSE επικαλυμμένο με sol-gel PCL-PDMS-PCL αποτελείται από το υδρόφοβο πολυεστερικό υπόστρωμα και το μετρίως πολικό PCL-PDMS-PCL, η δομή του οποίου φαίνεται στο σχήμα 11.1. Το πολυ-διμεθυλο-σιλοξάνιο (PDMS) είναι ένα μη πολικό πολυμερές, με αποτέλεσμα συνήθως να εφαρμόζεται για την εκχύλιση μη πολικών ενώσεων. Επίσης, παρουσιάζει ευελιξία και υψηλή θερμική σταθερότητα. Η πολυκαπρολακτόνη (PCL) είναι ένα υδρόφιλο ημι-κρυσταλλικό πολυμερές, το οποίο είναι εύκολα συμβατό με άλλα πολυμερή. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις φυσικοχημικές ιδιότητες, το πολυεστερικό μέσο sol-gel PCL-PDMS-PCL φαίνεται κατάλληλο για την αποτελεσματική εκχύλιση των μη πολικών και μετρίως πολικών προσδιοριζόμενων ενώσεων.



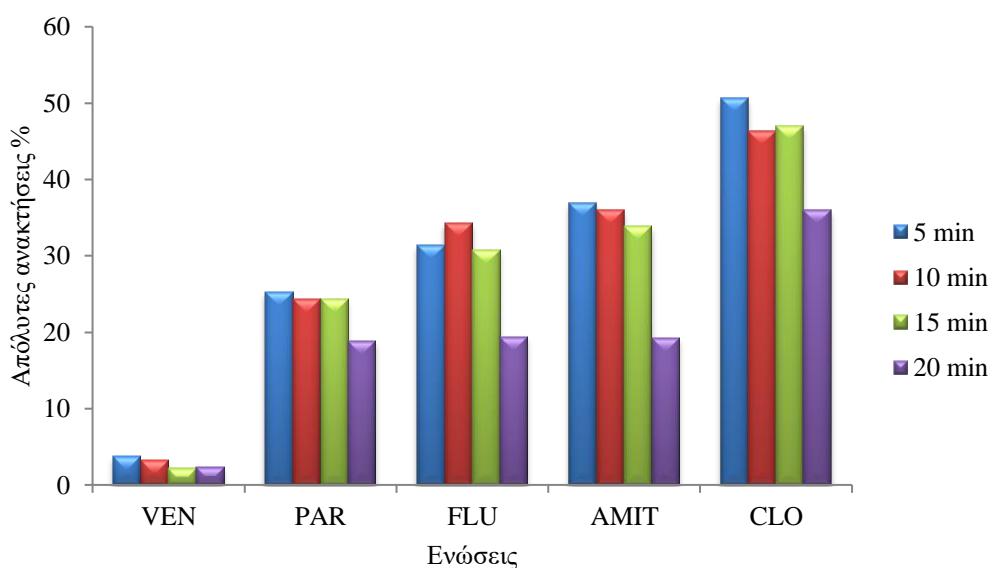
Σχήμα 11.1. Σχηματική αναπαράσταση της επίστρωσης sol-gel PCL-PDMS-PCL, που δημιουργεί χημικό δεσμό με το πολυεστερικό υπόστρωμα [44].

11.3.2. Χρόνος εκχύλισης και χρόνος έκλουσης των ενώσεων

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του χρόνου εκχύλισης και έκλουσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων με την τεχνική προκατεργασίας FPSE, δοκιμάστηκαν οι χρόνοι 10, 15 και 20 min για την εκχύλιση των ενώσεων (σχήμα 11.2.), και 5, 10, 15 και 20 min για την έκλουση των ενώσεων (σχήμα 11.3.). Η ισορροπία στην εκχύλιση των ενώσεων από το δείγμα παρατηρήθηκε στα 15 min. Αντίστοιχα, ο βέλτιστος χρόνος έκλουσης βρέθηκε να είναι μόλις τα 5 min, καθώς μετά από αυτό το χρονικό διάστημα δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω σημαντική αύξηση στην ανάκτηση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.



Σχήμα 11.2. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στις ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων με την τεχνική FPSE.

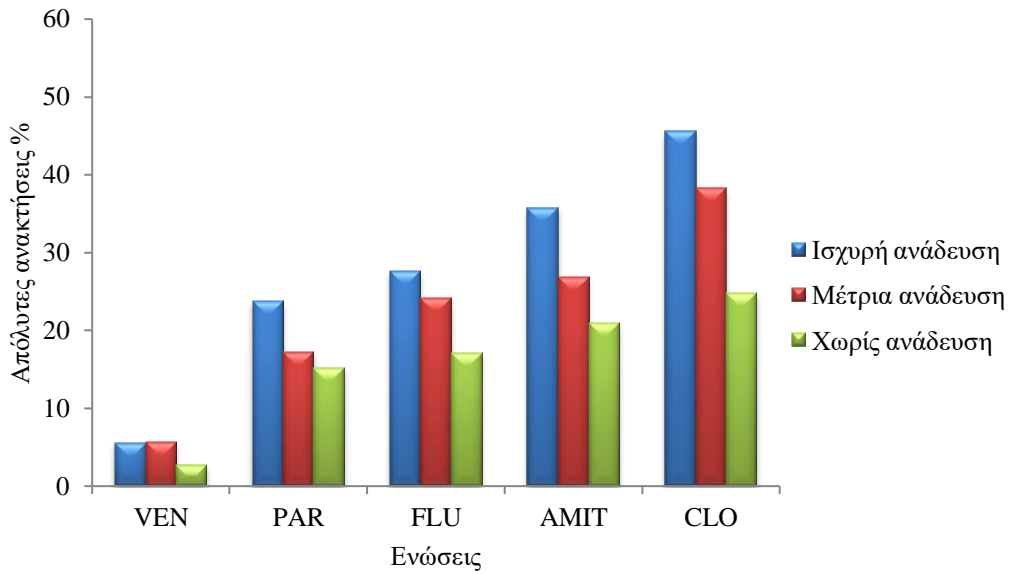


Σχήμα 11.3. Επίδραση του χρόνου έκλουσης στις ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων με την τεχνική FPSE.

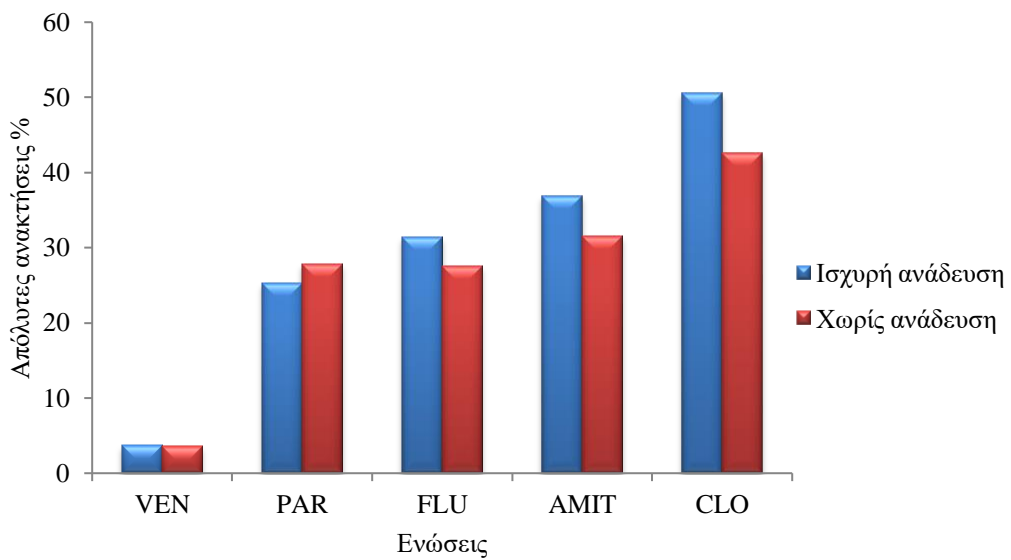
11.3.3. Ανάδευση κατά την εκχύλιση και την έκλουση των ενώσεων

Όπως φαίνεται στα σχήματα 11.4. και 11.5., η μαγνητική ανάδευση του διαλύματος κατά την εκχύλιση και την έκλουση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, όχι μόνο επιτάχυνε την όλη διαδικασία, αλλά παρατηρήθηκε ότι όσο πιο έντονη ήταν η εφαρμοζόμενη ανάδευση, τόσο καλύτερες ήταν οι ληφθείσες ανακτήσεις. Συνεπώς, τόσο

στην εκχύλιση, όσο και στην έκλυση των ενώσεων εφαρμόστηκε ισχυρή μαγνητική ανάδευση του διαλύματος.



Σχήμα 11.4. Επίδραση της ανάδευσης κατά την εκχύλιση των ενώσεων.

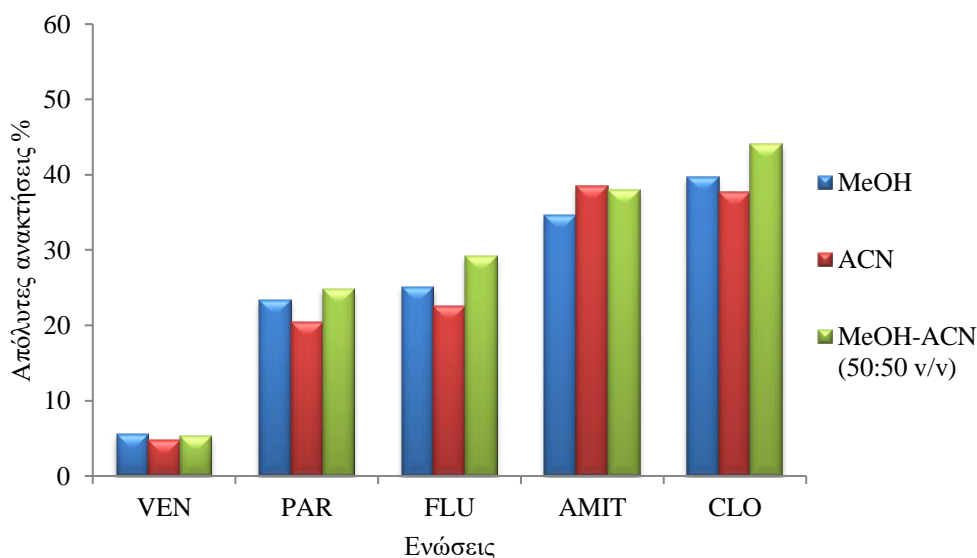


Σχήμα 11.5. Επίδραση της ανάδευσης κατά την έκλυση των ενώσεων.

11.3.4. Διαλύτης έκλουσης των ενώσεων

Ο διαλύτης έκλουσης είναι μια ακόμα σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της τεχνικής προκατεργασίας δείγματος FPSE. Συνεπώς, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το μίγμα $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}$ (50:50 v/v) εξετάστηκαν ως διαλύτες έκλουσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Μεταξύ αυτών, η χρήση του μίγματος οδήγησε σε υψηλότερες ανακτήσεις, όπως αναπαρίσταται στο σχήμα 11.6.

Σχετικά με το χρησιμοποιούμενο όγκο του διαλύτη έκλουσης, δοκιμάστηκαν τα 500 μL και το 1 mL του μίγματος. Εν τούτοις, οι ανακτήσεις των ενώσεων ήταν ουσιαστικά παρόμοιες για τους δύο εξεταζόμενους όγκους. Επίσης, εξετάστηκε και πάλι ο όγκος του 1 mL για το σύστημα έκλουσης, αυτή τη φορά με εξάτμιση των διαλυτών μέχρι ξηρού, επανασύσταση σε 500 μL διαλύτη έκλουσης και έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα. Παρ' όλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση στην ανάκτηση των ενώσεων. Ως εκ τούτου, ο όγκος που επιλέχθηκε για το σύστημα έκλουσης ήταν τα 500 μL , καθώς παρείχαν καλύτερη προσυγκέντρωση των ενώσεων.



Σχήμα 11.6. Επίδραση του διαλύτη έκλουσης στις ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων με την τεχνική FPSE.

Οι απόλυτες ανακτήσεις των ενώσεων που ελήφθησαν μετά την βελτιστοποίηση των προαναφερθέντων πειραματικών παραγόντων στην τεχνική προκατεργασίας FPSE παρουσιάζονται στον πίνακα 11.3.

Πίνακας 11.3. Απόλυτες ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες της τεχνικής προκατεργασίας FPSE.

Ένωση	Απόλυτη ανάκτηση%
VEN	3,7
PAR	25,3
FLU	31,4
AMIT	36,9
CLO	50,6

11.3.5. Βελτιστοποίηση των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας των προσδιοριζόμενων ενώσεων εξετάστηκε και βελτιστοποιήθηκε. Ο πίνακας 11.4. συγκρίνει τις απόλυτες ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών, που λήφθηκαν με τη χρήση του πρότυπου διαλύματος των ενώσεων συγκέντρωσης 10 ng/μL, αραιωμένου σε μεθανόλη και απιονισμένο νερό, και του βέλτιστου μέσου FPSE. Οι ανακτήσεις είναι σημαντικά αυξημένες στην περίπτωση του υδατικού πρότυπου διαλύματος. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις είναι μετρίως πολικές ή μη πολικές (υψηλές τιμές $\log K_{ow}$), με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια προς την οκτανόλη, από ό,τι προς το νερό. Κατ' αναλογία, οι ενώσεις έδειξαν υψηλότερη συγγένεια προς το μέσο FPSE, όταν ήταν διαλυμένες στο νερό παρά στη μεθανόλη. Συνεπώς, η χρήση του υδατικού πρότυπου διαλύματος κατέστησε ευκολότερη και αποτελεσματικότερη την εκχύλιση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων από το προσροφητικό μέσο.

Πίνακας 11.4. Απόλυτες ανακτήσεις % των προσδιοριζόμενων ενώσεων υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες FPSE, με τη χρήση πρότυπου διαλύματος αραιωμένου σε μεθανόλη και σε απιονισμένο νερό (10 ng/μL).

	Απόλυτη ανάκτηση %	
	Μεθανολικό πρότυπο διάλυμα	Υδατικό πρότυπο διάλυμα
VEN	3,7	9,4
PAR	25,3	58,3
FLU	31,4	64,2
AMIT	36,9	81,9
CLO	50,6	88,1

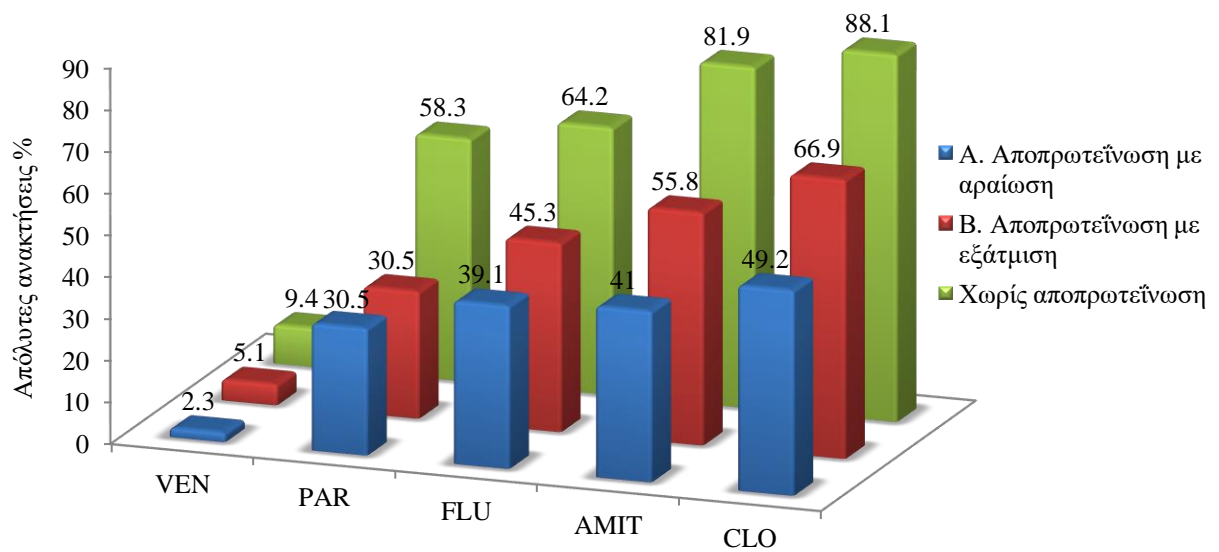
Η χρωματογραφική μέθοδος είχε επικυρωθεί σε πρότυπα μεθανολικά διαλύματα εργασίας των ενώσεων, και υπό τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς τους. Μετά τα παραπάνω αποτελέσματα όμως, έγινε εκ νέου επικύρωση της μεθόδου σε πρότυπα υδατικά διαλύματα εργασίας των ενώσεων και κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς τους, δεδομένα που δίνονται στις παραγράφους 10.3. και 10.4.

11.3.6. Αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος

Η επίδραση των πρωτεϊνών του ορού αίματος στην εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μελετήθηκε με την εφαρμογή της τεχνικής FPSE σε εμβολιασμένο ορό αίματος, ο οποίος υπέστη αποπρωτεΐνωση με την προσθήκη ακετονιτριλίου. Πειραματικά, η αποπρωτεΐνωση έγινε με δύο τρόπους και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- ✓ Προσθήκη 50 μL ορού αίματος, 500 μL υδατικού πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ και 200 μL ακετονιτριλίου σε ένα φιαλίδιο erpendorf.
 - ✓ Ανάδευση σε συσκευή vortex.
 - ✓ Φυγοκέντρηση για 15 min.
 - ✓ Παραλαβή του υπερκειμένου διαλύματος και μεταφορά σε ένα καθαρό φιαλίδιο erpendorf.
- A) Αραίωση του διαλύματος με απιονισμένο νερό σε αναλογία όγκων 1:4.
- B) Εξάτμιση του διαλύματος με άζωτο, μέχρι την μείωση του όγκου του κατά 200 μL .
- ✓ Προκατεργασία του διαλύματος με βάση το τελικό πρωτόκολλο FPSE και ανάλυση στο σύστημα HPLC.

Στο σχήμα 11.7. παρουσιάζονται γραφικά οι ληφθείσες ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων μετά από την αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος με τους δύο τρόπους, καθώς και οι αντίστοιχες ανακτήσεις, χωρίς την αποπρωτεΐνωση του υποστρώματος.



Σχήμα 11.7. Επίδραση της αποπρωτεΐνωσης του ορού αίματος στην εκχύλιση των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών ενώσεων.

Από τα αποτελέσματα των δοκιμών, φαίνεται ότι η αποπρωτεΐνωση του εμβολιασμένου ορού αίματος, δε βελτίωσε την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων με κανέναν από τους δύο τρόπους. Αντιθέτως, ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία οδήγησε σε χαμηλότερες ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών, σε σύγκριση με αυτές που ελήφθησαν χωρίς την αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος. Κατά συνέπεια, η εν λόγω διαδικασία δεν εφαρμόστηκε στην προτεινόμενη μέθοδο προκατεργασίας FPSE.

11.4. ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE

Το τελικό πρωτόκολλο για την προκατεργασία του εμβολιασμένου ανθρώπινου ορού αίματος, όπως προέκυψε μετά τη βελτιστοποίηση της τεχνικής FPSE (σχήμα 11.8.), είναι ακριβώς όπως το αρχικό, με δύο σημαντικές διαφορές:

- ✓ Χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα εργασίας των προσδιοριζόμενων ενώσεων αραιωμένα σε απιονισμένο νερό και όχι σε μεθανόλη.
- ✓ Η έκλουση των ενώσεων γίνεται πλέον υπό ισχυρή ανάδευση, και αντί για 15 min, διαρκεί μόλις 5 min.



Σχήμα 11.8. Διαδικασία προκατεργασίας δείγματος με την τεχνική FPSE.

11.5. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

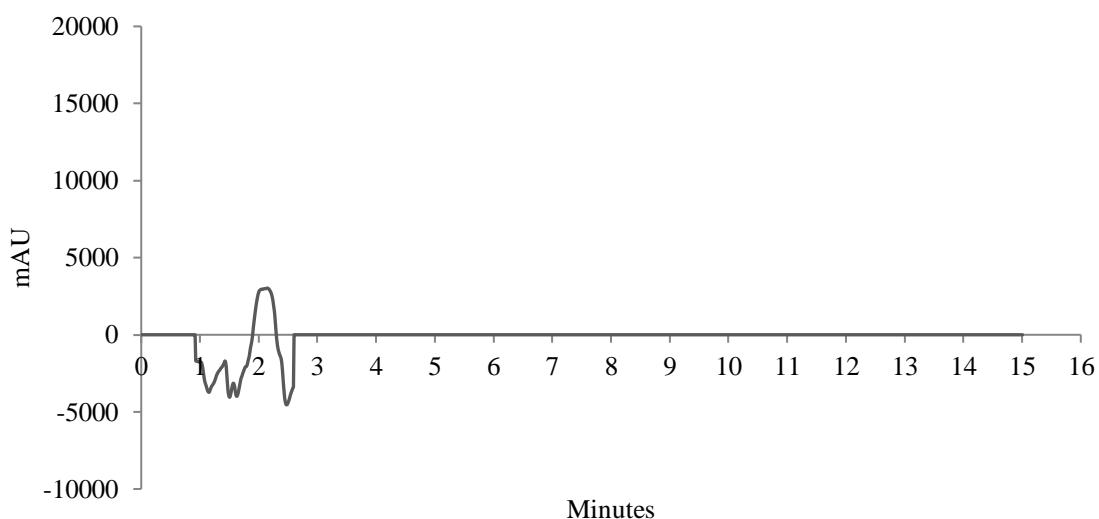
Παρασκευάστηκαν έξι πρότυπα υδατικά διαλύματα εργασίας των εξεταζόμενων ενώσεων σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, 10 και 15 ng/μL. Έπειτα, ακολούθησε προκατεργασία του ορού αίματος εμβολιασμένου με το κάθε πρότυπο διάλυμα, σύμφωνα με το τελικό πρωτόκολλο προκατεργασίας FPSE που προέκυψε μετά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας (παράγραφος 11.4). Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς για την κάθε προσδιοριζόμενη ένωση. Επίσης, εξήχθη η εξίσωση και ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) για κάθε καμπύλη αναφοράς, ο

οποίος κυμάνθηκε από 0,9937 έως 0,9985. Στον πίνακα 11.5. παρουσιάζονται οι εξισώσεις για κάθε καμπύλη αναφοράς, όπου y είναι το εμβαδόν της κορυφής της κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης και x είναι η συγκέντρωση της ένωσης σε $\text{ng}/\mu\text{L}$, καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού.

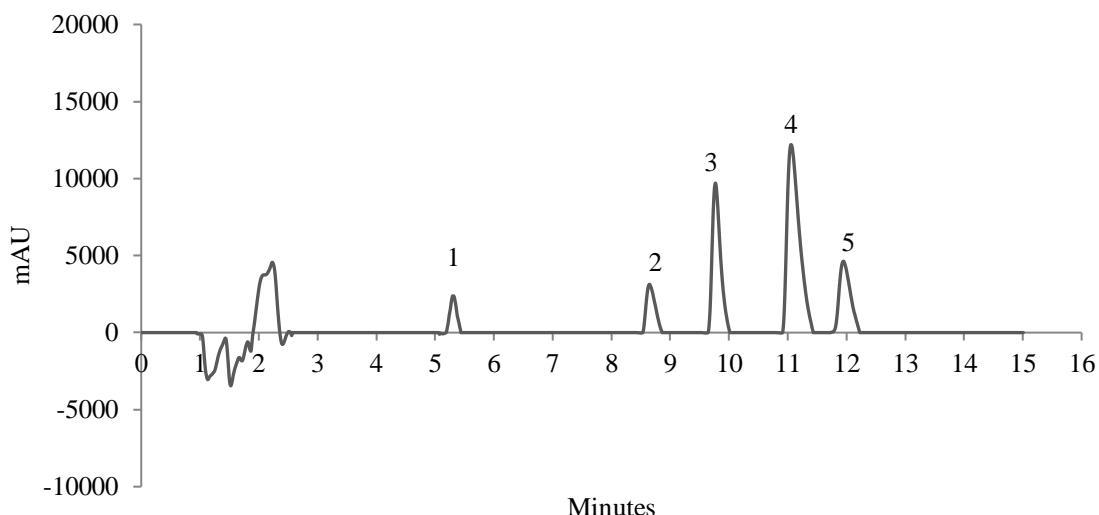
Πίνακας 11.5. Καμπύλες αναφοράς των πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος.

Ένωση	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	Συντελεστής προσδιορισμού (r^2)
VEN	$y = 929,88x + 805,17$	0,9955
PAR	$y = 4590,1x - 1446,5$	0,9985
FLU	$y = 12053x - 6851,7$	0,9973
AMIT	$y = 22886x - 12648$	0,9957
CLO	$y = 7949,3x - 3917,4$	0,9937

Στο σχήμα 11.9. δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος ορού αίματος, και στο σχήμα 11.10. δίνεται ένα χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος ορού αίματος, τα οποία υπέστησαν προκατεργασία με την τεχνική FPSE.



Σχήμα 11.9. Χρωματογράφημα λευκού δείγματος ορού αίματος μετά από προκατεργασία με την τεχνική FPSE.



Σχήμα 11.10. Χρωματογράφημα δείγματος ορού αίματος, εμβολιασμένου με υδατικό πρότυπο διάλυμα αντικαταθλιπτικών συγκέντρωσης 10 ng/μL, μετά από προκατεργασία με την τεχνική FPSE. (1) VEN, (2) PAR, (3) FLU, (4) AMIT, (5) CLO.

11.6. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ

Στα εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος, ο ορισμός και ο υπολογισμός των LOD και LOQ για τις προσδιοριζόμενες αντικαταθλιπτικές ενώσεις είναι ίδιοι με αυτούς που δόθηκαν στην παράγραφο 10.4 για τα πρότυπα διαλύματα. Συνεπώς, το όριο ποσοτικής αποτίμησης των ενώσεων ήταν 0,5 ng/μL, ενώ το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση που ποσοτικοποιήθηκε διά του 3, δηλαδή 0,16 ng/μL.

11.7. ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με την προκατεργασία και την ανάλυση λευκών δειγμάτων ορού αίματος, σύμφωνα με το τελικό πρωτόκολλο προκατεργασίας και τις εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες. Από τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις στους χρόνους συγκράτησης των ενώσεων, είτε από ενδογενή συστατικά του υποστρώματος είτε από άλλα προϊόντα αποδόμησης. Συνεπώς, η μέθοδος μπορεί να χαρακτηριστεί εκλεκτική για την απομόνωση των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών.

11.8. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (intra-day repeatability)

Η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται ως ο βαθμός συμφωνίας του αποτελέσματος ενός προσδιορισμού σε σχέση με μία παραδεκτή ή αποδεκτή τιμή. Όσο πιο μικρή είναι η απόκλιση μεταξύ των δύο τιμών, τόσο πιο μεγάλη είναι η ακρίβεια της μεθόδου. Ποσοτικά, η ακρίβεια εκφράζεται με τις σχετικές ανακτήσεις των ενώσεων, οι οποίες προκύπτουν με τη χρήση των εξισώσεων των πρότυπων καμπυλών αναφοράς των εμβολιασμένων δειγμάτων, από την εξής σχέση:

$$\text{Σχετική ανάκτηση (\%)} = \frac{\text{Μέση ευρεθείσα τιμή}}{\text{Θεωρητική τιμή}} \times 100 \quad (11.1)$$

Η πιστότητα (precision) μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών που γίνονται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα, και εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (repeatability) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility).

Η επαναληψιμότητα αποτελεί μέτρο της διασποράς των ομοειδών μετρήσεων που εκτελούνται με την εφαρμογή της ίδιας μεθόδου, στο ίδιο εργαστήριο, από το ίδιο προσωπικό και με την χρήση του ίδιου εξοπλισμού εντός της ίδιας ημέρας. Μαθηματικά εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD%) ή το συντελεστή διακύμανσης (Coefficient of Variance, CV) με την εξής σχέση:

$$\text{RSD\% (CV)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\bar{x}} \quad (11.2)$$

όπου \bar{x} είναι η μέση τιμή των μετρήσεων και SD είναι η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD). Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (11.3)$$

Η αναπαραγωγιμότητα αποτελεί μέτρο της διασποράς των ομοειδών μετρήσεων που έχουν ληφθεί με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο υλικό, κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικό προσωπικό, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικά εργαστήρια).

Πειραματικά, η πιστότητα εκφράζεται ως intra-day (within-day repeatability), όταν υπολογίζεται εντός της ίδιας ημέρας και ως inter-day (between-day precision), όταν υπολογίζεται σε διάστημα κάποιων διαδοχικών ημερών.

Για την αξιολόγηση της intra-day επαναληψιμότητας, έγινε ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 2, 5, και 15 ng/μL, ενώ για κάθε συγκέντρωση λήφθηκαν τέσσερις μετρήσεις κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Στον

πίνακα 11.6. δίνονται οι τιμές RSD% και οι σχετικές ανακτήσεις % των ενώσεων, που προκύπτουν μετά από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 11.6. Επαναληψιμότητα και ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της εντός της ίδιας ημέρας (n = 4) για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από τον ορό αίματος.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/μL)	Ποσότητα που βρέθηκε (ng/μL) ± SD	RSD%	Σχετική ανάκτηση %
VEN	2	2,0±0,1	5,3	101,0
	5	4,8±0,4	9,2	96,2
	15	14,6±0,7	4,8	97,5
PAR	2	2,0±0,1	4,9	97,2
	5	4,9±0,4	7,1	98,2
	15	14,3±0,3	1,9	95,3
FLU	2	2,0±0,1	7,1	100,8
	5	5,5±0,4	7,9	110,1
	15	15,3±0,9	5,9	101,8
AMIT	2	2,1±0,1	6,4	102,8
	5	5,59±0,08	1,5	111,9
	15	15,6±0,7	4,3	103,9
CLO	2	1,91±0,08	4,0	96,0
	5	4,5±0,2	5,4	90,4
	15	14,6±0,2	1,4	97,2

11.9. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (inter-day precision)

Για την αξιολόγηση της inter-day πιστότητας, έγινε ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 2, 5, και 15 ng/μL για τέσσερις διαδοχικές ημέρες. Κάθε μέρα λαμβάνονταν τρεις μετρήσεις για κάθε μια συγκέντρωση. Στον πίνακα 11.7. δίνονται οι τιμές RSD% και οι σχετικές ανακτήσεις % των ενώσεων που προκύπτουν μετά από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 11.7. Πιστότητα και ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από τον ορό αίματος σε διάστημα τεσσάρων διαδοχικών ημερών για τρεις μετρήσεις ημερησίως.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/μL)	Ποσότητα που βρέθηκε (ng/μL) ± SD	RSD%	Σχετική Ανάκτηση%
VEN	2	2,09±0,05	2,5	104,4
	5	4,2±0,5	11,3	83,3
	15	14,9±0,2	1,3	99,3
PAR	2	2,0±0,1	5,9	98,0
	5	4,8±0,5	11,0	97,0
	15	14,8±0,8	5,5	98,5
FLU	2	1,94±0,04	2,1	97,2
	5	5,4±0,2	3,5	108,3
	15	15,0±0,8	5,6	99,7
AMIT	2	2,0±0,2	9,0	99,6
	5	5,2±0,4	8,5	104,8
	15	14,7±1,0	6,4	97,9
CLO	2	1,9±0,2	8,0	97,1
	5	5,1±0,3	5,4	101,4
	15	15,1±0,5	3,3	100,5

11.10. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ – YOUDEN & STEINER TEST

Η ανθεκτικότητα ορίζεται ως η επιδεκτικότητα μιας μεθόδου σε αλλαγές των πειραματικών συνθηκών. Με άλλα λόγια, δηλώνει το πόσο ανθεκτική ή ευάλωτη είναι η μέθοδος κατά την αλλαγή κάποιων παραμέτρων, σχετικών με την πειραματική διαδικασία. Οι αλλαγές αυτές δύναται να αφορούν τις συνθήκες αποθήκευσης ή/και προκατεργασίας του δείγματος, αλλά και τα χρησιμοποιούμενα υλικά της μεθόδου. Γενικά, κατά τη μελέτη της ανθεκτικότητας, γίνονται κάποιες σκόπιμες λογικές μεταβολές, ήσσονος σημασίας, στην πειραματική διαδικασία και παρατηρούνται οι επερχόμενες συνέπειες.

Στην παρούσα εργασία, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας της μεθόδου έγινε με τη χρήση του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού Youden & Steiner test, γνωστού και ως «επτά παράμετροι/οκτώ πειράματα». Πρόκειται για μια γρήγορη, οικονομική και «πράσινη» διαδικασία, η οποία μελετά την επίδραση πολλών μεταβολών ταυτόχρονα και όχι κάθε μεταβολής ξεχωριστά. Εντούτοις, δεν επιτρέπει τον εντοπισμό των

αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων. Σύμφωνα με την προσέγγιση Youden, επιλέγονται επτά παράμετροι που μια ελαφρά μεταβολή τους θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τα πειραματικά αποτελέσματα. Οι ονομαστικές τιμές τους παριστάνονται με A, B, C, D, E, F και G και οι εναλλακτικές τιμές τους, μετά τη μεταβολή τους, συμβολίζονται με τα αντίστοιχα πεζά γράμματα a, b, c, d, e, f και g. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτουν 2^7 ή 128 διαφορετικοί πιθανοί συνδυασμοί. Ωστόσο, επιλέγονται οι οκτώ συνδυασμοί που περιλαμβάνουν ίσο αριθμό κεφαλαίων και πεζών γραμμάτων. Έτσι η μελέτη της ανθεκτικότητας μπορεί να διεξαχθεί με οκτώ απαραίτητα πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων δίνονται ως s, t, u, v, w, x, y και z.

Εν συνεχεία, πραγματοποιείται υπολογισμός των διαφορών των μέσων όρων από τα αποτελέσματα των κεφαλαίων γραμμάτων και των μέσων όρων από τα αποτελέσματα των αντίστοιχων πεζών γραμμάτων, για κάθε ένωση ξεχωριστά. Έπειτα, υπολογίζεται η τυπική απόκλιση των επτά διαφορών D_i , η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad (11.4)$$

Εάν η τυπική απόκλιση των διαφορών για την κάθε ένωση, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τυπική απόκλιση της μεθόδου, τότε προκύπτει με βεβαιότητα ότι όλοι οι παράγοντες μαζί επηρεάζουν το αποτέλεσμα, ακόμα και αν ο κάθε παράγοντας από μόνος του δεν εμφανίζει σημαντική επίδραση, και ότι η μέθοδος δεν είναι αρκετά ανθεκτική στις μεταβολές που επιλέχθηκαν για τη μελέτη [95].

Για αυτήν τη μελέτη, δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος εμβολιάστηκαν με πρότυπο υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 10 ng/μL. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν (1) το μέγεθος του μέσου FPSE, (2) η ανάδευση κατά την εκχύλιση των ενώσεων, (3) η ανάδευση κατά την έκλυση των ενώσεων, (4) ο χρόνος εκχύλισης, (5) ο χρόνος έκλυσης, (6) ο διαλύτης έκλυσης και (7) ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εργασίας. Ο πίνακας 11.8. παρουσιάζει τον πειραματικό σχεδιασμό του τεστ Youden, τις επιλεγμένες παραμέτρους, καθώς και τις σκόπιμες μεταβολές τους.

Πίνακας 11.8. Πειραματικός σχεδιασμός του τεστ Youden και μεταβολές των επιλεγμένων παραγόντων.

Παράγοντες	Μονάδες	Όνομ/κές τιμές	Εναλ/κές τιμές	Αριθμός πειράματος							
				1	2	3	4	5	6	7	8
A. Μέγεθος μέσου FPSE	cm	2,5×2	1,5×2	A	A	A	A	a	a	a	a
B. Ανάδευση στην εκχύλιση	×/✓	✓	×	B	B	b	b	B	B	b	b
C. Ανάδευση στην έκλουση	×/✓	✓	×	C	c	C	c	C	c	C	c
D. Χρόνος εκχύλισης	min	15	10	D	D	d	d	d	d	D	D
E. Χρόνος έκλουσης	min	5	10	E	e	E	e	e	E	e	E
F. Διαλύτης έκλουσης	Διαλύτης	CH ₃ CN:CH ₃ OH (50:50 v/v)	CH ₃ OH	F	f	f	F	F	f	f	F
G. Διαλύτης για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας	Διαλύτης	H ₂ O	CH ₃ OH	G	g	g	G	g	G	G	g
Αποτελέσματα				s	t	u	v	w	x	y	z

Τα αποτελέσματα της προσέγγισης Youden & Steiner για τις πέντε προσδιοριζόμενες ενώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 11.9. Με σκίαση επισημαίνεται η μικρότερη και η μεγαλύτερη επίδραση που ασκούν οι παράμετροι στην κάθε προσδιοριζόμενη ένωση, ενώ με έντονα γράμματα φαίνονται ορισμένες χαρακτηριστικές τιμές για κάθε ένωση.

Πίνακας 11.9. Αποτελέσματα της μελέτης ανθεκτικότητας της μεθόδου με βάση την προσέγγιση Youden & Steiner.

Ένωση	SD _{μεθόδου}	SD _i	D _a	D _b	D _c	D _d	D _e	D _f	D _g
VEN	372,5	4406,3	2208,5	3782,5	1080,0	-1156,5	1546,0	4445,0	4911,0
PAR	1018,3	18767,4	26148,8	10266,8	-4682,8	4938,2	2956,8	18520,8	6746,2
FLU	1695,9	56042,6	5000,0	62490,5	-17519,0	-8437,0	39450,5	-17511,0	69437,5
AMIT	4171,5	85062,7	42820,8	93680,8	-1358,8	-27428,2	62908,2	2208,2	99993,2
CLO	2778,9	30046,0	27239,8	30278,8	16333,8	15860,2	31307,2	544,2	-1441,2

Από τις διαφορές των μέσων όρων, παρατηρείται ότι η VEN είναι η ένωση που επηρεάστηκε λιγότερο από όλους τους παράγοντες, εκτός από το διαλύτη έκλουσης και το

διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας. Από την άλλη πλευρά, η AMIT ήταν η ένωση που επηρεάστηκε περισσότερο από όλες τις παραμέτρους, εκτός από την ανάδευση κατά την έκλυση και τον διαλύτη έκλυσης. Η ένωση PAR επηρεάστηκε περισσότερο θετικά από το μέγεθος του μέσου FPSE και αρνητικά με την ανάδευση κατά την έκλυση. Η FLU επηρεάστηκε περισσότερο θετικά από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τα πρότυπα διαλύματα και την ανάδευση στην εκχύλιση και περισσότερο αρνητικά από την ανάδευση κατά την έκλυση και από το διαλύτη έκλυσης. Η CLO επηρεάστηκε λιγότερο από το διαλύτη έκλυσης και επηρεάστηκε αρνητικά από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την αραίωση των ενώσεων στο πρότυπο διάλυμα. Οι παράμετροι, όπως το μέγεθος του μέσου FPSE, η ανάδευση στην εκχύλιση και ο χρόνος έκλυσης είχαν μόνο θετική επίδραση στα αποτελέσματα.

11.11. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Πολλές φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως, με αποτέλεσμα να χρειαστεί η αποθήκευσή τους για κάποια χρονική περίοδο. Επίσης, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις ενδέχεται να μην είναι επαρκώς σταθερές κατά την αποθήκευση ή την ανάλυση των δειγμάτων, γεγονός που δύναται να προκαλέσει σημαντικές αποκλίσεις στα πειραματικά αποτελέσματα. Συνεπώς, είναι σημαντικό να ελέγχεται η σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων στην εφαρμοζόμενη μέθοδο.

Στην παρούσα εργασία, έγινε έλεγχος της σταθερότητας των αντικαταθλιπτικών σε ορό αίματος μετά από έξι κύκλους ψύξης-απόψυξης των δειγμάτων, καθώς και μετά από τη συντήρηση του εμβολιασμένου δείγματος στους -18°C για ένα μήνα [96].

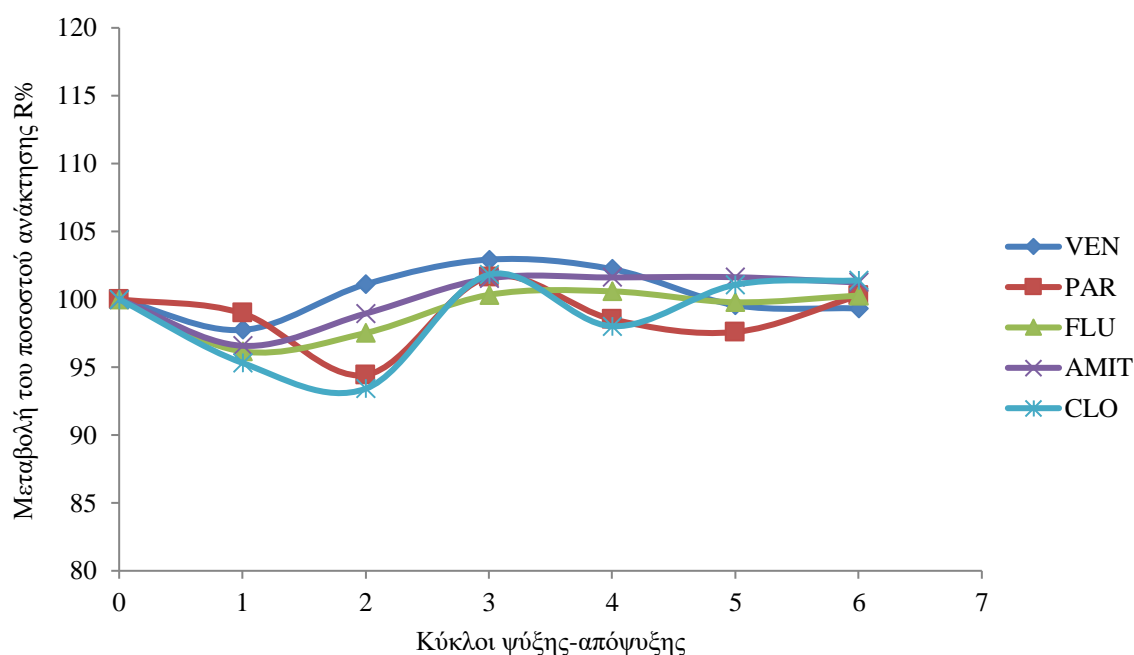
11.11.1. Σταθερότητα κύκλων ψύξης-απόψυξης

Ένας τρόπος για να γίνει μελέτη της σταθερότητας είναι ο έλεγχος επίδρασης των κύκλων ψύξης-απόψυξης στη σταθερότητα των ενώσεων εντός του δείγματος. Η σταθερότητα των ενώσεων σε δείγμα ορού αίματος ελέγχθηκε μετά από έξι κύκλους ψύξης-απόψυξης, σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- ✓ Προσθήκη σε επτά φιαλίδια erpendorf 50 μL ορού αίματος και 500 μL πρότυπου διαλύματος των ενώσεων σε συγκέντρωση 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- ✓ Άμεση προκατεργασία του πρώτου δείγματος με βάση την προβλεπόμενη μέθοδο και ανάλυση του δείγματος.

- ✓ Συντήρηση των υπόλοιπων φιαλιδίων στην κατάψυξη (-18°C).
- ✓ Απόψυξη όλων των διαλυμάτων στα φιαλίδια (1^{ος} κύκλος ψύξης-απόψυξης), προκατεργασία ενός διαλύματος και ψύξη εκ νέου των υπολοίπων φιαλιδίων.
- ✓ Επανάληψη της διαδικασίας μέχρι να ολοκληρωθούν και οι έξι κύκλοι ψύξης-απόψυξης.

Αφού ολοκληρώθηκαν όλοι οι κύκλοι και αναλύθηκαν όλα τα δείγματα του εμβολιασμένου ορού αίματος, υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Οι ληφθείσες ανακτήσεις των δειγμάτων που υπέστησαν τη διαδικασία της ψύξης-απόψυξης συγκρίθηκαν με αυτές του αρχικού δείγματος και στο σχήμα 11.11. αναπαρίσταται γραφικά ο ρυθμός μεταβολής τους σε σχέση με τις αρχικές τους ανακτήσεις. Με βάση το κριτήριο μείωσης της συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων κατά 10%, οι ενώσεις φαίνεται να είναι σταθερές για τους έξι κύκλους ψύξης-απόψυξης.



Σχήμα 11.11. Μεταβολή του ποσοστού ανάκτησης των πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε δείγματα ορού αίματος εμβολιασμένα με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 ng/μL, μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης.

11.11.2. Μακροπρόθεσμη σταθερότητα

Ένας ακόμα τρόπος για να ελεγχθεί η σταθερότητα των ενώσεων στα δείγματα, είναι να καταψυχθούν τα εμβολιασμένα δείγματα για κάποιο χρονικό διάστημα, στη συνέχεια να αποψυχθούν, να υποστούν προκατεργασία και μετά να αναλυθούν.

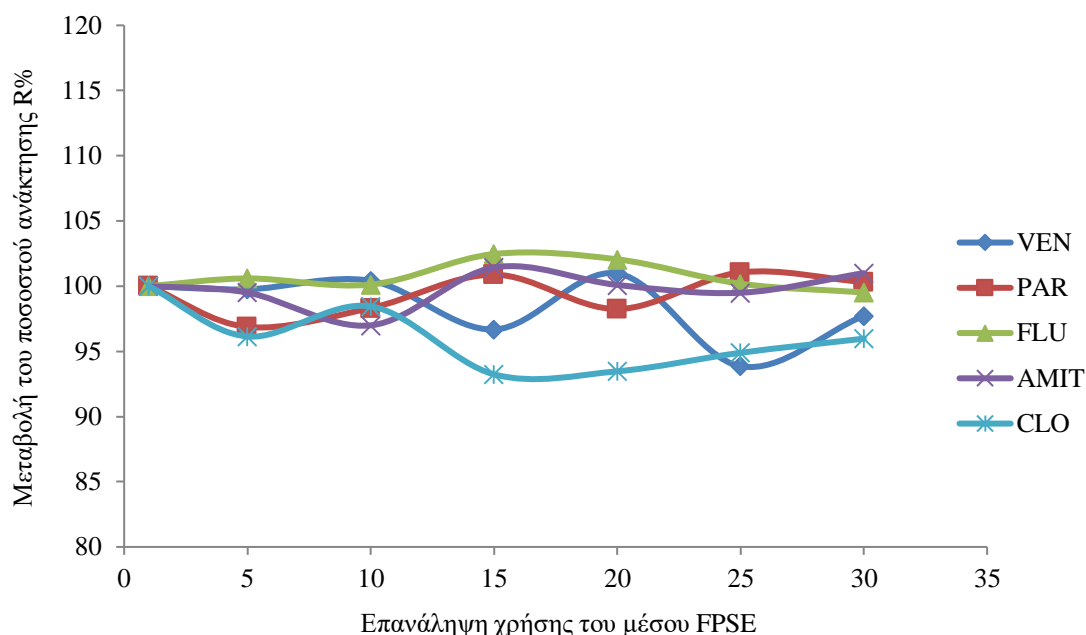
Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκε η σταθερότητα των ενώσεων στον ορό αίματος για το χρονικό διάστημα κατάψυξης (-18°C) ενός μήνα, σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- ✓ Προσθήκη σε δύο φιαλίδια erpendorf 50 μL ορού αίματος και 500 μL πρότυπου διαλύματος των ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/ μL .
- ✓ Το ένα δείγμα υπέστη προκατεργασία και αναλύθηκε κατευθείαν.
- ✓ Το άλλο δείγμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη.
- ✓ Μετά από ένα μήνα, αποψύχθηκε, υποβλήθηκε σε προκατεργασία και αναλύθηκε.

Υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών στα δείγματα ορού αίματος, και με βάση το κριτήριο μείωσης της συγκέντρωσης κατά 10%, διαπιστώθηκε ότι οι ενώσεις ήταν σταθερές μετά από ένα μήνα αποθήκευσης του δείγματος στους -18°C.

11.12. ΕΠΑΝΑΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ FPSE

Ο βαθμός επαναχρησιμοποίησης του πολυεστερικού μέσου FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL αξιολογήθηκε, επαναλαμβάνοντας τριάντα φορές διαδοχικά τη χρήση του μέσου για την εκχύλιση των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε δείγματα ορού αίματος που εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 ng/ μL . Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση και υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Στο σχήμα 11.12. αναπαρίσταται γραφικά ο ρυθμός μεταβολής των ανακτήσεων για τις ενώσεις σε σχέση με τις ανακτήσεις που ελήφθησαν από την πρώτη χρήση του προσροφητικού μέσου FPSE. Με βάση το κριτήριο μείωσης της συγκέντρωσης των ενώσεων κατά 10%, βρέθηκε ότι το εν λόγω προσροφητικό μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον τριάντα φορές, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική απώλεια της προσροφητικής του ικανότητας.



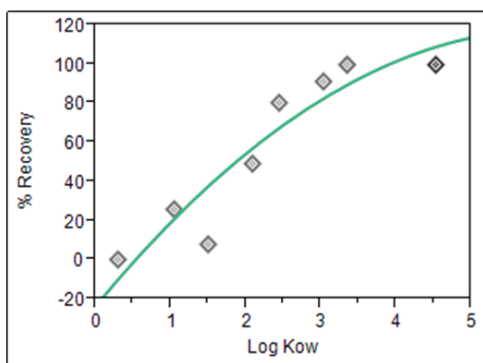
Σχήμα 11.12. Μεταβολή του ποσοστού ανάκτησης των πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε δείγματα ορού αίματος εμβολιασμένα με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 ng/μL, μετά από διαδοχική επαναχρησιμοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE.

11.13. ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ FPSE: ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log K_{ow}$

Διάφορα μέσα προσρόφησης δοκιμάστηκαν και εκτέθηκαν σε αραιωμένο διάλυμα των προσδιοριζόμενων ενώσεων, με σκοπό να βρεθεί το βέλτιστο μέσο προσρόφησης για την προκατεργασία του δείγματος. Αναφορικά με την επιλογή του μέσου FPSE, έχει αναπτυχθεί ένα μαθηματικό μοντέλο για κάθε προσροφητικό μέσο FPSE. Αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο πρόβλεψης, προκειμένου να εκτιμηθεί η απόδοση στην εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων (σε όρους απόλυτης ανάκτησης % - προσρόφησης) από το κάθε μέσο προσρόφησης, χρησιμοποιώντας τις τιμές $\log K_{ow}$ των ενώσεων. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}) μιας ένωσης εκφράζεται από την αναλογία της διαλυτότητας μίας ένωσης σε οκτανόλη, που είναι ένας μη πολικός διαλύτης, και της διαλυτότητας της ένωσης σε νερό, που είναι ένας πολικός διαλύτης, και κατά συνέπεια δείχνει την πολικότητα της ένωσης (χαμηλή τιμή K_{ow} σημαίνει υψηλή πολικότητα της ένωσης).

Προκειμένου να εξαχθεί το μαθηματικό μοντέλο για το πολυεστερικό μέσο FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL, έγινε εκχύλιση αντιπροσωπευτικών ενώσεων που διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα πολικότητας ($\log K_{ow}$ από 0,3 έως 5,07) υπό ισχυρή ανάδευση, για μία ώρα, σε 10 mL υδατικού διαλύματος των ενώσεων (βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για το μοντέλο) και ελήφθησαν οι απόλυτες ανακτήσεις % των ενώσεων. Στη συνέχεια, οι τιμές $\log K_{ow}$ των ενώσεων δόθηκαν γραφικά σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές ανάκτησής τους (σχήμα 11.13.), και εξήχθη η μαθηματική εξίσωση δευτέρου βαθμού που συσχετίζει τα δύο μεγέθη. Συνεπώς, η μαθηματική εξίσωση για το πολυεστερικό μέσο FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL έχει ως εξής:

$$\text{Απόλυτη ανάκτηση}\% = -3,40633 + 29,035983 \times \log K_{ow} - 3,8315069 \times (\log K_{ow} - 2,2875)^2 \quad (11.5)$$



$$\text{Απόλυτη ανάκτηση}\%: -3.40633 + 29.035983 \times \log K_{ow} - 3.8315069 \times (\log K_{ow} - 2.2875)^2$$

Σχήμα 11.13. Μοντέλο για την πρόβλεψη της απόδοσης εκχύλισης των ενώσεων από το πολυεστερικό μέσο FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL.

Στην παρούσα εργασία, οι εξεταζόμενες ενώσεις είναι οι VEN, PAR, FLU, AMIT και CLO, οι οποίες παρουσιάζουν τιμές $\log K_{ow}$ από 3,2 έως 5,19, όπως φαίνεται στον πίνακα 9.1. Οι απόλυτες ανακτήσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που εξήχθησαν με την εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου συγκρίνονται στον πίνακα 11.10. με τις πειραματικές ανακτήσεις που προέκυψαν από την εκχύλιση των ενώσεων διάρκειας 15 min υπό ισχυρή ανάδευση σε 1 mL υδατικού διαλύματος των ενώσεων συγκέντρωσης 2,5 ng/mL (βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την προτεινόμενη μέθοδο προκατεργασίας FPSE). Η απόλυτη ανάκτηση κατά την εκχύλιση, στην προκειμένη περίπτωση, υπολογίζεται με την εξής σχέση:

$$\text{Απόλ. ανάκτηση}\% = \frac{\text{Εμβαδόν προτύπου} - \text{Εμβαδόν υπερκειμένου μετά την εκχύλιση}}{\text{Εμβαδόν προτύπου}} \times 100 \quad (11.6)$$

Με αυτό τον τρόπο, η απόλυτη ανάκτηση δηλώνει το ποσοστό των προσδιοριζόμενων ενώσεων που μπορεί να εκχυλιστεί από το μέσο προσρόφησης FPSE.

Πίνακας 11.10. Απόλυτες ανακτήσεις % που προκύπτουν από το μαθηματικό μοντέλο και μετά από την εκχύλιση των πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων με βάση την πειραματική μέθοδο προκατεργασίας.

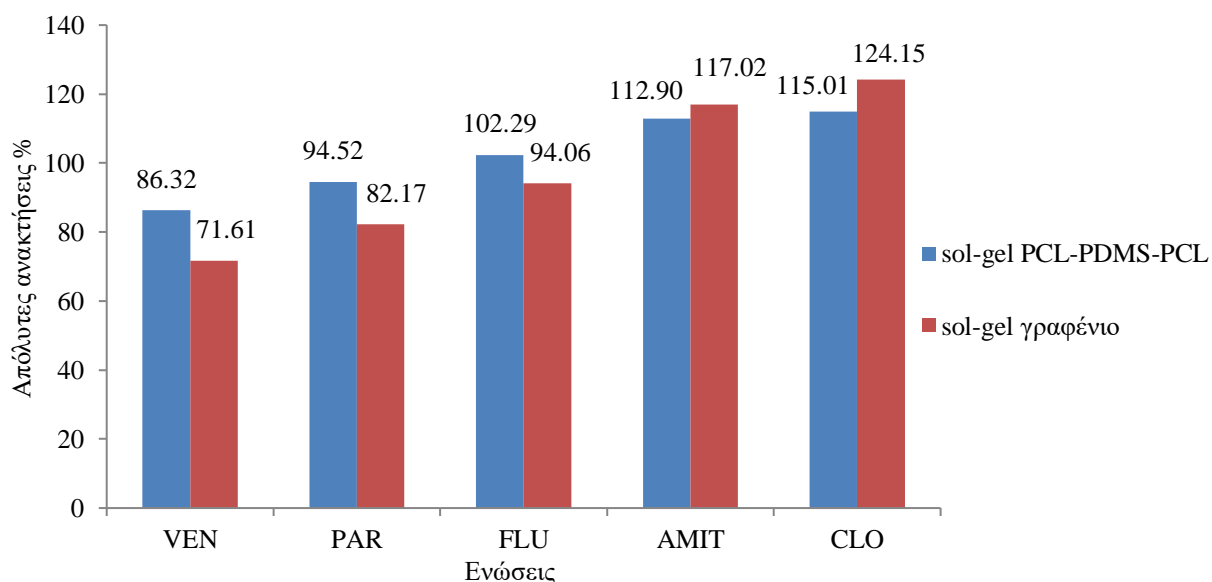
	Απόλυτη ανάκτηση %				
	VEN	PAR	FLU	AMIT	CLO
Μαθηματικό μοντέλο	86,3	94,5	102,3	112,9	115,0
Πειραματική μέθοδος	62,3	100	93,6	85,5	89,9

Παρατηρήθηκε ότι οι πειραματικές απόλυτες ανακτήσεις των ενώσεων PAR και FLU ήταν περίπου της ίδιας τάξης μεγέθους με τις αντίστοιχες ανακτήσεις που ελήφθησαν από το μαθηματικό μοντέλο, ενώ οι πειραματικές απόλυτες ανακτήσεις των ενώσεων VEN, AMIT και CLO ήταν λίγο χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του μαθηματικού μοντέλου. Αυτή η διαφορά αποδόθηκε στους συνολικούς δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου που διαθέτει η κάθε ένωση. Όπως φαίνεται στον πίνακα 9.1., οι ενώσεις VEN, AMIT και CLO έχουν μικρότερο συνολικό αριθμό δεκτών και δοτών δεσμών υδρογόνου (4, 1 και 2 αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις ενώσεις PAR και FLU που διαθέτουν υψηλότερο αριθμό δεκτών και δοτών δεσμού υδρογόνου (9 και 6 αντίστοιχα). Συνεπώς, η παρουσία των δεσμών υδρογόνου και η έκταση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ενώσεων και του μέσου FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL φαίνεται να «παίζουν» κρίσιμο ρόλο στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.

Η εκχύλιση των εξεταζόμενων φαρμάκων έχει μελετηθεί σε διαφορετικό βιολογικό υπόστρωμα (ανθρώπινα ούρα) με τη χρήση του μέσου FPSE από κυτταρίνη και επικάλυψη με sol-gel γραφένιο [79]. Προς σύγκριση των δύο προσροφητικών μέσων FPSE, εξήχθη η μαθηματική εξίσωση και για το μέσο κυτταρίνης με επικάλυψη sol-gel γραφένιο, η οποία έχει ως εξής:

$$\text{Απόλυτη ανάκτηση}\% = -12,99078 + 26,439622 \times \log K_{OW} - 0,009992 \times (\log K_{OW} - 2.2875)^2 \quad (11.7)$$

Οι απόλυτες ανακτήσεις που προέκυψαν από το μαθηματικό μοντέλο για το μέσο επικαλυμμένο με sol-gel γραφένιο συσχετίζονται με τις αντίστοιχες ανακτήσεις για το μέσο επικαλυμμένο με sol-gel PCL-PDMS-PCL στο σχήμα 11.14. Οι απόλυτες ανακτήσεις των ενώσεων VEN και PAR για το sol-gel PCL-PDMS-PCL είναι συγκριτικά υψηλότερες από εκείνες που λήφθηκαν για το sol-gel γραφένιο (διαφορά >10%), ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις εμφανίζουν απόλυτες ανακτήσεις περίπου της ίδιας τάξης μεγέθους (διαφορά <10%) και στα δύο μέσα FPSE. Ως εκ τούτου, με τη χρήση των μαθηματικών μοντέλων για τα δύο μέσα FPSE επιβεβαιώθηκε ότι το επιλεγμένο πολυεστερικό μέσο με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL ήταν πιο κατάλληλο από το μέσο FPSE από κυτταρίνη επικαλυμμένο με sol-gel γραφένιο, για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.



Σχήμα 11.14. Σύγκριση των απόλυτων ανακτήσεων % των προσδιοριζόμενων φαρμάκων που προέκυψαν από το μαθηματικό μοντέλο, για το πολυεστερικό μέσο FPSE με επικάλυψη sol-gel PCL-PDMS-PCL και για το μέσο FPSE από κυτταρίνη με επικάλυψη sol-gel γραφένιο.

11.14. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Μια ποικιλία τεχνικών προκατεργασίας δειγμάτων και αναλυτικών μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα. Η προτεινόμενη μέθοδος FPSE-HPLC/PDA συγκρίνεται ενδεικτικά με άλλες μεθόδους, όπως HF-LPME-HPLC/UV, HF-LPME-HPLC/FD, in-tube SPME-LC/MS, SPE-GC/MS, SPE-GC/NPD, LLE-HPLC/DAD και LLE-NACE στον πίνακα 11.11. Στην προτεινόμενη μέθοδο, ο όγκος του βιολογικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο μικρότερος, ενώ ο χρόνος εκχύλισης των προσδιοριζόμενων ενώσεων ήταν από τους μικρότερους χρόνους που σημειώθηκαν σε σχέση με τις άλλες μεθόδους που αναφέρονται στον πίνακα. Η μέση ανάκτηση των ενώσεων και οι τιμές RSD% ήταν παρόμοιας τάξης μεγέθους με τις αντίστοιχες τιμές των υπολοίπων μεθόδων. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις πειραματικές συνθήκες και τα αναλυτικά αποτελέσματα που προέκυψαν, σε συνδυασμό με τον περιορισμένο όγκο οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διαδικασία, καθώς και τη πεντάλεπτη έκλυση των ενώσεων, φαίνεται ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι απλή, σχετικά γρήγορη και αποτελεσματική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος.

Πίνακας 11.11. Σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με άλλες μεθόδους για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα.

Ένωση	Αναλυτική τεχνική	Τεχνική προκατεργασίας δείγματος	Βιολογικό δείγμα	Όγκος δείγματος (mL)	Χρόνος εκχύλισης (min)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Ανάκτηση %	RSD%	Αναφορά
Τραζοδόνη Κλοζαπίνη Σιταλοπράμη Ντοξεπίνη Παροξετίνη Φλουβοξαμίνη Αμιτριπυλίνη Φλουοξετίνη Σερτραλίνη Ιμιπραμίνη Κλομιπραμίνη	LC-MS	in-tube SPME	Ούρα Πλάσμα	0,5	10	0,06-2,84 0,07-2,95	0,19-9,45 0,23-9,83	40,5-111,2 71,0-125,3	0,5-16,7 0,9-12,3	[53]
Φλουοξετίνη Νορφλουοξετίνη	HPLC-FD	Three-phase HF-LPME	Πλάσμα	1,0	40	-	5	59,7-70,9	-	[56]
Ιμιπραμίνη Αμιτριπυλίνη Σερτραλίνη	HPLC-UV	HF-LPME	Ούρα Πλάσμα	11 ^α	45	0,5 ^β 0,5 ^β 0,7 ^β	1,7 ^β 1,7 ^β 2,3 ^β	68 68 65	4,9-6,8 4,1-8,2	[57]
Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη Δεσιπραμίνη Ντοξεπίνη Ιμιπραμίνη Οπιπραμόλη	HPLC-DAD	LLE	Ολικό αίμα	1,0	10	- 100 50 135 85 125	-	47-90	2,5-10,6	[62]
Βουπροπιόνη Μιρταζαπίνη Σερτραλίνη Σιταλοπράμη Κλομιπραμίνη Κλοζαπίνη	GC-MS	SPE	Ορός αίματος Πλάσμα Ολικό αίμα	1,0	10	6,25 2,50 7,50 4,69 3,75 7,50	20,83 8,33 25,00 15,63 12,50 25,00	10,88-95,15 9,33-97,77 10,87-90,15	1,0-10,5 0,8-12,9 3,6-10,5	[69]

Βιλοξαζίνη Βενλαφαξίνη Ιμιπραμίνη Δεσιπραμίνη Σερτραλίνη Αμοξαπίνη	GC-NPD	SPE <i>Chem Elut</i> <i>columns</i>	Ολικό αίμα	2	5	39-153	128-504	28-74	2-19	[74]
		SPE <i>Bond Elut</i> <i>Certify</i>		2,5	-	21-100	70-330	64-86	2-10	
Ιμιπραμίνη Αμιτριπυλίνη Νορτριπυλίνη Δεσιπραμίνη	NACE	LLE	Πλάσμα	1,1	30	20 30 20 30	30 50 30 50	75	1,2-14,1	[76]
Βενλαφαξίνη Παροξετίνη Φλουοξετίνη Αμιτριπυλίνη Κλομιπραμίνη	HPLC-PDA	FPSE	Ορός αίματος	0,5	15	160	500	9,4-88,1	1,34-11,30	Προτεινόμενη μέθοδος

^α Αναφέρεται ο όγκος δείγματος μετά από αραιώση

^β Υπολογίστηκαν με βάση τον όγκο διαλύματος 100 mL

12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος για τον προσδιορισμό πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, της βενλαφαξίνης, της παροξετίνης, της φλουοξετίνης, της αμιτριπτυλίνης και της κλομιπραμίνης σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος με την τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) και την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) σε σύζευξη με τον ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (PDA). Για πρώτη φορά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική προκατεργασίας δείγματος FPSE για την εκχύλιση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε ορό αίματος, σύμφωνα με την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εν λόγω μελέτη, συμπεραίνεται ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από:

- ✓ Επιλογή του υφάσματος από πολυεστέρα με επίστρωση sol-gel PCL-PDMS-PCL ως μέσου προσρόφησης FPSE για την αποτελεσματική εκχύλιση των αντικαταθλιπτικών ενώσεων, πιθανόν λόγω της γενικότερης μη πολικής-μετρίως πολικής φύσης του, αντίστοιχης με αυτή των ενώσεων.
- ✓ Το επιλεγμένο υφασμάτινο μέσο από πολυεστέρα με επίστρωση sol-gel PCL-PDMS-PCL φαίνεται να είναι πιο κατάλληλο από το αντίστοιχο κυτταρίνης επικαλυμμένο με sol-gel γραφένιο για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, σύμφωνα με τα μαθηματικά μοντέλα για τα δύο μέσα προσρόφησης FPSE.
- ✓ Ικανοποιητικές ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων, μετά τη βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας δείγματος FPSE.
- ✓ Απλότητα, καθώς δεν απαιτείται κάποια διαδικασία για την αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος κατά την τεχνική προκατεργασίας.
- ✓ Χαμηλό κόστος, καθώς χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών και βασικός/κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός.
- ✓ Ταχύτητα, καθώς ο συνολικός χρόνος προκατεργασίας είναι μικρός, με την εκχύλιση των ενώσεων να ολοκληρώνεται στα 15 min και την έκλουση στα 5 min.
- ✓ Εναρμόνιση με τις Αρχές της Πράσινης Χημείας, καθώς χρησιμοποιεί ελάχιστη ποσότητα οργανικών διαλυτών, παράγει μειωμένο όγκο αποβλήτων και δεν χρησιμοποιεί επικίνδυνες τοξικές ουσίες.
- ✓ Αποτελεσματικό χρωματογραφικό διαχωρισμό και ταυτόχρονο προσδιορισμό πέντε αντικαταθλιπτικών ενώσεων σε 15 min.

- ✓ Εκλεκτικότητα, καθώς δεν υπήρχαν παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των ενώσεων.
- ✓ Επαναληψιμότητα, σύμφωνα με τις δοκιμές που έγιναν.
- ✓ Επαναχρησιμοποίηση του μέσου προσρόφησης FPSE για τουλάχιστον τριάντα φορές, χωρίς να παρατηρηθεί απώλεια της προσροφητικής του ικανότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Malhi, G. S., and Mann, J. J., Seminar, 2018, **392**, 2299–2312.
2. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>
(τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
3. Ευθυμίου, Κ., Μαυροειδή, Α., Παυλάτου, Ε., και Καλατζή-Αζίζι, Α., Πρώτες βοήθειες ψυχικής υγείας, Ινστιτούτο Έρευνας και Θεραπείας της Συμπεριφοράς - Ηλεκτρονικό Βιβλίο, 2006, κεφ. 6, 53–68.
4. Sharma, B., J. Appl. Biotechnol. Bioeng. 2017, **3**, 437–448.
5. Hillhouse, T. M., and Porter, J. H., Exp. Clin. Psychopharmacol., 2015, **23**, 1–21.
6. López-muñoz, F., and Álamo, C., Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy, eds, López-muñoz, F., Srinivasan, V., Berardis, D., Álamo, C., and Kato T.A., Springer, India, 2016, ch. 6., 365–383.
7. Corbineau, S., Breton, M., Mialet-perez, J., and Costemale-lacoste, J., Matrix. Int. J. Cardiol., 2017, **247**, 1–6.
8. Vardanyan, R., and Hruby, V. Synthesis of Best-Seller Drugs, 2016, ch. 7, 111–143.
9. <https://opencourses.auth.gr/modules/document/file.php/OCRS154/%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%9C%CE%B1%CE%B8%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/04.%20%CE%91%CE%BD%CF%84%CE%B%CE%BA%CE%B1%CF%84%CE%B1%CE%B8%CE>
(τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
10. Pacher, P., and Kecskemeti, V., Curr. Med. Chem., 2008, **11**, 925–943.
11. <https://institute.progress.im/en/content/mechanism-action-tricyclic-antidepressants-tcas> (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
12. Pacher, P., Kohegyi, E., Kecskemeti, V., and Furst, S., Curr. Med. Chem., 2001, **8**, 89–100.
13. Ferguson, J. M., Clin. Psychiatry, 2001, **3**, 22–27.
<https://ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/36982/1/The%20Effects%20of%20SSRIs%20on%20Male%20Fertility.pdf> (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
15. Celikyurt, I. K., Mutlu, O., and Ulak, G., in Effects of Antidepressants, 2003, ch. 5, 91–108.
16. Santarsieri, D., and Schwartz, T. L., Drugs Context, 2015, **4**, 1–12.

17. <https://institute.progress.im/en/content/mechanism-action-selective-serotonin-and-noradrenaline-re-uptake-inhibitors-snr1s> (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
18. https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_antidepressants (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
19. Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ. Ε., και Φούτζουλα, Χ. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα, 2015, κεφ 8, 1–44.
20. Παπαδογιάννης, Ι., και Σαμανίδου, Β., Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Έκδοση 2^η, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2001.
21. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-layout-of-a-HPLC-system_fig1_307971644 (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
22. Χατζιωάννου, Θ., και Κουμπάρης, Μ., Ενόργανη Ανάλυση, Έκδοση 8^η, Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα, 2014, κεφ 20, 467–492.
23. Majors, R., Sample Preparation Fundamentals For Chromatography, ch. 1, 1–9.
24. Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α. Σ., και Σαμανίδου, Β. Βιοαναλυτική Χημεία, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα, Αθήνα, 2015.
25. Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, and M., Namieśnik, J., Trends Anal. Chem. 2015, **73**, 19–38.
26. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/ay/c3ay41771a/unauth#!divAbstract>
27. Kabir, A., and Furton, K.G., Analytical Chemistry Developments, Applications and Challenges in Food Analysis, eds., Locatelli, M., and Celia, C., Nova Science, New York, 2017, ch. 2, 23–53.
28. Samanidou, V. F., Separations 2018, **5**, 10–13.
29. Yamini, Y., Rezazadeh, M., and Seidi, S., Trends Anal. Chem. 2019, **112**, 264–272.
30. https://www.researchgate.net/figure/Steps-of-DLLME-procedure_fig1_309225164 (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
31. Rykowska, I., Ziembli, J., and Nowak, I., J. Mol. Liq. 2018, **259**, 319–339.
32. Kabir, A., Locatelli, M., and Ulusoy, H., Separations 2017, **4**, 36.
33. https://www.researchgate.net/figure/The-steps-of-SPME-technique_fig1_242140258 (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
34. Ibarra, I. S., Rodriguez, J. A., Galán-vidal, C. A., Cepeda, A., and Miranda, J. M., J.

- Chem., 2015, **2015**, 1–13.
35. Kabir, A., Furton, K. G., and Malik, A., Trends Anal. Chem., 2013, **45**, 197–218.
 36. Kazantzi, V., and Anthemidis, A., Separations, 2017, **4**, 1–20.
 37. <https://www.preprints.org/manuscript/201701.0085/v1>
(τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2019)
 38. Zilfidou, E., Kabir, A., Furton, K.G., and Samanidou, V., Separations, 2018, **5**, 1–23.
 39. Samanidou, V. F., Pharm. Anal. Acta, 2015, **6**, 6–8.
 40. Roldán-Pijuán, M., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M., Kabir, A., and Furton, K. G., J. Chromatogr. A, 2015, **1376**, 35–45.
 41. Huang, G., Dong, S., Zhang, M., Zhang, H., and Huang, T., Water Res., 2016, **101**, 547–554.
 42. Lakade, S. S., Borrull, F., Furton, K. G., Kabir, A., Marcé, R. M., and Fontanals, N., J. Chromatogr. A, 2016, **1456**, 19–26.
 43. Anthemidis, A., Kazantzi, V., Samanidou, V., Kabir, A., and Furton, K. G., Talanta, 2016, **156–157**, 64–70.
 44. Kazantzi, V., Samanidou, V., and Anthemidis, A., Separations, 2018, **5**, 1–13.
 45. <https://ikee.lib.auth.gr/record/299213/files/GRI-2018-22312.pdf>
(τελευταία επίσκεψη Μάιος 2019)
 46. Murtada, K., Andrés, F. De, Ríos, Á., and Zougagh, M., Talanta, 2018, **188**, 772–778.
 47. Boeck, M. De, Dubrulle, L., Dehaen, W., Tytgat, J., and Cuypers, E., Talanta, 2018, **180**, 292–299.
 48. Chaves, A. R., Moura, B. H. F., Caris, J. A., Rabelo, D., Eugênia, M., and Queiroz, C., J. Chromatogr. A, 2015, **1399**, 1–7.
 49. Safari, M., Shalaeai, M., Yamini, Y., Shakorian, M., and Arkan, E., Anal. Chem. Acta, 2018.
 50. Vaghar-lahijani, G., and Saber-tehrani, M., J. Anal. Chem., 2018, **73**, 145–151.
 51. Aparecida, L., Thaís, M., Nakahara, T., Bervelieri, T., Bortholazzi, M., Alessandra, A., Monteiro, M., Almeida, M. De, Carrilho, E., and Nixdorf, S. L., Biomed. Chromatogr., 2019, **33**, 1–9.
 52. Jannesar, R., Zare, F., Ghaedi, M., and Daneshfar, A., Ultrason. Sonochem., 2016, **32**, 380–386.
 53. Zheng, M., Wang, S., Hu, W., and Feng, Y., J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 7493–

- 7501.
54. Gonc, B. J., Lanc, F. M., Eugênia, M., and Queiroz, C., *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8590–8597.
 55. Breaud, A. R., Harlan, R., Kozak, M., and Clarke, W., *Clin. Biochem.*, 2009, **42**, 1300–1307.
 56. Freitas, D. F. De, Eduardo, C., Porto, D., Vieira, E. P., Elisa, M., and Bastos, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **51**, 170–177.
 57. Esrafil, A., Yamini, Y., and Shariati, S., *Anal. Chim. Acta*, 2007, **4**, 127–133.
 58. Fernandes, C., Jos, A., Rodrigues, C., Alves, C., and Lanc, F. M., *J. Chromatogr. B*, 2007, **847**, 217–223.
 59. Juan, H., Zhiling, Z., and Huande, L., *J. Chromatogr. B*, 2005, **820**, 33–39.
 60. Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Addolorata, M., Fanali, S., and Augusta, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **36**, 351–356.
 61. Zainaghi, I. A., Lanchote, V. L., and Queiroz, R. H. C., *Pharmacol. Res.*, 2003, **48**, 217–221.
 62. Madej, K., Parczewski, A., and Ka, M., *Toxicol. Mech. Methods*, 2003, **13**, 121–127.
 63. Magalhães, P., Alves, G., Llerena, A., and Falcão, A., *J. Anal. Toxicol.*, 2017, **41**, 631–638.
 64. Miranda, L. F. C., Domingues, D. S., and Queiroz, M. E. C., *J. Chromatogr. A*, 2016, **1458**, 46–53.
 65. Fernández, P., Taboada, V., Regenjo, M., Morales, L., Alvarez, I., Carro, A. M., and Lorenzo, R. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **124**, 189–197.
 66. Mofazzeli, F., Shirvan, H. A., and Mohammadi, F., *J. Sep. Sci.*, 2018, 1–28.
 67. Farajzadeh, M. A., and Abbaspour, M., *Biomed. Chromatogr.*, 2018, **32**.
 68. Kamaruzaman, S., Sanagi, M. M., Yahaya, N., Ibrahim, W. A. W., Endud, S., and Ibrahim, W. N. W., *J. Sep. Sci.*, 2017, **40**, 4222–4233.
 69. Boumba, V. A., Assistant, P. D., Rallis, G., Petrikis, P., Vougiouklakis, T., and Mavreas, V., *J. Chromatogr. B*, 2016, **1038**, 43–48.
 70. Truta, L., Castro, A. L., Tarelho, S., Costa, P., Sales, M. G. F., and Teixeira, H. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **128**, 496–503.
 71. Bravo, F., Zambra, C., Venegas, K., Rios, D., Calderon, P. B., and Benites, J., *J. Chil. Chem. Soc.*, 2013, **58**, 1–4.
 72. Papoutsis, I., Khraiwesh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., and Spiliopoulou, C., *J.*

- Pharm. Biomed. Anal., 2012, **70**, 557–562.
73. Saeed, S., Davarani, H., Najarian, A. M., Nojavan, S., and Tabatabaei, M., *Anal. Chim. Acta*, 2012, **725**, 51–56.
 74. Martfnez, M. A., Sanchez, T., and Almarza, E., *J. Anal. Toxicol.*, 2002, **26**, 296–302.
 75. Sasajima, Y., Wah, L., Takeuchi, T., Suenami, K., Sato, K., and Takekoshi, Y., *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 7598–7604.
 76. Delmar, M., Hillebrand, S., Eugenia, M., Lanças, F. M., and Carrilho, E., *J. Chromatogr. B*, 2004, **799**, 127–132.
 77. Alizadeh, T., and Azizi, S., *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **81**, 198–206.
 78. Lakade, S. S., Borrull, F., Furton, K. G., Kabir, A., Fontanals, N., and Marcé, R. M., *Talanta*, 2015, **144**, 1342–1351.
 79. Lioupi, A., Kabir, A., Furton, K., and Samanidou, V., *J. Chromatogr. B*, 2019, **1118-1119**, 171–179.
 80. Locatelli, M., Tinari, N., Grassadonia, A., Macerola, D., Piccolantonio, S., Ovidio, C. D., Carradori, S., Ibrahim, H., Furton, K. G., and Kabir, A., *J. Chromatogr. B* 2018, **1095**, 204–213.
 81. Kabir, A., Furton, K. G., Tinari, N., Grossi, L., Innosa, D., Macerola, D., Tartaglia, A., Di Donato, V., D’Ovidio, C., and Locatelli, M., *J. Chromatogr. B*, 2018, **1084**, 53–63.
 82. Samanidou, V., Michaelidou, K., Kabir, A., and Furton, K. G., *Food Chem.*, 2017, **224**, 131–138.
 83. Yang, M., Gu, Y., Wu, X., Xi, X., Yang, X., Zhou, W., Zeng, H., Zhang, S., Lu, R., Gao, H., and Li, J., *Food Chem.*, 2018, **239**, 797–805.
 84. Locatelli, M., Kabir, A., Innosa, D., Lopatriello, T., and Furton, K. G., *J. Chromatogr. B*, 2017, **1040**, 192–198.
 85. Samanidou, V., Kaltzi, I., Kabir, A., and Furton, K. G., *Biomed. Chromatogr.*, 2016, **30**, 829–836.
 86. Karageorgou, E., Manousi, N., Samanidou, V., Kabir, A., and Furton, K. G., *Food Chem.*, 2016, **196**, 428–436.
 87. Samanidou, V., Galanopoulos, L. D., Kabir, A., and Furton, K. G., *Anal. Chim. Acta*, 2015, **855**, 41–50.
 88. Kumar, R., Gaurav, Heena, Malik, A. K., Kabir, A., and Furton, K. G., *J. Chromatogr. A*, 2014, **1359**, 16–25.

89. Pérez-mayán, L., Rodríguez, I., Ramil, M., Kabir, A., Furton, K. G., and Cela, R., J. Chromatogr. A, 2019, **1584**, 13–23.
90. Santana-Viera, S., Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Kabir, A., and Furton, K. G., J. Chromatogr. A, 2017, **1529**, 39–49.
91. Guedes-Alonso, R., Ciofi, L., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Del Bubba, M., Kabir, A., and Furton, K. G., J. Chromatogr. A, 2016, **1437**, 116–126.
92. Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J. B., Sieira, B. J., Kabir, A., Furton, K. G., and Cela, R., Anal. Chim. Acta, 2015, **865**, 22–30.
93. Βάση Δεδομένων <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2019)
94. Βάση Δεδομένων <https://www.drugbank.ca/> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2019)
95. Karageorgou, E., and Samanidou, V., J. Chromatogr. A, 2014, **1353**, 131–139.
96. Σαμανίδου, Β., και Θεοδορίδης, Γ., Βιοαναλυτική Χημεία, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα, 2015, κεφ. 15, 241–250.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) για τον προσδιορισμό πέντε αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε ορό ανθρώπινου αίματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων

Ειρήνη Ζιλφίδου

Τα τελευταία χρόνια, η συνεχής έρευνα για τη σύνθεση νέων αντικαταθλιπτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων και η δραματική αύξηση της κατανάλωσής τους σε παγκόσμιο επίπεδο, εντείνουν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη νέων τεχνικών προκατεργασίας δειγμάτων και αναλυτικών μεθόδων, με σκοπό τον προσδιορισμό των εν λόγω ενώσεων σε βιολογικά δείγματα.

Στην παρούσα εργασία, για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η νέα τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) για την ταυτόχρονη εκχύλιση πέντε κοινών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, της βενλαφαζίνης, της παροξετίνης, της φλουοξετίνης, της αμιτριπτυλίνης και της κλομιπραμίνης από τον ανθρώπινο ορό αίματος. Ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με στήλη LiChrospher®100 RP-8e (5 μ m, 250 \times 4 mm), με κινητή φάση από διάλυμα οξικού αμμωνίου (0,05 mol/L) και ακετονιτρίλιο με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης διάρκειας 15 min. Η ανίχνευση των ενώσεων έγινε στα 235 nm από ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (PDA). Η προτεινόμενη τεχνική προκατεργασίας FPSE των δειγμάτων είναι σύμφωνη με τις αρχές της «πράσινης» αναλυτικής χημείας, καθώς δε χρειάστηκε αποπρωτεΐνωση του ορού αίματος και χρησιμοποιήθηκαν μικροί όγκοι οργανικού διαλύτη. Μεταξύ των διαφορετικών μέσων FPSE που εξετάστηκαν, το υφασμάτινο μέσο από πολυεστέρα με επικάλυψη sol-gel πολυκαπρολακτόνης-διμεθυλοσιλοξανίου-πολυκαπρολακτόνης (sol-gel PCL-PDMS-PCL) παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ενώ βρέθηκε ότι μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον τριάντα διαδοχικές φορές. Η υπό ισχυρή ανάδευση εκχύλιση και έκλουση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε 15 και 5 min, αντίστοιχα, ενώ ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτρίλιου-μεθανόλης (50:50 v/v). Οι ανακτήσεις

κυμάνθηκαν μεταξύ 9,4-88,1% για όλες τις ενώσεις, ενώ οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις για την intra-day επαναληψιμότητα και την inter-day πιστότητα ήταν $\leq 9,2\%$ και $\leq 11,3\%$, αντίστοιχα. Οι ενώσεις σε εμβολιασμένα δείγματα βρέθηκαν να παραμένουν σταθερές υπό τις διάφορες συνθήκες που μελετήθηκαν, ενώ εφαρμόστηκε η προσέγγιση Youden & Steiner για τη μελέτη της ανθεκτικότητας της μεθόδου.

ABSTRACT

Development of fabric phase sorptive extraction (FPSE) method for the determination of five antidepressant drugs in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with photodiode array detection

Eirini Zilfidou

In recent years, the research about synthesis of new antidepressant drugs and their dramatic increased consumption worldwide lead to the development of novel sample preparation techniques and analytical methods for the determination of these pharmaceuticals in biological samples.

In the current study, the new fabric phase sorptive extraction (FPSE) technique was applied for the first time in order to achieve the simultaneous extraction of five common antidepressant drugs (venlafaxine, paroxetine, fluoxetine, amitriptyline and clomipramine) from human blood serum. The examined compounds separation was carried out by a LiChrospher®100 RP-8e column (5 μ m, 250 \times 4 mm), using a mobile phase of ammonium acetate solution (0.05 mol/L) and acetonitrile in a 15 minutes gradient elution program. Detection was achieved by a photodiode array detector (PDA), monitoring at 235 nm. Elimination of protein precipitation step and minimized solvent consumption led to a sample preparation workflow compliant with the principles of green analytical chemistry. Among the different FPSE media examined, sol-gel polycaprolactone-dimethylsiloxane-polycaprolactone (sol-gel PCL-PDMS-PCL) coated polyester substrate presented optimum extraction efficiency and was found to be reusable for at least 30 times. Extraction and elution of the compounds was performed under stirring condition in 15 and 5 min, respectively, while a acetonitrile-methanol (50:50 v/v) mixture was used as the elution solvent. Recoveries ranged between 9.4% and 88.1% for all compounds, and relative standard deviations for intra-day repeatability and inter-day precision were \leq 9.2% and \leq 11.3%, respectively. The examined compounds in spiked blood serum samples were found to be stable for the conditions applied. Youden & Steiner approach was applied to study the method ruggedness.