



**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 ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ  
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ HPLC ΣΕ ΟΡΟ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ  
FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION (FPSE)**

**ΑΛΑΜΠΙΑΝΟΣ Δ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019**

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ  
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ HPLC ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ  
ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ  
FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION (FPSE)

ΑΛΑΜΠΙΑΝΟΣ Δ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ

Επιβλέπων: Ι. Ν. ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ,  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ Α.Π.Θ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Ι. Παπαδογιάννης, Καθηγητής

Β. Σαμανίδου, Καθηγήτρια

Γ. Θεοδωρίδης, Καθηγητής

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	6
<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	7
<b>1. ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΕΣ</b> .....	7
<b>1.1. Ιστορικά Στοιχεία</b> .....	7
<b>1.2. Δομή των πενικιλινών</b> .....	9
<b>1.3. Μηχανισμός δράσης πενικιλινών</b> .....	11
<b>1.4. Διαφοροποίηση και υποομάδες ή γενιές πενικιλινών</b> .....	12
<b>1.5. Φαρμακοκινητική των πενικιλινών</b> .....	15
<b>1.6. Χρήση των πενικιλινών στην Ιατρική και Φαρμακευτική</b> .....	15
<b>1.7. Συσχέτιση δομής και φαρμακευτικής δράσης</b> .....	16
<b>1.8. Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες</b> .....	17
<b>2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΩΝ</b> .....	20
<b>2.1. Σημασία ανάπτυξης νέων μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού πενικιλινών</b> .....	20
<b>2.2. Σημασία προκατεργασίας δείγματος και βιολογικό υπόστρωμα</b> .....	21
<b>2.3. Πράσινη Αναλυτική Χημεία και Προκατεργασία δείγματος</b> .....	22
<b>2.4. Ορός αίματος</b> .....	23
<b>3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b> .....	24
<b>3.1. Γενικά Χαρακτηριστικά</b> .....	24
<b>3.2. Κλασικές τεχνικές προκατεργασίας υγρών και στερεών δειγμάτων</b> .....	25
<b>3.2.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού</b> .....	25
<b>3.2.2. Εκχύλιση soxhlet</b> .....	25
<b>3.3 Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας δείγματος</b> .....	26
<b>3.3.1. Εκχύλιση στερεάς φάσης-Solid Phase Extraction (SPE)</b> .....	27
<b>3.3.2. Ανάπτυξη τεχνικών μικροεκχύλισης και σύγχρονων προηγμένων προσροφητικών υλικών</b> .....	30
<b>3.3.3. Αρχές λειτουργίας τεχνικών μικροεκχύλισης</b> .....	31
<b>3.3.4. Περιορισμοί των εμπορικά διαθέσιμων τεχνικών μικροεκχύλισης</b> .....	33
<b>3.4. Τεχνολογία sol-gel</b> .....	34
<b>4. FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION (FPSE)</b> .....	36
<b>4.1. Τεχνική προκατεργασίας FPSE</b> .....	36
<b>4.2. Διαδικασία της FPSE</b> .....	38
<b>4.3. Θεωρητικές αρχές FPSE</b> .....	40
<b>4.4. Ο ρόλος του πορώδους υφασμάτινου υποστρώματος</b> .....	41

4.5.	Δημιουργία του μέσου FPSE.....	43
4.6.	Πολύ-THF μέσο FPSE.....	43
4.7.	Πλεονεκτήματα FPSE και σύγκριση με άλλες τεχνικές.....	44
4.8.	Είδη προσροφητικών στην FPSE.....	48
<b>5.</b>	<b>ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)</b> .....	<b>51</b>
5.1.	Εισαγωγικά Στοιχεία.....	51
5.2.	Είδη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης.....	52
5.3.	Οργανολογία της HPLC.....	54
5.4.	Διαλύτες κινητής φάσης .....	62
5.5.	Επιλογή κινητής φάσης.....	62
5.6.	Πλεονεκτήματα της HPLC.....	63
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>69</b>
<b>B.</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>ΥΛΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b> .....	<b>70</b>
8.1.	Οργανολογία χρωματογραφικού συστήματος HPLC.....	70
8.2.	Όργανα, συσκευές και αναλώσιμα.....	70
8.3.	Αντιδραστήρια και διαλύτες.....	71
8.4.	Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων.....	71
8.5.	Παρασκευή δειγμάτων ορού αίματος.....	72
8.6.	Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης.....	72
<b>9.</b>	<b>ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ</b> .....	<b>74</b>
9.1.	Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου.....	74
9.2.	Χρωματογραφικές Συνθήκες .....	75
9.3.	Υπολογισμός Διαχωριστικής Ικανότητας.....	77
9.4.	Εξισώσεις καμπυλών αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων.....	78
<b>10.</b>	<b>ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ FPSE</b> .....	<b>79</b>
10.1.	Διαδικασία πρακατεργασίας FPSE.....	79
10.2.	Επιλογή του καταλληλότερου μέσου FPSE.....	80
<b>11.</b>	<b>ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ FPSE</b> .....	<b>82</b>
11.1.	Παράγοντες προς βελτιστοποίηση και διερεύνηση.....	82
11.2.	Επίδραση του διαλύτη έκλυσης / εκρόφησης.....	82
11.3.	Βελτιστοποίηση του χρόνου έκλυσης / εκρόφησης.....	83
11.4.	Επίδραση της ανάδευσης κατά την έκλυση / εκρόφηση.....	84

11.5.	Βελτιστοποίηση του χρόνου εκχύλισης ισορροπίας υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση.....	85
11.6.	Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης κατά το στάδιο της εκχύλισης υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση.....	86
11.7.	Τελικό βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο προκατεργασίας δείγματος FPSE.....	87
<b>12.</b>	<b>ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ</b>	
	<b>ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΣΕ ΟΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ</b> .....	89
12.1.	Διαδικασία προκατεργασίας δείγματος ανθρώπινου ορού αίματος με FPSE .....	89
12.2.	Αποτελέσματα εφαρμογής της μεθόδου – Επίδραση υποστρώματος .....	91
12.3.	Έλεγχος της επίδρασης της αποπρωτεΐνωσης στην απόδοση της εκχύλισης FPSE.....	95
<b>13.</b>	<b>ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....</b>	97
13.1.	Καμπύλες αναφοράς εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος και γραμμικότητα.....	97
13.2.	Όριο ανίχνευσης (LOD), όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και εκλεκτικότητα (selectivity) .....	98
13.3.	Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα της μεθόδου (intra-day repeatability).....	98
13.4.	Ακρίβεια και πιστότητα της μεθόδου στα δείγματα γάλακτος σε διάρκεια τεσσάρων ημερών (inter-day precision) .....	100
13.5.	Ανθεκτικότητα της μεθόδου – Δοκιμασία Youden and Steiner.....	101
13.6.	Μελέτη σταθερότητας των ενώσεων στον ορό αίματος σε θερμοκρασία -18 ° C κατά τη διάρκεια έξι κύκλων ψύξης-απόψυξης.....	104
13.7.	Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του μέσου FPSE.....	107
<b>14.</b>	<b>ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ</b>	
	<b>ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ FPSE.....</b>	109
14.1.	Περιγραφή του μοντέλου – Η εξίσωση του μέσου sol-gel PTHF.....	109
14.2.	Σύγκριση δεδομένων θεωρητικού μαθηματικού μοντέλου και πειραματικών δοκιμών...	111
<b>15.</b>	<b>ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΑΝΑΦΕΡΟΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.....</b>	114
<b>16.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....</b>	116
<b>17.</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	121
<b>18.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	122
<b>19.</b>	<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ.....</b>	123
<b>20.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	124

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Γενεσιουργές αιτίες για την ενασχόληση και την εκπόνηση του θέματος της παρούσας διπλωματικής αποτέλεσαν αφενός μεν το συνεχές ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού αντιβιοτικών ενώσεων πενικιλίνης που προκύπτει από τη σημαντικότητα της χρήσης και της δράσης τους έναντι στις βακτηριακές μολύνσεις, αφετέρου δε η ανάγκη για εφαρμογή νέων, καινοτόμων, οικονομικών, φιλικών προς το περιβάλλον, απλών και αξιόπιστων τεχνικών μικροεκχύλισης και προκατεργασίας δείγματος, οι οποίες εναρμονίζονται με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας.

Υπό αυτό το πρίσμα μελετήθηκαν τέσσερα αντιβιοτικά, της κατηγορίας των β-λακταμών και συγκεκριμένα τέσσερις πενικιλίνες, η βενζυλοπενικιλίνη, η οξακιλίνη, η κλοξακιλίνη και η δικλοξακιλίνη. Ο στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας απλής και γρήγορης μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αυτών ενώσεων σε ορό ανθρώπινου αίματος, με μια νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος: την Fabric Phase Sorptive Extraction.

Το υφασμάτινο μέσο FPSE αποτελούμενο από υπόστρωμα υφάσματος κελουλόζης επικαλυμμένο με κολλοειδές διάλυμα πολυτετραϋδροφουράνιου (PTHF) απέδωσε τη βέλτιστη ευαισθησία εκχύλισης για τα επιλεγμένα αντιβιοτικά πενικιλίνης και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση τεσσάρων πενικιλινών από ανθρώπινο ορό αίματος, χωρίς προηγούμενη καταβύθιση πρωτεϊνών και χωρίς εξάτμιση διαλύτη και επανασύσταση του δείγματος μετά την εκχύλιση. Το δείγμα ορού αίματος, αφού εκχυλίστηκε με τη μέθοδο FPSE που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε, ακολούθως αναλύθηκε με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) και οι τέσσερις ενώσεις ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ιωάννη Παπαδογιάννη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά, για την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μεταλαμπάδευσε και τις πολύτιμες συμβουλές του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βικτωρία Σαμανίδου για τη συνεργασία που είχαμε στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, για την αμέριστη υποστήριξη της, τη συμβολή της, καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις της, κατά το στάδιο συγγραφής της εργασίας ως μέλος της τριμελούς επιτροπής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το έτερο μέλος της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Θεοδωρίδη, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους για την αγάπη και τη στήριξή τους.

Αλαμπάνος Δ. Βασίλειος  
Θεσσαλονίκη, Ιούλιος 1019

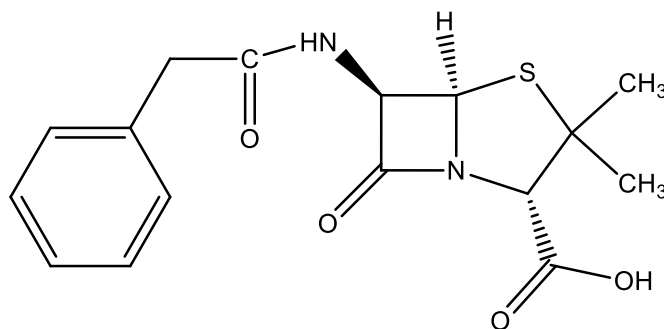
## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΕΣ

#### 1.1. Ιστορικά Στοιχεία

Οι πενικιλίνες είναι μία από τις παλαιότερες και πιο σημαντικές ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία λοιμώξεων. Είναι γνωστό από ιστορικά αρχεία ότι η βακτηριοστατική δράση του *Penicillium*, ενός γένους μυκήτων (μούχλας, mould), οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των ασκομυκήτων, ήταν γνωστή ήδη από την αρχαιότητα (αρχαία Ελλάδα, αρχαία Αίγυπτος, αρχαία Ινδία). Η χρήση του μουχλιασμένου ψωμιού, στο οποίο έχει αναπτυχθεί ένα είδος κυανής μούχλας, ως μέσου για την αντιμετώπιση πυωδών πληγών ήταν ήδη γνώριμη λαϊκή ιατρική πρακτική στην Ευρώπη από το Μεσαίωνα. Τον 15ο αιώνα από τη μοναχή Hildegarde von Bingen, η οποία παρατήρησε ότι στους κορμούς των δέντρων υπήρχε ένα είδος μούχλας, το οποίο μπορούσε να θεραπεύσει τραύματα.[1-3] Πολλοί επιστήμονες, είχαν διαπιστώσει την αντιβακτηριακή δράση της μούχλας και αρκετοί την είχαν χρησιμοποιήσει για θεραπευτικούς σκοπούς, αρκετά χρόνια πριν από την ανακάλυψη της πενικιλίνης και συστηματική μελέτη της (1928) από τον Alexander Fleming.

Ο βακτηριολόγος Alexander Fleming, κατάφερε να ανακαλύψει και να απομονώσει τυχαία το πρώτο μέλος αυτής της ομάδας αντιβιοτικών, τη βενζυλοπενικιλίνη. Δουλεύοντας κάποια πειράματά του, άφησε κατά λάθος μια καλλιέργεια σταφυλόκοκκου ακάλυπτη για μερικές ημέρες. Στο τέλος των πειραμάτων και ενώ ετοιμαζόταν να πετάξει το τριβλίο με την καλλιέργεια, διαπίστωσε ότι σε ορισμένα σημεία της είχαν αναπτυχθεί μύκητες (μούχλα). Σε μικρή ακτίνα γύρω από τους μύκητες δεν υπήρχαν πια βακτήρια. Όσα βακτήρια υπήρχαν, είχαν διαλυθεί, ενώ δεν είχαν αναπτυχθεί νέα. Ο Fleming απομόνωσε το μύκητα αυτό, το μελέτησε και διαπίστωσε ότι πρόκειται για το *Penicillium notatum*. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο μύκητας απελευθερώνει κάποια ένωση, η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Έτσι λοιπόν ονόμασε την ένωση αυτή πενικιλίνη, με μοριακό τύπο M.T.= C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, η δομή της οποίας παρουσιάζεται στο σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1 Συντακτικός τύπος της πενικιλίνης (βενζυλοπενικιλίνης)

Ωστόσο, συνειδητοποίησε ότι η καλλιέργειά της ήταν αρκετά δύσκολη και ότι στη συνέχεια ήταν ακόμα δυσκολότερο να απομονώσει την αντιβιοτική ουσία. Η προσωπική του εντύπωση ήταν ότι εξαιτίας του προβλήματος της παραγωγής της σε μεγάλη ποσότητα και της φαινομενικά βραδείας δράσης της, η πενικιλίνη δε θα ήταν σημαντική στην καταπολέμηση των μολύνσεων, ενώ παρατήρησε πειραματικά πως η πενικιλίνη δε μπορούσε να μείνει σταθερή στο ανθρώπινο σώμα για το απαραίτητο χρονικό διάστημα. Επίσης, πολλές κλινικές δοκιμές δεν έδωσαν σαφή αποτελέσματα, ίσως επειδή τη χρησιμοποιούσαν ως επιφανειακό αντισηπτικό. Για τους λόγους αυτούς σταμάτησε την περαιτέρω έρευνα. Ο Fleming θεωρείται ως ο "πατέρας της πενικιλίνης", επειδή υπήρξε ο πρώτος, ο οποίος ορθά υπέθεσε την ύπαρξή της, όπως και την παραγωγή της από μύκητες. Ωστόσο, η πραγματική έρευνα πάνω στην πενικιλίνη ξεκίνησε περίπου 10 χρόνια μετά τις πρώτες παρατηρήσεις του Fleming από την ονομαζόμενη "ομάδα της Οξφόρδης".

Το 1939, οι Dr. Howard Florey και Dr. Ernst Chain και οι ερευνητικές τους ομάδες, πέτυχαν να παρασκευάσουν με επιτυχία φάρμακο από το υγρό περιβάλλον-υπόστρωμα, όπου η πενικιλίνη αναπτύσσεται, και επιτυχώς να το εφαρμόσουν σε κλινική δοκιμή. Χάρης στο βιοχημικό της ομάδας Norman Heatley, ο οποίος είναι ο αφανής ήρωας της παρασκευής της πενικιλίνης και χωρίς τον οποίο, η απομόνωση της καθαρής πενικιλίνης θα αργούσε πολύ, λύθηκαν δύο βασικά προβλήματα: (α) το πρόβλημα της μέτρησης της δραστηριότητας ενός διαλύματος πενικιλίνης, αφού με τις μετρήσεις αυτές μπορούσαν οι ερευνητές να διαπιστώνουν τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στα διάφορα στάδια καθαρισμού, ελέγχοντας έτσι αν επέρχεται εμπλουτισμός ή όχι και (β) η απομόνωση της πενικιλίνης με επανεκχύλιση (back-extraction) -αρχικά με διαιθυλαιθέρα-, την οποία ο Heatley κατάφερε σχεδόν να αυτοματοποιήσει, χρησιμοποιώντας αυτοσχέδιες διατάξεις. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκε η βάση για νέα αντιβιοτικά φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου στην επούλωση των τραυμάτων. Η πενικιλίνη εισήχθη στην αγορά μετά το 2ο Παγκόσμιο Πόλεμο το 1946 και χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα αυτών που προκαλούνται από σταφυλόκοκκους και στρεπτόκοκκους. Σε κλινικές εφαρμογές, βρέθηκε να παρουσιάζει περιορισμούς, όπως σχετική αστάθεια στο γαστρικό οξύ, ευαισθησία έως και αδρανοποίηση από β-λακταμάσες (πενικιλινάσες) και σχετική αδράνεια ενάντια στα gram-αρνητικά βακτήρια. Αυτό βρέθηκε να προκύπτει από την αδυναμία να εισχωρήσει στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, λόγω της έλλειψης διαθέσιμων θέσεων δέσμευσης (σε πρωτεΐνες), ή από ενζυματική αδρανοποίηση.[1-3]

Ωστόσο, η χημική τροποποίηση της φυσικής πενικιλίνης παρείχε ακόμη πιο αποτελεσματικά αντιβιοτικά πενικιλίνης, με ένα ευρύτερο φάσμα δράσης και χρήσης. Ο Fleming ανακάλυψε επίσης από πολύ νωρίς ότι τα βακτήρια ανέπτυσσαν ανοχή στα αντιβιοτικά και για το λόγο αυτό συνιστούσε προσοχή στη χρήση της πενικιλίνης. Προειδοποιούσε να μη χρησιμοποιείται το



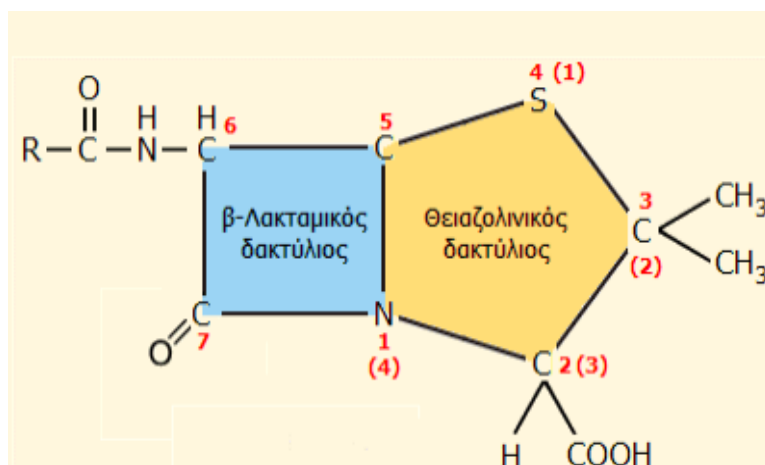
αντιβιοτικό, παρά μόνο όταν υπήρχε ορθά διαγνωσμένη αιτία, και όταν χρησιμοποιείται να χορηγείται σε αρκετή ποσότητα και επί αρκετό χρονικό διάστημα, γιατί αλλιώς δίνεται η ευκαιρία στα βακτηρίδια να αναπτύξουν ανθεκτικά στελέχη τους ως προς το συγκεκριμένο φάρμακο. Αδιαμφισβήτητα, η πενικιλίνη αποδείχθηκε μια επαναστατική ανακάλυψη που άλλαξε τη σύγχρονη ιατρική και σημάδεψε την έναρξη μιας νέας εποχής στην Ιατρική, της εποχής των αντιβιοτικών. [4] Οι Fleming, Florey και Chain τιμήθηκαν με το Βραβείο Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1945.[5]

**“Χωρίς τον Fleming, δε θα υπήρχε ο Chain. Χωρίς τον Chain δε θα υπήρχε ο Florey. Χωρίς τον Florey δε θα υπήρχε ο Heatley. Χωρίς τον Heatley δε θα υπήρχε η πενικιλίνη”**

*Sir Henry Harris, 1998*

## 1.2 Δομή των πενικιλινών

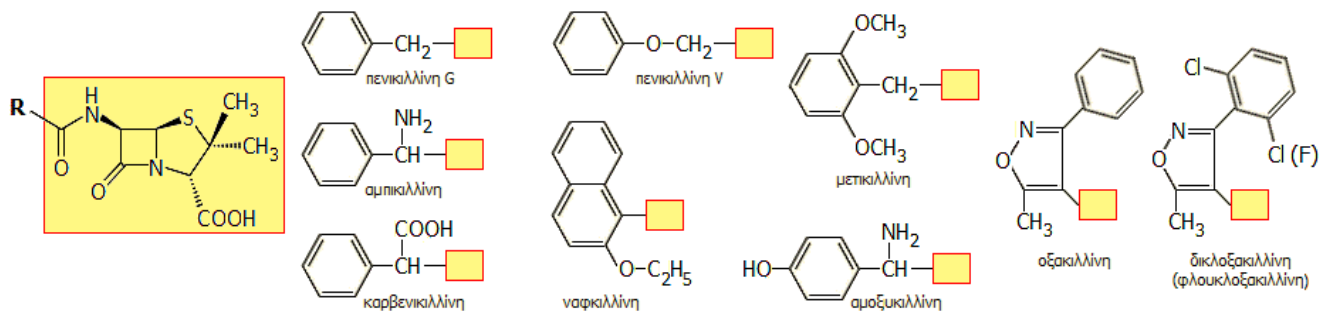
Μετά από εκτενείς έρευνες, απομονώθηκε το δραστικό τμήμα του μορίου της βενζυλοπενικιλίνης (φυσικής πενικιλίνης), το 6-αμινοπενικιλανικό οξύ, το οποίο φαίνεται στο σχήμα 1.2 και το οποίο αποτέλεσε τη βασική μοριακή δομή για χημική τροποποίηση και παρασκευή πλήθους αντιβιοτικών πενικιλίνης με διαφορετική δραστηριότητα, ξεπερνώντας τους διάφορους περιορισμούς της φυσικής πενικιλίνης.



**Σχήμα 1.2** Δομή του 6-αμινοπενικιλανικού οξέος, Γενικός τύπος πενικιλινών και αρίθμηση των θέσεων των δακτυλίων στην κατά IUPAC ονοματολογία (σε παρενθέσεις: η "παραδοσιακή" αρίθμηση που ακολουθείται για τις πενικιλίνες στη φαρμακευτική χημεία)

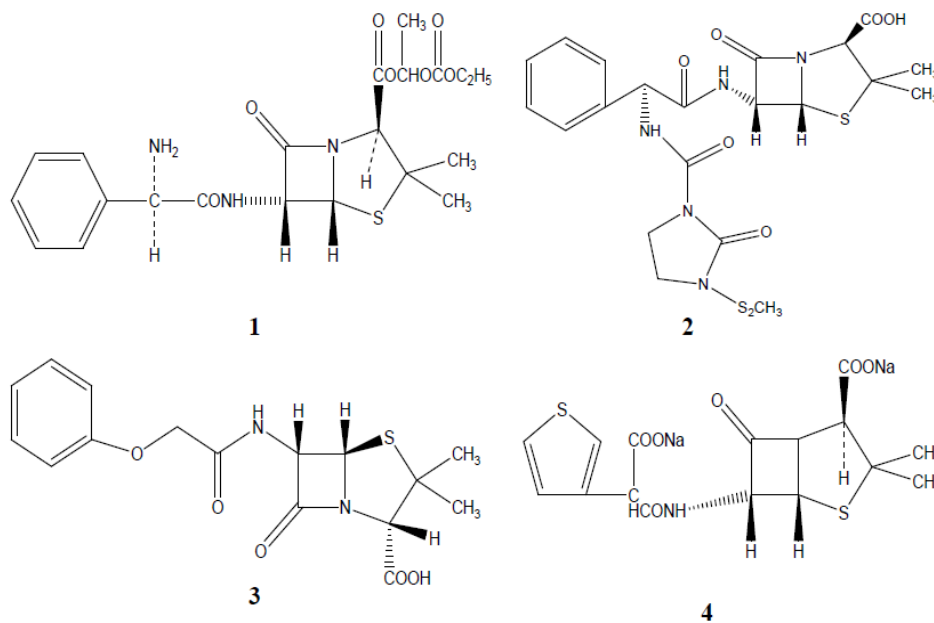
Όπως προκύπτει και από το σχήμα 1.2, κύριο χαρακτηριστικό των ενώσεων που ανήκουν στην ομάδα των πενικιλινών είναι η παρουσία ενός τετραμελούς β-λακταμικού δακτυλίου, ο οποίος είναι συμπυκνωμένος με ένα δακτύλιο θειαζολιδίνης. Στη θέση σύνδεσης του υποκαταστάτη R της

ακυλομάδας R, συνδέονται οι διαφορετικές υποομάδες, δίνοντας μια σημαντική ποικιλία αντιβιοτικών πενικιλίνης. Στο σχήμα 1.3 απεικονίζονται οι δομές των κυριότερων υποκαταστατών R, καθώς και το όνομα της αντίστοιχης πενικιλίνης.



**Σχήμα 1.3:** Πενικιλίνη G (φυσική πενικιλίνη) και αντιβιοτικά - παραλλαγές της που διαφέρουν μόνο ως προς τη φύση της ομάδας R της αμιδικής ομάδας.

Στο σχήμα 1.4 φαίνονται τέσσερις ακόμη πενικιλίνες που υπάρχουν και είναι η μπακαμπικιλίνη, η καρμπενικιλίνη, η μεζλοκιλίνη, η πενικιλίνη V, η τερκακιλίνη και η αζλοκιλίνη. Παρατηρείται πως είναι δυνατόν να παρασκευαστούν τροποποιημένα μόρια πενικιλίνης με υποκατάσταση και στο θεαζολιδινικό δακτύλιο, όπως στην περίπτωση της μπακαμπικιλίνης.[6-8]



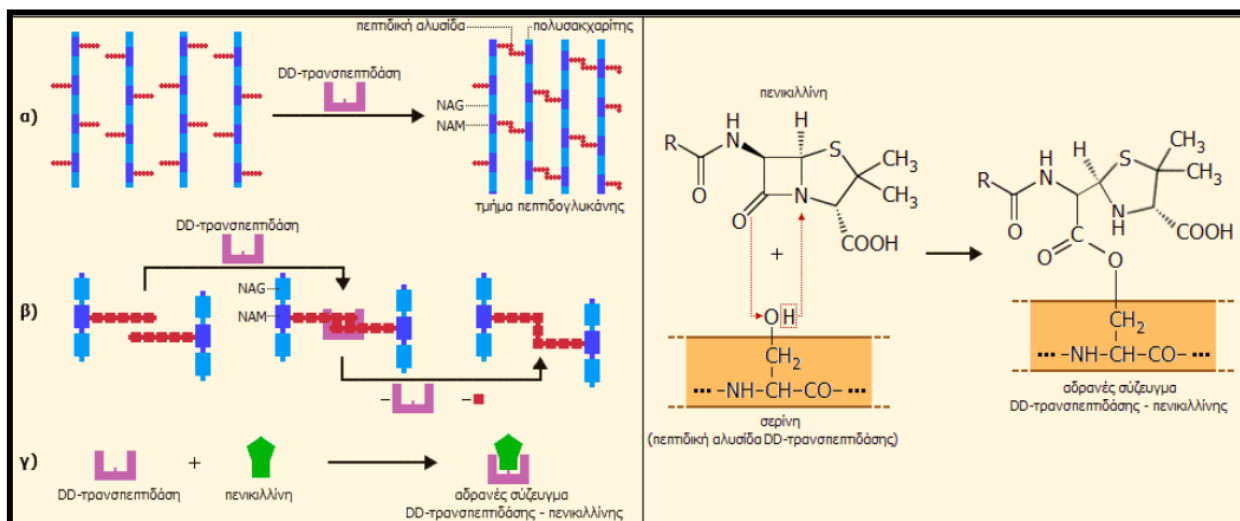
**Σχήμα 1.4:** (1) μπακαμπικιλίνη, (2) μεζλοκιλίνη, (3) πενικιλίνη V και (4) τερκακιλίνη.

### **1.3. Μηχανισμός δράσης πενικιλινών**

Οι πενικιλίνες, όπως ήδη αναφέρθηκε, ανήκουν στις β-λακτάμες. Τα αντιβιοτικά αυτού του είδους δρουν εμποδίζοντας το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου, παρεμβαίνοντας στο τελικό στάδιο της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. Κατά τη δράση τους, λοιπόν, οι πενικιλίνες διαμέσου του τετραμελούς β-λακταμικού δακτυλίου δεσμεύουν τη DD-trans-πεπτιδάση και άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs), οι οποίες φυσιολογικά καταλύουν τη διασταυρούμενη σύνδεση γλυκοπεπτιδίων με πολυμερείς μονάδες από το κυτταρικό τοίχωμα. Κατά αυτόν τον τρόπο, η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος παρεμποδίζεται, προκαλώντας τον πρόωρο θάνατο των κυττάρων. Τα φάρμακα αυτά, εκφράζουν βακτηριοστατική δράση προκαλώντας, όμως λύση, μόνο σε αναπτυσσόμενα κύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης του κυτταρικού τοιχώματος.

Η διαφοροποίηση στη δραστηριότητα των διάφορων β-λακταμών, προκύπτει από τη διαφορά στη συγγένεια των φαρμάκων με τα PBPs. Ο στόχος όλων των β-λακταμών είναι οι PBPs που βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτές οι πρωτεΐνες, συμμετέχουν στη σύνθεση και ανάπλαση του κυτταρικού τοιχώματος. Η ευαισθησία που παρουσιάζει ένα βακτήριο στην πενικιλίνη εξαρτάται από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως η συγγένεια της πενικιλίνης με την PBP, η ικανότητα εισχώρησης στο κυτταρικό τοίχωμα και η ικανότητα αντίστασης στις β-λακταμάσες. Στα βακτήρια υπάρχουν συνήθως 4 με 7 PBPs, οι οποίες είναι οι στόχοι των πενικιλινών. Η βακτηριοστατική δράση στα Gram-αρνητικά βακτήρια προκύπτει από ωσμωτική λύση των κυττάρων που έχουν εξασθενήσει από την απώλεια του στρώματος πεπτιδογλυκάνης. Στα Gram-θετικά βακτήρια, τα οποία έχουν μεγαλύτερες ποσότητες πεπτιδογλυκάνης στα κυτταρικά τους τοιχώματα, η δράση των β-λακταμών είναι για πρόληψη της τελικής διασταυρούμενης σύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης. Τέλος, ενζυμική ρήξη του β-λακταμικού δακτυλίου από τις β-λακταμάσες, θα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αντιβακτηριδιακής δράσης.[6-9] Στο σχήμα 1.5 (αριστερά) δίνεται παραστατικά ο γενικός μηχανισμός σχηματισμού του τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων και ο τρόπος, με τον οποίο η πενικιλίνη και τα άλλα αντιβιοτικά τύπου β-λακτάμης παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του δικτύου της πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα το θάνατο του βακτηρίου. Το δραστικό κέντρο της πενικιλίνης, όπως και κάθε άλλου αντιβιοτικού β-λακτάμης, ο τετραμελής λακταμικός δακτύλιος διαθέτει σημαντικά αποθέματα ενέργειας, λόγω της διάταξης των δεσμών C-C και C-N. Αποτέλεσμα αυτού του ενεργειακού αποθέματος είναι να καθίσταται ιδιαίτερα δραστικός κατά τη διάνοιξη του (σαν "συμπιεσμένο ελατήριο" που ξαφνικά ελευθερώνεται) και να αντιδρά αντιδρά εύκολα με το ελεύθερο υδροξύλιο μιας σερίνης της πεπτιδικής αλυσίδας της DD-τρανσπεπτιδάσης σχηματίζοντας εστερικό δεσμό,

όπως φαίνεται στο σχήμα 1.5 (δεξιά). Έτσι, το σύζευγμα DD-τρανσπεπτιδάσης - πενικιλίνης είναι σταθερό και η ενζυματική δράση της DD-τρανσπεπτιδάσης παύει πλέον να υφίσταται. [6-9]



**Σχήμα 1.5: Αριστερά:** Μηχανισμός σύνθεσης του τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης: α) οι αλυσίδες πολυσακχαριτών ενώνονται με πεπτιδικές αλυσίδες μέσω του ενζύμου DD-τρανσπεπτιδάση. β) Στάδια του μηχανισμού. γ) η πενικιλίνη συνδέεται σταθερά με το ένζυμο DD-τρανσπεπτιδάση, καθιστώντας αδύνατη τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. **Δεξιά:** Αντίδραση πενικιλίνης μετά τη διάνοιξη του β-λακταμικού δακτυλίου με το υδροξύλιο του αμινοξέος σερίνη της πεπτιδικής αλυσίδας της DD-τρανσπεπτιδάσης.

#### 1.4 Διαφοροποίηση και υποομάδες ή γενιές πενικιλινών

Η πλέον κοινή φυσική πενικιλίνη είναι γνωστή και ως πενικιλίνη G (το G προέρχεται από το gold: χρυσός, gold standard penicillin: χρυσή πρότυπη πενικιλίνη) και η κατά IUPAC ονομασία της είναι: (2S,5R,6R)-3,3-διμεθυλο-7-οξο-6-(2-φαινυλακεταμιδο)-4-θεια-1-αζα-δικυκλο[3.2.0]επτανο-2καρβοξυλικό οξύ. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί η ύπαρξη μιας επιπλέον μορφής φυσικής πενικιλίνης, γνωστής ως πενικιλίνης F (το F από το first: η πρώτη πενικιλίνη), στην οποία η ομάδα R είναι το 2-πεντενύλιο ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ ). Η πενικιλίνη F ήταν και η πρώτη που μελετήθηκε (σε διάλυμα στο υγρό καλλιέργειας) αρχικά από τον Fleming και απομονώθηκε αργότερα από την ομάδα της Οξφόρδης, αλλά η πενικιλίνη G ήταν η εκείνη που προέκυψε, όταν άρχισε η μαζική της παραγωγή με τη μέθοδο της "βυθισμένης καλλιέργειας". Η φύση της ομάδας R δεν επιδρά σημαντικά στις αντιβιοτικές ιδιότητες της πενικιλίνης, όπου η "ομάδα-κλειδί" είναι ο β-λακταμικός δακτύλιος. Ωστόσο, οι πενικιλίνες με διαφορετικές πλευρικές ομάδες εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες, όπως η σταθερότητα έναντι των οξέων και της πενικιλινάσης, ένζυμο, το οποίο υπάρχει σε ορισμένα βακτήρια, καταστρέφει την πενικιλίνη και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αλλεργικών αντιδράσεων που οφείλονται στην πενικιλίνη. Συνεπώς, η πλευρική αλυσίδα (R), η οποία είναι

ενωμένη με την αμινομάδα του 6-αμινοπενικιλανικού οξέος (σχήμα 1.2), προκαθορίζει την ευαισθησία της προκύπτουσας πενικιλίνης σε υδρολυτική διάσπαση ή ενζυματική απενεργοποίηση από βακτηριακές β-λακταμάσες. Η αλλαγή της πλευρικής αλυσίδας επηρεάζει επίσης και το αντιβακτηριδιακό φάσμα των πενικιλινών. Η δραστηριότητα στην κλινική χρήση, καθορίζεται από τους πιο πάνω παράγοντες, καθώς και τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο σημείο της μόλυνσης. Η φύση των υποκαταστατών R έχει μικρή επίδραση στο ρυθμό εξάλειψης (elimination) των πενικιλινών, αλλά καθορίζει την έκταση της δέσμευσης πλάσματος με την αλβουμίνη και σε μικρότερο βαθμό, την ικανότητα εισχώρησης στη μεμβράνη.

Συνήθως, οι πενικιλίνες χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες ή γενιές, με πρωτεύον κριτήριο το χρόνο που άρχισαν να χρησιμοποιούνται κλινικά. Δευτερευόντως, κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή, το φάσμα (στενό, ευρύ ή εκτεταμένο), την πηγή (φυσική, ημισυνθετική ή συνθετική) και την ευαισθησία στην καταστροφή από τη β-λακταμάση. Οι ομάδες αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1. Η ομάδα 1 με τη βενζυλο-πενικιλίνη και τις μεγάλης διάρκειας παρεντερικές μορφές της, η ομάδα 2 με τις πενικιλίνες που απορροφώνται στοματικά και είναι παρόμοιες με τη βενζυλο-πενικιλίνη, η ομάδα 3 με τις ανθεκτικές σε σταφυλοκοκκικές πενικιλινάσες, ισοξαζολικές πενικιλίνες, η ομάδα 4 με τις ευρέως φάσματος πενικιλίνες, η ομάδα 5 με τις αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες και η ομάδα 6 με τις πενικιλίνες ανθεκτικές στις β-λακταμάσες. Από το 1940, η σταδιακή ανάπτυξη των πενικιλινών για κλινική χρήση είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία παραγώγων με παρόμοια δραστηριότητα με τη βενζυλο-πενικιλίνη, αλλά μπορούσαν να χορηγηθούν δια του στόματος ή και ήταν ανθεκτικά στις β-λακταμάσες (πενικιλινάσες) του *S. Aureus*. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκαν οι εκ του στόματος χορηγούμενες πενικιλίνες με πιο ευρύ φάσμα δράσης έναντι στα gram-αρνητικά βακτήρια και οι πενικιλίνες με δράση έναντι στο *P.aeruginosa*. [6-9]

Πίνακας 1.1. Κατηγοριοποίηση των πενικιλινών στις 6 υποομάδες ή γενιές.

Υποομάδα ή Γενιά	Αντιπροσωπευτικά Παράγωγα	Αντιμικροβιακή Δράση
1. Βενζυλοπενικιλίνες ή πενικιλίνες της ομάδας G	Προκαΐνη (μακράς διάρκειας)	Gram-θετικά βακτήρια, Σε υψηλές συγκεντρώσεις και κατά Gram-αρνητικών
2. Στοματικής πρόσληψης βένζυλοπενικιλίνες ή πενικιλίνες της ομάδας V	Φαινοξυμεθυλο πενικιλίνη	Σε μικρό βαθμό κατά Gram-αρνητικών
3. Αντισταφυλοκοκκικές ισοξαζολικές πενικιλίνες ή πενικιλίνες της ομάδας M	Κλοξακιλίνη, Δικλοξακιλίνη, οξακιλίνη, μεθυκιλίνη, ναφκιλίνη	Κατά οργανισμών που παράγουν πενικιλινάσες <i>S.aureus</i> και <i>S.pseudintermedius</i>
4. Ευρέως φάσματος πενικιλίνες ή πενικιλίνες της ομάδας A	Αμινοβενζυλο πενικιλίνες (αμπικιλίνη, ετακιλίνη, αμοξικιλίνη)	Δρουν κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, αλλά ευαίσθητες στις β-λακταμάσες
5. Αντιψευδομοναδική πενικιλίνη	Ουρεΐδοπενικιλίνες (πιπερακιλίνη), καρβοξυπενικιλίνες (καρβενικιλίνη, τικαρκιλίνη)	Κατά <i>P.aeruginosa</i> , λιγότερο κατά Gram-θετικά βακτήρια
6. Πενικιλίνες ανθεκτικές στις β-λακταμάσες	Τεμοκιλίνη	Ανθεκτικότητα στις β-λακταμάσες (αλλά όχι στη μεθικιλίνη)

### **1.5 Φαρμακοκινητική των Πενικιλινών**

Οι πενικιλίνες είναι οργανικά οξέα που είναι διαθέσιμα ως το αντίστοιχο άλας νατρίου ή καλίου του ελεύθερου οξέος. Σε ξηρή κρυσταλλική μορφή, οι πενικιλίνες είναι σταθερές, αλλά χάνουν τη δραστηρότητά τους, όταν είναι διαλυμένες. Πέρα από τις ισοξαζολικές πενικιλίνες (κλοξακιλίνη, δικλοξακιλίνη, οξακιλίνη) και την πενικιλίνη V, η όξινη υδρόλυση στο στομάχι, περιορίζει τη διαθεσιμότητα των περισσότερων πενικιλινών. Οι πενικιλίνες με pKa 2.7 ιονίζονται στο πλάσμα και έχουν μικρό όγκο κατανομής (0.2-0.3 L/kg), μικρούς χρόνους ημιζωής (0.5-1.2 h). Μετά την απορρόφηση, κατανέμονται σε εξωκυττάρια υγρά, αλλά δε διαπερνούν εύκολα μεμβράνες, λόγω του ότι βρίσκονται σε ιοντική μορφή και δεν είναι διαλυτές σε λιπίδια. Η είσοδος διαμέσου βιολογικών μεμβρανών ή αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού ή στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενισχύεται από την παρουσία φλεγμονής. Ακολούθως μπορούν να επιτευχθούν ανασταλτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου σε αυτά τα υγρά, τα οποία δεν είναι κανονικά προσβάσιμα από την πενικιλίνη. Οι πενικιλίνες απομακρύνονται ολοκληρωτικά από τα νεφρά και άρα προκύπτουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ούρα και μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 10% βιομετατρέπεται από άγνωστους μηχανισμούς.[9]

### **1.6 Χρήση των πενικιλινών στην Ιατρική και Φαρμακευτική**

Τα αντιβιοτικά της πενικιλίνης έχουν μεγάλη θεραπευτική, αλλά και ιστορική σημασία για τον τομέα της φαρμακευτικής και των ιατρικών επεμβάσεων για τη θεραπεία νόσων, οι οποίες αποδεκάτισαν εκατομμύρια ανθρώπους τις προηγούμενες αιώνες, η σύφιλη, η γονόρροια και πλήθος άλλων μολυσματικών ασθενειών, που προκαλούνταν από σταφυλόκοκκους και στρεπτοκόκκους. Οι πενικιλίνες αποτελούν τα πλέον διαδεδομένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρύτατα μέχρι σήμερα και συνεχής είναι η έρευνα για νέα βελτιωμένα παράγωγά της. Υπάρχουν διάφορες μορφές πενικιλινών, η κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση διαφορετικών μορφών ασθενειών, τις μολύνσεις του δέρματος, των δοντιών, των αυτιών, του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος, αλλά και στη θεραπεία κατά βακτηριακών μολύνσεων. Εντούτοις, οι πενικιλίνες είναι αναποτελεσματικές στη θεραπεία κατά τις γρίπης, του κοινού κρυολογήματος και άλλων ιογενών ασθενειών. Ο ρόλος των πενικιλινών είναι να καταστρέφουν ή να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων που μολύνουν διάφορα μέρη του ανθρώπινου σώματος. Όλα τα βακτηριακά κύτταρα περικλείονται από το κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο και τα προστατεύει. Οι πενικιλίνες εμποδίζουν τη δημιουργία αυτού του τοιχώματος, δρώντας ενάντια στα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, προκαλώντας κατά αυτό τον τρόπο το θάνατο του βακτηρίου.

Σε κάποιες περιπτώσεις τα βακτήρια αναπτύσσουν μια «αντίσταση» κατά των αντιβιοτικών αυτών. Κυριότερη αιτία της αντίστασης είναι η ικανότητα των βακτηρίων να δημιουργούν τα ένζυμα β-λακταμάσες (υπάρχουν περίπου 50 διαφορετικοί τύποι β-λακταμάσης), τα οποία υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο, αχρηστεύοντας έτσι το δραστικό κέντρο του αντιβιοτικού, πριν προλάβει να δράσει επί της DD-τρανσπεπτιδάσης. Δηλαδή, τα βακτήρια όταν (κατά κάποιο τρόπο) αισθανθούν την «επίθεση» τις πενικιλίνης, «αντεπιτίθεται» εκλύοντας β-λακταμάσες. Για την αντιμετώπιση αυτού του είδους της αντίστασης, οι πενικιλίνες μπορούν να χορηγηθούν με αναστολείς (inhibitors) τις β-λακταμάσης ή (συνηθέστερα) χορηγούνται ως τροποποιημένες μορφές τις πενικιλίνης, που είναι ανθεκτικές στη δράση της β-λακταμάσης, οπότε παρακάμπτεται το πρόβλημα αυτό.

Τυπικό παράδειγμα φαρμακευτικού σκευάσματος, το οποίο συνδυάζει αντιβιοτικό και αναστολέα, είναι το σκεύασμα με την εμπορική ονομασία Augmentin, που αποτελείται από την ημισυνθετική πενικιλίνη αμοξικιλίνη (Amoxicillin) και τον αναστολέα τις β-λακταμάσης κλαβουλανικό οξύ (clavulanic acid). Οι μέχρι σήμερα γνωστοί αναστολείς των πενικιλινών είναι τρεις, το κλαβουλανικό οξύ, η σουλμπακτάμη και η ταζομπακτάμη. Έχουν πολύ μικρή αντιμικροβιακή δράση, αλλά τις διακρίνει η ικανότητα να αναστέλουν τις β-λακταμάσες, τις οποίες δεσμεύουν σταθερά, γι' αυτό και αποκαλούνται μη αναστρέψιμοι αναστολείς. Οι ουσίες αυτές συνδυαζόμενες με την αμοξικιλίνη και την τικαρκιλίνη –όσον αφορά στο κλαβουλανικό οξύ- ή με την αμικιλίνη –όσον αφορά στη σουλμπακτάμη, ή με την ταζομπακτάμη-όσον αφορά στην πιπερακιλίνη, δρουν αναστέλλοντας τη δράση των σταφυλοκοκκικών και πολλών πλασμιδιακών λακταμασών, καθιστώντας έτσι ευαίσθητα τα μικρόβια που προηγουμένως ήταν ανθεκτικά στα υπό χορήγηση φάρμακα. Η προσθήκη και άλλων παρόμοιων συστατικών, δίνει τη δυνατότητα στο αντιβιοτικό να είναι ακόμα πιο αποτελεσματικό έναντι των βακτηρίων, τα οποία μπορεί να έχουν αναπτύξει ένα είδος ανθεκτικότητας σε κάποια αντιβιοτικά.[2,3,6,8]

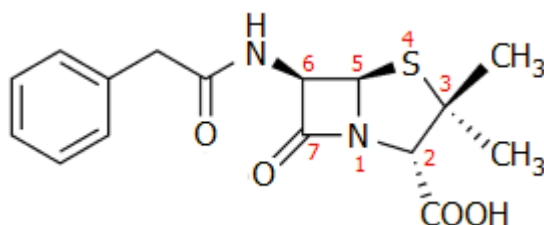
### ***1.7 Συσχέτιση δομής και φαρμακευτικής δράσης***

Η φαρμακευτική δράση της πενικιλίνης έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει εξετασθεί η χρησιμότητα και επίδραση κάθε υποκαταστάτη στο βασικό σκελετό της, όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 1.6. Σε πολύ γενικές γραμμές τα συμπεράσματα των μελετών αυτών συνοψίζονται στα εξής (χρησιμοποιείται η κατά IUPAC αρίθμηση των θέσεων):

- Θέση 1: Το άτομο αζώτου είναι απαραίτητο και μη αντικαταστάσιμο.
- Θέση 2: Η καρβοξυλική ομάδα είναι απαραίτητη. Εάν η ομάδα αυτή εστεροποιηθεί, η αντιβιοτική δράση μειώνεται.



- Θέση 3: Δεν επιτρέπονται αντικαταστάσεις στη θέση αυτή. Κάθε αλλαγή μειώνει την αντιβιοτική δράση. Τα δύο μεθύλια είναι απαραίτητα.
- Θέση 4: Όταν το άτομο θείου (-S-) του θειαζολινικού δακτυλίου οξειδωθεί προς σουλφοξειδική (-SO-) ή σουλφονική (-SO<sub>2</sub>-) ομάδα, το μόριο σταθεροποιείται χημικώς, αλλά η αντιβιοτική δράση μειώνεται.
- Θέση 5: Δεν επιτρέπονται προσθήκες ομάδων στη θέση αυτή.
- Θέση 6: Αντικαταστάσεις της ομάδας C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>- στην πλευρική αλυσίδα της αμιδικής ομάδας επιτρέπονται.
- Θέση 7: Η καρβονυλική ομάδα του β-λακταμικού δακτυλίου είναι απαραίτητη.



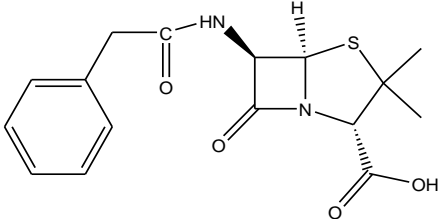
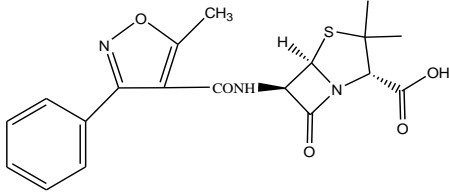
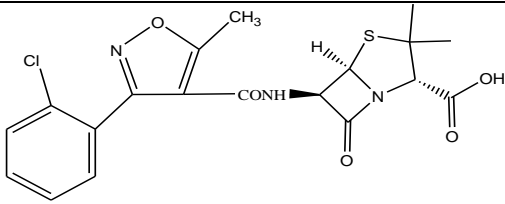
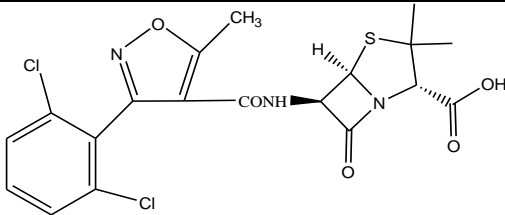
**Σχήμα 1.6.** Βασικός σκελετός πενικιλίνης

### 1.8 Αντισταφυλοκοκκικές Πενικιλίνες

Οι περισσότεροι σταφυλόκοκκοι έχουν γίνει ανθεκτικοί στη βενζυλοπενικιλίνη επειδή παράγουν πενικιλινάσες που τη διασπούν. Μερικές από τις πενικιλίνες όμως δε διασπώνται από τις σταφυλοκοκκικές πενικιλινάσες. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η μεθικιλίνη και οι ισοξαζολικές πενικιλίνες (οξακιλίνη, κλοξακιλίνη, δικλοξακιλίνη, φλουκλοξακιλίνη) Η μοναδική τους κλινική ένδειξη είναι η θεραπεία κατά των λοιμώξεων από ανθεκτικούς στη βενζυλοπενικιλίνη σταφυλόκοκκους και η χειρουργική πρόληψη (καρδιοχειρουργική, ορθοπεδική) σε χώρες, όπου η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη δεν είναι συχνή. Οι ισοξαζολικές πενικιλίνες εμφανίζουν μέτρια απορρόφηση χορηγούμενες από το στόμα (30-60%). Η απορρόφηση επηρεάζεται από την ταυτόχρονη λήψη τροφής, γι' αυτό και πρέπει να χορηγούνται σε κενό στομάχι (1 ώρα προ του γεύματος ή 2 ώρες μετά). Δεσμεύονται στις πρωτεΐνες του ορού σε υψηλά ποσοστά (90-95%). Δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφόρων φαρμάκων της ομάδας όσον αφορά στη φαρμακοκινητική και στη δραστηριότητα. Η απορρόφηση της φλουκλοξακιλίνης και της δικλοξακιλίνης είναι ελαφρώς μεγαλύτερη των υπολοίπων.

Δρουν με τη δέσμευση σε συγκεκριμένες πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) που βρίσκονται στο εσωτερικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και αναστέλλουν το τρίτο και τελευταίο στάδιο της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Στη συνέχεια επέρχεται η κυτταρική λύση με τη μεσολάβηση βακτηριακών ενζύμων του κυτταρικού τοιχώματος, όπως οι αυτολυσίνες. Στον πίνακα 1.2 δίνονται οι συντακτικοί τύποι της δικλοξακιλίνης, της κλοξακιλίνης, της οξακιλίνης και της βενζυλοπενικιλίνης καθώς και σχετικές τιμές φυσικοχημικών μεγεθών για τις εξεταζόμενες τέσσερις πενικιλίνες.

**Πίνακας 1.2:** Χημικές δομές και τιμές φυσικοχημικών ιδιοτήτων εξεταζόμενων αντιβιοτικών πενικιλίνης

Ένωση	Ακρωνύμιο	Μοριακό βάρος (g/mole)	LogK <sub>ow</sub>	pKa	Συντακτικός Τύπος
Βενζυλοπενικιλίνη	PENG	334.39	1.83	2.74	
Οξακιλίνη	OXA	401.44	2.38	2.72	
Κλοξακιλίνη	CLO	435.88	2.44	3.75	
Δικλοξακιλίνη	DICLO	470.33	2.91	3.75	

Η δικλοξακιλίνη είναι περισσότερο δραστική έναντι των σταφυλόκοκκων. Η δικλοξακιλίνη δεν πρέπει να χορηγείται συγχρόνως με β-λακτάμες και αμινογλυκοσίδες. Επίσης δεν πρέπει να

χορηγείται σε νεογνά. Η κλοξακιλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη σταφυλόκοκκου, ανθεκτικά στην πενικιλίνη και ευαίσθητα στη μεθικιλίνη. Το μικρόβιο του σταφυλόκοκκου, το οποίο υπάρχει και φυσιολογικά στη μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπου, μερικές φορές διεισδύει στους ιστούς και προκαλεί αποστήματα. Παρουσιάζονται συχνά πνευμονίες από σταφυλόκοκκο μετά από επιδημίες γρίπης. Επίσης είναι αρκετά συχνή στους νοσοκομειακούς αρρώστους, σε διασωληνωμένους ασθενείς και σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Για τη θεραπεία όλων αυτών των λοιμωδών ασθενειών γίνεται ενδοφλέβια χορήγηση οξακιλίνης. [2,3,6,8]

## **2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΩΝ**

### **2.1. Σημασία ανάπτυξης νέων μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού πενικιλινών**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιβιοτικών πενικιλίνης στον ορό του ανθρώπινου αίματος, καθώς και η ανάπτυξη νέων μεθόδων είναι διαρκώς στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος για ποικίλους λόγους. Είναι γνωστό ότι οι πενικιλίνες είναι αποτελεσματικές έναντι σοβαρών λοιμώξεων που σχετίζονται ακόμη και με τη σήψη, ενώ παράλληλα τα αντιβιοτικά β-λακτάμης αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας των εξαιρετικά επικίνδυνων μολύνσεων που απειλούν τη ζωή ενός ασθενούς, ο οποίος βρίσκεται σε κρίσιμη κατάσταση στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Γενικά, η καταλληλότητα της έκθεσης στο αντιβιοτικό είναι μια κρίσιμη παράμετρος της θεραπείας. Έτσι, η βελτιστοποίηση της χορήγησης αντιβιοτικών για ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση (ΜΕΘ) θεωρείται βασική προϋπόθεση προκειμένου να βελτιωθούν τα κλινικά αποτελέσματα και να εξαλειφθεί η δημιουργία ανθεκτικών μεταλλάξεων του μολυσματικού μικροοργανισμού. Αυτή η δήλωση θεμελιώνεται έγκυρα και τεκμηριωμένα από μελέτες που δηλώνουν τη σημασία της ρύθμισης της δόσης (dose adjustment). Η διαδικασία βελτιστοποίησης απαιτεί την πρόβλεψη και γνώση της φαρμακοκινητικής των αντιβιοτικών πενικιλίνης, κάτι που καθίσταται εφικτό με την αξιόπιστη και γρήγορη μέτρηση της συγκέντρωσης. Η φαρμακοκινητική αφορά τη χρονική εξέλιξη της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών στους ιστούς και τα βιολογικά υγρά, όπως ο ορός του ανθρώπινου αίματος.

Αυτή η αναγκαιότητα αντιμετωπίζεται με τη διαδικασία της θεραπευτικής παρακολούθησης φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring), κατά την οποία διερευνάται διεξοδικά η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών. Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, η κύρια προσπάθεια εστιάζεται στον υπολογισμό του λόγου φαρμακοκινητικής (PK) / φαρμακοδυναμικής (PD), ο οποίος συσχετίζεται με τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και περιγράφεται ως το ποσοστό του χρονικού διαστήματος, κατά το οποίο η συγκέντρωση του φαρμάκου (fT) είναι μεγαλύτερη από την ελάχιστη δραστική συγκέντρωση του φαρμάκου (MIC) που έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη ενός παθογόνου μικροοργανισμού (fT > MIC). Έχει αποδειχθεί ότι το βακτηριοστατικό αποτέλεσμα των αντιβιοτικών της πενικιλίνης παρατηρείται, όταν το fT > MIC διατηρείται για το 30% του διαστήματος δοσολογίας για τις πενικιλίνες, ενώ η μέγιστη θανάτωση βακτηρίων και η βέλτιστη κλινική αποτελεσματικότητα εμφανίζονται για το 40-50% του διαστήματος. Κατά συνέπεια, ο προσδιορισμός πενικιλινών στον ορό του αίματος είναι πολύ σημαντικός για την εξατομίκευση της αντιμικροβιακής θεραπείας. [10-13]

Ως εκ τούτου, όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα σε επόμενα κεφάλαια, υπάρχει μια αξιοσημείωτη ποικιλία μεθόδων και ανασκοπήσεων στη βιβλιογραφία που ασχολείται με αυτό το

θέμα και καλύπτει τον προσδιορισμό πενικιλίνης και άλλων αντιβιοτικών β-λακτάμης στον ορό του ανθρώπινου αίματος και σε ποικίλα βιολογικά υποστρώματα. Αναμφισβήτητα, οι μέθοδοι που στηρίζονται στην τεχνική της HPLC και γενικότερα στην υγρή χρωματογραφία, αποτελούν τη βάση για τον αξιόπιστο προσδιορισμό υπολειμμάτων αντιβιοτικών. Οι μέθοδοι αυτές συνήθως διαφοροποιούνται από τη στατική φάση, από την κινητή φάση με ή χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα, τον τρόπο ανίχνευσης, τη χρήση παραγωγοποίησης, τη διαδικασία παρασκευής δείγματος κ.τ.λ. Σε όλες αυτές τις αναφορές, είναι προφανές ότι η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται, κυρίως με παρόμοιους τρόπους, χωρίς σημαντικές αποκλίσεις και με τις συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων. Η διαδικασία περιλαμβάνει καταβύθιση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη, ως επί το πλείστον ακετονιτρίλιο (ACN), με ή χωρίς φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθεί άμεση ανάλυση, ενώ σε άλλες παρατηρείται μια πιο επίπονη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την εξάτμιση του διαλύτη και την επακόλουθη επανασύσταση του δείγματος. Επιπλέον, μερικές μέθοδοι επωφελούνται από τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ως τεχνικής προσυγκέντρωσης και προετοιμασίας του δείγματος.[14-20]

## ***2.2 Σημασία προκατεργασίας δείγματος και βιολογικό υπόστρωμα***

Η προκατεργασία των δειγμάτων είναι ένα από τα πιο κρίσιμα και καθοριστικά βήματα στην ανάπτυξη μιας βιοαναλυτικής μεθόδου, καθώς επηρεάζει ολόκληρη τη διαδικασία. Ο ορός ανθρώπινου αίματος είναι ένα βιολογικό υπόστρωμα ακατάλληλο για άμεση ανάλυση, εξαιτίας της πολύπλοκης σύστασής του. Αποτελείται κυρίως από νερό (92% κατ'όγκο) και περιέχει επίσης πρωτεΐνες, μεταλλικά άλατα, ορμόνες, διοξείδιο του άνθρακα, γλυκόζη και αιμοσφαίρια (κυρίως ερυθρά αιμοσφαίρια). Συνεπώς, η σημασία της προετοιμασίας του δείγματος και της προσυγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων είναι προφανής, ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι στα βιολογικά υγρά οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε χαμηλές τιμές συγκέντρωσης. Η επιλεγόμενη τεχνική προκατεργασίας δείγματος πρέπει να εγγυάται την ποσοτική ανάκτηση των στοχευόμενων ενώσεων, να καθαρίζει το δείγμα αποφεύγοντας την επιμόλυνσή του και να εξασφαλίζει τη μείωση των παρεμποδίσεων και των επιδράσεων του υποστρώματος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μέτρησης. Επιπροσθέτως, αυτή η μεθοδολογία θα πρέπει να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα, ενώ παράλληλα οφείλει να βελτιώνει τις αναλυτικές παραμέτρους μιας αναπτυσσόμενης μεθόδου, όπως είναι η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η ευρωστία, η επιλεκτικότητα και η ευαισθησία. Όπως είναι προφανές, οι διάφορες στρατηγικές προετοιμασίας δειγμάτων πρέπει να βελτιστοποιούνται, να εκσυγχρονίζονται διαρκώς, να αποτελούν αντικείμενο έρευνας και να συμμορφώνεται με τις νέες τάσεις που απορρέουν από τη ραγδαία επιστημονική και τεχνολογική

εξέλιξη. Από τα προαναφερθέντα ερευνητικά άρθρα και ανασκοπήσεις, προέκυψε ότι οι συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων, οι οποίες θα αναφερθούν στη συνέχεια, εξακολουθούν να προτιμώνται στην περίπτωση προσδιορισμού των αντιβιοτικών πενικιλίνης στον ορό του αίματος. Παραδόξως, η αποπρωτεΐνωση φαίνεται να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος αυτών των τεχνικών, παρά το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για απώλεια ποσότητας εκχυλιζόμενων ενώσεων, ειδικά στην περίπτωση που ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και επανασύσταση του δείγματος. Μελετώντας, όλες αυτές τις αναφορές, είναι προφανές ότι η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται κυρίως με παρόμοιους τρόπους, χωρίς σημαντικές αποκλίσεις και με τις συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων. [14-22]

### ***2.3 Πράσινη Αναλυτική Χημεία και Προκατεργασία δείγματος***

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η Πράσινη Αναλυτική Χημεία (Green Analytical Chemistry - GAC), η οποία προέκυψε από τις αρχές που πλαισιώνουν την Πράσινη Χημεία και διατυπώθηκαν για πρώτη φορά το 2000, αναπτύσσεται συνεχώς, και φαίνεται πως θα κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στον τομέα της βιοανάλυσης τα επόμενα χρόνια. Λαμβάνοντας σοβαρά υπόψη τις αρχές της Πράσινης Αναλυτικής Χημείας, μια νέα τάση, η ανάπτυξη πράσινων μεθόδων, είναι γεγονός.

Το στάδιο της προκατεργασίας δείγματος, κατέχει κεντρικό ρόλο και αποτελεί λυδία λίθο για την εναρμόνιση μιας μεθόδου με τη φιλοσοφία της Πράσινης Αναλυτικής Χημείας, η επίδραση της οποίας έθεσε τα θεμέλια για την ανάπτυξη των αντίστοιχων κριτηρίων, με βάση τα οποία μια τεχνική προκατεργασίας δείγματος μπορεί να θεωρείται «πράσινη», και συνεπώς οδηγεί στην ανάπτυξη «πράσινων» μεθόδων. Με βάση τα κριτήρια αυτά, μια τεχνική προκατεργασίας δείγματος εναρμονίζεται με την GAC, εφόσον ελαχιστοποιεί τα συνολικά στάδια της διαδικασίας, μειώνει αξιοσημείωτα το μέγεθος του χρησιμοποιούμενου δείγματος σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές, χρησιμοποιεί σημαντικά μικρότερες ποσότητες προσροφητικών υλικών, εξασφαλίζει τη σημαντικά χαμηλότερη κατανάλωση επικίνδυνων αντιδραστηρίων, οργανικών διαλυτών και ενέργειας, μεγιστοποιεί την ασφάλεια και αυξάνει τη φιλικότητα της μεθόδου με το περιβάλλον καθιστώντας την οικολογική.

Ως εκ τούτου, ο κύριος στόχος είναι η ανάπτυξη και η εφαρμογή φιλικών προς το περιβάλλον και οικονομικών μεθοδολογιών με τη σύγκριση των τεχνικών εκχύλισης και την ανάπτυξη νέων προσροφητικών υλικών. Προφανώς, όλα αυτά τα χαρακτηριστικά θα πρέπει να προστεθούν στις κλασικές αρχές που πρέπει να χαρακτηρίζουν μια τεχνική ή μέθοδο προετοιμασίας του δείγματος, όπως είναι οι υψηλές τιμές ανάκτησης, ο εύκολος χειρισμός και η ταχύτητα. Όπως φαίνεται στη συνέχεια και προκύπτει από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, μια αξιοσημείωτη ποικιλία τεχνικών προετοιμασίας δείγματος που ικανοποιούν όλα τα επιθυμητά κριτήρια, βασίζονται στην Εκχύλιση

Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction) και προέκυψαν από τη σύγκριση, την τροποποίηση και την απλούστευση της κύριας αρχής της SPE, δηλαδή την εκλεκτική προσρόφηση της ένωσης στόχου στην επιφάνεια ενός κατάλληλου προσροφητικού υλικού και την επακόλουθη εκρόφιση / εκχύλιση αυτού με τον κατάλληλο διαλύτη έκλουσης. [23-25]

#### **2.4 Ορός αίματος**

Ο ορός αίματος, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.1, είναι ένα διαυγές, υποκίτρινο υγρό, το οποίο είναι μέρος του αίματος. Δεν περιέχει λευκά ή ερυθρά αιμοσφαίρια ή παράγοντες πήξης. Ουσιαστικά είναι το πλάσμα χωρίς τα ινωδογόνα, δηλαδή τους παράγοντες πήξης. Ο ορός περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες που δε χρησιμοποιούνται στην πήξη του αίματος και όλους τους ηλεκτρολύτες, αντισώματα, αντιγόνα, ορμόνες, και οποιεσδήποτε άλλες ουσίες, όπως φάρμακα και μικροοργανισμούς. Υπάρχει ξεχωριστός επιστημονικός κλάδος (serology) που μελετά τον ορό αίματος (blood serum). Ο ορός χρησιμοποιείται σε πολλές ιατρικές διαγνωστικές εξετάσεις.

Για την προετοιμασία του ορού συλλέγεται το ολικό αίμα σε ένα καλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30min. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3500 rpm. Το υπερκείμενο είναι ορός αίματος, ο οποίος κατανέμεται σε μικρά κλάσματα και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία  $-18^{\circ}\text{C}$  για να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη μεθόδου. Είναι σημαντικό να αποφεύγονται οι κύκλοι ψύξης-απόψυξης, χωρίς προηγούμενη διερεύνηση της σταθερότητας κατά τη διάρκεια αυτών, καθώς αυτό μπορεί να είναι επιζήμιο για πολλά συστατικά του ορού.[26-27]



**Σχήμα 2.1:** Ορός αίματος

### 3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

#### 3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Σ' ένα εργαστήριο, η πλειοψηφία των δειγμάτων απαιτεί κάποια ιδιαίτερη προκατεργασία πριν την ανάλυσή τους. Η προκατεργασία έχει σκοπό την απομάκρυνση των ενώσεων που παρεμποδίζουν και δημιουργούν πρόβλημα μόλυνσης ή απόφραξης της στήλης, την απομόνωση των προσδιοριζόμενων συστατικών χωρίς την παραμικρή αλλοίωση της σύστασής τους και την προσυγκέντρωσή τους, όταν αυτά βρίσκονται σε μεγάλο όγκο δείγματος. Είναι το πιο πολύπλοκο και χρονοβόρο στάδιο της συνολικής αναλυτικής μεθοδολογίας και αποτελεί τα δυο τρίτα του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Ο στόχος της προκατεργασίας των δειγμάτων είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία, η εκλεκτικότητα, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται. Το πρακτικό αποτέλεσμα της προκατεργασίας του δείγματος είναι:

- ❖ Τροποποίηση του υποστρώματος
- ❖ Καθαρισμός του δείγματος
- ❖ Εμπλουτισμός / προσυγκέντρωση
- ❖ Απομόνωση συστατικών που ενδιαφέρουν

Για να είναι μια μέθοδος προκατεργασίας αποτελεσματική, θα πρέπει:

- 1) Να είναι εκλεκτική, όσον αφορά στις ενώσεις που ενδιαφέρουν τη ανάλυση.
- 2) Να είναι επαναλήψιμη, όσον αφορά στην ανάκτηση της ένωσης ή των ενώσεων, εφόσον οι συνθήκες της ανάλυσης παραμένουν αμετάβλητες.
- 3) Να είναι γρήγορη.
- 4) Να είναι απλή στους χειρισμούς προετοιμασίας του δείγματος.
- 5) Να είναι οικονομική.
- 6) Να μπορεί να αυτοματοποιηθεί.
- 7) Να μην καταστρέφει ή αλλοιώνει το δείγμα.

Τέλος, για την ανάπτυξη της καταλληλότερης μεθόδου προκατεργασίας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι εξής παράμετροι:

- Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του δείγματος
- Η χημική σύνθεση του δείγματος
- Το υπόστρωμα και οι παρεμποδίσεις από τα ενδογενή συστατικά
- Η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Η ανάκτηση, η οποία πρέπει να είναι ποσοτική.
- Η διαδικασία, η οποία πρέπει να είναι απλή
- Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια



Δεδομένου όμως ότι καμία τεχνική προκατεργασίας, είτε κλασική είτε σύγχρονη, δεν πληροί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις, θα πρέπει να επιλέγεται κάθε φορά η καταλληλότερη, ανάλογα με το είδος του δείγματος που πρόκειται να αναλυθεί, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προσδιοριζόμενων συστατικών, την αναλυτική τεχνική, την επιθυμητή ακρίβεια των προσδιορισμών, αλλά και τις δυνατότητες του εκάστοτε εργαστηρίου με βάση τον εξοπλισμό του.[28-29]

### **3.2 Κλασικές τεχνικές προκατεργασίας υγρών και στερεών δειγμάτων**

Η μεταφορά ενός συγκεκριμένου συστατικού από μία φάση (διάλυμα ή αιώρημα) σε μία άλλη (υγρή) λέγεται εκχύλιση και είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται, κυρίως για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την παραλαβή ενός συστατικού από ένα χημικό σύστημα. Στις κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος περιλαμβάνονται η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση Soxhlet, οι οποίες υπήρξαν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την προκατεργασία των δειγμάτων στη χημική ανάλυση. Βασική αρχή, στην οποία στηρίζονται οι δύο παραπάνω τεχνικές, είναι η επαφή του μίγματος που περιέχει το προσδιοριζόμενο συστατικό με κατάλληλο διαλυτικό μέσο, το οποίο διαλύει εκλεκτικά το συγκεκριμένο συστατικό.

#### **3.2.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού**

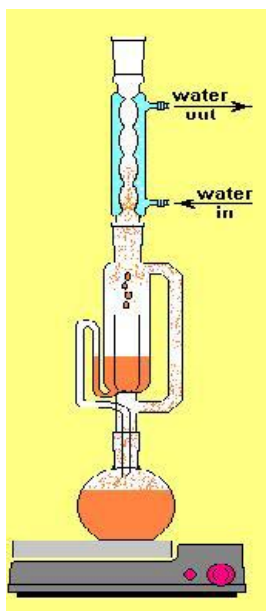
Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει συνήθως τη μίξη ενός δείγματος υδατικού διαλύματος με ένα μη αναμίξιμο οργανικό διαλύτη για μια χρονική περίοδο, και έπειτα επιτρέπει σε αυτές τις δύο υγρές φάσεις να αλληλεπιδράσουν, έτσι ώστε οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν να εκχυλίζονται από την υδατική στην οργανική στιβάδα, καθώς ο οργανικός διαλύτης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτούς. Αφού διαχωριστούν τα μη αναμίξιμα υγρά, η οργανική στιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το σύστημα ανάλυσης.[29]

#### **3.2.2 Εκχύλιση soxhlet**

Η εκχύλιση οργανικών στερεών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Σημειώνεται ότι η εκχύλιση είναι συνήθως η κύρια διαδικασία παραλαβής των αλκαλοειδών από τα φυτά (φύλλα, ρίζες, καρπούς κλπ), των γευστικών συστατικών από διάφορους σπόρους, των αρωμάτων από άνθη κλπ. Μια απλή εκχύλιση ενός στερεού μπορεί να γίνει με θέρμανση της ένωσης με ένα διαλύτη και στη συνέχεια απόχυση ή διήθηση του θερμού μίγματος. Για μικρές ποσότητες ένωσης, η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με προσαρμοσμένο ένα μακρύ γυάλινο σωλήνα ως κάθετο ψυκτήρα και η εργασία αυτή να επαναληφθεί πολλές φορές. Ένας ακόμα απλούστερος τρόπος είναι

να αφηθεί για εκχύλιση ένα στερεό σε επαφή με ένα κατάλληλο διαλύτη σε μια πωματισμένη φιάλη για κάποιο χρονικό διάστημα.

Στο εργαστηριακό επίπεδο, η εκχύλιση από στερεά μίγματα γίνεται συνήθως με την εκχυλιστική συσκευή Soxhlet, η οποία δίνεται στο σχήμα 3.1. Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο υποδοχέα στο επίθεμα της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν επί του χάρτινου ή υάλινου υποδοχέα του στερεού μίγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη μέχρι του ύψους του κεκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός και ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Η τεχνική αυτή με παρατεταμένη λειτουργία είναι κατάλληλη για την παραλαβή ακόμη και ελάχιστα διαλυτών ενώσεων.[30]



*Σχήμα 3.1: Συσκευή εκχύλισης Soxhlet.*

### **3.3 Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας δείγματος**

Τα σημαντικά μειονεκτήματα των κλασικών τεχνικών προκατεργασίας ανάγκασαν τους επιστήμονες να αναζητήσουν νέες μεθόδους και τεχνικές απαλλαγμένες από τα μειονεκτήματα αυτά, οι οποίες θα είναι σε θέση να παρέχουν αξιόπιστα, εκλεκτικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Επίσης, με την κατασκευή αναλυτικών οργάνων, τα οποία προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία, η προκατεργασία των δειγμάτων έχει γίνει ιδιαίτερος απαιτητική, με αποτέλεσμα οι κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος να μην είναι επαρκείς. Από την εξέλιξη της κλασικής τεχνικής εκχύλισης προέκυψε μια σειρά τεχνικών προκατεργασίας με εκχύλιση με τη χρήση στερεού προσροφητικού υλικού, όπως η

εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού, η εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού σε στήλη, η υπερκρίσιμη ρευστή εκχύλιση, η διασπορά στερεάς φάσης υποστρώματος, η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων κ.ά.

### **3.3.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης-Solid Phase Extraction (SPE)**

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος. Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction-SPE), περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις: τη στερεή, που είναι το προσροφητικό υλικό, και την υγρή, το οποίο είναι το υγρό υπόστρωμα που περιέχει τις ενώσεις που πρόκειται να προσδιοριστούν και τυχόν παρεμποδίσσεις. Τα προσδιοριζόμενα συστατικά, θα πρέπει να έχουν συγγένεια προς τη στερεή φάση μεγαλύτερη απ' ό,τι έχουν με το υπόστρωμα του δείγματος, έτσι ώστε να γίνει η συγκράτησή τους στο προσροφητικό. Τα προσδιοριζόμενα συστατικά ακολούθως, με τη βοήθεια διαλύτη με μεγάλη συγγένεια μ' αυτά, θα απομακρυνθούν με έκλυση. Οι διάφοροι μηχανισμοί συγκράτησης και έκλυσης, είναι αποτέλεσμα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα: στα προσδιοριζόμενα συστατικά, στις ενεργές ομάδες στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και στην υγρή φάση του υποστρώματος του δείγματος και στην υγρή φάση του διαλύτη έκλυσης.[29]

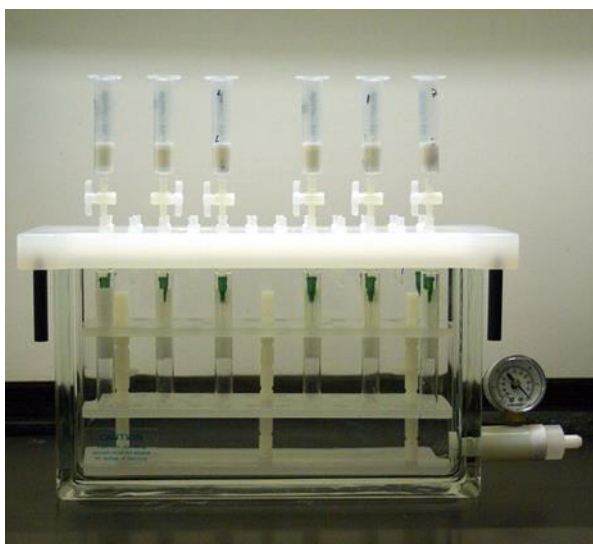
Η εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιείται κυρίως για τις ακόλουθες αναλυτικές διαδικασίες:

- **Προσυγκέντρωση (pre-concentration)** της προσδιοριζόμενης ένωσης από μεγάλους όγκους δειγμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις η ευαισθησία των διάφορων αναλυτικών μεθόδων δεν επαρκεί για μετρήσεις σε πολλά δείγματα, στα οποία η προσδιοριζόμενη ένωση βρίσκεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον η παρουσία διάφορων ενώσεων στο αρχικό δείγμα είναι πολύ πιθανό να παρεμποδίζει την απευθείας μέτρηση (άμεση εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική συσκευή). Στις περιπτώσεις αυτές μεγάλοι όγκοι δειγμάτων (αερίων ή υγρών) υπόκεινται σε εκχύλιση στερεάς φάσης έτσι, ώστε η συνολική ποσότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης να "παγιδευθεί" στο μικρό όγκο της στερεάς φάσης, από την οποία μπορεί να παραληφθεί εύκολα με μικρό όγκο διαλύτη, συγχρόνως απαλλαγμένη από άλλα συστατικά που θα παρεμπόδιζαν τη μέτρηση.
- **Καθαρισμός δείγματος.** Με τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης συχνά επιδιώκεται η δέσμευση ουσιών από τα δείγματα, οι οποίες παρεμποδίζουν μια διαδικασία μέτρησης.
- **Ικανοποιητική απομάκρυνση των παρεμποδίσεων**
- **Προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων** με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία κατά τη χημική ανάλυση.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι κατά πολύ αποτελεσματικότερη τεχνική από αυτήν της υγρής/υγρής εκχύλισης, καθώς με αυτή επιτυγχάνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, είναι ταχύτερη στην εφαρμογή της και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί.

Με την εκχύλιση στερεάς φάσης επιλύονται πολλά προβλήματα της υγρής/υγρής εκχύλισης, όπως π.χ. ο ατελής διαχωρισμός φάσεων, η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ενώσεων, η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες), η χρήση και απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και κατά κανόνα εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και την δέσμευση από αυτά ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά, ημιστερεά ή κρεμώδη δείγματα, τα οποία προηγουμένως θα έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη. Στο σχήμα 3.2 παρουσιάζεται μία συσκευή ταυτόχρονου χειρισμού πολλών μικροστηλών εκχύλισης στερεάς φάσης.



*Σχήμα 3.2: Διάταξη Εκχύλισης Στερεάς Φάσης*

Για την εφαρμογή της SPE, υπάρχουν δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη είναι με συγκράτηση των επιθυμητών συστατικών στο προσροφητικό, έκπλυση για απομάκρυνση παρεμποδίσεων και παραλαβή των συστατικών με έκλουση. Ενώ η δεύτερη, με συγκράτηση των παρεμποδίσεων, και διέλευση των επιθυμητών συστατικών χωρίς να συγκρατηθούν.

Η SPE εφαρμόζεται σύμφωνα με τα ακόλουθα στάδια, τα οποία διακρίνονται πιο παραστατικά στο σχήμα 3.3:

**1. Ενεργοποίηση του προσροφητικού.** Αυτή περιλαμβάνει την επιδιόρθωση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού και την προετοιμασία του να αλληλεπιδράσει με το δείγμα.

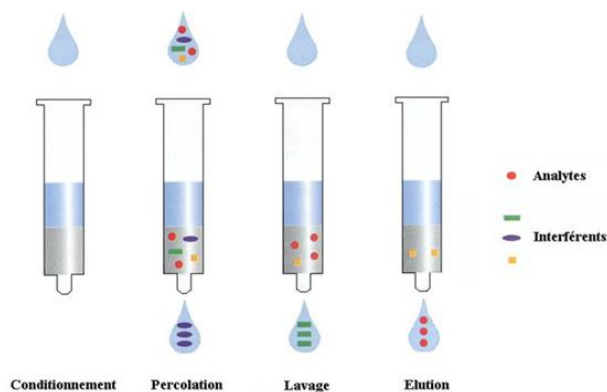
**2. Φόρτωση δείγματος.** Στο στάδιο αυτό, το δείγμα, το οποίο μπορεί να περιέχει και το εσωτερικό πρότυπο, ωθείται μέσα από το προσροφητικό της μικροστήλης. Τα επιθυμητά συστατικά δεσμεύονται στο προσροφητικό. Για να αυξηθεί η δέσμευση το δείγμα αραιώνεται με νερό, ώστε να αυξηθεί η πολικότητα του περιβάλλοντος των συστατικών.

**3. Έκπλυση.** Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται τα ανεπιθύματα συστατικά του υποστρώματος. Ο διαλύτης που επιλέγεται για την έκπλυση πρέπει να είναι ασθενής (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα), ώστε τα επιθυμητά συστατικά να μην εκροφηθούν από το προσροφητικό.

**4. Ξήρανση** του προσροφητικού, εάν πρέπει να απομακρυνθεί το νερό σε περίπτωση που ο διαλύτης έκλυσης είναι μη αναμίξιμος. Η ξήρανση μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή κενού, διαβίβαση ρεύματος αζώτου ή με φυγοκέντρηση. Τα επιθυμητά συστατικά βρίσκονται στη φάση αυτή δεσμευμένα στη μικροστήλη και σε καθαρή κατάσταση.

**5. Έκλυση** για την ποσοτική παραλαβή των επιθυμητών συστατικών, με χρήση του κατάλληλου διαλύτη. Για την έκλυση μιας προσροφημένης ένωσης από μία μικροστήλη SPE αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης τα μόρια του οποίου, ανταγωνίζονται τα μόρια της προσροφημένης ένωσης και λόγω της μεγάλης περίσσειάς τους, τη "διώχνουν" από το υπόστρωμα.

**6. Εξάτμιση του διαλύτη**, σε ήπιο ρεύμα αζώτου και πιθανή επαναδιάλυση του στερεού υπολείμματος στον επιθυμητό διαλύτη όπως π.χ. στην κινητή φάση, με πιθανή προσθήκη του εσωτερικού προτύπου.



*Σχήμα 3.2: Στάδια εφαρμογής εκχύλισης στερεάς φάσης*

Συμπερασματικά, η τεχνική της SPE είναι μια ελκυστική, ταχεία και αποτελεσματική τεχνική που εφαρμόζεται για την εκλεκτική απομόνωση, παραλαβή και προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών, ενώ παράλληλα, αντικαθιστά την εκχύλιση υγρού-υγρού, καθώς περιορίζει πολλά από τα μειονεκτήματά της. Επιπρόσθετα, όλα τα δείγματα μπορούν να υποστούν κατεργασία με την τεχνική της SPE, όπως στερεά, υγρά, ημιστερεά, κρεμώδη κλπ. Είναι μια γρήγορη τεχνική, ασφαλής

και κατάλληλη για συνδυασμό με χρωματογραφικές τεχνικές. Το κυριότερο όμως πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι χρησιμοποιεί μικρότερους όγκους διαλύτη από την εκχύλιση υγρού-υγρού, έχει ικανοποιητική απομάκρυνση των παρεμποδίσεων και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις προσυγκεντρώνονται με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία κατά τη χημική ανάλυση. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, είτε σε σύζευξη με την τεχνική ανάλυσης (on-line), είτε ανεξάρτητα (off-line).

### ***3.3.2 Ανάπτυξη τεχνικών μικροεκχύλισης και σύγχρονων προηγμένων προσροφητικών υλικών.***

Οι τεχνικές μικροεκχύλισης έχουν προταθεί ως εναλλακτική λύση έναντι των κλασικών μεθόδων προκατεργασίας δειγμάτων, από τη στιγμή που η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε και παρουσιάστηκε από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του κατά τη δεκαετία του 1990.[31] Την ίδια χρονική περίοδο, το ενδιαφέρον των αναλυτικών χημικών επικεντρώθηκε στη χρήση μικρών όγκων υγρών διαλυτών για εκχυλίσεις, οδηγώντας στην ανάπτυξη της μικροεκχύλισης υγρής φάσης (LPME). Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή εισήχθη το 1996 με τη χρήση οργανικών σταγονιδίων αιωρούμενων από την άκρη μίας μικροσύρριγγας.[32] Η αντικατάσταση των κλασικών διαδικασιών εκχύλισης με τεχνικές μικροεκχύλισης είναι μια νέα ιδέα, κατά την οποία μειώνεται σημαντικά η ποσότητα του δείγματος και των αντιδραστηρίων, ενώ ταυτόχρονα, η βιωσιμότητα και η ταχύτητα των μεθόδων βελτιώνονται. Οι τεχνικές μικροεκχύλισης έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των κλασικών τεχνικών (LLE ή SPE), συμπεριλαμβανομένης της χρήσης μικρότερης ποσότητας διαλυτών, της ελαχιστοποίησης του αριθμού και του μεγέθους του δείγματος, της μείωσης των σταδίων προκατεργασίας του δείγματος, της μείωσης της κατανάλωσης επικίνδυνων αντιδραστηρίων και ενέργειας, της μεγιστοποίησης της ασφάλειας για τους χειριστές και το περιβάλλον και της παραγωγής μικρότερης ποσότητας αποβλήτων.[33] Επιπλέον, χαρακτηριστικά των πράσινων τεχνικών εκχύλισης είναι η σμίκρυνση των διατάξεων, αλλά και η αυτοματοποίηση.

Μέσα σε δύο δεκαετίες από τη σύλληψη της SPME, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές μικροεκχύλισης, όπως:

- Η εκχύλιση με μαγνητικό αναδευτήρα (stir-bar sorptive extraction, SBSE).[34]
- Η εκχύλιση στερεάς φάσης σε μικροκλίμακα (micro-solid phase extraction,  $\mu$ -SPE).[35]
- Η μικροεκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (Dispersive micro-solid-phase extraction, DMSPE). [36]
- Η μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (Magnetic solid-phase extraction, MSPE).[37]

- Η μικροεκχύλιση με χρήση συσκευασμένου προσροφητικού (Microextraction by packed sorbent, MEPS).[38]
- Η μοριακώς αποτυπωμένη εκχύλιση στερεάς φάσης (Molecularly imprinted solid-phase extraction, MISPE).[39]
- Η μοριακώς αποτυπωμένη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Molecularly imprinted solid-phase micro-extraction, MI-SPME).[39]
- Η εκχύλισης περιστρεφόμενης στήλης (Spin Column Extraction, SCE).[40]
- Καθώς και η τεχνική της εκχύλισης με χρήση υφασμάτινου προσροφητικού (fabric phase sorptive extraction, FPSE) η οποία εξετάζεται στην παρούσα εργασία.[41]

Όλες αυτές οι τεχνικές ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία και βασίζονται στη μικροεκχύλιση με χρήση ροφητικών υλικών (sorbent-based sorptive microextraction). Η ισορροπία κατανομής της προσδιοριζόμενης ένωσης ανάμεσα στο προσροφητικό υλικό και στο δείγμα είναι και η αρχή λειτουργίας των τεχνικών που προαναφέρθηκαν. Κατά την απομάκρυνση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από το υπόστρωμα του δείγματος, λαμβάνει χώρα ρόφηση και προσρόφηση, το καθένα από τα φαινόμενα, να πραγματοποιείται με αντίστοιχα υλικά.

Έτσι, τα φαινόμενα της ρόφησης, καθώς και της προσρόφησης παίζουν ρόλο στην εκχύλιση και στη προσυγκέντρωση των ενώσεων που ενδιαφέρουν σε μια αναλυτική πορεία. Αυτού του είδους τα συστήματα εκχύλισης με ροφητικά υλικά, έχουν μειώσει σημαντικά τη χρήση τοξικών και επικίνδυνων οργανικών διαλυτών κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας δείγματος και κατ'επέκταση θεωρείται ότι έχουν χαρακτηριστικά «πράσινων» τεχνικών. Πέρα από τη σημαντική μείωση των οργανικών διαλυτών, τα συστήματα μικροεκχύλισης με ροφητικά υλικά, συμπεριλαμβάνουν τη δειγματοληψία, την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση της ένωσης-στόχου σε ένα βήμα. Το αποτέλεσμα είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική προκατεργασίας του δείγματος.

### **3.3.3 Αρχές λειτουργίας τεχνικών μικροεκχύλισης**

Όλες οι τεχνικές μικροεκχύλισης, οι οποίες βασίζονται σε ροφητικά υλικά, ανεξαρτήτως είδους, ακολουθούν την αρχή της εκχύλισης με επίτευξη ισορροπίας (equilibrium extraction). Τα ροφητικά υλικά, τα οποία πραγματοποιούν την εκχύλιση ακινητοποιούνται είτε σε μια εξωτερική επιφάνεια ενός υλικού (fiber-SPME, SBSE, FPSE), ή στο εσωτερικό μιας τριχοειδούς ίνας πυριτίου (fused silica capillary, in tube-SPME ή CME) ή στο εσωτερικό μιας κούλης ίνας (hollow fiber, HF-SPME). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, η συσκευή μικροεκχύλισης μπορεί να εκτεθεί κατευθείαν μέσα στο δείγμα που περιέχει τις ενώσεις που πρόκειται να προσδιοριστούν (direct immersion mode) ή μπορεί να εκτεθεί στον κενό χώρο που δημιουργείται, όταν το δείγμα βρίσκεται σε ένα ερμητικά κλειστό

δοχείο (headspace mode). Κατά την εκχύλιση, η επίστρωση πολυμερούς που βρίσκεται πάνω στο υλικό, εκτίθεται άμεσα ή έμμεσα στο υπόστρωμα του δείγματος, το οποίο περιέχει τις ενώσεις που θα προσδιοριστούν. Το υλικό αφήνεται για ένα χρονικό διάστημα μέχρι να επέλθει η ισορροπία ανάμεσα στο ροφητικό και το υπόστρωμα του δείγματος. Όταν επέλθει η ισορροπία εκχύλισης, οποιαδήποτε περαιτέρω έκθεση του ροφητικού υλικού στο δείγμα δε θα συσσωρεύσει μεγαλύτερη ποσότητα των ενώσεων που ενδιαφέρουν.

Ο χρόνος, στον οποίο επέρχεται η ισορροπία αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η φύση της επικάλυψης του υλικού, ο τύπος της ένωσης που πρόκειται να προσδιοριστεί, η πυκνότητα και η θερμοκρασία του υποστρώματος του δείγματος, το πάχος του ροφητικού υλικού. Ο χρόνος ισορροπίας, μπορεί να μειωθεί με ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα ή με διοχέτευση του υγρού δείγματος μέσα στον τριχοειδή, δηλαδή με αύξηση της διάχυσης του δείγματος, πράγμα το οποίο προκύπτει από την κινητική εξίσωση της ισορροπίας. Μετά το τέλος της εκχύλισης, η συσκευή μικροεκχύλισης αφαιρείται από το υπόστρωμα του δείγματος, και οι ενώσεις που εκχυλίστηκαν, εκροφώνται από το ροφητικό υλικό για να γίνει η εισαγωγή του σε κάποιο αναλυτικό όργανο.

Συνήθως, ακολουθεί ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC), υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis, CE) ή ένα σύστημα χρωματογραφίας υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical fluid chromatography, SFC).

Οι ενώσεις που προσδιορίζονται μπορούν επίσης να εκροφηθούν θερμικά με την εισαγωγή της συσκευής μικροεκχύλισης σε θερμαινόμενο υποδοχέα δείγματος σε ένα όργανο GC.

Εισαγωγή του δείγματος σε υγρή μορφή μπορεί να πραγματοποιηθεί με έκπλυση της επικαλυμμένης συσκευής μικροεκχύλισης με κατάλληλο διαλύτη και ακολούθως εισαγωγή του δείγματος στο ανάλογο αναλυτικό όργανο.

Φαίνεται, οι τεχνικές μικροεκχύλισης που βασίζονται σε ροφητικά υλικά να διέπονται από δύο αρχές-κριτήρια: (1) θερμοδυναμικές και (2) κινητικές. Οι ιδιότητες της θερμοδυναμικής καθορίζουν την ποσότητα των ενώσεων, οι οποίες μπορούν να εκχυλιστούν από μια συγκεκριμένη μάζα ροφητικού υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Εφόσον μεγαλύτερη ποσότητα ροφητικού επιτρέπει την εκχύλιση των ενώσεων σε μεγαλύτερο βαθμό, όταν παρέχεται επαρκής χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας, τότε προκύπτει ότι η ποσότητα του ροφητικού είναι ευθέως ανάλογη με την ικανότητα εκχύλισης. Απεναντίας, η κινητική ελέγχει το ρυθμό, με τον οποίο πραγματοποιείται η εκχύλιση και κατ' επέκταση το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η ισορροπία.[42]



### **3.3.4 Περιορισμοί των εμπορικά διαθέσιμων τεχνικών μικροεκχύλισης.**

Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι τεχνικές μικροεκχύλισης με ροφητικά υλικά ως προς τις συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος, χαρακτηρίζονται και από μερικά μειονεκτήματα. Αυτοί οι περιορισμοί προκύπτουν από (1) τη φυσική διάταξη της συσκευής μικροεκχύλισης και (2) τη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της πολυμερικής επίστρωσης για την ακινητοποίηση του οργανικού ροφητικού υλικού. Οι ελλείψεις προκύπτουν από τη φυσική διάταξη της συσκευής περιλαμβάνουν:

- Την εύθραυστη φύση της ίνας SPME.
- Τον κίνδυνο κάμψης της βελόνας της σύριγγας της ίνας SPME κατά τη διάρκεια της χρήσης.
- Τη χαμηλή ποσότητα ροφητικού υλικού στις ίνες SPME που έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ικανότητα εκχύλισης.
- Την καταστροφή της επικάλυψης των μαγνητικών αναδευτήρων στην τεχνική της SBSE, όταν αυτοί χρησιμοποιούνται σε ανάδευση με μεγάλες ταχύτητες.

Η φυσική απόθεση του οργανικού πολυμερούς με διασταυρούμενη σύνδεση με ελεύθερες ρίζες, είναι η τεχνική που επιλέγεται πιο συχνά για δημιουργία επίστρωσης, στις διαθέσιμες στο εμπόριο τεχνικές μικροεκχύλισης με ροφητικά υλικά. Αυτή η διαδικασία δημιουργίας επίστρωσης, συνοδεύεται με κάποια μειονεκτήματα όπως:

- ☞ Το οργανικό πολυμερές που χρησιμοποιείται ως το ροφητικό υλικό, είναι η μοναδική πηγή που ορίζει την εκλεκτικότητα του συστήματος μικροεκχύλισης
- ☞ Παρουσιάζει μικρό εύρος ως προς τη θερμοκρασιακή ανοχή, μικρή αντοχή ως προς τους διαλύτες, περιορισμένη σταθερότητα ως προς το pH, εξαιτίας της φυσικής απόθεσης του πολυμερούς πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος της συσκευής.
- ☞ Αστάθεια και διαστολή της πολυμερικής επίστρωσης, όταν αυτή βρίσκεται σε οργανικούς διαλύτες.
- ☞ Έντονη διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών ανάμεσα σε παρτίδες προϊόντος.
- ☞ Ιξώδη και κολλώδη οργανικά πολυμερή δεν επιτρέπουν τη διάχυση της προσδιοριζόμενης ένωσης, κάτι που οδηγεί σε μεγάλους χρόνους επίτευξης ισορροπίας.
- ☞ Απουσία χημικού δεσμού ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ροφητικό υλικό δηλώνει ταυτόχρονα μικρό χρόνο ζωής της επικάλυψης.
- ☞ Μικρή ποσότητα ροφητικού υλικού στις ίνες SPME, το οποίο περιορίζει την ευαισθησία της συσκευής. Αυτό ήταν που οδήγησε στη δημιουργία της τεχνικής SBSE, όπου υπήρχε μεγαλύτερη ποσότητα ροφητικού υλικού. Ωστόσο, ο μικρός ρυθμός διάχυσης των ενώσεων-στόχων ανάμεσα στη συμπαγή επίστρωση οργανικού ροφητικού δεν προσφέρει κέρδος στην

εκχυλιστική ικανότητα, εκτός αν αφηθεί παρατεταμένα για να επιτευχθεί η εκχυλιστική ισορροπία.

Η εκτεταμένη αξιολόγηση των μειονεκτημάτων που παρουσίαζαν τα συστήματα μικροεκχύλισης, αποκάλυψαν ότι η βιώσιμη ανάπτυξη των τεχνικών μικροεκχύλισης εξαρτάται κυρίως από την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών επίστρωσης. Αυτές θα προσέφεραν πιο γρήγορη κινητική εκχύλισης, μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία, μεγαλύτερη θερμική αντοχή και σταθερότητα ως προς τη χρήση διαλυτών και άλλων χημικών. Στα περισσότερα από αυτά τα προβλήματα απευθύνθηκε η εισαγωγή μιας νέας τεχνολογίας δημιουργίας επιστρώσεων, αυτής της sol-gel, η οποία αναπτύχθηκε από τον Malik και τους συνεργάτες του.[43]

### **3.4 Τεχνολογία sol-gel**

Η διαδικασία δημιουργίας επίστρωσης σε επιφάνειες με την τεχνολογία sol-gel, παρέχει έναν εύκολο, βολικό και οικονομικό τρόπο στη δημιουργία υβριδικών οργανικών-ανόργανων υλικών. Τα υλικά που λαμβάνονται, μπορούν να είναι σε διαφορετικό βαθμό εκλεκτικά, να ρυθμιστεί το πορώδες τους και παράλληλα να έχουν υψηλή θερμική και χημική αντοχή, αλλά και σταθερότητα σε ποικιλία διαλυτών. Εξαιτίας αυτής της απλότητας στη δημιουργία ποικίλων υλικών, έχει δημιουργηθεί ένας μεγάλος αριθμός ροφητικών υλικών μικροεκχύλισης. Η τεχνολογία sol – gel περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

**1.** Προκατεργασία του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί ως το υπόστρωμα για αύξηση των διαθέσιμων υδροξυλομάδων (-OH). Ο σκοπός αυτού του σταδίου είναι ο καθαρισμός της επιφάνειας του υποστρώματος, καθώς και η αύξηση της διαθεσιμότητας των ενεργών ομάδων. Το διάλυμα του sol θα αλληλεπιδράσει με αυτές τις ενεργές ομάδες και θα τις εισάγει μέσα στο τρισδιάστατο και ολοένα αναπτυσσόμενο δίκτυο του sol-gel, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα ροφητικό υλικό, το οποίο θα είναι καλά δεσμευμένο στην επιφάνεια του υποστρώματος. Ανάλογα με το υλικό του υποστρώματος, ενδέχεται να χρειάζεται κάποια άλλου είδους προκατεργασία, έτσι ώστε να εισαχθούν ομάδες, οι οποίες θα λειτουργήσουν συνδετικά δημιουργώντας γέφυρες ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο δίκτυο του sol-gel.

**2.** Σχεδιασμός και προετοιμασία του sol διαλύματος. Το πιο βασικό και απαιτητικό στάδιο στην τεχνολογία επίστρωσης με sol-gel, είναι η διαδικασία παραγωγής του sol διαλύματος. Αυτό περιλαμβάνει κατάλληλη επιλογή του εκκινητή (precursor), του προσαρμοζόμενου μορίου (ligand), του αντιδραστηρίου απενεργοποίησης (deactivating reagent), του διαλύτη, του καταλύτη και των πορογονικών αντιδραστηρίων (porogenic reagents). Από αυτά και τον κατάλληλο σχεδιασμό του sol διαλύματος εξαρτάται και η καλύτερη επίδοση των ροφητικών υλικών. Παράγοντες, όπως η

εκλεκτικότητα, το πορώδες, το πάχος της επίστρωσης, η αντοχή σε θερμική επεξεργασία και σε μεγάλο αριθμό διαλυτών παίζουν επίσης, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του διαλύματος.

**3.** Σχηματισμός της επίστρωσης sol-gel πάνω στο υπόστρωμα. Μετά την παραγωγή του sol διαλύματος, ακολουθεί η διαδικασία της δημιουργίας της επίστρωσης. Τα συστατικά του διαλύματος sol αναμιγνύονται, έτσι ώστε να είναι ομογενές. Πολλές φορές η ανάδευση γίνεται είτε με συσκευή vortex, είτε με υπέρηχους. Το ομογενές sol διάλυμα έπειτα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό τότε χρησιμοποιείται, για τη δημιουργία της επίστρωσης sol-gel πάνω στην επιθυμητή επιφάνεια.

**4.** Ενεργοποίηση του ροφητικού (conditioning). Ο σκοπός αυτού του σταδίου είναι να ολοκληρωθεί η αντίδραση σταθεροποίησης, η απομάκρυνση των διαλυτών, καθώς και οποιονδήποτε υπολειμμάτων ενώσεων που δεν αντέδρασαν. Το στάδιο της ενεργοποίησης, εξασφαλίζει μια καθαρή επιφάνεια, η οποία είναι καλά σχηματισμένη, χωρίς δομικές παραμορφώσεις. Είναι σύνηθες, το πλέγμα sol-gel να θερμαίνεται πολύ αργά υπό συνεχόμενη ροή αδρανούς αερίου. Η μέγιστη θερμοκρασία επεξεργασίας επιλέγεται ανάλογα με την τελική χρήση του ροφητικού υλικού. Για εκρόφηση ενώσεων με διαλύτες, δεν απαιτείται τελική επεξεργασία με υψηλή θερμοκρασία. Αντιθέτως, για θερμική εκρόφηση ενώσεων, η επίστρωση πρέπει να εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες, κατά το τελευταίο στάδιο διαμόρφωσης. [42-43]

## **4. FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION (FPSE)**

### **4.1 Τεχνική προκατεργασίας FPSE**

Η τεχνολογία sol-gel, η οποία, όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.3.4., αναπτύχθηκε από τον Malik και τους συνεργάτες του, έπαιξε σημαντικό ρόλο στη δημιουργία πολυάριθμων υλικών. Μεταξύ αυτών είναι και η επικάλυψη εύκαμπτων επιφανειών (π.χ. υφασμάτων κελουλόζης ή πολυεστέρα) με διάφορα είδη πολυμερών με την τεχνική sol-gel. Η πλειοψηφία των μειονεκτημάτων που παρουσιάζονται κατά τις κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος, μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση της τεχνικής Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE). Η τεχνική αυτή βασίζεται στις αρχές και τα φυσικοχημικά φαινόμενα της φυσικής και χημικής προσρόφησης και αναπτύχθηκε από τον Kabir και το Furton το 2014 [41], ενώ μπορεί να χαρακτηριστεί ως καινοτόμα και αποδοτική.

Η FPSE εκπληρώνει την έντονη ανάγκη για μια «πράσινη», σύγχρονη, καινοτόμα, ροφητική τεχνική μικροεκχύλισης που ξεπερνά όλες τις αδυναμίες των κλασικών, συμπεριλαμβάνοντας πρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως είναι ο οικολογικός χαρακτήρας, η οικονομική λειτουργία, η απλότητα και η αποφυγή χρονοβόρων και επισφαλών σταδίων, όπως είναι η εξάτμιση του διαλύτη που ακολουθείται από επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος. Η ολιστική προσέγγιση και οι αρχές της FPSE έχουν αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Παρόλο που πρόκειται για μια νέα τεχνική, έχει ήδη εφαρμοστεί με αξιοσημείωτα αποτελέσματα σε διάφορα δείγματα, όπως περιβαλλοντικά, φαρμακευτικά, δείγματα τροφίμων και βιολογικά όπως παρατηρείται από διάφορες βιβλιογραφικές πηγές.[44-45]

Με αυτή την τεχνική, δεν απαιτείται κάποια τεχνική τροποποίηση του υποστρώματος του δείγματος, όπως η καταβύθιση πρωτεϊνών, αλλά ούτε και κάποιο στάδιο καθαρισμού (clean-up). Η τεχνική FPSE, συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της κλασικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (solid-phase microextraction, SPME) που πραγματοποιείται με την επίτευξη ισορροπίας, και της εκχύλισης στερεάς φάσης, η οποία πραγματοποιείται με πλήρη εκχύλιση. Το ροφητικό υλικό στην FPSE, είναι δεσμευμένο με ομοιοπολικούς δεσμούς στην επιφάνεια του υποστρώματος και έτσι, έχει μεγάλη χημική, θερμική σταθερότητα, καθώς και αντοχή σε ποικιλία διαλυτών. Η ανοιχτή γεωμετρία του FPSE διευκολύνει τη ρόφηση και την εκρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Σε αντίθεση με άλλα μέσα μικροεκχύλισης, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην FPSE δεν είναι αδρανές, αντιθέτως, συμβάλλει στη γενικότερη πολικότητα του FPSE.

Κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας του δείγματος, το υλικό της FPSE μπορεί να εισαχθεί κατευθείαν στο δοχείο που περιέχει το αρχικό δείγμα, όπου θα πραγματοποιηθεί η ρόφηση των ενώσεων που ενδιαφέρουν. Ακολούθως, θα βυθιστεί σε ένα δοχείο με το διαλύτη έκλυσης για ένα

χρονικό διάστημα. Αυτό στη συνέχεια θα εισαχθεί σε οποιοδήποτε αναλυτικό όργανο, όπως αέριο χρωματογράφο, υγρό χρωματογράφο, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ή οποιοδήποτε άλλο συμβατό αναλυτικό όργανο. Έτσι, με την τεχνική της FPSE εξασφαλίζεται η γρήγορη και χωρίς παρεμποδίσσεις ρόφηση των προσδιοριζόμενων ουσιών, χωρίς την ανάγκη εξάτμισης του διαλύτη, η ελαχιστοποίηση των βημάτων προκατεργασίας δείγματος, καθώς και η ρόφηση των αρχικών ενώσεων από το δείγμα. Αυτά τα πλεονεκτήματα οδηγούν στην εξάλειψη σφαλμάτων που εμφανίζονται κατά την προκατεργασία του δείγματος. Επίσης εξασφαλίζει ταχύτητα, καθαρότητα, υψηλή προσυγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας στόχου, χωρίς την ξήρανση του διαλύτη και την επαναδιαλύτωση της διαδικασίας, έτοιμο απευθείας για ανάλυση. Τέλος ελαχιστοποιεί τα βήματα της προκατεργασίας, μειώνοντας έτσι τις πιθανές πηγές σφαλμάτων.

Η FPSE εκμεταλλεύεται τα αξιοσημείωτα οφέλη από τη χρήση και τις ιδιότητες της συσκευής εξαγωγής FPSE, ή αλλιώς της μεμβράνης FPSE. Αυτή προέκυψε από το συνδυασμό διαφόρων φυσικών ή συνθετικών υφασμάτων ως το υφασμάτινο υπόστρωμα, χημικώς επικαλυμμένων με τη μορφή εξαιρετικά λεπτής επίστρωσης υβριδικού οργανικού-ανόργανου προσροφητικού που παράγεται με την τεχνική sol-gel κολλοειδούς πηκτής. Οι τελικές μεμβράνες FPSE χαρακτηρίζονται από ευκαμψία, διαπερατότητα και εντυπωσιακά επαυξημένη επιφάνεια πρωτογενούς επαφής. Αυτά τα χαρακτηριστικά οδηγούν και εξασφαλίζουν τη γρήγορη και άμεση εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα υποστρώματα υφάσματος μπορούν να είναι είτε υδρόφιλα, είτε υδρόφοβα, χρησιμοποιώντας κελουλόζη (κυτταρίνη) ή πολυεστέρα αντίστοιχα.

Επιπροσθέτως, μπορεί επίσης να παραχθεί ένα μικτό υπόστρωμα με κατάλληλο συνδυασμό κυτταρίνης ή πολυεστέρα σε επιθυμητή αναλογία, ανάλογα με την πολικότητα της μεμβράνης FPSE. Γενικά, η φύση του υποστρώματος επηρεάζει σημαντικά την επιλεκτικότητα και την πολικότητα της μεμβράνης FPSE. Επιπλέον, άλλα χρήσιμα χαρακτηριστικά, όπως η χημική, η θερμική και η σταθερότητα διαλύτη εξασφαλίζονται από τον ισχυρό ομοιοπολικό χημικό δεσμό μεταξύ του διαπερατού υφάσματος και του πορώδους προσροφητικού διαλύματος sol-gel που επιτρέπει τη χρήση οποιουδήποτε μίγματος διαλυτών έκλουσης ή χημικού περιβάλλοντος (pH), ενώ συγχρόνως η μεμβράνη FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για αρκετές φορές. Βεβαίως, όλα αυτά είναι εφικτά χωρίς στατιστικά σημαντική μείωση της ικανότητας προσρόφησης.

Η τεράστια ικανότητα συγκράτησης και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης βασίζονται τόσο στο εγγενές πορώδες του υποστρώματος υφάσματος, κυρίως στην κυτταρίνη και στον πολυεστέρα, όσο και στις προηγμένες ιδιότητες του υλικού του κολλοειδούς πηγματος και του πορώδους δικτύου που δημιουργεί. Αυτή η ανοιχτή δομική στερεοχημεία επιτρέπει την απομίμηση της διαδικασίας SPME. Έτσι, η μεμβράνη FPSE μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε άμεση επαφή με το δείγμα, το οποίο εμπεριέχει τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Σε αυτήν την περίπτωση, δημιουργείται μια ισορροπία

μεταφοράς μάζας μεταξύ του προροφητικού και του δείγματος, καθιστώντας την FPSE κατάλληλη για εκχύλιση ισορροπίας, η οποία συμβαίνει και χρησιμοποιείται από την παρούσα εργασία. Λόγω αυτής της πορώδους αρχιτεκτονικής, επιτρέπεται η ταχεία ρόφηση και η εκρόφηση των αναλυτών.[44-45]

#### **4.2 Διαδικασία της FPSE**

Λαμβάνοντας μία πιο προσεκτική εικόνα της διαδικασίας FPSE κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ισορροπίας, το κύριο βήμα ξεκινά με την εμφύσηση της μεμβράνης απευθείας στο διάλυμα του δείγματος που περιέχει τις ενώσεις στόχους. Είναι γνωστό από την κινητική θεωρία της εκχύλισης ισορροπίας ότι η αύξηση της διάχυσης των αναλυτών προάγει την ταχύτερη εκχύλιση. Επομένως, με τη χρήση εξωτερικών διατάξεων, όπως μαγνητική ανάδευση, εφαρμογή υπερήχων και ανακίνηση τροχιάς, μπορεί να δημιουργηθεί μια σταθερή ροή του δείγματος, μέσω της διαπερατής συσκευής μικροεκχύλισης. Υπό αυτές τις συνθήκες λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαμοριακών δεσμών, όπως οι δυνάμεις London, οι δεσμοί υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, οι αλληλεπιδράσεις π-π τροχιακών κλπ. Συνεπώς επιτυγχάνεται η υψηλότερη ευαισθησία και αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της εκχύλισης. Όταν η ισορροπία φθάσει στο σημείο, όπου οι ανακτήσεις των εκχυλιζόμενων ενώσεων είναι βέλτιστες, η μεμβράνη FPSE απομακρύνεται από το δείγμα και αφήνεται να στεγνώσει.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη εμφύεται σε μικρό όγκο διαλύτη έκλουσης αποτελούμενο κυρίως από ένα μίγμα οργανικών διαλυτών, στο οποίο λαμβάνει χώρα η έκλυση ή αλλιώς η αντίστροφη εκχύλιση. Το έκλουσμα περιέχει τις ενώσεις στόχους σε μικρό όγκο με υψηλό παράγοντα προσυγκέντρωσης, εξαλείφοντας ταυτόχρονα την ανάγκη για εξάτμιση του διαλύτη και ανασύσταση του δείγματος. Στη συνέχεια, αν αποδειχθεί απαραίτητο, φυγοκεντρείται το έκλουσμα ή εναλλακτικά διηθείται για να εγχυθεί στο αναλυτικό όργανο. Πριν από το κύριο στάδιο, τυπικά, κάθε διαδικασία FPSE ξεκινά με την εμφύσηση της μεμβράνης για 5 min σε ένα μίγμα διαλυτών, αποτελούμενο συνήθως από MeOH:ACN, σε αναλογία 50:50 v/v, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα ανεπιθύμητα υπολείμματα. Έπειτα ακολουθεί πλύση με απιονισμένο νερό ή βύθιση σε φιαλίδιο με απιονισμένο νερό για ακόμη 5 min για την απομάκρυνση όλων των υπολειμματικών οργανικών διαλυτών. Τέλος, το μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές χωρίς μείωση της αποτελεσματικότητας προσρόφησης και εκχύλισης εάν πλυθεί με το κατάλληλο σύστημα οργανικού διαλύτη (συνήθως από MeOH:ACN, σε αναλογία 50:50 v/v). Κατόπιν, αφήνεται να στεγνώσει και αποθηκεύεται σε γυάλινο αεροστεγές φιαλίδιο. [44-45]

Ανακεφαλαιώνοντας όλα τα παραπάνω, το πρωτόκολλο της τεχνικής FPSE περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Το πρωτόκολλο της τεχνικής FPSE περιλαμβάνει τα εξής στάδια, τα οποία απεικονίζονται και στο σχήμα 4.1:

#### **Καθαρισμός του μέσου FPSE**

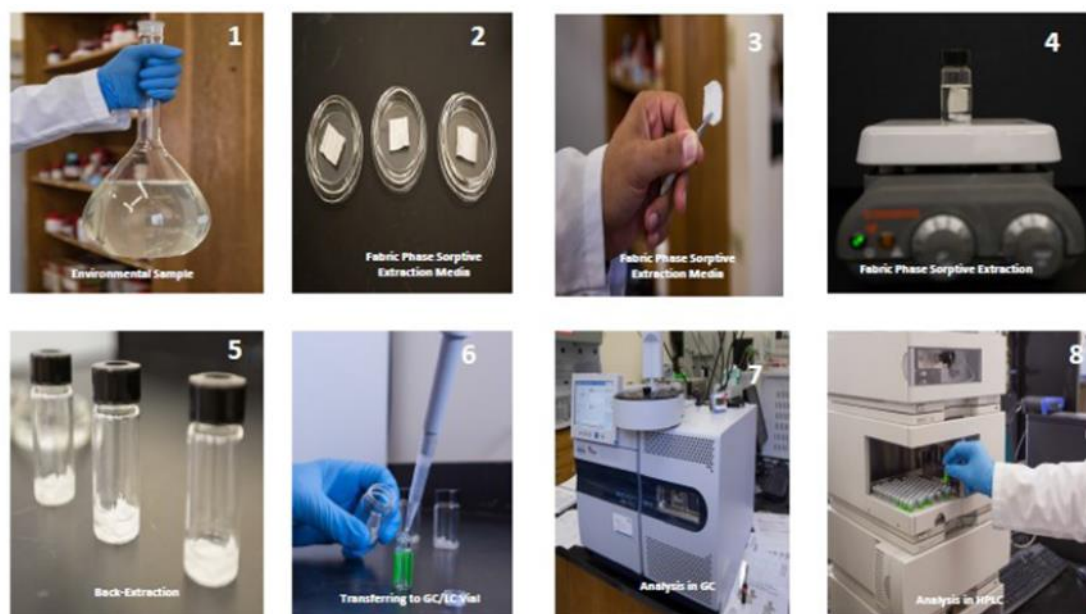
- Πριν την εκχύλιση, εμβαπτίζεται το μέσο FPSE σε 2 mL μίγματος MeOH:ACN (50:50 v/v) για 5 min (δε χρειάζεται ανακίνηση/vortex/ανάδευση). Για το χειρισμό της μεμβράνης χρησιμοποιείται ειδική λαβίδα.
- Η μεμβράνη FPSE εμβαπτίζεται σε 2 mL απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση υπολειμμάτων οργανικών διαλυτών.

#### **Εκχύλιση (10-40 min)**

- Μεταφέρεται ένα αντιπροσωπευτικό κλάσμα του δείγματος σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Τοποθετείται στο φιαλίδιο μια καθαρή μαγνητική ράβδος επικαλυμμένη με Teflon.
- Εισάγεται ένα καθαρό μέσο FPSE.
- Ρυθμίζεται ο μαγνητικός αναδευτήρας στο κατάλληλο επίπεδο που προκύπτει μετά από τη διαδικασία βελτιστοποίησης, ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη διάχυση.
- Εκχυλίζεται το δείγμα για 10-40 min, σε χρόνο που καθορίζεται μετά από τη διαδικασία βελτιστοποίησης που πρέπει να εφαρμόζεται κάθε φορά για τις διάφορες προσδιοριζόμενες ουσίες και υποστρώματα.

#### **Έκλυση (5-10 min).**

- Σε όμοιο γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται 500  $\mu$ L διαλύτη έκλυσης
- Το μέσο FPSE εμβαπτίζεται σε αυτό.
- Αφήνεται για 5-10 min για την πλήρη έκλυση (δε χρειάζεται στροβιλισμός, φυγοκέντρηση ή υπέρηχοι)
- Με τη χρήση πιπέτας, μεταφέρεται το έκλυσμα σε φιαλίδιο Eppendorf για τη χρωματογραφική ανάλυση.



*Σχήμα 4.1: Απεικόνιση σταδίων FPSE*

### **4.3 Θεωρητικές αρχές FPSE**

Η αρχή της FPSE, παρομοίως με την SPME και τις συναφείς τεχνικές ροφητικής μικροεκχύλισης που ακολουθούν τις αρχές της εκχύλισης ισορροπίας, βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών και του προσροφητικού εκχυλίσματος. Υπό συνθήκες εκχύλισης ισορροπίας, η ποσότητα της εκχυλιζόμενης ένωσης ( $n$ ) από το μέσο FPSE είναι ανάλογη του συντελεστή κατανομής ( $K_{es}$ ) μεταξύ της φάσης εκχύλισης και του υποστρώματος του δείγματος, του όγκου της φάσης εκχύλισης ( $V_e$ ), του όγκου του δείγματος ( $V_s$ ) και την αρχική συγκέντρωση των ενώσεων ( $C_0$ ), όπως εκφράζεται στην εξίσωση (4.1):

$$n = \frac{K_{es} V_e V_s C_0}{K_{es} V_e + V_s} \quad (4.1)$$

Όταν ο όγκος του δείγματος είναι σημαντικά πολύ μεγάλος σε σύγκριση με τον όγκο του προσροφητικού υλικού εκχύλισης, δηλαδή  $K_{es} V_e \ll V_s$ , η εξίσωση (4.1) μπορεί να απλοποιηθεί ως εξής:

$$n = K_{es} V_e C_0 \quad (4.2)$$

Όπως υποδηλώνει η απλοποιημένη εξίσωση (4.2), η ποσότητα της εκχυλισμένης ένωσης ή των εκχυλισμένων ενώσεων είναι ανάλογη με τον όγκο του προσροφητικού εκχύλισης και συνεπώς μπορεί να αυξηθεί με την αύξηση του όγκου αυτού, εάν η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων



ουσιών διατηρηθεί σταθερή. Ωστόσο, σύμφωνα με την κινητική θεωρία της εκχύλισης, η αύξηση του όγκου του προσροφητικού υλικού εκχύλισης, αυξάνοντας το πάχος της επίστρωσης του προφητικού μπορεί να οδηγήσει σε χρόνο ισορροπίας πιο μεγάλο, όπως εκφράζεται στην εξίσωση (4.3). Όταν το προσροφητικό υλικό εκχύλισης επικαλύπτει ως λεπτό φιλμ το υπόστρωμα, η διάχυση των προσδιοριζόμενων ουσιών μέσω του οριακού στρώματος, ελέγχει την κινητική της εκχύλισης (ρυθμός εκχύλισης). Ως εκ τούτου, ο απαιτούμενος χρόνος για την εκχύλιση του 95% της ποσότητας εκχύλισης ισορροπίας των προσδιοριζόμενων ουσιών, μπορεί να υπολογιστεί ως:

$$t_{e,95\%} = \frac{B\delta bK_{es}}{D_s} \quad (4.3)$$

όπου το  $b$  είναι το πάχος του προσροφητικού, το  $d$  είναι το πάχος της οριακής στιβάδας, το  $K_{es}$  είναι η σταθερά κατανομής της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταξύ του προσροφητικού της εκχύλισης και του υποστρώματος του δείγματος, το  $D_s$  είναι ο συντελεστής διάχυσης του αναλύτη στο υπόστρωμα/διάλυμα του δείγματος και το  $B$  είναι ένας γεωμετρικός παράγοντας αναφερόμενος στη γεωμετρία της επιφάνειας, την οποία επικαλύπτει το προσροφητικό sol-gel υλικό. Όπως προκύπτει από την εξίσωση (4.3), ο χρόνος εκχύλισης ισορροπίας μπορεί να μειωθεί, περιορίζοντας το πάχος επικάλυψης ( $b$ ), αυξάνοντας την επιφάνεια πρωταρχικής επαφής του μέσου εκχύλισης (μικρότερη τιμή  $B$ ) ή αυξάνοντας τη διάχυση του αναλύτη στο διάλυμα του δείγματος με την εφαρμογή εξωτερικών διατάξεων, όπως μαγνητική ανάδευση, κατεργασία με υπερήχους κλπ.

Ο ρυθμός εκχύλισης δεν είναι γραμμικός. Ο ρυθμός είναι πολύ γρήγορος στην αρχή της διαδικασίας εκχύλισης και επιβραδύνεται, καθώς η εκχύλιση εξελίσσεται προς ισορροπία. Ο αρχικός ρυθμός ( $dn/dt$ ) της εκχύλισης είναι ανάλογος προς την επιφάνεια της φάσης εκχύλισης  $A$ , όπως φαίνεται στην εξίσωση (4.4):

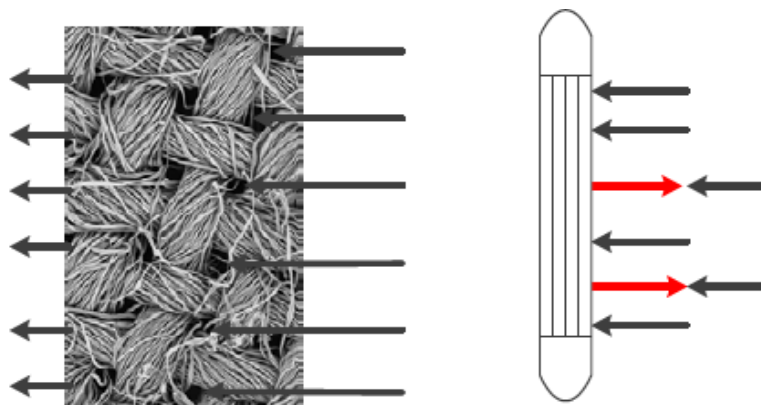
$$dn/dt = (D_s A / \delta) C_0 \quad (4.4)$$

Επομένως, είναι προφανές ότι για να αυξηθεί η ευαισθησία του συστήματος μικροεκχύλισης, πρέπει να αυξηθεί η ποσότητα φόρτωσης του προσροφητικού. Από την άλλη πλευρά, για να μειωθεί ο χρόνος εξισορρόπησης της εκχύλισης, η επιφάνεια της μεμβράνης FPSE πρέπει να αυξηθεί.[45]

#### **4.4 Ο ρόλος του πορώδους υφασμάτινου υποστρώματος**

Η διαπερατότητα του υποστρώματος παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην ταχύτητα μεταφοράς μάζας από το υπόστρωμα του δείγματος στο μέσο μικροεκχύλισης FPSE. Ένα αξιόπιστο μοντέλο που εξηγεί τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης τόσο για το διαπερατό υπόστρωμα, όσο και για το μη διαπερατό παρουσιάζεται στο σχήμα 4.2. Αξίζει να

αναφερθεί ότι μεταξύ όλων των σύγχρονων τεχνικών προσροφητικής μικροεκχύλισης, η FPSE είναι η μόνη τεχνική που χρησιμοποιεί διαπερατό υπόστρωμα για να επιταχύνει την ισορροπία εκχύλισης.



**Σχήμα 4.2:** Από αριστερά: διαπερατό και μη διαπερατό υπόστρωμα επικάλυψης

Στην περίπτωση της διαπερατής επιφάνειας, λόγω της εύκολης διείσδυσης της εισερχόμενης ροής μέσα από τους πόρους της επιφάνειας εκχύλισης, κανένα ρεύμα δεν αντιστρέφεται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Κατά συνέπεια, ευνοείται ο υψηλός ρυθμός μεταφοράς μάζας από το υπόστρωμα του δείγματος προς το μέσο εκχύλισης FPSE, κάτι που συνεπάγεται μικρό χρόνο επίτευξης της εκχύλισης ισορροπίας. Στη δεύτερη περίπτωση, μόνο ένα κλάσμα της εισερχόμενης ροής προς το μέσο εκχύλισης, έρχεται επιτυχώς σε επαφή με την επιφάνεια εκχύλισης, εξαιτίας της σύγκρουσης μεταξύ του εισερχόμενου και του εξερχόμενου ρεύματος. Ως αποτέλεσμα, ο χρόνος επίτευξης της εκχύλισης ισορροπίας είναι σημαντικά υψηλότερος.

Υπό την επίδραση εξωτερικών διατάξεων (ανάδευση, υπερήχοι κλπ.), μια συνεχής ροή του δείγματος κινείται προς το υπόστρωμα που κρατάει το προσροφητικό υλικό μικροεκχύλισης και συμβαίνει αλληλεπίδραση. Όταν χρησιμοποιείται ένα μη διαπερατό υπόστρωμα, όπως ίνες silica gel, η ροή αναπηδά και συγκρούεται με την εισερχόμενη ροή, σπρώχνοντας μέρος της εισερχόμενης ροής μακριά από την επιφάνεια του υποστρώματος. Ως συνέπεια, μόνο ένα κλάσμα των προσδιοριζόμενων ουσιών μπορεί να αλληλεπιδρά με το προσροφητικό. Αντίθετα, όταν το υπόστρωμα είναι διαπερατό, η πλειονότητα της εισερχόμενης ροής του δείγματος διεισδύει στην επιφάνεια του μέσου. Ως αποτέλεσμα, η μεταφορά μάζας μεταξύ του προφητικού και του δείγματος λαμβάνει χώρα ταχέως, μέσα σε ένα κλάσμα του χρόνου που απαιτείται για παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με μη διαπερατά υποστρώματα. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται με το πειραματικό αποτέλεσμα που ελήφθη από τον Alcludia-León και τους συνεργάτες του.[46] Σε αυτήν τη μελέτη, οι συγγραφείς συνέκριναν τη συμπεριφορά εκχύλισης των ράβδων ανάδευσης επικαλυμμένων με μη διαπερατό PTFE διαφόρων επιφανειακών περιοχών, με μία πορώδη μεμβράνη ανάδευσης PTFE, χρησιμοποιώντας την τεχνική της μικροεκχύλισης με μαγνητικό αναδευτήρα (stir-bar sorptive extraction, SBSE). Η υψηλότερη ευαισθησία εκχύλισης προέκυψε από την πορώδη μεμβράνη

ανάδευσης μεταξύ όλων των μέσων δοκιμής, παρ' όλο που είχε μικρή επιφάνεια συγκρινόμενη με τις μη διαπέρατες ράβδους. Αυτή η παρατήρηση ήταν μια σαφής δήλωση του ρόλου των πορωδών υποστρωμάτων.

#### **4.5 Δημιουργία του μέσου FPSE**

Ένα ιδανικό υπόστρωμα για τη δημιουργία ενός πολικού FPSE θα πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια:

1. Να είναι εύκαμπτο και να μπορεί να μπει σε πολλούς τύπους φιαλιδίων για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων.
2. Να έχει λειτουργικές ομάδες που μπορούν να προσδέσουν επαρκώς στο υβριδικό οργανικό-ανόργανο sol-gel μέσω πολυσυμπύκνωσης.
3. Να έχει πόρους (μακροσκοπικά), έτσι ώστε να επιτρέπει την εισχώρηση του υποστρώματος του δείγματος και των συστατικών του μέσα σε αυτούς για μικρότερο χρόνο ισορροπίας εκχύλισης.
4. Να ενισχύει την αλληλεπίδραση προσδιοριζόμενης ένωσης-ροφητικού μέσω της υδροφιλικότητάς του.

Η διεργασία επικάλυψης Sol-gel για τη δημιουργία της επίστρωσης προσρόφησης σε υπόστρωμα κελουλόζης περιλαμβάνει τις ακόλουθες αντιδράσεις:

- (i) Καταλυτική υδρόλυση του προδρόμου του κολλοειδούς πήγματος.
- (ii) Πολυσυμπύκνωση υδρολυμένων προδρόμων που οδηγούν σε ένα αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel.
- (iii) Τυχαία ενσωμάτωση του ενεργού οργανικού πολυμερούς στο αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel.
- (iv) Ακίνητοποίηση του αναπτυσσόμενου δικτύου sol-gel στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω πολυσυμπύκνωσης.

#### **4.6 Είδη προσροφητικών στην FPSE**

Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα διάφορα είδη μεμβρανών FPSE καθώς και ορισμένα χαρακτηριστικά τους.[50]

**Πίνακας 4.1:** Μεμβράνες FPSE [50]

Sol-gel Επικάλυψη	Ποσότητα προσροφητικού (mg/cm <sup>2</sup> )	Υφασμάτινο υπόστρωμα	Πολικότητα
PDMDPS	5,02	Κελουλόζη	Μη πολικό
PDMDPS	1,93	Πολυεστέρας	Μη πολικό
C18	2,4	Κελουλόζη	Μη πολικό
PDMS	4,56	Κελουλόζη	Μη πολικό
PDMS	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό
PTHF	3,96	Κελουλόζη	Μέτρια πολικό
PEO-PPO-PEO	5,68	Κελουλόζη	Πολικό
PEG-PPG-PEG	5,68	Κελουλόζη	Πολικό
CHITOSAN	Υπό ανάπτυξη	Κελουλόζη	-
PDPS	-	Κελουλόζη	Μη πολικό
PDPS	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό
PCAP-DMS-CAP	6.14	Κελουλόζη	Μη πολικό
PCAP-DMS-CAP	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό
C8	2.32	Κελουλόζη	Μη πολικό
Negatively Charged	-	Κελουλόζη	Πολύ πολικό

#### 4.7 Υλικό πολυ-τετραοδροφουρανίου (PTHF) ως μέσο FPSE

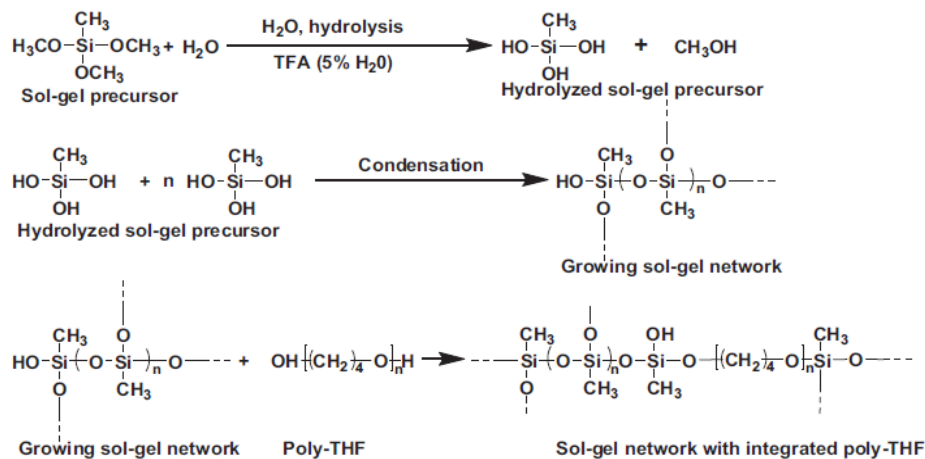
Στην παρούσα εργασία, μετά από διεξοδικές πειραματικές δοκιμές για τα προσδιοριζόμενα αντιβιοτικά πενικιλίνης, επιλέχθηκε το ύφασμα κελουλόζης ως υπόστρωμα για την επικάλυψη του με PTHF με την τεχνολογία sol-gel. Εν συντομία, αυτού του είδους το μέσο FPSE παράχθηκε ως εξής:

Αρχικά συμβαίνει **προκατεργασία υλικού υποστρώματος κελουλόζης**. Υφασμάτινο μέσο κελουλόζης, επιφάνειας 50 cm<sup>2</sup> πλένεται με απιονισμένο νερό για 15 min, για την απομάκρυνση διαλυτών σωματιδίων και χημικών επεξεργασίας. Έπειτα, το υφασμάτινο μέσο διαβρέχεται αρχικά με NaOH 1 M, για μια ώρα σε λουτρό υπερήχων. Ακολούθως πλένεται με απιονισμένο νερό και τοποθετείται εκ νέου σε λουτρό υπερήχων για μια ώρα με διάλυμα HCl 0,1 M. Τα κατεργασμένο ύφασμα πλένεται με απιονισμένο νερό και αφήνεται σε αδρανή ατμόσφαιρα για ξήρανση. Το στεγνό

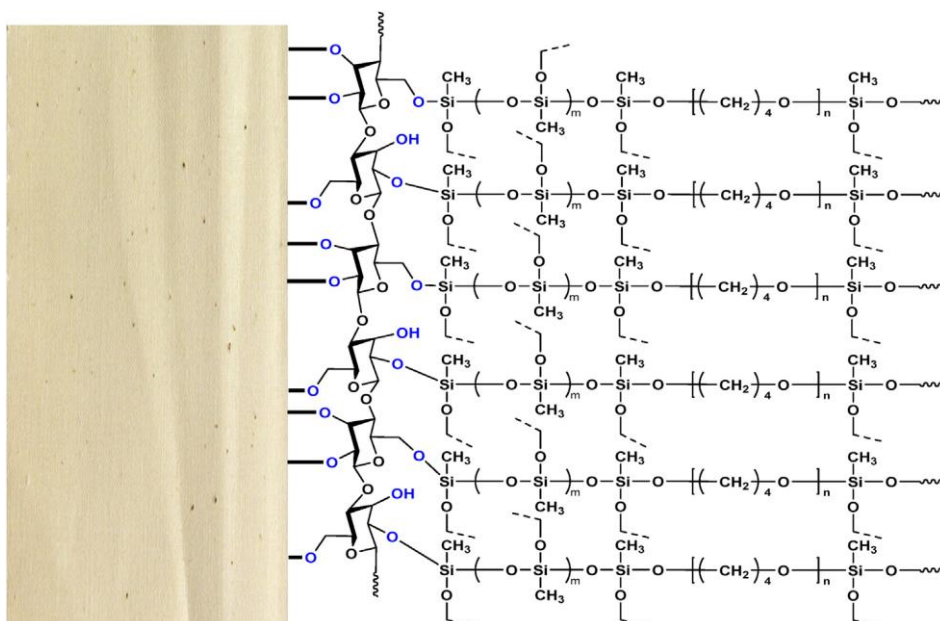
πλέον υφασμάτινο μέσο φυλάσσεται σε καθαρό αεροστεγές σκεύος, μέχρι την ώρα που θα χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία επίστρωσης με sol-gel.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η **προετοιμασία του κολλοειδούς διαλύματος** και η **σύνθεση του προροφητικού υλικού PTHF**. Το κολλοειδές διάλυμα παρασκευάστηκε διαλύοντας 10 g πολυμερούς πολυ-THF, 10 mL προδρόμου μεθυλοτριμεθοξυσιλανίου (MTMS), 20 mL μίγματος χλωριούχου μεθυλενίου/ακετονιτριλίου σε αναλογία όγκων (50:50 v/v) ως σύστημα οργανικού διαλύτη, 4 mL τριφθοροξικού οξέος (που περιέχει 5% νερό) ως τον καταλύτη. Το μίγμα στροβιλίστηκε για 3 min, φυγοκεντρήθηκε για 5 min, υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερήχους για 2 min και τελικά το διαυγές υπερκείμενο τμήμα του κολλοειδούς διαλύματος μεταφέρθηκε σε καθαρή γυάλινη σκουρόχρωμη φιάλη αντίδρασης. Το προεπεξεργασμένο υπόστρωμα κελουλόζης βυθίστηκε για προκαθορισμένο χρόνο στο διάλυμα αυτό, για να σχηματιστεί η επικάλυψη sol-gel. Μετά την επικάλυψη με PTHP-κολλοειδούς διαλύματος επί του υποστρώματος κυτταρίνης, το παραγόμενο επικαλυμμένο υπόστρωμα απομακρύνθηκε από το διάλυμα και διατηρήθηκε στον ξηραντήρα όλη τη νύκτα για την εξάτμιση του διαλύτη και για την ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του νέου αυτού υλικού. Το επικαλυμμένο μέσο FPSE στη συνέχεια ξεπλύθηκε με χλωριούχο μεθυλένιο: ακετονιτρίλιο (50:50 v/v) υπό υπερήχους για 30 min για να απομακρυνθούν τα συστατικά του διαλύματος που δεν αντέδρασαν. Το μέσο FPSE στη συνέχεια κόπηκε σε 2.5 cm x 2.0 cm για μελλοντική χρήση και αποθηκεύτηκε σε αεροστεγή δοχεία για να αποφευχθεί η συσσώρευση ανεπιθύμητων ουσιών από το περιβάλλον. Η περιγραφόμενη διαδικασία και οι συμπεριλαμβανόμενες αντιδράσεις απεικονίζονται στο σχήμα 4.3, ενώ στο σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η διαμόρφωση του παραγόμενου μέσου. Στο σχήμα 4.5, διακρίνονται διάφορες εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με (αριστερή πλευρά) υπόστρωμα υφάσματος κελουλόζης μη επικαλυμμένο, όπου διακρίνονται ίνες και πόροι της επιφάνειας του υφάσματος και (δεξιά πλευρά) ομοιόμορφα επικαλυμμένο μέσο εκχύλισης FPSE με PTHF.

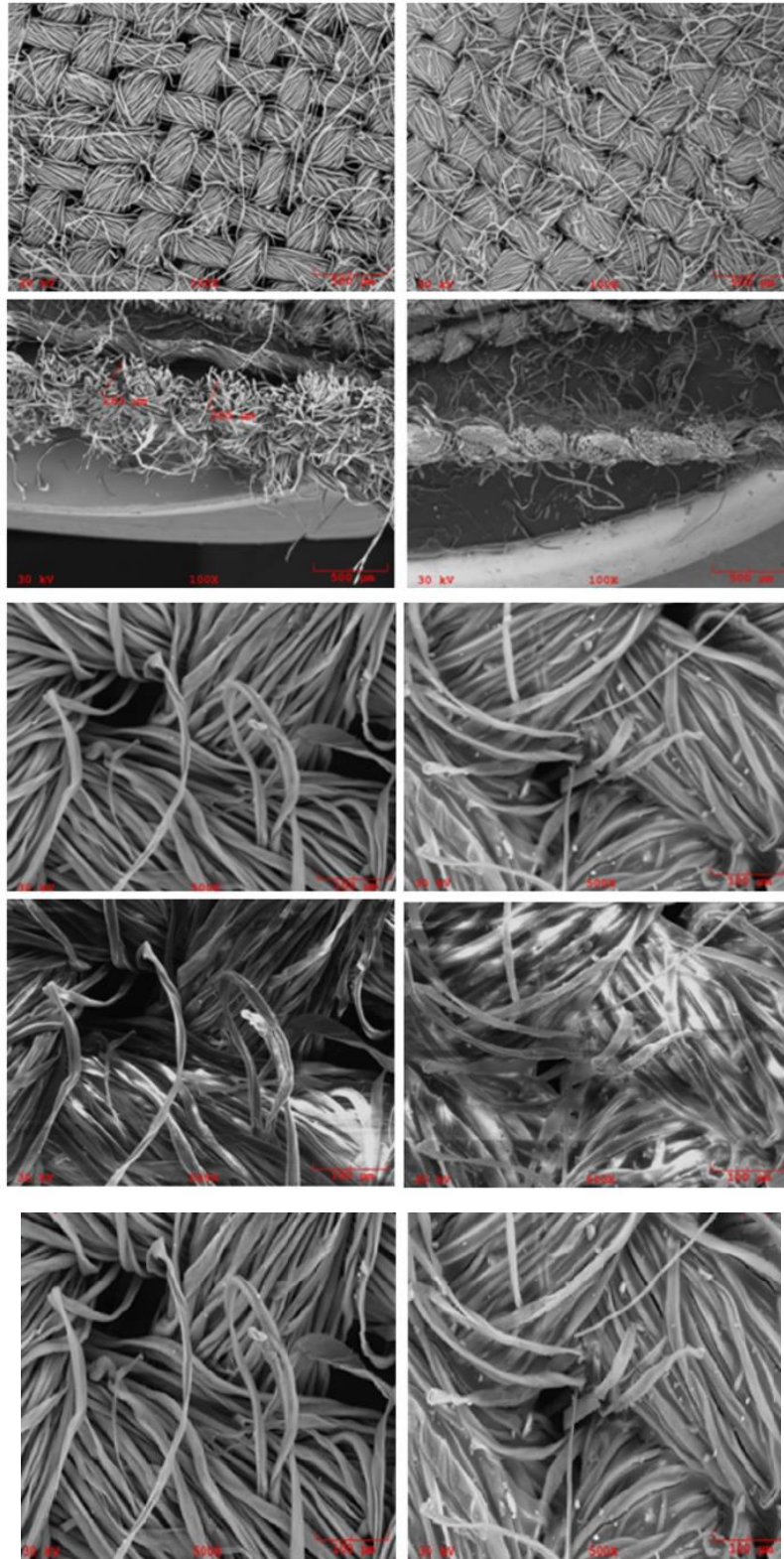
Τέλος, στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα ονόματα, οι λειτουργίες και οι χημικές δομές των συστατικών για την παρασκευή PTHF διαλύματος επικάλυψης sol-gel. [47-48]



Σχήμα 4.3: Χημικές αντιδράσεις για τη δημιουργία PTHF μέσω FPSE.



Σχήμα 4.4: Σχηματική αναπαράσταση του μέσου FPSE επικαλυμμένου με PTHF-κolloειδές διάλυμα.



*Σχήμα 4.5: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με (αριστερή πλευρά) υπόστρωμα υφάσματος κελουλόζης μη επικαλυμμένο όπου διακρίνονται ίνες και πόροι της επιφάνειας του υφάσματος. (δεξιά πλευρά) ομοιόμορφα επικαλυμμένο μέσο εκχύλισης FPSE με PTHF.*

**Πίνακας 4.2:** Ονόματα, λειτουργίες και χημικές δομές των συστατικών για την παρασκευή PTHF διαλύματος επικάλυψης *sol-gel*. [47]

Ονόματα Ενώσεων	Λειτουργία	Δομή
Methyltrimethoxysilane (MTMOS)	Sol-gel precursor	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{O}-\text{Si}-\text{OCH}_3 \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$
Polytetrahydrofuran	Organic ligand	$\text{H}-\text{O}-\left[ (\text{CH}_2)_4-\text{O} \right]_n-\text{H}$
Trifluoroacetic acid/water 95:5 (v/v)	Catalyst	$\text{CF}_3\text{COOH}$
Methylene chloride	Solvent	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$
Hexamethyldisilazane	Deactivating reagent	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{NH}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$

#### 4.8 Πλεονεκτήματα FPSE και σύγκριση με άλλες τεχνικές

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η FPSE, παρουσιάζονται παρακάτω:

- ★ **Ευελιξία υποστρώματος:** το εύκαμπτο υπόστρωμα επιτρέπει τη συστρόφη, κάμψη, συμπίεση του υπό εκχύλιση μέσου και επομένως είναι συμβατό με οποιοδήποτε τύπο περιέκτη.
- ★ **Προσβάσιμη επιφάνεια επαφής:** η υψηλή πρόσβαση στην επιφάνεια επαφής για την άμεση αλληλεπίδραση διαλύτη-ένωσης εξασφαλίζει γρήγορη ισορροπία εκχύλισης.
- ★ **Λειτουργία εκχύλισης:** ικανότητα εκχύλισης της προσδιοριζόμενης ένωσης και με πλήρη εκχύλιση και με εκχύλιση ισορροπίας.
- ★ **Διαλύτης έκλουσης:** εξαιτίας των ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του υποστρώματος και της επίστρωσης του προσροφητικού, δεν υπάρχει περιορισμός στην επιλογή του διαλύτη έκλουσης.
- ★ **Όγκος του διαλύτη έκλουσης:** απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα διαλύτη έκλουσης (500 μL). Δεν απαιτείται εξάτμιση του διαλύτη ή ανασύσταση του προσδιοριζόμενου συστατικού.
- ★ **Επιλογή διαλύτη:** μεγάλη ποικιλία διαλυτών.
- ★ **Σταθερότητα pH:** υψηλή σταθερότητα pH (pH 1-13)
- ★ **Πολύπλοκα δείγματα:** μπορεί να εκχυλίσει ενώσεις στόχους από πολύπλοκα δείγματα. Δε χρειάζεται καθαρισμός του υποστρώματος.
- ★ **Πεδίο εφαρμογής:** εξίσου αποτελεσματική τόσο στο εργαστήριο, όσο και στον τομέα εφαρμογών
- ★ **Χρόνος εκχύλισης ισορροπίας:** εξαιτίας της μεγάλης πρόσβασης στην επιφάνεια για την αλληλεπίδραση διαλύτη-ένωσης, η FPSE είναι ικανή για προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (10-30 min).



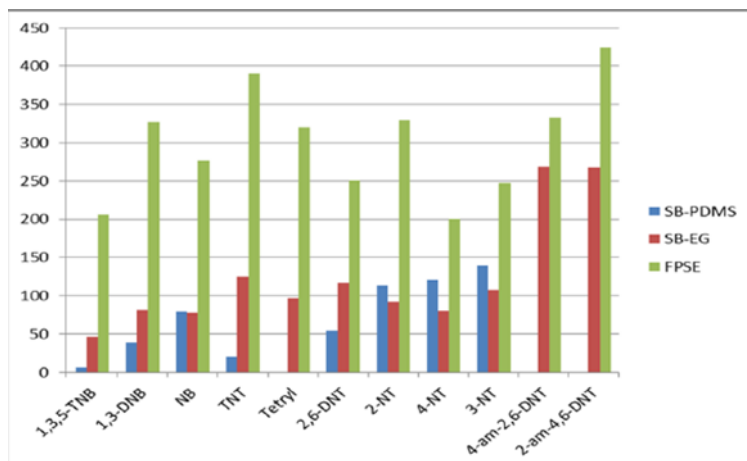
- ★ **Η έκπλυση / Επανεκχύλιση:** Ικανή τόσο για θερμική εκρόφηση και εκρόφηση του διαλύτη, ανάλογα με την ανάγκη ανάλυσης.
- ★ **Επαναληψιμότητα:** διαδικασία επίστρωσης sol-gel (μέσω χημικών αντιδράσεων), η οποία διασφαλίζει πολύ καλή αναπαραγωγιμότητα στην επικάλυψη από παρτίδα σε παρτίδα, εξαιρετική επαναληψιμότητα εκχύλισης μεταξύ ημερών και μέσα στην ημέρα.
- ★ **Προσαρμοσμένο προσροφητικό:** Έχει αναπτυχθεί ένας απλός τρόπος για το σχεδιασμό και τη σύνθεση προσροφητικών υλικών για κάθε οργανικό συστατικό.
- ★ **Ευαισθησία:** Δυνατότητα ανάκτησης συστατικών σε συγκεντρώσεις ppt / ppb.
- ★ **Χρόνος εκρόφησης:** η ανοικτή γεωμετρία της FPSE διευκολύνει τη γρήγορη εκρόφηση του προσδιοριζόμενου συστατικού (~ 5 min).
- ★ **Εξειδίκευση tune-up:** Η διαθεσιμότητα ενός μεγάλου αριθμού sol-gel ανόργανων πρόδρομων ουσιών και οργανικών πολυμερών επιτρέπει την αλλαγή της επιλεκτικότητας του προσροφητικού εύκολα.
- ★ **Μοριακή αποτύπωση:** έχει αναπτυχθεί επίσης μία εύκολη διαδικασία για τη μοριακή αποτύπωση με τη χρησιμοποίηση του μέγιστου αριθμού μοριακών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων. [49]

Όπως φαίνεται στο πίνακα 4.2 ακολουθεί σύγκριση της τεχνικής FPSE με άλλες, όπως η Solid Phase Microextraction (SPME) και η Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE). Στην FPSE η επιφάνεια επαφής προσροφητικού-ένωσης στόχου είναι περίπου 100 και 10 φορές μεγαλύτερη από τις τεχνικές SPE και SBSE αντίστοιχα.

**Πίνακας 4.3:** Σύγκριση επιφάνειας προσροφητικού-ένωσης σε διάφορες τεχνικές [49]

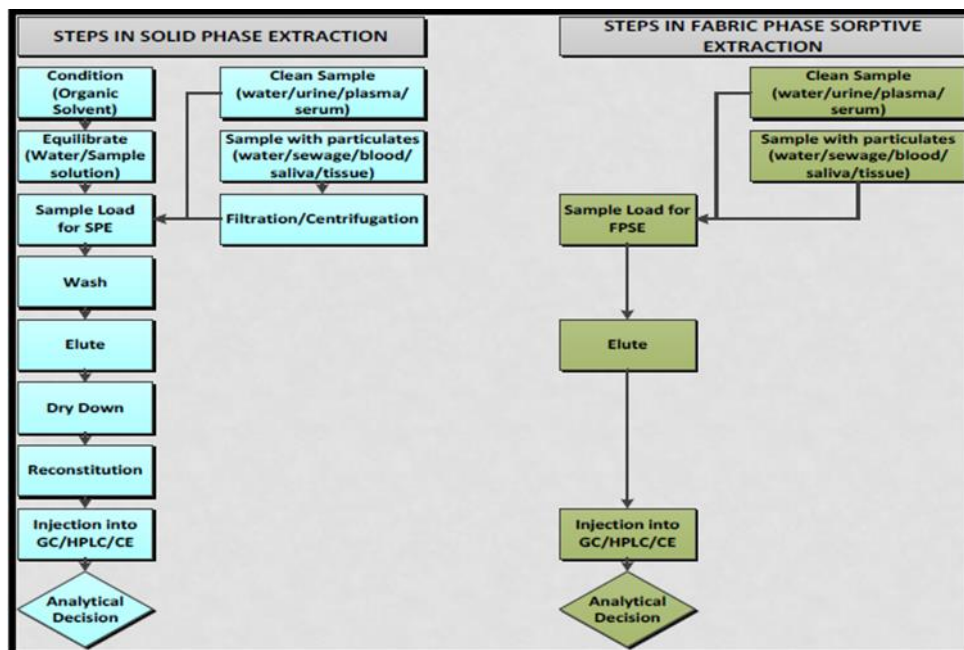
Solid Phase Microextraction	Stir Bar Sorptive Extraction (PDMS/ EG-Silicone Twister)	Fabric Phase Sorptive Extraction
		
(20 mm x 0.305 mm o.d.)	(10 mm x 3.2 mm o.d.)	(2.5 mm x 2.0 mm)
10-20 mm <sup>2</sup>	100 mm <sup>2</sup>	1000 mm <sup>2</sup> (Two Sides) Any size of the extraction media can be used!

Επίσης από σχετικές έρευνες που έχουν γίνει βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης στην FPSE είναι σημαντικά μεγαλύτερη, σε σχέση με την SBSE (σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6: Σύγκριση αποτελεσματικότητας εκχύλισης μεταξύ FPSE και SBSE

Τέλος είναι φανερό ότι και τα στάδια της FPSE είναι πολύ λιγότερα από άλλες τεχνικές όπως είναι η SPE (σχήμα 4.7) [49].



Σχήμα 4.7: Σύγκριση σταδίων SPE (αριστερά) και FPSE (δεξιά).

## 5. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

### 5.1 Εισαγωγικά Στοιχεία

Χρωματογραφική τεχνική είναι εκείνη που χρησιμοποιείται πρωταρχικά για το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, τα οποία κατανέμονται ανάμεσα σε δύο φάσεις, η μία από τις οποίες είναι στατική, ενώ η άλλη κινείται. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή, υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή μια πηκτή και να βρίσκεται πακτωμένη σε στήλη, τοποθετημένη ως στιβάδα ή ως υμένιο. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια ή υπερκρίσιμο ρευστό. Όταν η κινητή φάση είναι ένα υγρό και η στατική φάση είναι στερεό ή υγρό και βρίσκεται καλά πακτωμένη μέσα σε μια στήλη, τότε πρόκειται για την Υγρή Χρωματογραφία Στήλης (Liquid Chromatography: LC).

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography: HPLC) αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική και μπορεί να θεωρηθεί ως επέκταση της υγρής χρωματογραφίας στήλης, με εφαρμογή υψηλών πιέσεων. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται μικρότερου μεγέθους κόκκοι για το υλικό πλήρωσης και καλύτερα συστήματα ανίχνευσης, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση των στηλών, καθώς επίσης και υψηλή ταχύτητα διαχωρισμού, σε σχέση με την απλή τεχνική.

Αν και η χρωματογραφία είναι γνωστή από το 1903, όταν ο Tswett διαχώρισε καροτένια και χλωροφύλλη, χρησιμοποιώντας ανθρακικό ασβέστιο ως στατική φάση, η υγρή χρωματογραφία αναπτύχθηκε πολύ αργότερα. Οι Martin και Synge το 1941, χρησιμοποιώντας στήλες χρωματογραφίας, μέσα στις οποίες είχαν τοποθετήσει χονδρόκοκκα υλικά, κατόρθωσαν με χαμηλές ταχύτητες ροής του εκλουστικού συστήματος και χαμηλές πιέσεις, να πετύχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, αν και είναι σήμερα γνωστό, ότι καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας υψηλές πιέσεις και λεπτόκοκκα υλικά. Το 1950, όταν η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography: GC) αναπτύχθηκε απότομα με την ανακάλυψη της τεχνικής ανίχνευσης ιονισμού φλόγας, δόθηκε παράλληλη προσοχή στην ανάπτυξη χαλύβδινων στηλών για την υγρή χρωματογραφία. Έτσι λοιπόν, έχοντας στήλες από ανοξείδωτο χάλυβα, οι οποίες μπορούσαν να αντέξουν σε υψηλές πιέσεις, αναπτύχθηκαν και αντλίες υψηλής πίεσης με σταθερή παροχή.

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, τόσο στον προσδιορισμό διαφόρων ιόντων, όσο και στον προσδιορισμό οργανικών μορίων και πλέον θεωρείται η πιο κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων, τόσο οργανικών, όσο και ανόργανων. Η HPLC ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι

προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC, είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών, καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Τέλος, είναι δυνατή η χρήση αναλυτικών στηλών σε σειρά, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ο καλύτερος διαχωρισμός συστατικών ενός μίγματος. Ο χρόνος ανάλυσης με την τεχνική της HPLC είναι συνήθως μικρός, της τάξης των μερικών min, ενώ έχει πολύ καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Γενικά, η HPLC είναι μια ευαίσθητη αναλυτική τεχνική που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους ενώσεων.

Η HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς, όπως: ιατρικούς (π.χ. ανίχνευση των επιπέδων της βιταμίνης D σε ορό αίματος), νομικούς (π.χ. ανίχνευση αναβολικών στα ούρα), έρευνα (π.χ. διαχωρισμός συστατικών ενός πολύπλοκου βιολογικού δείγματος), και την κατασκευή (π.χ. κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων). [28,29]

## 5.2 Είδη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Στην HPLC μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την επιλογή του κατάλληλου υλικού πλήρωσης της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

Αυτά τα είδη αναφέρονται συνοπτικά:

- **Χρωματογραφία Κατανομής (partition chromatography):** είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος υγρής χρωματογραφίας. Διαιρείται σε δύο υπομονάδες τη χρωματογραφία υγρού-υγρού και τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης. Οι δύο τεχνικές διαφέρουν ως προς τον τρόπο, με τον οποίο η στατική φάση συγκρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης. Στην χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση συγκρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση. Στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Αρχικά, η χρωματογραφία κατανομής ήταν αποκλειστικά τύπου υγρού-υγρού, τώρα όμως υπερισχύει η μέθοδος της δεσμευμένης φάσης.
- **Χρωματογραφία Προσρόφησης (Αντίστροφης και Κανονικής Φάσης).** Ο διαχωρισμός των διαφόρων ενώσεων βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοια δομή, αλλά

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

Η Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης, στην οποία η στατική φάση (συνήθως  $\text{SiO}_2$  ή  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλυτές, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.α.

Η Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης, η οποία αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, αφού χρησιμοποιείται στο 80% περίπου των αναλυτικών εφαρμογών. Η στατική φάση, η οποία είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου, συζευγμένο με διάφορες ομάδες (bonded phase), όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο) φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό. Τα υλικά συζευγμένης φάσης πλεονεκτούν ως προς τη σταθερότητα, αλλά και τη συμβατότητα με μεγάλη ποικιλία εκλουστικών συστημάτων

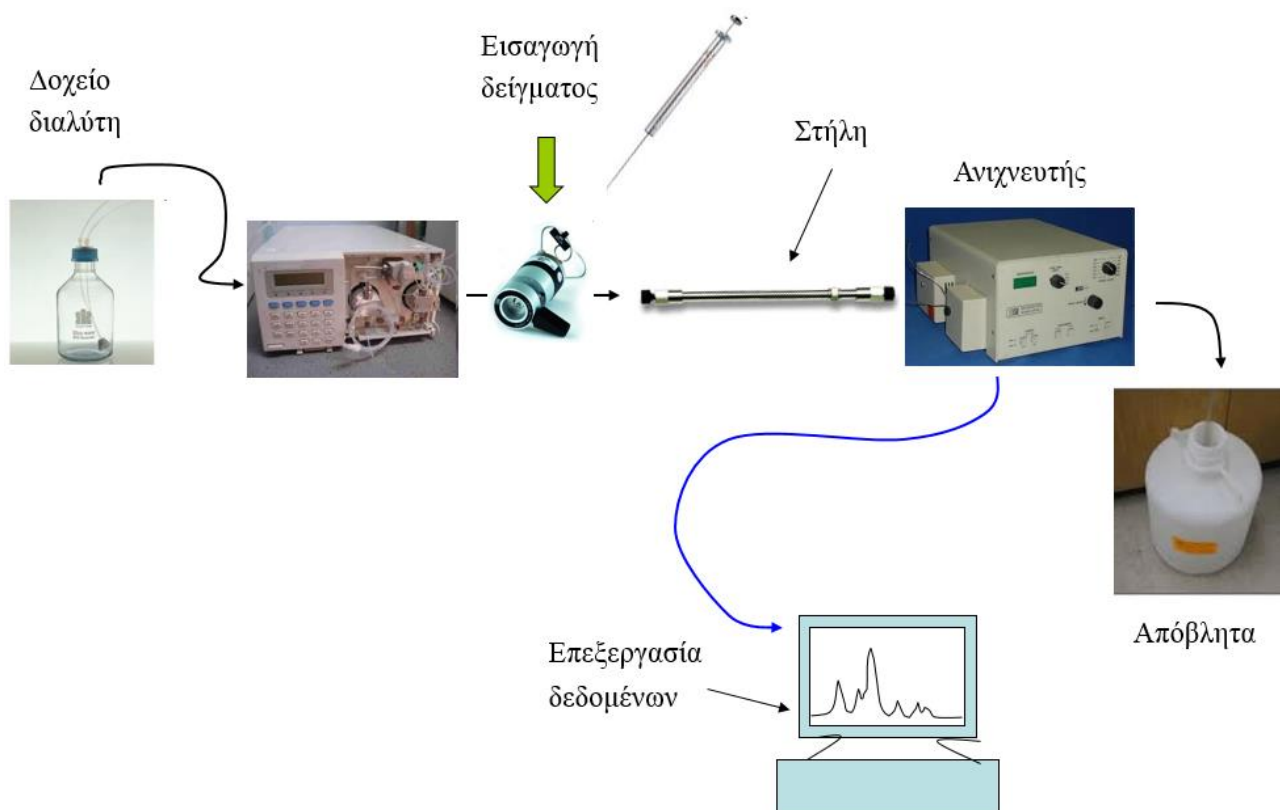
- **Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.** Ο διαχωρισμός στηρίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, είναι το αντίθετο ιόν της στατικής ομάδας, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.
- **Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους.** Η Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size-exclusion chromatography), η οποία ονομάζεται και χρωματογραφία διήθησης με πηκτή, είναι μια χρωματογραφική τεχνική στην οποία τα μόρια σε ένα διάλυμα διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, και σε ορισμένες περιπτώσεις ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Εφαρμόζεται συνήθως σε μεγάλα μόρια ή μακρομοριακά σύμπλοκα, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα πολυμερή. Τα υλικά πλήρωσης, για τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελούνται από μικρά ( $\approx 10$   $\mu\text{m}$ ) σωματίδια πυρίτιας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιομόρφων πόρων, μέσα από τους οποίους μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμιά συγκράτηση. Τα μόρια αυτά εκλούνται πρώτα από τη στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν σ' αυτούς και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούνται τελευταία από τη στήλη. Μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους.

- *Χρωματογραφία Εκλεκτικής Συγγένειας*, όπου οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες (ligand), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του SiO<sub>2</sub>. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών. [28,29]

### **5.3 Οργανολογία της HPLC**

Με την τεχνική της HPLC επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μια χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Η HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων, καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό μιγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους και πολικότητας, προσδιορίζοντας σε ιόντα ποσότητες της τάξης των μερών ανά δισεκατομμύριο (ppb). Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων, καθώς και των μεταβολιτών τους. Για να επιτευχθούν οι ταχύτητες ροής έκλουσης, μέσα σε στήλη, όπου τα σωματίδια του υλικού πλήρωσης έχουν μέγεθος 2 έως 10 μm, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες θα πρέπει να φτάνουν τις μερικές χιλιάδες psi. Συνεπώς, η οργανολογία της HPLC, είναι πιο πολύπλοκη και πιο δαπανηρή από άλλα είδη χρωματογραφίας. Η HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα, όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 5.1 :

- |  |  |
|--|--|
| 1. σύστημα παροχής διαλυτών                  | 4. στήλη και προστήλη  |
| 2. αντλία                                    | 5. σύστημα αντίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος |
| 3. σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη |  |



*Σχήμα 5.1: Διάταξη ενός υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης.*

#### **A. Σύστημα παροχής διαλυτών**

Το σύστημα παροχής διαλυτών μιας υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης περιλαμβάνει το ή τα δοχείο/α του διαλύτη και πιθανόν κάποια διάταξη απαέρωσης των διαλυτών. Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλυση (isocratic), ή φιάλες μέχρι τέσσερις στη βαθμωτή έκλυση (gradient), όπου τοποθετούνται οι διαλύτες και απαερώνονται. Ένα σύστημα HPLC μπορεί να αναμίξει διαλύτες, από δύο έως τέσσερα δοχεία διαλυτών, με την προϋπόθεση ότι δε σχηματίζεται γαλάκτωμα ή ίζημα κατά την ανάμιξή τους, μπορεί όμως να αντλεί διαλύτη προκαθορισμένης σύστασης από μία φιάλη. Η απαέρωση είναι απαραίτητη, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα διαλυμένα αέρια, κυρίως το οξυγόνο, που μπορεί να δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα, μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής, καθώς επίσης και αστάθεια στη βασική γραμμή του χρωματογράφηματος, αν εγκλωβιστούν φυσαλίδες στην κυψελίδα του ανιχνευτή περνώντας τους διαλύτες μέσα από συσκευή με ειδικές μεμβράνες που κατακρατούν όλα τα διαλυμένα αέρια, ή με υπερήχους, είτε τέλος και με συνδυασμό όλων των παραπάνω μεθόδων. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, ειδικοί για χρωματογραφικές αναλύσεις και να συνοδεύονται από πιστοποιητικό απορρόφησης στο υπεριώδες, απαραίτητο για την περίπτωση που χρησιμοποιείται φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

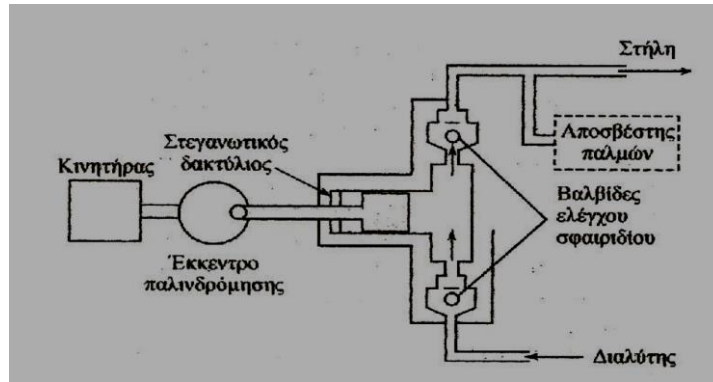
Αρκετές φορές είναι απαραίτητη η διήθηση των διαλυτών πριν τη χρησιμοποίησή τους μέσα από κατάλληλους ηθμούς, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν στερεά που μπορεί να φράξουν τη βαλβίδα εισαγωγής, τα έμβολα της αντλίας και να προκληθούν βλάβες στο σύστημα της ανάλυσης.

Το σύστημα των διαλυτών επιλέγεται κατάλληλα, ώστε να επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των ενώσεων που προσδιορίζονται και να έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης. Οι δύο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης είναι η «ισοκρατική έκλουση» (isocratic elution), στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, καθ' όλη την ανάλυση και η «βαθμωτή έκλουση» (gradient elution), στην οποία η κινητή φάση μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα βάσει προγραμματισμού. Αρχικά εκλούνται τα συστατικά που συγκρατούνται ασθενέστερα από ένα διαλύτη Α με μικρή ισχύ έκλουσης. Στη συνέχεια, παρεμβάλλεται ένας δεύτερος διαλύτης Β (ή περισσότεροι Γ και Δ) με μεγαλύτερη ισχύ έκλουσης και αναμιγνύεται με τον Α, είτε σε ξεχωριστά στάδια, είτε συνεχώς, οπότε αυξάνεται η εκλουστική ικανότητα του μίγματος και επιτυγχάνεται έτσι σταδιακή έκλουση όλων των συστατικών. Η μεγάλη πίεση απαιτείται προκειμένου το δείγμα να περάσει με μια λογική ταχύτητα ροής μέσα από τη στήλη που είναι γεμάτη με μικρά σωματίδια.

## **B. Αντλία**

Με την αντλία υψηλής πίεσης επιτρέπεται στο σύστημα των διαλυτών να περάσει μέσα από τη στήλη, έτσι ώστε να παρασύρει το δείγμα και να διαχωρίσει τα διάφορα συστατικά του ανάλογα με την πολικότητά τους και σε σχέση με το εκλουστικό σύστημα. Υπάρχουν πολλοί τύποι αντλιών, ενώ ιδανική είναι εκείνη η αντλία που μπορεί να δώσει πίεση μέχρι 5000 psi, μέσα από μια στήλη. Ανάλογα με τη σταθερότητα της πίεσης που εξασφαλίζουν αυξάνει και η τιμή τους. Η σταθερή ροή επηρεάζεται από τον κινητήρα της αντλίας, τις φλάντζες στεγανοποίησης και τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος. Το σύστημα της αντλίας περιλαμβάνει τα διάφορα φίλτρα, καθώς και τις διατάξεις πίεσης και μέτρησης της ροής. Το έργο της αντλίας είναι η άσκηση υψηλής πίεσης στο εκλουστικό σύστημα, ώστε αυτό να περάσει με σταθερή ροή μέσα από τους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης. Η υψηλή πίεση είναι απαραίτητη για να ξεπεραστεί η αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης, η οποία οφείλεται στη στατική φάση. Το υλικό, από το οποίο είναι κατασκευασμένη η αντλία είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας, ώστε να μην υπόκειται καμία διάβρωση από τις διάφορες ενώσεις και τους διαλύτες. Στην περίπτωση αυτή, επιτυγχάνεται πίεση μέχρι και 8.000-10.000 psi, ενώ με αντλίες από αδρανή πολυμερή, για παράδειγμα από πολυαιθερική κετόνη: PEEK, μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 5.000 psi το ανώτερο. Συνήθως χρησιμοποιείται η αντλία παλινδρομικής κίνησης με δύο έμβολα, όπως στο σχήμα 5.2, ώστε η άντληση του εκλουστικού συστήματος να γίνεται ομαλά και να διατηρείται σταθερή η ροή και η πίεση του συστήματος.

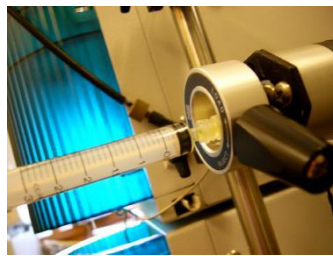




Σχήμα 5.2: Παλινδρομική αντλία με απόσβεση παλμών.

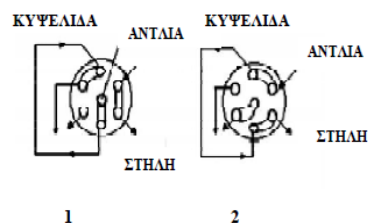
### Γ. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόχο ή με αυτόματο δειγματολήπτη. Η ποσότητα του δείγματος κυμαίνεται συνήθως από 5 - 50  $\mu\text{L}$ . Η εισαγωγή του δείγματος με ειδική βαλβίδα εισαγωγής, φωτογραφία, της οποίας φαίνεται στο σχήμα 5.3, γίνεται σε δυο στάδια.



Σχήμα 5.3: Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος.

Αρχικά, όταν η βαλβίδα βρίσκεται στη θέση πλήρωσης «load» της κυψελίδας, γεμίζει η προκαθορισμένου όγκου κυψελίδα, ενώ ό,τι περισσεύει αποβάλλεται από την ειδική έξοδο. Στη συνέχεια, η βαλβίδα στρέφεται στη θέση της έγχυσης, «inject», κι έτσι το δείγμα συμπαρασύρεται από το εκλουστικό σύστημα και διαβιβάζεται στη στήλη. Στο σχήμα 5.4 δίνεται η δομή του εσωτερικού μίας βαλβίδας εισαγωγής δείγματος, καθώς και τα δύο στάδια εισαγωγής του δείγματος.



Σχήμα 5.4 Βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος, με 1: Θέση πλήρωσης της κυψελίδας και 2: Θέση εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Οι βαλβίδες εισαγωγής δείγματος είναι κατασκευασμένες από ειδικό ανοξείδωτο χάλυβα ή από κεραμικά υλικά υψηλής αντοχής ή από αδρανή πολυμερή. Έχουν το πλεονέκτημα ότι δε χρειάζεται να διακοπεί η ροή του εκλουστικού και επομένως να διαταραχθεί η ισορροπία του συστήματος. Υπάρχει επίσης και η δυνατότητα αυτόματης σύνδεσης με τον ολοκληρωτή σε ορισμένους τύπους βαλβίδων εισαγωγής. Εκτός από τις βαλβίδες εισαγωγής δείγματος με πίεση, υπάρχουν και βαλβίδες, στις οποίες η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με αναρρόφηση.

#### **Δ. Στήλη και προστήλη**

Η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος είναι η στήλη, αφού σ' αυτήν επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ουσιών. Πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας, ώστε να μπορεί να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Το εξωτερικό περίβλημα είναι συνήθως κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα, ώστε να αντέχει στις πολύ υψηλές πιέσεις, της τάξης των 10.000 psi, κάτι το οποίο δε μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση γυάλινων στηλών. Εσωτερικά, η στήλη περιέχει τη στατική φάση καλά πακτωμένη, ώστε να μην υπάρχουν κενά που να οδηγούν σε ελάττωση της απόδοσης ή να δημιουργούν κανάλια κατά μήκος της στήλης. Το μέγεθος των κόκκων του υλικού πλήρωσης κυμαίνεται από 3 έως και 10  $\mu\text{m}$ . Οι στήλες με μικρή διάμετρο κόκκων έχουν μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, έχουν όμως μικρότερη διάρκεια ζωής, μεγαλύτερο κόστος και επιπλέον αναπτύσσονται υψηλότερες πιέσεις επαναφοράς. Οι κόκκοι του υλικού πλήρωσης μπορεί να είναι σφαιρικοί ή ακανόνιστου σχήματος. Οι πρώτοι διαποτίζονται ευκολότερα με το εκλουστικό σύστημα και έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, ενώ οι δεύτεροι έχουν μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια, που ευνοεί την προσρόφηση. Η στήλη βρίσκεται συνήθως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αλλά μπορεί και να θερμοστατείται με μανδύα, όταν πρόκειται για ειδικές εφαρμογές. Στο σχήμα 5.5 δίνονται ενδεικτικά διάφορες στήλες υγρής χρωματογραφίας.



**Σχήμα 8.5:** Στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Το περισσότερο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης είναι η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) που χρησιμοποιείται στην κανονικής-αδέσμευτης φάσης HPLC. Ο κύριος μηχανισμός διαχωρισμού οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των μορίων των συστατικών του δείγματος με τις πολικές ομάδες Si-

OH της επιφάνειας του διοξειδίου του πυριτίου. Για περισσότερο εκλεκτικούς διαχωρισμούς χρησιμοποιείται η δεσμευμένης φάσης HPLC, στην οποία δεσμεύονται διάφορες ομάδες στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου.

Οι ομάδες αυτές μπορεί να είναι μη πολικές, για παράδειγμα αλκύλια με 8 ή 18 άτομα άνθρακα, αντίστοιχα ( $-C_8H_{17}$ )  $C_8$  ή ( $-C_{18}H_{37}$ )  $C_{18}$ , ή λιγότερο πολικές ομάδες απ' ό,τι το αδέσμευτο διοξείδιο του πυριτίου, π.χ. φαινύλια Ph, ομάδες κυανίου -CN, διόλες -2OH, αμινοπροπυλικές ομάδες  $-NH_2$ , καθώς επίσης μπορούν να δράσουν και ως ιοντοανταλλάκτες. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, τα λιγότερο πολικά συστατικά αλληλεπιδρούν με τη μη πολική επιφάνεια της στατικής φάσης και έτσι εκλούνται αργότερα από τα πολικά συστατικά του δείγματος. Η επιλογή των υλικών πλήρωσης της στήλης για τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης γίνεται με βάση το είδος των συστατικών που πρόκειται να προσδιοριστούν, τη διαλυτότητά τους σε διάφορα εκλουστικά συστήματα, την ικανότητα, την εκλεκτικότητα και τη χωρητικότητα που απαιτείται για το συγκεκριμένο διαχωρισμό. Κρίσιμος παράγοντας για τη διατήρηση της απόδοσης και τη διατήρηση του προκαθορισμένου χρόνου ζωής της στήλης, είναι ο καθαρισμός της με τους διαλύτες που ορίζει ο κατασκευαστής της πριν και μετά την ανάλυση. Αυτό επιτυγχάνει απομάκρυνση ισχυρά προσροφημένων ενώσεων στο υλικό πλήρωσης, καθώς και απομάκρυνση της κινητής φάσης

### **Ε. Σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος**

Ο ανιχνευτής είναι ένα όργανο, το οποίο έχει ως σκοπό να δίνει μια απόκριση, η οποία να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ή της ποσότητας ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή θα πρέπει να έχει τη μορφή ενός τέτοιου σήματος, το οποίο να μπορεί να μετρηθεί. Κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή είναι η ευαισθησία, η γραμμικότητα, η εκλεκτικότητα και η ικανότητα να ανιχνεύει την ελάχιστη δυνατή ποσότητα ενός συστατικού μέσα στο διάλυμα. Κάθε ανιχνευτής HPLC ανεξάρτητα από την αρχή, στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

- χαμηλό επίπεδο θορύβου,
- υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής,
- μικρό χρόνο απόκρισης,
- μικρό νεκρό όγκο,
- ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής,
- ευελιξία σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης,
- αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση,
- δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους,
- μη καταστροφή του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Οι ανιχνευτές κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

α) στους γενικούς, οι οποίοι μετράνε την αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης (ανιχνευτές δείκτη διάθλασης και αγωγιμότητας)

β) στους ειδικούς, που μετράνε την αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων συστατικών (ανιχνευτές ορατού - υπεριώδους).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι και των δύο κατηγοριών, για παράδειγμα ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού, παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικοί, φασματογράφοι μάζας, φθορισμομετρικοί, ραδιενέργειας κ.ά. Τα διάφορα είδη των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία δίνονται στον πίνακα 5.1:

Παρουσιάζεται στη συνέχεια μια πιο λεπτομερής περιγραφή του ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, καθώς είναι το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη της μεθόδου της παρούσας εργασίας.

*Πίνακας 2.1: Είδη ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην HPLC*

<b>Ανιχνευτής</b>	<b>Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (εμπορικοί ανιχνευτές)</b>	<b>Όριο ανίχνευσης μάζας (LOD) (υπάρχουσα κατάσταση)</b>
Απορρόφησης	100 pg - 1 ng	1 pg
Φθορισμού	1-10 pg	10 fg
Ηλεκτροχημικός	10 pg - 1 ng	100 fg
Δείκτη διάθλασης	100 ng - 1 μg	10 ng
Αγωγιμότητας	500 pg - 1 ng	500 pg
Φασματομετρία μαζών	100 pg - 1 ng	1 pg
FT-IR	1 μg	100 ng
Σκέδαση φωτός	10 μg	500 ng
Οπτικής ενεργότητας	-	1 ng
Επιλογής στοιχείου	-	10 ng
Φωτοϊονισμού	-	1 pg -1 ng

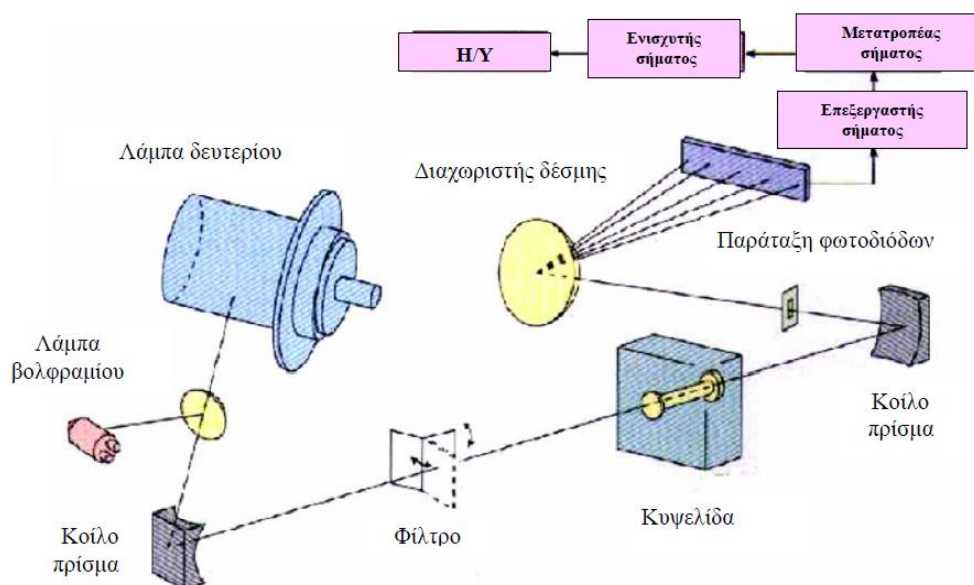
#### ***Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector)***

Πρόκειται για έναν ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους, ο οποίος συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της προσδιοριζόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα. Η αρχή λειτουργίας ενός φασματοφωτόμετρου παράταξης φωτοδιόδων είναι ότι το λευκό φως (με όλα τα μήκη κύματος) περνά μέσα από το δείγμα. Στη συνέχεια το φως εισέρχεται σε πολυχρωμάτορα, ο οποίος διαχωρίζει το φως στα συστατικά του,

ανάλογα με το μήκος κύματος και κατευθύνει το φως στην παράταξη διόδων. Μια διαφορετικού μήκους κύματος δέσμη πέφτει σε κάθε δίοδο και η ανάλυση εξαρτάται από το πόσο κοντά είναι παρατεταγμένες οι δίοδοι και πόση διασπορά προκαλείται από τον πολυχρωμάτορα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής παράταξης φωτοδίοδων, ο οποίος αποτελείται από 512 δόδους. Στο σχήμα 5.7 δίνεται η δομή ενός τέτοιου ανιχνευτή. Με το φασματοφωτόμετρο παράταξης φωτοδίοδων δίνεται η δυνατότητα να παρατηρείται ταυτόχρονα όλο το φάσμα κάθε ένωσης. Η παράταξη αποτελείται από μερικές εκατοντάδες έως και μερικές χιλιάδες δόδους, οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν μέσα σε κλάσματα δευτερολέπτου. Η πληροφορία κάθε δόδου μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα και αποθηκεύεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανίχνευση με παράταξη φωτοδίοδων παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Ταυτόχρονη ανίχνευση σε διάφορα μήκη κύματος.
- Δυνατότητα ταυτοποίησης της κορυφής.
- Προσδιορισμός της καθαρότητας της κορυφής.

Μειονεκτεί στο ότι έχει μικρότερη ευαισθησία από τον κλασικό ανιχνευτή, κάτι το οποίο μπορεί να διορθωθεί με χρήση κυψελίδας με τοιχώματα χαμηλού δείκτη διάθλασης, όγκου 10  $\mu\text{L}$  και μήκους 50 mm.[28,29]



Σχήμα 5.7: Ανιχνευτής παράταξης φωτοδίοδων.

#### 5.4 Διαλύτες κινητής φάσης

Η κινητή φάση στην HPLC είναι συνήθως μίγμα, ενός ή περισσότερων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με συγκεκριμένη τιμή pH, στην περίπτωση της HPLC αντίστροφης φάσης, ή μίγμα μη πολικών διαλυτών στην περίπτωση της HPLC κανονικής φάσης.

Για να μπορεί ένας οργανικός διαλύτης να χρησιμοποιηθεί στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

- Να είναι υψηλής καθαρότητας και ειδικός για χρωματογραφία
- Να είναι σχετικά φθηνός.
- Να έχει χαμηλή τοξικότητα.
- Να είναι δραστικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- Να μην καταστρέφει το δείγμα.
- Να μην αποσυντίθεται εύκολα.
- Να μην είναι πτητικός.
- Να έχει χαμηλό ιξώδες, χαμηλή πίεση επαναφοράς και μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού.

Οι οργανικοί διαλύτες που συνήθως προτιμώνται είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Όταν λαμβάνει χώρα ανάμιξη διαλυτών ή όταν χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών, κυρίως υδατικά, είναι απαραίτητη η απαέρωσή τους, γιατί δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα από το διαλυμένο οξυγόνο και άζωτο του αέρα. [28-29]

#### 5.5 Επιλογή κινητής φάσης

Η επιλογή κινητής φάσης αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο, όσον αφορά στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων. Είναι γνωστό, από τη χρωματογραφική θεωρία, ότι η διαχωριστική ικανότητα  $R_s$  εξαρτάται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών  $N$ , τον παράγοντα συγκράτησης  $k'$ , και τον παράγοντα διαχωρισμού  $\alpha$ . Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων  $k'$  και  $\alpha$  γίνεται, κυρίως, με αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης. Έτσι μετά την επιλογή της στατικής φάσης (βελτιστοποίηση του  $N$ ), η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση, έτσι ώστε  $-1 < k' < 1$ . Η βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Οι ιδιότητες της κινητής φάσης που εξετάζονται είναι:

- |   |  |
|---|--|
| • Πολικότητα  | • Τοξικότητα                                       |
| • Ελουοτροπική ισχύς                                | • Συμβατότητα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή και |
| • Βασικότητα ή δυνατότητα διπολικών αλληλεπιδράσεων | • Κόστος   |

Η έκλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών μπορεί να είναι ισοκρατική ή βαθμωτή.

**Ισοκρατική Έκλυση:** Ονομάζεται η έκλυση, κατά την οποία διατηρείται σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η ισοκρατική έκλυση επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, έχει χαμηλότερο κόστος, σε σχέση με τη βαθμωτή, και παρέχει σταθερότερη βασική γραμμή. Το κύριο μειονέκτημά της είναι ότι δεν εξασφαλίζει το διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοιες ιδιότητες και παρόμοια δομή.

**Βαθμωτή έκλυση:** Χαρακτηρίζεται από μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης με το χρόνο, για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων, οι οποίες συνήθως παρουσιάζουν παρόμοια δομή και ιδιότητες. Γενικότερα σκοπός της βαθμωτής έκλυσης είναι η ταχύτερη μετακίνηση των συστατικών που συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη και ο ικανοποιητικός διαχωρισμός αυτών που συγκρατούνται ελάχιστα. Συνήθως, η αρχική σύσταση της κινητής φάσης χαρακτηρίζεται από μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη, γεγονός που επιτρέπει το διαχωρισμό των συστατικών που δε συγκρατούνται ισχυρά στη στατική φάση. Τα συστατικά που συγκρατούνται ισχυρότερα, δε μετακινούνται, παρά μόνο, όταν αρχίσει να αυξάνεται το ποσοστό του οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη) στην κινητή φάση, λόγω των ανταγωνιστικών δράσεων που λαμβάνουν χώρα. Η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης μπορεί να επιτευχθεί αναμιγνύοντας δύο ή περισσότερους διαλύτες, σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα.[28-29]

## ***5.6 Πλεονεκτήματα της HPLC***

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική, η οποία εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, τα οποία την καθιστούν σήμερα μια από τις πλέον εφαρμοζόμενες διαχωριστικές τεχνικές που υπερέχει σαφώς έναντι των υπολοίπων. Αυτά είναι:

- ★ Πολύ καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
- ★ Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα.
- ★ Χαμηλά όρια ανίχνευσης και μικροί χρόνοι ανάλυσης, της τάξης των μερικών λεπτών.
- ★ Απλότητα και ευκολία εφαρμογής.
- ★ Δυνατότητα εφαρμογής σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων τόσο για αναλύσεις ρουτίνας, όσο και για ερευνητικούς σκοπούς.[28-29]

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα στο κεφάλαιο 2.1, ο προσδιορισμός των πενικιλινών σε ανθρώπινο ορό αίματος κρίνεται εξαιρετικά σημαντικός και συνεπώς η ανάπτυξη νέων μεθόδων είναι διαρκώς στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος για ποικίλους λόγους, όπως για παράδειγμα για φαρμακοκινητικές μελέτες, ή μελέτες βελτιστοποίησης της δόσης αντιβιοτικών κ.τ.λ. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια αξιοσημείωτη ποικιλία μεθόδων και ανασκοπήσεων στη βιβλιογραφία που ασχολείται με αυτό το θέμα και καλύπτει τον προσδιορισμό της πενικιλίνης και άλλων αντιβιοτικών β-λακτάμης στον ορό του ανθρώπινου αίματος. Αναμφισβήτητα, οι μέθοδοι που στηρίζονται στην τεχνική της HPLC και γενικότερα στην υγρή χρωματογραφία αποτελούν τη βάση για τον αξιόπιστο προσδιορισμό των αντιβιοτικών πενικιλίνης. Οι μέθοδοι αυτές συνήθως διαφοροποιούνται από τη στατική φάση, από την κινητή φάση με ή χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα, τον τρόπο ανίχνευσης, τη χρήση παραγωγοποίησης, τη διαδικασία παρασκευής δείγματος κ.τ.λ. Σε όλες αυτές τις αναφορές, είναι προφανές ότι η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται κυρίως με παρόμοιους τρόπους, χωρίς σημαντικές αποκλίσεις και με τις συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων. Η διαδικασία περιλαμβάνει απομάκρυνση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη, ως επί το πλείστον, ακετονιτρίλιο (ACN), με ή χωρίς φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθεί άμεση ανάλυση, ενώ σε άλλες παρατηρείται μία πιο επίπονη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την εξάτμιση του διαλύτη και την επακόλουθη επανασύσταση του δείγματος. Επιπλέον, μερικές μέθοδοι επωφελούνται από τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ως τεχνικής προσυγκέντρωσης και προετοιμασίας του δείγματος. Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφούν αντιπροσωπευτικά, κάποιες βιβλιογραφικές πηγές, οι οποίες παρουσιάζουν μεθόδους προσδιορισμού πενικιλινών σε ανθρώπινο ορό αίματος και περιλαμβάνουν κάποιες από τις ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα εργασία. Έμφαση δίνεται κυρίως στην τεχνική προκατεργασίας δείγματος που χρησιμοποιείται στην κάθε βιβλιογραφική πηγή και συνεπώς στην περιγραφόμενη μέθοδο προκατεργασίας δείγματος. Οι εργασίες αυτές που αναφέρονται περιληπτικά, παρουσιάζονται και στον πίνακα 14.1, συγκριτικά με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε από την εργασία αυτή.

Το 2010 παρουσιάστηκε μια επικυρωμένη μέθοδος HPLC-DAD προσδιορισμού 12 αντιβιοτικών ενώσεων β-λακτάμης σε 200  $\mu$ L ανθρώπινου ορού αίματος. Μεταξύ των αντιβιοτικών ενώσεων ήταν και διάφορες πενικιλίνες, όπως η Βενζυλοπενικιλίνη, η Δικλοξακιλίνη, η Αμπικιλίνη, η Φλουκλοξακιλίνη, η Πιπερακιλίνη και η Τιρκακιλίνη. Υπήρχε μια κοινή προσέγγιση προετοιμασίας δείγματος που περιελάμβανε καθίζηση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και την απομάκρυνση των



λιποδιαλυτών συστατικών με πλύση με χλωροφόρμιο. Για κάθε δείγμα, 200  $\mu\text{L}$  ορού αίματος αναμίχθηκαν σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης πολυπροπυλενίου 1,8 mL με 100  $\mu\text{L}$  εσωτερικού προτύπου και 600  $\mu\text{L}$  ακετονιτριλίου για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Το δείγμα αυτό στροβιλίστηκε για 30 s με συσκευή vortex. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρωση για 5 min σε 14.000 x g. Το υπερκείμενο υγρό, μεταγγίζεται σε άλλο φιαλίδιο πολυπροπυλενίου, στο οποίο προστέθηκαν 600  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου. Ακολουθήθηκε και πάλι στροβιλισμός για 30 s, για να εκχυλιστούν από το ακετονιτρίλιο στην οργανική φάση του χλωροφορμίου τα λιποδιαλυτά συστατικά του πλάσματος και στη συνέχεια έλαβε χώρα φυγοκέντρωση για 5 min σε 1700 x g για να διαχωριστούν οι στιβάδες. Ένα κλάσμα (100  $\mu\text{L}$ ) της ανώτερης υδατικής φάσης μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο για χρωματογραφική ανάλυση. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, σε αναλυτική στήλη Waters X-bridge  $\text{C}_{18}$  (30 mm  $\times$  4,6 mm, 2,5  $\mu\text{m}$  silica). Η ανίχνευση έγινε στα 210, 260 και 304 nm. Η επικύρωση έδειξε ότι η μέθοδος εμφανίζει ικανοποιητική γραμμικότητα, είναι ακριβής και επαναλήψιμη. Το όριο ποιοτικής ανίχνευσης ήταν 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε εργαστήριο παθολογίας για την παρακολούθηση θεραπευτικών φαρμάκων (TDM) των  $\beta$ -λακταμών, σε ασθενείς στη ΜΕΘ. [14]

Σε μια άλλη μελέτη το 2014, παρουσιάζεται μια μέθοδος προσδιορισμού πενικιλινών και άλλων αντιβιοτικών  $\beta$ -λακτάμης σε ανθρώπινο ορό αίματος, η οποία στηρίζεται στη χρωματογραφική τεχνική LC-MS/MS (υγρή χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μαζών). Σε αυτή την έρευνα, οι μελετούμενες πενικιλίνες είναι η Πιπερακιλίνη, Βενζυλοπενικιλίνη, η Φλουκλοξακιλίνη και η Δικλοξακιλίνη. Η προκατεργασία των δειγμάτων περιλαμβάνει καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο που περιέχει 0,1% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, προστέθηκαν 15  $\mu\text{L}$  εσωτερικού προτύπου Φλουκοναζόλης (Fluconazole) συγκέντρωσης 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σε κάθε πρότυπο των 300  $\mu\text{L}$  και τα δείγματα ελέγχου ποιότητας τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 mL και στη συνέχεια στροβιλίστηκαν με vortex για 20 s. Οι πρωτεΐνες κατόπιν καταβυθίστηκαν προσθέτοντας 600  $\mu\text{L}$  ακετονιτριλίου που περιείχε 0,1% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος. Το μίγμα αυτό στροβιλίστηκε με vortex για 30 s. Ο τελικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε με φυγοκέντρωση στα 12.000  $\times$  g για 6 min στους 4°C. Έπειτα, 400  $\mu\text{L}$  του καθαρού υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε άλλο φιαλίδιο των 1,5 mL και αραιώθηκαν σε αναλογία όγκων 1:1 με 400  $\mu\text{L}$  νερού που περιείχε 0,1% μυρμηκικό οξύ. Μετά από vortex για 20 s, 300  $\mu\text{L}$  μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη για να λάβει χώρα η χρωματογραφική ανάλυση. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης ( $\text{C}_{18}$ , 2,6 mm, 2,1  $\times$  50 mm) με βαθμωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση απιονισμένο νερό και ακετονιτρίλιο, καθένα από τα οποία περιείχε 0,1% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος. Η μέθοδος είναι ακριβής και επαναλήψιμη, με την ακρίβεια να εκφράζεται με

την % σχετική ανάκτηση των ενώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QCs), η οποία μέσα στην ίδια μέρα (intra-day) κυμάνθηκε από 95 έως 107% και σε διάστημα πέντε διαφορετικών ημερών (inter-day) κυμάνθηκε από 95 έως 108%. Η επαναληψιμότητα, εκφρασμένη με το συντελεστή διακύμανσης RSD% κυμάνθηκε από 4 έως 12% για την ίδια μέρα (intra-day) και από 5 έως 14% για πέντε διαφορετικές μέρες (inter-day). Το όριο ποιοτικού προσδιορισμού LOD ήταν 0,1 µg/mL για κάθε αντιβιοτικό εκτός από την Φλουκλοξακιλίνη (0,25 µg / mL). Οι ενώσεις ήταν σταθερές σε τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης. Αυτή η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας διαδοχικής φασματομετρίας μάζας αποδείχθηκε εφαρμόσιμη για την παρακολούθηση θεραπευτικών φαρμάκων και φαρμακοκινητικών μελετών των επιλεγμένων αντιβιοτικών β-λακτάμης.[15]

Το 2011, από μια άλλη ομάδα ερευνητών, δημοσιεύτηκε μια εργασία που περιέγραφε μια ταχεία μέθοδο HPLC-DAD για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 12 αντιβιοτικών β-λακτάμης σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος. Μεταξύ των 12 ενώσεων, περιλαμβάνονταν ορισμένες πενικιλίνες και πιο συγκεκριμένα η Αμοξικιλίνη, η Κλοξακιλίνη, η Οξακιλίνη, η Βενζυλοπενικιλίνη, η Πιπερακιλίνη και η Τικαρκιλίνη. Η εκχύλιση των ενώσεων από τον ορό αίματος έγινε με βάση την καταβύθιση των πρωτεϊνών και την εν συνεχεία προσθήκη ακετονιτριλίου, προκειμένου να ακολουθήσει η κλασική εκχύλιση υγρού-υγρού. Αναλυτικότερα, κατά το στάδιο προκατεργασίας του δείγματος και για τη διαδικασία της εκχύλισης, 200 µL απιονισμένου νερού και 700 µL ακετονιτριλίου αναμίχθηκαν με 100 µL ορού αίματος. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα στροβιλίστηκε με vortex και φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα  $3.000 \times g$  για 10 min στους 4 ° C. Έπειτα 100 µL του υπερκείμενου διαλύματος αραιώθηκαν με 900 µL νερού. Με τη χρήση σύριγγας, 20 µL από το τελικό διάλυμα εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC-DAD. Η ανίχνευση των ενώσεων έγινε στα 210 nm, στα 230 nm, ή στα 298 nm. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε ακριβής και επαναλήψιμη με συντελεστή διακύμανσης μικρότερο από 8%. Το όριο ανίχνευσης LOD ήταν 2 µg/mL. Οι μέσες τιμές ανάκτησης ήταν μεγαλύτερες από 90% για τις διάφορες ενώσεις. Η μέθοδος περιγράφεται ως εύκολη στη χρήση, επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιβιοτικών β-λακτάμης και συνεπώς των πενικιλινών από 5 έως 250 µg/mL, χωρίς παρεμπόδιση από άλλα κοινά φάρμακα. Αυτή η τεχνική είναι χρήσιμη στην τακτική θεραπευτικής παρακολούθησης φαρμάκων και αντιβιοτικών.[16]

Επίσης το 2011 καταγράφηκε μια ακόμη εργασία, όπου περιγραφόταν μια μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό οκτώ αντιβιοτικών β-λακτάμης, μεταξύ αυτών και ενώσεων πενικιλίνης, συμπεριλαμβανομένης της Αμπικιλίνης και της Πιπερακιλίνης, σε ανθρώπινο ορό αίματος, στηριζόμενη αυτή τη φορά στη χρωματογραφική τεχνική LC-MS/MS. Η προκατεργασία δείγματος στηρίχθηκε στην τεχνική της SPE. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με SPE, χρησιμοποιώντας μικροστήλη HLB Waters Oasis® (30 mg). Εν συντομία, 50 µL ορού προστίθενται σε 20 µL διαλύματος ισοπροπανόλης (10 µg/mL σε μεθανόλη) και 280 µL μυρμηκικού αμμωνίου

συγκέντρωσης 10 mM και το μίγμα στροβιλίζεται με vortex για 20 s. Τα δείγματα στη συνέχεια φορτώθηκαν στη μικροστήλη, η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 1 mL μεθανόλη και εν συνεχεία 1 mL νερό. Ακολούθως πλύθηκε με 1 mL διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο και στη συνέχεια έλαβε χώρα η έκλουση με 1 mL μεθανόλη. Το έκλουσμα εξατμίζεται υπό ρεύμα αζώτου στους 50 °C. Το υπόλειμμα ανασυστάθηκε με 200 μL μίγματος μυρμηκικού αμμωνίου και μεθανόλης σε αναλογία 95:5 v/v και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο μικρού όγκου. Όλα τα δείγματα ορού αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 10 min στους 4 ° C. Στη συνέχεια καταψύχθηκαν στους -70 ° C μέχρι την ανάλυση. Η μέθοδος επικυρώθηκε και βρέθηκε πως η γραμμικότητα ήταν ικανοποιητική, σε ένα εύρος από 0.1-50 μg/mL. Το LOD και το LOQ κάθε ένωσης κυμαίνονταν από 0,001 έως 0,1 μg/mL και από 0,005 έως 0,5 μg/mL αντίστοιχα. Η μέθοδος θεωρήθηκε ακριβής και επαναλήψιμη. Οι τιμές RSD% εντός της ίδιας ημέρας κυμαινόταν από 1,1 έως 14,3% και οι μέσες τιμές ανάκτησης κυμαίνονταν από 86,4 έως 106,3%. Οι τιμές RSD% σε μετρήσεις διαφορετικών ημερών και η μέση ακρίβεια κυμάνθηκαν από 3,7% έως 14,8% και από 90,0% έως 112,3% αντίστοιχα. Τελικά και η παρούσα μέθοδος είναι εφαρμόσιμη στην τακτική θεραπευτική παρακολούθηση των αντιβιοτικών β-λακτάμης και των πενικιλινών.[17]

Τέλος, από το εργαστήριό μας αναπτύχθηκε, επικυρώθηκε και παρουσιάστηκε το 2006 μια ποσοτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης, της αμοξικιλίνης (AMO), της οξακιλίνης (OXA), της κλοξακιλίνης (CLO) και της δικλοξακιλίνης (DICLO) σε βιολογικά ανθρώπινα υγρά. Η εκλεκτική εκχύλιση των ενώσεων από το βιολογικό υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SPE. Η βέλτιστη ανάκτηση επιτεύχθηκε με μικροστήλη RP-Adsorbex (Merck), η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί διαδοχικά με 2 mL μεθανόλης και 2 mL νερού. Μετά τη φόρτωση του δείγματος, τα αντιβιοτικά πενικιλίνης εκλούστηκαν με 2 mL μεθανόλης. Τα εκλούσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα N<sub>2</sub> στους 30 ° C. Τα ξηρά υπολείμματα ανασυστάθηκαν με μεθανόλη. Πριν από την SPE, τα βιολογικά υγρά υποβλήθηκαν σε διαδικασία απομάκρυνσης των πρωτεϊνών. Για την καταβύθιση των πρωτεϊνών, ποσότητα 500 μL ACN προστέθηκε σε κλάσματα 50 μL ορού αίματος ή ολικού αίματος που περιείχαν 100 μL νερού στην περίπτωση των λευκών δειγμάτων ή πρότυπο υδατικό μίγμα των ενώσεων ποσότητας 100 μL (σε πέντε επίπεδα συγκέντρωσης 1, 2, 4, 5 και 6 ng/μL) στην περίπτωση των εμβολιασμένων δειγμάτων. Μετά από φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm, το υπερκείμενο αραιώθηκε με νερό και στη συνέχεια φορτώθηκε στην ενεργοποιημένη μικροστήλη. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη Inertsil ODS-3 (250 × 4 mm, 5 μm). Χρησιμοποιήθηκε σαλικυλικό οξύ (5 ng/μL) ως εσωτερικό πρότυπο. Η αναπτυχθείσα μέθοδος επικυρώθηκε πλήρως ως προς την επιλεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, τη σταθερότητα και την ευαισθησία. Η γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς κρίθηκε πολύ καλή με τις τιμές των γραμμικών

συντελεστών συσχέτισης να είναι μεγαλύτερες από 0.990. Το όριο ανίχνευσης LOD της μεθόδου εκτιμήθηκε ως 3,3 ng/μL για τις AMO, OXA και CLO και 6,6 ng/μL για τη DICLO. Η ακρίβεια εκτιμήθηκε με βάση το ποσοστό ανάκτησης των πενικιλινών, με οκτώ προσδιορισμούς σε δείγματα που έχουν εμβολιαστεί σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Όλα τα αποτελέσματα κυμαίνονταν μεταξύ 90,3 έως 102,8%. Η επαναληψιμότητα για μετρήσεις της ίδιας μέρας (intra-day) αξιολογήθηκε με βάση τις τιμές RSD% τριών προσδιορισμών σε δείγματα που εμβολιαστεί σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Οι τιμές RSD% για τις τέσσερις πενικιλίνες ήταν χαμηλότερες από 5,4%. Η επαναληψιμότητα για μετρήσεις διαφορετικών ημερών (inter-day precision), εκτιμήθηκε και πάλι με βάση τις τιμές RSD%, οι οποίες και σε αυτή την περίπτωση ήταν χαμηλότερες από 8%. Η εκλεκτικότητα εκτιμήθηκε με την απουσία παρεμβολής στους ίδιους χρόνους συγκράτησης με τις εξεταζόμενες πενικιλίνες. Τέλος, τα δείγματα κρίθηκαν σταθερά για τρεις συνεχόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αξιολογήθηκε μετά από 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και 24 ώρες αποθήκευσης. Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα αξιολογήθηκε μετά από 1, 1,5 και 2 μήνες αποθήκευσης σε καταψύκτη στους -18°C. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε εμπορικά διαθέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν AMO και σε βιολογικά υποστρώματα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης σε βιολογικά δείγματα μετά την από του στόματος χορήγηση AMO, όπου το φάρμακο ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε επιτυχώς. Η ανίχνευση με PDA και η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε στα 240 nm.[63]

Σε όλες τις περιγραφόμενες μεθόδους, το στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών πριν την εκχύλιση αποτελεί αναπόσπαστο και αναμφισβήτητο κομμάτι της διαδικασίας προκατεργασίας του δείγματος. Όπως θα αποδειχθεί στη συνέχεια, η μέθοδος που αναπτύχθηκε και παρουσιάζεται από αυτήν την εργασία δεν περιλαμβάνει το στάδιο αυτό κάτι που είναι πολύ σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς σημαίνει εξοικονόμηση χρόνου και μείωση του κόστους, δίνοντας ωστόσο αποτελέσματα αναφορικά με τις αναλυτικές παραμέτρους και την επικύρωση της μεθόδου απολύτως συγκρίσιμα με τις παραπάνω μεθόδους, έχοντας και ακόμη ένα πλεονέκτημα, αυτό της εναρμόνισης με τις αρχές τις πράσινης αναλυτικής χημείας.

## **7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με αντικειμενικό σκοπό την ανάπτυξη μιας καινοτόμου, «πράσινης» μεθόδου προκατεργασίας δείγματος, στηριζόμενη στην τεχνική της Fabric Phase Sorptive Extraction, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης σε ορό ανθρωπίνου αίματος, χρησιμοποιώντας την χρωματογραφική τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (photodiode array detector, DAD).

Οι τέσσερις πενικιλίνες, η βενζυλοπενικιλίνη, η δικλοξακιλίνη, η κλοξακιλίνη και η οξακιλίνη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης παρακολουθούνταν σε μήκος κύματος 265 nm, ενώ η ανίχνευση, η διάκριση, η ποσοτικοποίηση και ο υπολογισμός του εμβαδού των κορυφών πραγματοποιήθηκαν στα 290 nm για τη βενζυλοπενικιλίνη και στα 240 nm για τη δικλοξακιλίνη, την κλοξακιλίνη και την οξακιλίνη. Ως κινητή φάση, χρησιμοποιήθηκε βαθμωτή έκλυση με ακετονιτρίλιο και υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 0.05M. Ο ολικός χρόνος ανάλυσης ήταν τα 7,8 min, γι' αυτό και μπορεί να χαρακτηριστεί ως ταχεία μέθοδος ανάλυσης.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα που παρασκευάστηκαν, όπως θα περιγράφει στη συνέχεια από αίμα υγιούς ασθενούς, ο οποίος δε λάμβανε κάποια φαρμακευτική συνταγή ή δεν ακολουθούσε κάποιου είδους θεραπεία. Ως μέσο FPSE, επιλέχθηκε ανάμεσα σε άλλα με βάση πειραματικά δεδομένα, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο, το υφασμάτινο μέσο κελουλόζης με επίστρωση πολυτετράδροφουρανίου (PTHF), η οποία επιτεύχθηκε με την τεχνολογία sol-gel. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στο πειραματικό σχεδιασμό της βελτιστοποίησης των σταδίων της προκατεργασίας ως προς ένα σημαντικό πλήθος παραγόντων.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη για την επαλήθευση συγκεκριμένου μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης της αποδοτικότητας της εκχύλισης με το μέσο PTHF FPSE. Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, την επαναληψιμότητα και την ανθεκτικότητα με τη μέθοδο Youden.[51-52] Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με ήδη υπάρχουσες μεθόδους προσδιορισμού των εξεταζόμενων ενώσεων ως προς συγκεκριμένες αναλυτικές παραμέτρους.

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **8. ΥΛΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

#### **8.1 Οργανολογία χρωματογραφικού συστήματος HPLC**

- Αντλία LC-10AD της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan).
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i, με βρόχο χωρητικότητας 20  $\mu$ L, (Rheodyne, Cotati, GA, USA).
- Σύστημα ανάμιξης κινητών φάσεων FCV-10AL.
- Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων SPD-M10A.
- Σύστημα ελέγχου συστήματος SCL-10AL.
- Λογισμικό ελέγχου συστήματος Lab Solutions, LC Solution.
- Συσκευή απαέρωσης διαλυτών DGU-10B.
- Αναλυτική στήλη, LiChroCART-LiChrospher®100 RP-18e (5  $\mu$ m, 250 x 4 mm) Merck (Darmstadt, Germany).
- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών.
- Φιάλη Ηλίου και μονάδα απαέρωσης διαλυτών

#### **8.2 Όργανα, συσκευές και αναλώσιμα**

- Γυάλινη συσκευή διήθησης διαλυτών από την Alltech Associates (Deerfield, IL USA).
- Διηθητικοί ηθμοί WHATMAN νιτρικής κυτταρίνης, 0,2  $\mu$ m (Maidstone, England).
- Φίλτρα σύριγγας 13 mm, 0,2  $\mu$ m, Supelco (Bellefonte, PA, USA).
- Αναλυτικός ζυγός SHIMADZU AUX 120, ακρίβειας  $\pm 0,0001$  g.
- Φυγόκεντρος Hermle Z 230 (Gosheim, Germany).
- Συσκευή υπερήχων, Transonic 460/h (Elma, Germany).
- Αναδευτήρας Small Vortexer Glass-col (Terre Haute, USA).
- Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου με εννέα κανάλια ReactiVap (model 18780), Pierce (Rockford, IL, USA).
- Πιπέττες, ISOLAB Laborgerate GmbH (20-200  $\mu$ L).
- Θερμαινόμενος Μαγνητικός Αναδευτήρας Gerhardt (Bonn, Germany).
- Σύστημα καθαρισμού και παραγωγής απιονισμένου νερού Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **8.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες**

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα οποία ήταν όλα αναλυτικώς καθαρά, ήταν τα εξής:

- Μεθανόλη για HPLC, LiChrosolv Merck (Darmstadt, Germany)
- Ακετονιτρίλιο για HPLC, Fisher Scientific (Loughborough, Leicestershire, UK).
- Οξικό αμμώνιο, Merck.
- Νερό υψηλής καθαρότητας από σύστημα καθαρισμού Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Βενζυλοπενικιλίνη (Benzyl Penicillin Procaïn), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Οξακιλίνη, Oxacillin sodium salt Sigma-Aldrich.
- Κλοξακιλίνη, Cloxacillin sodium salt, Sigma-Aldrich.
- Δικλοξακιλίνη, Dicloxacillin sodium salt, Sigma-Aldrich.

### **8.4 Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων**

Ζυγίστηκαν 5 mg από τη βενζυλοπενικιλίνη, την οξακιλίνη (Oxacillin sodium salt), την κλοξακιλίνη (Cloxacillin sodium salt) και τη δικλοξακιλίνη (Dicloxacillin sodium salt) και παρασκευάστηκαν πυκνά υδατικά πρότυπα διαλύματα των 100 ng/μL με διάλυση και αραιώση με απιονισμένο νερό τη ποσότητας που ζυγίστηκε για κάθε ένωση σε φιάλη των 50 mL. Τα πυκνά υδατικά διαλύματα βρέθηκαν να είναι σταθερά για ένα μήνα, όταν φυλάσσονταν στους +4 °C. Τα αραιά υδατικά διαλύματα, προήλθαν από τα πυκνά με τις κατάλληλες αραιώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις, οι οποίες κάλυπταν όλο το εύρος της γραμμικής περιοχής, από 0,5 έως 15 ng/μL. Τα αραιά πρότυπα, παρασκευάζονταν ξανά κάθε πέντε ημέρες από τα πυκνά τους διαλύματα. Καθημερινά πραγματοποιούνταν μετρήσεις για τον έλεγχο των προτύπων και την απόκριση σε σύγκριση με τα αρχικά.

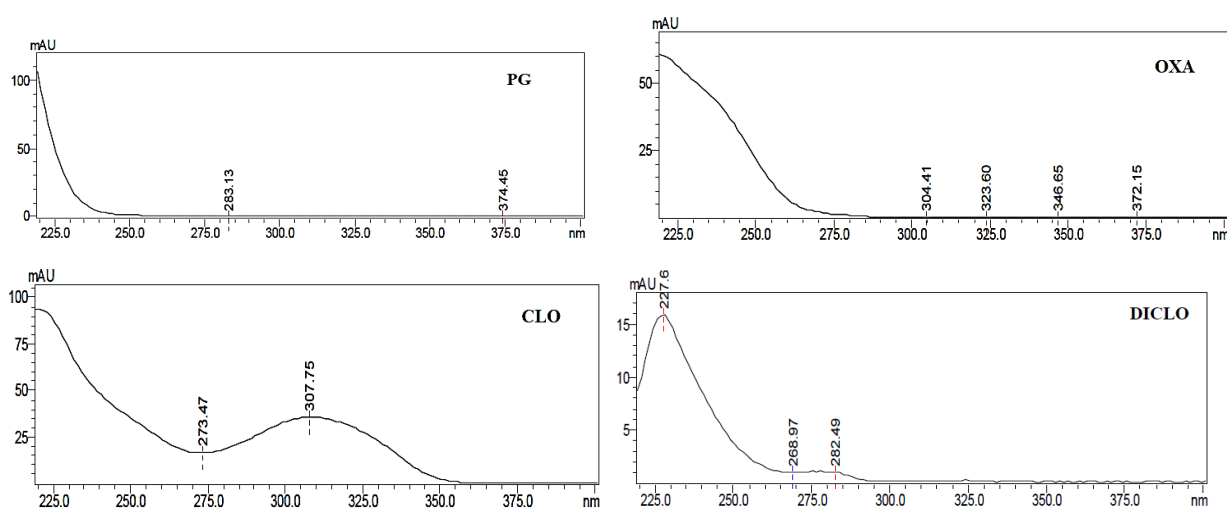
### **8.5 Παρασκευή δειγμάτων ορού αίματος**

Ο χρησιμοποιημένος ορός ανθρώπινου αίματος προπαρασκευάστηκε ως εξής. Αρχικά, το πλήρες αίμα συλλέχθηκε σε ένα καλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα από έναν υγιή εθελοντή που δε λάμβανε κανενός είδους φαρμακευτική αγωγή. Στη συνέχεια, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση για 15 min στις 3500 rpm. Το υπερκείμενο υποκίτρινο υγρό είναι ορός αίματος, ο οποίος κατανέμεται σε μικρά κλάσματα και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -18 °C για να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη μεθόδου. Είναι σημαντικό να αποφεύγονται οι κύκλοι ψύξης-απόψυξης χωρίς προηγούμενη διερεύνηση των επιπτώσεων που μπορεί να επιφέρουν στην ποιότητα των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να είναι επιζήμιο για πολλά συστατικά του

ορού. Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιήθηκε και παρουσιάζεται στη συζήτηση. Τα εμβολιασμένα δείγματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τα κλάσματα ορού αίματος και τα πρότυπα αραιά μίγματα συγκέντρωσης από 0,5 έως 15 ng/μL.

### 8.6 Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης

Ως σύστημα ανίχνευσης στην HPLC χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων. Για την επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος ανίχνευσης, όπου οι πενικιλίνες παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας, ελήφθησαν τα UV φάσματά τους σε υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 5 ng/μL, από τα 190 μέχρι και τα 400 nm. Τα φάσματα απορρόφησης UV ακτινοβολίας δίνονται στο σχήμα 8.1.



**Σχήμα 8.1.:** Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV πρότυπων διαλύματων βενζυλο-πενικιλίνης(PG), οξακιλίνης(OXA), κλοξακιλίνης (CLO), δικλοξακιλίνης(DICLO).

Ως μήκος κύματος παρακολούθησης της χρονικής πορείας του διαχωρισμού κατά τη χρωματογραφική ανάλυση επιλέχθηκαν τα 265 nm, όπου παρατηρήθηκε μεγάλη ένταση του σήματος για τις ενώσεις, ενώ ταυτόχρονα η βασική γραμμή διατηρούνταν σταθερή. Για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικό υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών επιλέχθηκαν τα μήκη κύματος, στα οποία οι προσδιοριζόμενες ενώσεις εμφάνιζαν τις μέγιστες εντάσεις κορυφών. Αυτά ήταν τα 240 nm για την οξακιλίνη, την κλοξακιλίνη και τη δικλοξακιλίνη και τα 290 nm για τη βενζυλοπενικιλίνη.



## 9. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 9.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου

Η επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος και της κατάλληλης στήλης είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την επίτευξη του βέλτιστου διαχωρισμού των ενώσεων, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Και αυτό γιατί η βελτιστοποίηση των παραμέτρων  $N$  (αριθμός θεωρητικών πλακών),  $k'$  (παράγοντας συγκράτησης) και  $\alpha$  (παράγοντας διαχωρισμού), από τις οποίες εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα  $R_s$ , καθορίζεται από την επιλογή της κατάλληλης στήλης και του εκλουστικού συστήματος αντίστοιχα. Η στήλη που επιλέχθηκε, όπως προαναφέρθηκε ήταν η αναλυτική στήλη, LiChroCART-LiChrospher®100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm) της Merck, λόγω προηγούμενης καλής απόδοσης σε πενικιλίνες με στήλη αυτού του τύπου. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η λειτουργία της στήλης έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Με βάση τη βιβλιογραφία, τα υδατικά διαλύματα των ενώσεων, PENG, OXA, CLO και DICLO είναι σταθερά και δεν επηρεάζονται από την οξύτητα του διαλυτικού μέσου. Έτσι, αρχικά έγιναν δοκιμές με το δυαδικό εκλουστικό σύστημα υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,05M (pH=7,0)/ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη ή συνδυασμό και των δύο αυτών οργανικών διαλυτών, με βαθμωτή έκλουση.

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη της μεθανόλης δε βελτιώνει το διαχωρισμό και γι' αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκε τελικά ως οργανικός διαλύτης στην κινητή φάση μόνο το ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Όπως προκύπτει από τη χημική τους δομή, οι τέσσερις πενικιλίνες παρουσιάζουν μικρές διαφορές στη δομή τους, με συνέπεια να μη διαχωρίζονται εύκολα, και για το λόγο αυτό να είναι απαραίτητη η χρήση της βαθμωτής έκλουσης.

Έπειτα, δοκιμάστηκε η αντικατάσταση του διαλύματος οξικού αμμωνίου 0,05 M από διάλυμα οξικού οξέος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1%, από υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος  $\text{HCOOH}$  0,1% και από υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος  $\text{CF}_3\text{COOH}$  0,1 % (TFA), με διάφορα προγράμματα βαθμωτής έκλουσης, αλλά και σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά στις κορυφές που ελήφθησαν και στο διαχωρισμό δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά. Έτσι, λοιπόν, η κινητή φάση που επιλέχτηκε ήταν υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,05M (pH=7,0)/ακετονιτρίλιο. Με αυτό το εκλουστικό σύστημα πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές σε διάφορες αναλογίες όγκων και με διάφορα προγράμματα βαθμωτής έκλουσης. Οι ενώσεις εκλύονται με την εξής σειρά: PENG, OXA, CLO και DICLO, δηλαδή από την περισσότερο πολική στη λιγότερο.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια βελτίωσης του διαχωρισμού των ενώσεων ως προς την παράμετρο του χρόνου, χωρίς όμως να ελαττώνεται η διαχωριστική ικανότητα του συστήματος. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν διάφορα προγράμματα βαθμωτής έκλουσης, αλλάζοντας είτε το χρόνο μεταβολής του ποσοστού του υδατικού διαλύματος οξικού αμμωνίου 0,05M, είτε τη ροή του

εκλουστικού συστήματος, είτε και τους δύο παράγοντες ταυτόχρονα. Το πρόγραμμα, με το οποίο επιτεύχθηκε ο καλύτερος και ταχύτερος διαχωρισμός και τελικά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί δίνεται στον πίνακα 9.1. Ο συνολικός χρόνος έκλουσης και ανάλυσης ήταν 7,8 min. Η δυαδική κινητή φάση αποτελούμενη από οξικό αμμώνιο 0,05 M και ακετονιτρίλιο μεταβλήθηκε από την αρχική αναλογία 80:20 (v/v) στην τελική των 40:60 (v/v) . Για το βέλτιστο διαχωρισμό των ενώσεων και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης, ο ρυθμός ροής ακολουθούσε έναν σταδιακό ρυθμό αύξησης, ξεκινώντας από τα 1.2 mL/min και φθάνοντας μέχρι τα 1.3 mL/min στο έβδομο λεπτό τιμή η οποία παρέμενε σταθερή μέχρι και το τέλος του διαχωρισμού στα 7,8 min. Πριν από την έγχυση του επόμενου δείγματος, η κινητή φάση επανερχόταν στην αρχική σύσταση. Η παρατηρούμενη πίεση κυμάνθηκε από  $190 \times 10^5$  Pa (έναρξη) έως  $115 \times 10^5$  Pa (λήξη). Ο όγκος έγχυσης είναι 20  $\mu$ L. Οι χρόνοι συγκράτησης ήταν 4.976 min για την PENG, 5.738 min για την OXA, 6.169 min για την CLO και 6.733 min για την DICLO. Το μήκος κύματος ρυθμίστηκε στα 265 nm για παρακολούθηση, ενώ η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε στα 290 nm για την PENG και στα 240 nm για OXA, CLO και DICLO.

**Πίνακας 9.1:** Σύσταση της κινητής φάσης και πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης για το βέλτιστο διαχωρισμό των ενώσεων

t (min)	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 0,05M % v/v	CH <sub>3</sub> CN % v/v	Ροή εκλουστικού συστήματος (mL/min)
0,01	80	20	1,2
7,00	-	-	1,3
7,8	40	60	1,3
7,81	80	20	1,2

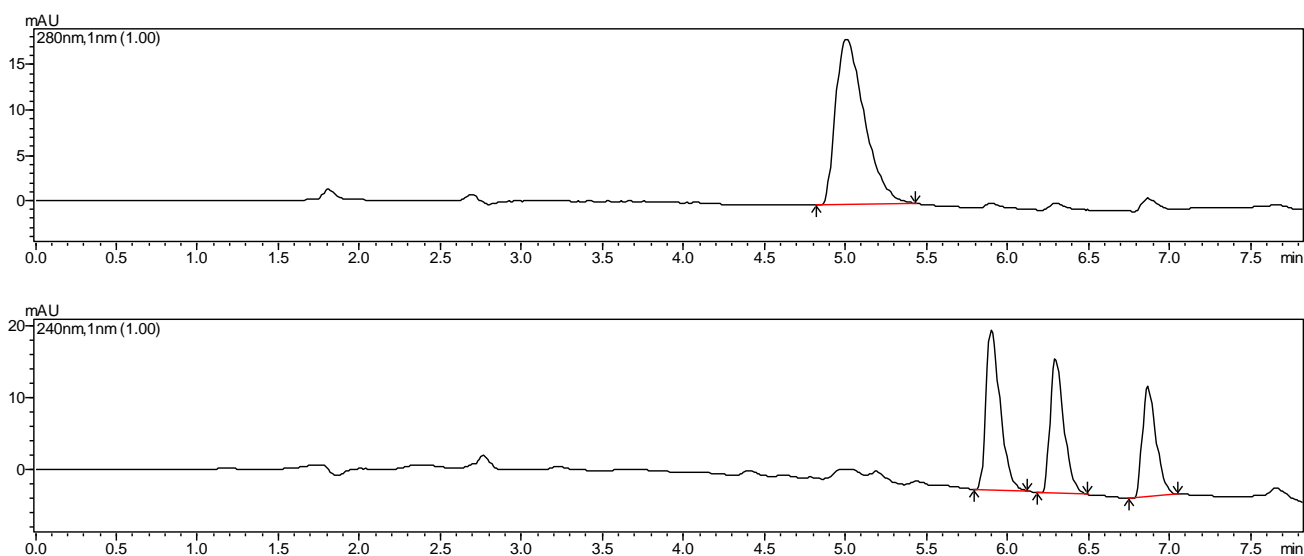
## 9.2 Χρωματογραφικές Συνθήκες

Στον πίνακα 9.1 δίνονται συγκεντρωτικά οι χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου, οι οποίες επιλέχθηκαν τελικά προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των τεσσάρων αντιβιοτικών ενώσεων.

**Πίνακας 9.2:** Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των τεσσάρων πενικιλινών

Στήλη	LiChroCART-LiChrospher®100 RP-18e (5μm, 250×4 mm) Merck
Εκλουστικό σύστημα	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 0,05M (pH=7,00)/ CH <sub>3</sub> CN
Ανιχνευτής	DAD με ανίχνευση σε μήκη κύματος 240 nm και 290 nm
Πίεση	190 × 10 <sup>5</sup> Pa (έναρξη) έως 115 × 10 <sup>5</sup> Pa (λήξη)
Ροή	Από 1.2 mL/min (έναρξη) σε 1.3 mL/min (7 <sup>ο</sup> λεπτό)
Θερμοκρασία Στήλης	περιβάλλοντος
Εισαγόμενος όγκος	20 μL

Στο σχήμα 9.1 δίνεται από ένα τυπικό χρωματογράφημα διαχωρισμού αυτών των ενώσεων σε ένα πρότυπο υδατικό διάλυμά τους, συγκέντρωσης 10 ng/μL στα 290 nm για την PENG και στα 240 nm για την OXA, την CLOXA και την DICLO, ενώ στον πίνακα 9.3 δίνονται οι χρόνοι συγκράτησης των τεσσάρων διαχωριζομένων αντιβιοτικών ενώσεων.



**Σχήμα 9.1:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος των ενώσεων, συγκέντρωσης 10 ng/μL, στα 290 nm (επάνω) για την PENG και στα 240 nm (κάτω) για τις OXA, CLOXA και DICLO.

**Πίνακας 9.3:** Χρόνοι συγκράτησης των τεσσάρων ενώσεων πενικιλίνης

Ένωση	Χρόνος συγκράτησης (min)
PENG	4.976
OXA	5.738
CLOXA	6.169
DICLO	6.733

### 9.3 Υπολογισμός Διαχωριστικής Ικανότητας

Η διαχωριστική ικανότητα R (Resolution) μιας στήλης είναι η ικανότητα που έχει η στήλη να διαχωρίζει δύο ή περισσότερα συστατικά και εκφράζεται στη μονάδα συγκράτησης δια του μέσου εύρους της κορυφής. Ο υπολογισμός της διαχωριστικής ικανότητας των κορυφών των χρωματογραφημάτων γίνεται με βάση τη σχέση:

$$Rs = \frac{(t_2 - t_1)}{0,5 (t_{w1} + t_{w2})}$$

Όπου  $t_1$  και  $t_2$  οι χρόνοι συγκράτησης των συγκρινόμενων κορυφών και  $t_{w1}$  και  $t_{w2}$  τα εύρη των συγκρινόμενων κορυφών εκφρασμένα στη μονάδα του χρόνου. Τα ζεύγη, προέκυψαν από τη σειρά έκλουσης από τη στήλη, σύμφωνα με το βέλτιστο πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.3.

**Πίνακας 9.3.** Διαχωριστική ικανότητα του εκλουστικού συστήματος

Ζεύγη Ενώσεων	Διαχωριστική Ικανότητα, Rs
PENG-OXA	2,0
OXA-CLO	1,5
CLOXA-DICLO	2,0

#### 9.4 Εξισώσεις καμπυλών αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων

Για τη χάραξη καμπυλών αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων που αναφέρονται στην παράγραφο 8.4. πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση το εμβαδόν της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών των ελαχίστων τετραγώνων με τη βοήθεια της μεθόδου της παλινδρόμησης για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι του τύπου  $y = ax+b$ , όπου  $y$  ο μέσος όρος (τριών μετρήσεων) του εμβαδού της κορυφής της κάθε πενικιλίνης και  $x$  η συγκέντρωσή της σε  $ng/mL$ ,  $a$  η κλίση της ευθείας και  $b$  η τεταγμένη επί την αρχή. Ο συντελεστής προσδιορισμού επιλέχθηκε ως μέτρο της γραμμικότητας. Οι τιμές των μεγεθών αυτών, καθώς και των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης δίνονται στον πίνακα 9.4.

**Πίνακας 9.4:** Εξισώσεις Παλινδρόμησης υδατικών προτύπων διαλυμάτων των τεσσάρων πενικιλινών.

Προσδιοριζόμενη Ένωση	Στατιστικά Στοιχεία	$r^2$
PENG	$Y = 24376 X + 12775$	0,9994
OXA	$Y = 25520 X - 1127,4$	0,999
CLOXA	$Y = 13958 X + 6068,7$	0,9993
DICLO	$Y = 14710 X + 418,45$	1

## 10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΟΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ FPSE

### 10.1 Διαδικασία πρακατεργασίας FPSE.

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, οι δεκατέσσερις διαφορετικές μεμβράνες FPSE που δίνονται στον πίνακα 4.3 και θα παρουσιάσουν μαζί με γενικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και τις απόλυτες ανακτήσεις τους στη συνέχεια, διερευνήθηκαν και δοκιμάστηκαν, προκειμένου να διαπιστωθεί ποιο είδος μεμβράνης είναι πιο αποτελεσματικό στην εκχύλιση και στην ακολουθούμενη εκρόφηση των ενώσεων που εξετάζονται. Αυτές οι μεμβράνες κάλυψαν ένα ευρύ φάσμα πολικότητας. Εφαρμόστηκε ακριβώς η ίδια αλληλουχία σταδίων FPSE για να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων χωρίς πιθανότητα εσφαλμένων εκτιμήσεων. Η διαδικασία αφορά υδατικά διαλύματα του πρότυπου μίγματος των τεσσάρων πενικιλινών σε συγκέντρωση 10 ng/μL. Όλα τα πανάκια FPSE κόβονται σε διαστάσεις 1.5 cm × 1 cm συνολικού εμβαδού 1.5 cm<sup>2</sup>. Το πρωτόκολλο FPSE που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα έξι στάδια:

#### Ενεργοποίηση και καθαρισμός FPSE:

- ☞ Σε φιαλίδιο προστίθενται 2 mL διαλύματος ACN/MeOH σε αναλογία όγκων 1:1. Το κάθε υφασμάτινο μέσο FPSE εμβαπτίστηκε στο μίγμα των διαλυτών για 5 min. Με αυτό τον τρόπο καθαρίζεται το μέσο από πιθανά ανεπιθύμητα υπολείμματα ουσιών και ενεργοποιούνται οι επιφανειακές ομάδες.
- ☞ Σε δεύτερο φιαλίδιο προστέθηκαν 2 mL απιονισμένο νερό. Το υφασμάτινο μέσο αφέθηκε στο νερό για 5 min. Κατ' αυτόν τον τρόπο, απομακρύνονται τα υπολείμματα οργανικών διαλυτών και το μέσο είναι έτοιμο για το κύριο στάδιο της διαδικασίας, αυτό της εκχύλισης.



**Σχήμα 9.1:** Στάδιο ενεργοποίησης και καθαρισμού FPSE.

#### Στάδιο εκχύλισης ή πρόσροφησης:

- ☞ Σε τρίτο φιαλίδιο προστέθηκαν 500 μL πρότυπου υδατικού διαλύματος των εξεταζόμενων ενώσεων συγκέντρωσης 10 ng/μL, στο οποίο προστέθηκαν 500 μL απιονισμένου νερού, ώστε ο τελικός όγκος του συγκεκριμένου σταδίου να είναι 1 mL. Το πανάκι εμβαπτίστηκε στο δείγμα

και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα σε μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα η εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μέσω της ανάπτυξης διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και δεσμών.

#### Έκλυση – Εκρόφιση:

☞ Σε τέταρτο φιαλίδιο, προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  ACN. Το ύφασμα αφήνεται στον οργανικό διαλύτη έκλυσης για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, κάθε δοκιμασμένο μέσο FPSE, το οποίο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές χωρίς μείωση της αποτελεσματικότητας προσρόφησης και εκχύλισης, πλένεται με το κατάλληλο σύστημα οργανικού διαλύτη, το οποίο είναι 2 mL διαλύματος ACN/MeOH σε αναλογία όγκων 1:1. Κατόπιν αφήνεται να στεγνώσει και αποθηκεύεται σε γυάλινο αεροστεγές δοχείο.

Στο τέλος κάθε διαδικασίας δοκιμής και ελέγχου της απόδοσης εκχύλισης των μέσων ακολουθεί χρωματογραφική ανάλυση, με τη διαδικασία του περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

### **10.2 Επιλογή του καταλληλότερου μέσου FPSE**

Όπως προαναφέρθηκε, ένας πολύ καθοριστικός παράγοντας της διαδικασίας FPSE είναι οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες εξαρτώνται από την πολικότητα τόσο των αντιβιοτικών πενικιλίνης, όσο και του προσροφητικού υλικού και συνεπώς του μέσου FPSE. Τα στοχευόμενα αντιβιοτικά πενικιλίνης ήταν υψηλής έως μέσης πολικότητας, όπως καθορίστηκαν από τις τιμές  $\log K_{ow}$  τους, οι οποίες είναι 1,83 για βενζυλο-πενικιλίνη, 2,38 για την οξακιλίνη, 2,44 για την κλοξακιλίνη και 2,91 για την δικλοξακιλίνη.[53-54] Συνεπώς, η πολικότητα του προσροφητικού και άρα του μέσου αναμένεται να είναι από μεσαία έως υψηλή.

Ωστόσο, η τελική επιλογή του καταλληλότερου μέσου επικαθορίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, δοκιμάστηκαν 15 διαφορετικά υφασμάτινα μέσα FPSE, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 10.1. Όλες οι επικαλύψεις με προσροφητικό υλικό παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο επικάλυψης sol-gel είτε σε ύφασμα υδρόφιλης κελουλόζης, είτε σε ύφασμα υδρόφοβου πολυεστέρα.

Το καθοριστικό κριτήριο ήταν η απόλυτη ανάκτηση των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης, η οποία υπολογίστηκε με ολοκλήρωση των κορυφών των τεσσάρων ενώσεων κατόπιν της ανωτέρω περιγραφόμενης διαδικασίας FPSE και σύγκρισης του εμβαδού αυτού με το εμβαδόν των κορυφών που προκύπτουν μετά από χρωματογραφική ανάλυση πρότυπου δείγματος των ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/ $\mu\text{L}$ . Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό. Δηλαδή:

$$\text{Απόλυτη ανάκτηση (Absolute recovery)} = 100 \times \frac{\text{εμβαδόν κορυφής μετά από FPSE}}{\text{εμβαδόν κορυφής πρότυπου διαλύματος}}$$

Τα δεδομένα, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 10.1 έδειξαν ότι το PTHF FPSE μέσο με υπόστρωμα ύφασμα υδρόφιλης κελουλόζης, το οποίο είναι μέσο FPSE μέσης πολικότητας, ήταν η κατάλληλη συσκευή μικροεκχύλισης, καθώς απέδωσε τις υψηλότερες τιμές απόλυτης ανάκτησης και για τις τέσσερις ενώσεις. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω διερεύνηση και βελτιστοποίηση της μεθόδου FPSE αναφορικά με τις εξεταζόμενες συνθήκες στην τρέχουσα μελέτη, φυσικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος.

**Πίνακας 10.1:** Μεμβράνες FPSE και απόλυτες ανακτήσεις με πρότυπο μίγμα 10 ng/μL.

Sol-gel Επικάλυψη	Ποσότητα προσροφητικού (mg/cm <sup>2</sup> )	Υφασμάτινο υπόστρωμα	Πολικότητα	Απόλυτη Ανάκτηση Ενώσεων			
				PENG	OXA	CLOXA	DICLO
PDMDPS	5,02	Κελουλόζη	Μη πολικό	9.9	1.2	3.6	4.2
PDMDPS	1,93	Πολυεστέρας	Μη πολικό	0.5	1.1	1.5	1.8
C18	2,4	Κελουλόζη	Μη πολικό	4.9	1.6	3.5	3.8
PDMS	4,56	Κελουλόζη	Μη πολικό	1.3	0.9	2.2	2.2
PDMS	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό	0	1.3	3.5	2.9
<b>PTHF</b>	<b>3,96</b>	<b>Κελουλόζη</b>	<b>Μέτρια πολικό</b>	<b>10.8</b>	<b>39.2</b>	<b>52.2</b>	<b>65.5</b>
PEO-PPO-PEO	5,68	Κελουλόζη	Πολικό	3.1	2.1	7.8	13.4
PEG-PPG-PEG	5,68	Κελουλόζη	Πολικό	7.6	9.4	15.41	25.9
CHITOSAN	Υπό ανάπτυξη	Κελουλόζη	-	2.2	36.7	42.3	58.6
PDPS	-	Κελουλόζη	Μη πολικό	10.9	1.1	2.5	3.7
PDPS	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό	0.6	0.7	1.7	1.6
PCAP-DMS-CAP	6.14	Κελουλόζη	Μη πολικό	7.5	0.8	1.6	3.6
PCAP-DMS-CAP	-	Πολυεστέρας	Μη πολικό	0	0.5	0.7	1.8
C8	2.32	Κελουλόζη	Μη πολικό	12.1	4.9	6.3	5.9
Negatively Charged	-	Κελουλόζη	Πολύ πολικό	1.8	1.6	3.2	3.4

Αυτό το μέσο εκχύλισης FPSE μέσης πολικότητας, έχει χρησιμοποιηθεί επανειλημμένως για την ταυτόχρονη εκχύλιση και προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών, όπως για παράδειγμα:

οιστρογόνα από το έδαφος και το νερό ποταμού, σε πόσιμο νερό, νοσοκομειακά λύματα και ούρα [55], αλκυλοφαινόλες από τα υπόγεια ύδατα κλπ.[56], οι στεροειδείς ορμόνες, τα ανδρογόνα και τα προγεσταγόνα από τα λύματα των νοσοκομείων, το νερό της βρύσης και τα ούρα [57], τα ιόντα βαρέων μετάλλων από βιομηχανικά ύδατα κ.λπ. [58-59] και μη πτητικά πρόσθετα σε τρόφιμα [60].



## **11. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ FPSE**

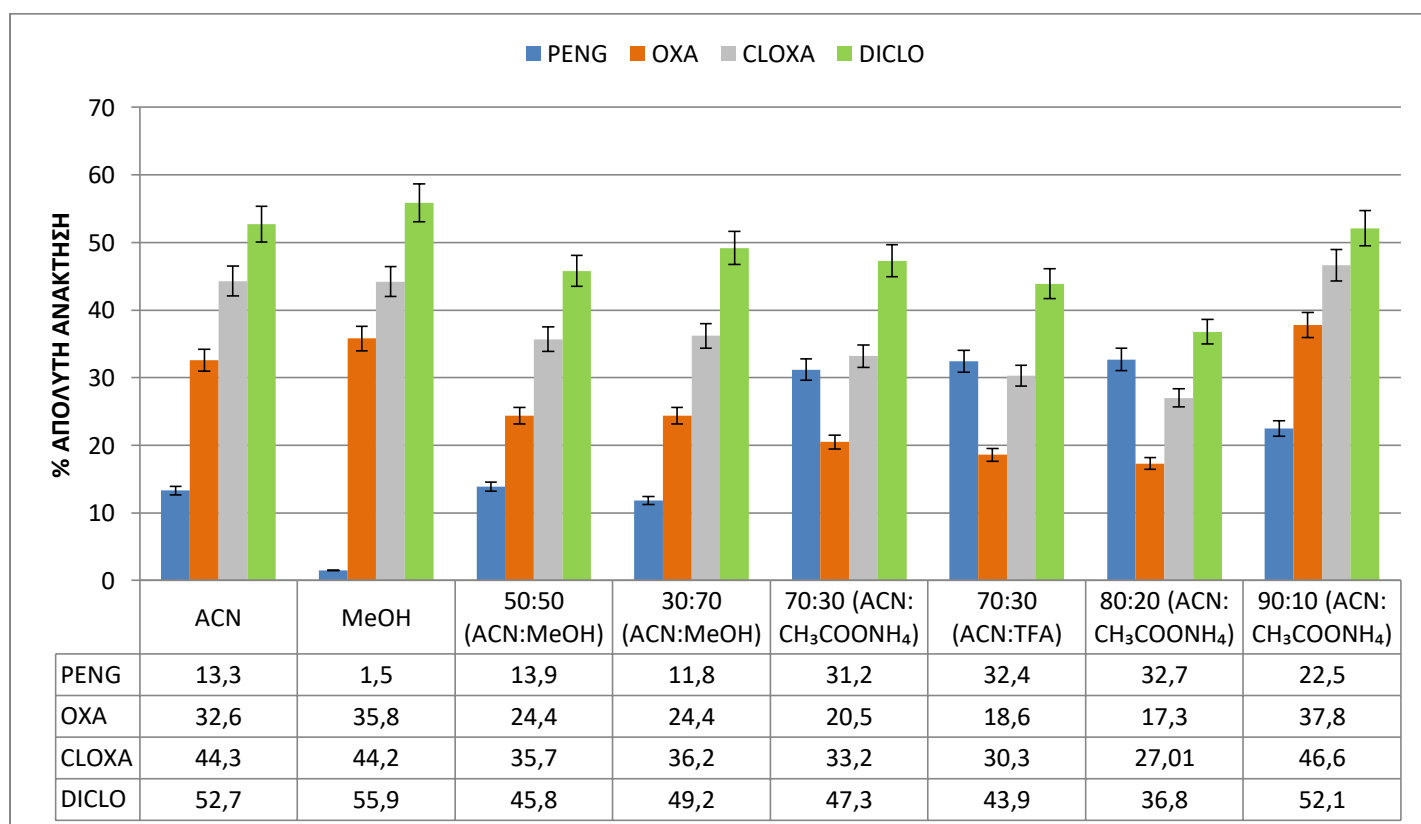
### **11.1 Παράγοντες προς βελτιστοποίηση και διερεύνηση**

Εφόσον η μεμβράνη PTHF έδειξε την καλύτερη ευαισθησία και αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση των τεσσάρων πενικιλινών, όπως αποδείχθηκε εκτιμώντας τις τιμές απόλυτης ανάκτησης, επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση και βελτιστοποίηση. Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του μέσου PTHF FPSE, εκτιμήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένου (α) του διαλύτη εκρόφησης/έκλουσης, (β) του χρόνου έκλουσης, (γ) της εφαρμογής ανάδευσης κατά την έκλυση (δ) το χρόνο εκχύλισης/προσρόφησης, (ε) και την ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Μετά τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών, η μέθοδος προκατεργασίας εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού αίματος, κάτι που περιγράφεται εκτενώς στο κεφάλαιο 12. Να σημειωθεί πως το πρωτόκολλο της διαδικασίας FPSE, το οποίο βελτιστοποιήθηκε και τροποποιήθηκε είναι αυτό που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 10.1. Τα πειράματα βελτιστοποίησης διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας πρότυπο υδατικό μίγμα των μελετώμενων ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/μL.

### **11.2 Επίδραση του διαλύτη έκλουσης / εκρόφησης**

Εξαιτίας των διαφορών πολικότητας μεταξύ των επιλεγμένων αντιβιοτικών πενικιλίνης ( $\log K_{ow}$  1.83-2.91), έπρεπε να διερευνηθεί και με βάση πειραματικά αποτελέσματα να επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης ή το κατάλληλο σύστημα διαλυτών για την έκλυση των ουσιών κατά το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας FPSE. Ως κριτήριο επιλογής χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές απόλυτης ανάκτησης των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, 500 μL διαφόρων διαλυτών ή μιγμάτων διαλυτών, όπως ακετονιτρίλιο (ACN) (σχετική πολικότητα 0,46), μεθανόλη (MeOH) (σχετική πολικότητα 0,762), μίγμα μεθανόλης-ακετονιτριλίου (MeOH:ACN) (50:50 v/v) και άλλοι συνδυασμοί διαλυτών χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση των τεσσάρων επιλεγμένων αντιβιοτικών πενικιλίνης από το μέσο εκχύλισης που επιλέχθηκε. Όλα τα μίγματα που δοκιμάστηκαν και οι προκύπτουσες τιμές ανάκτησης παρουσιάζονται και αναπαριστώνται γραφικά στο σχήμα 11.1. Η PENG φαίνεται να έχει διαφορετική χημική συμπεριφορά από τα άλλα τρία αντιβιοτικά πενικιλίνης. Ένα μίγμα διαλυτών αποτελούμενο από 90% ACN: 10% οξικό αμμώνιο αποδείχθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό κατά μέσο όρο για τις τέσσερις ενώσεις ως εκλουστικό σύστημα από το μέσο

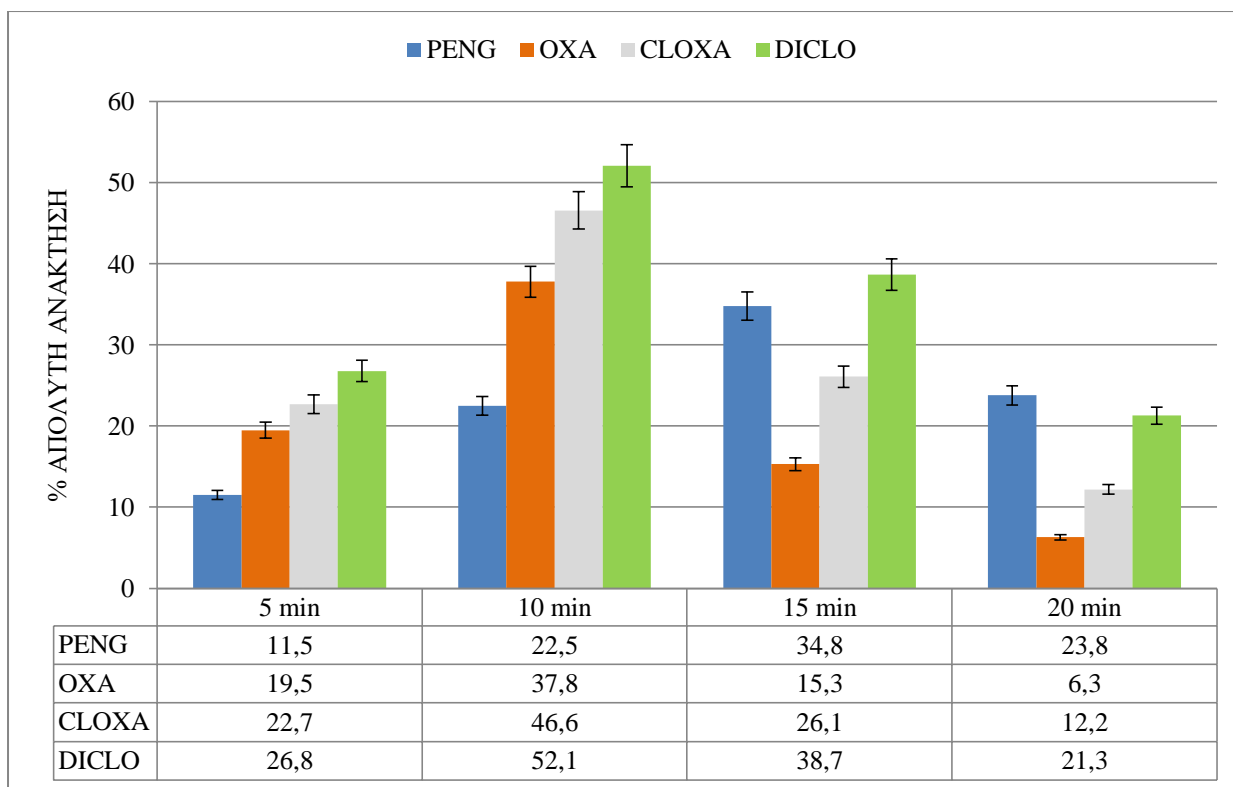
ΡΤΗΗ. Από εδώ και στο εξής, αυτό το σύστημα διαλυτών θεωρείται ως βέλτιστο και για τις τέσσερις ενώσεις ως σύνολο και χρησιμοποιείται για έκλυση σε όλα τα επακόλουθα πειράματα.



*Σχήμα 11.1: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης ως προς το διαλύτη έκλυσης*

### **11.3 Βελτιστοποίηση του χρόνου έκλυσης / εκρόφησης**

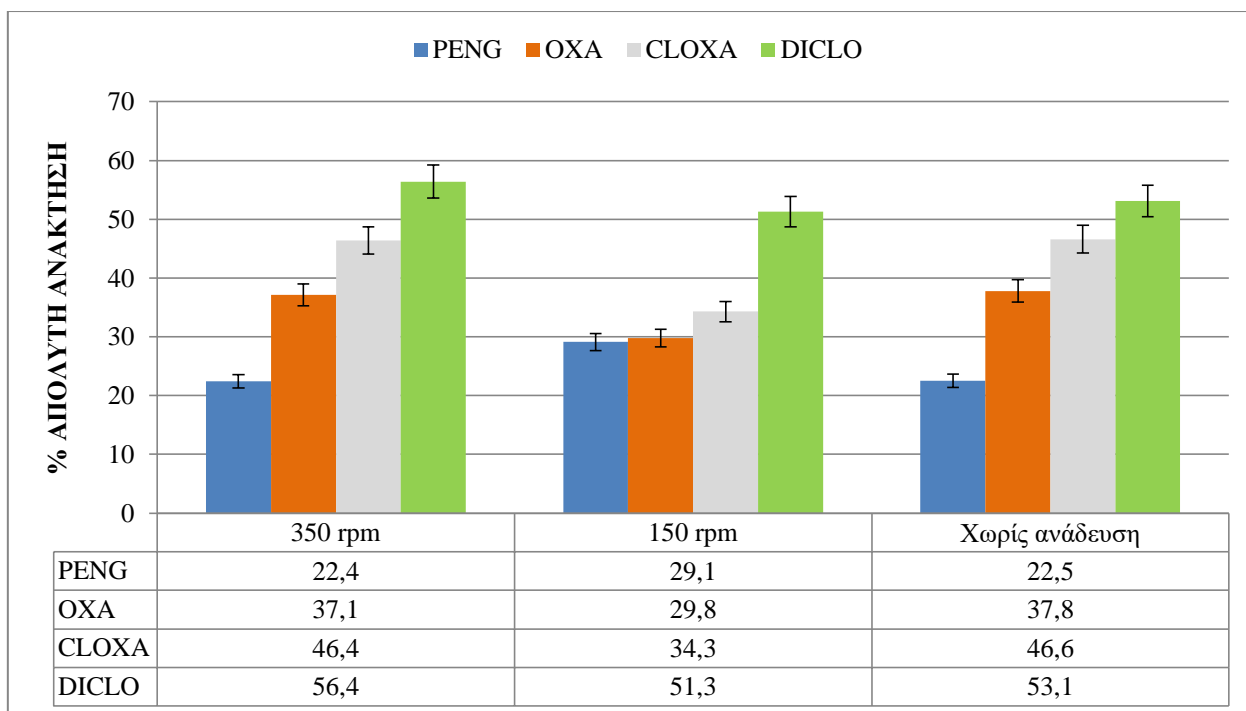
Τέσσερις χρόνοι εκλυσης, τα 5 min, τα 10 min, τα 15 min και τα 20 min διερευνήθηκαν με το επιλεγθέν μίγμα. Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 11.2, ο χρόνος έκλυσης των 10 min βρέθηκε να αποδίδει κατά μέσον όρο τη μέγιστη ανάκτηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από τη μεμβράνη FPSE και χρησιμοποιήθηκε ως ο βέλτιστος χρόνος εκρόφησης σε όλα τα επακόλουθα πειράματα. Να σημειωθεί πως και σε αυτή τη διαδικασία βελτιστοποίησης, η βενζυλοπενικιλίνη παρουσίασε διαφορετική τάση από τις υπόλοιπες τρεις ενώσεις.



*Σχήμα 11.2: Δοκιμές επιλογής του βέλτιστου χρόνου έκλουσης*

#### **11.4 Επίδραση της ανάδευσης κατά την έκλουση / εκρόφιση**

Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών παρουσιάζονται στο σχήμα 11.3 αναφορικά με τις απόλυτες ανακτήσεις των εξεταζόμενων ενώσεων. Όπως φαίνεται, η ανάδευση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έκλουσης αποδείχθηκε ότι δεν έχει κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στις τιμές ανάκτησης, πιθανότατα λόγω του πολύ μικρού όγκου οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, σε συνδυασμό βεβαίως με την ισχυρή τριχοειδή δράση που προκαλείται από το υπόστρωμα του μέσου FPSE. Συμπερασματικά, η μαγνητική ανάδευση κρίθηκε ουσιαστικά μη πρακτική και συνεπώς δε χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της έκλουσης σε όλα τα επακόλουθα πειράματα.



*Σχήμα 11.3: Έλεγχος εφαρμογής ανάδευσης κατά την έκλυση.*

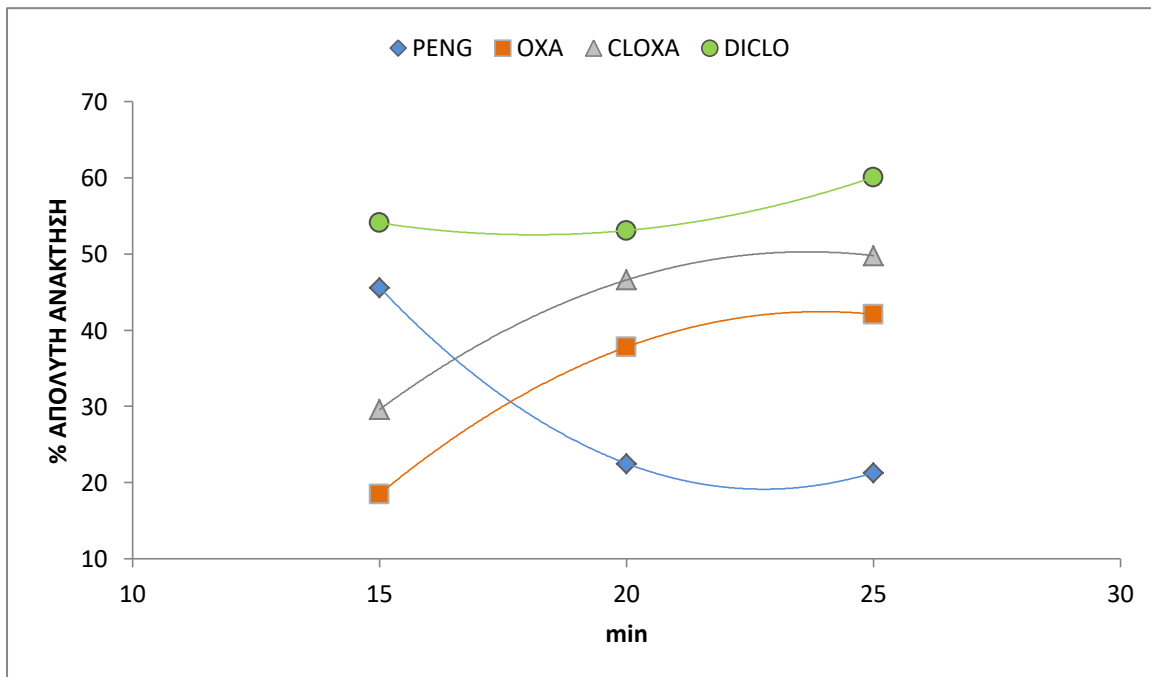
### ***11.5 Βελτιστοποίηση του χρόνου εκχύλισης ισορροπίας υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση***

Ο χρόνος εκχύλισης είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης και συνεπώς την αποδοτικότητα και αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής προκατεργασίας δείγματος. Η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πενικιλίνης διερευνήθηκε για τρία χρονικά διαστήματα, των 15 min, των 20 min και των 25 min. Τα πειραματικά δεδομένα που απεικονίζονται στο σχήμα 11.4 και στον πίνακα 11.1 καταδεικνύουν ότι οι τιμές απόλυτων ανακτήσεων για την οξακιλίνη, την κλοξακιλίνη και τη δικλοξακιλίνη αυξάνονται με αύξηση του χρόνου του σταδίου της εκχύλισης, δηλαδή με αύξηση του χρόνου έκθεσης του μέσου FPSE στο διάλυμα, το οποίο περιέχει τις ενώσεις. Για ακόμη μία φορά, η βένζυλοπενικιλίνη εμφανίζει διαφορετική τάση. Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη, το χρονικό διάστημα των 25 min θεωρήθηκε κατά μέσο όρο ως ο πλέον κατάλληλος χρόνος εκχύλισης και επομένως χρησιμοποιήθηκε κατά τα επόμενα πειράματα.

**Πίνακας 11.1:** Αποτελέσματα τιμών απόλυτων ανακτήσεων μετά από δοκιμές βελτιστοποίησης του χρόνου εκχύλισης

χρόνος (min)	% Απόλυτη Ανάκτηση			
	PENG	OXA	CLOXA	DICLO
15	45,6	18,5	29,6	54,1
20	22,5	37,8	46,6	53,1
25	21,3	42,1	49,8	60,1

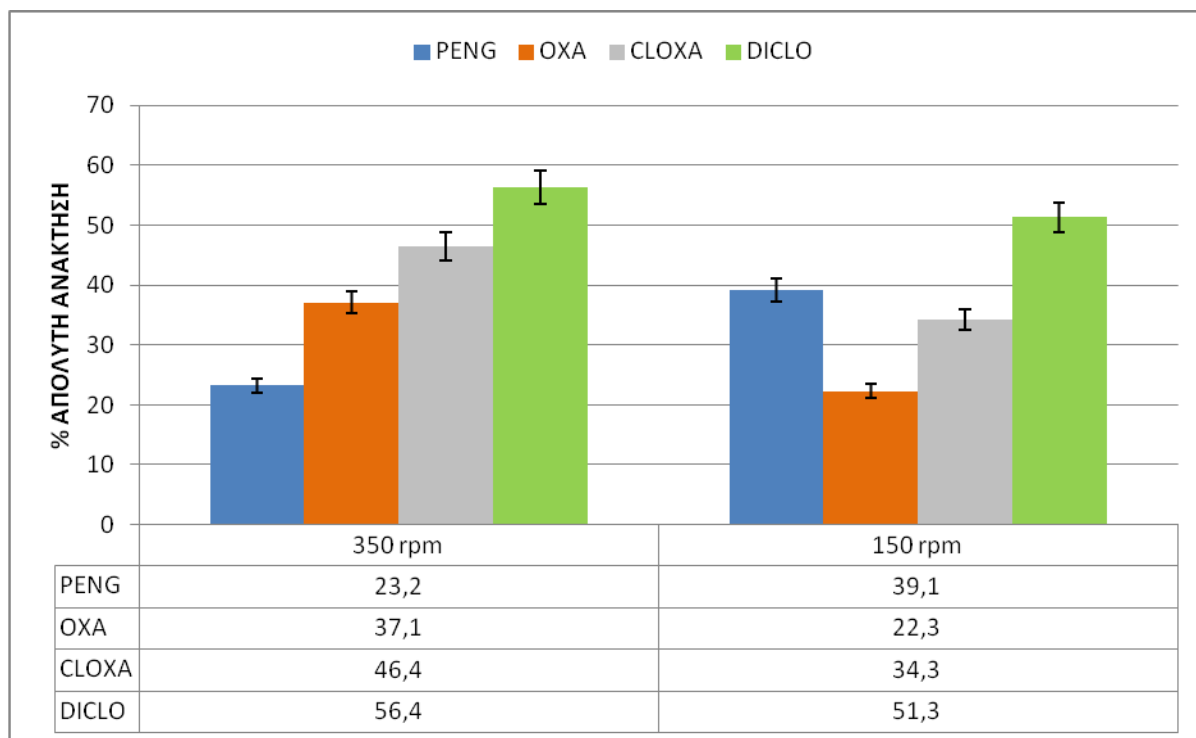
**Σχήμα 11.4:** Διάγραμμα απεικόνισης των δοκιμών βελτιστοποίησης του χρόνου εκχύλισης. Σχέση χρόνου εκχύλισης και τιμών απόλυτων ανακτήσεων των τεσσάρων ενώσεων.



### 11.6 Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης κατά το στάδιο της εκχύλισης υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση

Όπως είναι γνωστό και έχει αναφερθεί στην ενότητα 4, με βάση την κινητική θεωρία της εκχύλισης ισορροπίας, αύξηση της διάχυσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων του δείγματος αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς της μάζας μεταξύ δείγματος και προσροφητικού (υφασμάτινο μέσο PTHF) στη φάση της εκχύλισης και μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο για την επίτευξη ισορροπίας, αυξάνοντας σημαντικά τη συνολική κινητική της εκχύλισης. Επομένως, αναμένεται η υψηλότερη ταχύτητα ανάδευσης να οδηγεί σε υψηλότερες τιμές ανάκτησης και άρα σε καλύτερη και πιο αποδοτική εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Δύο διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης, η πολύ γρήγορη με ταχύτητα 350 rpm και η μέτρια στα 150 rpm, μελετήθηκαν για να προσδιοριστεί η επίδραση της ανάδευσης στην ευαισθησία εκχύλισης. Αποδείχθηκε πως η ευαισθησία εκχύλισης των OXA,

CLOXA και DICLO είναι υψηλότερη, με τη μεγαλύτερη ταχύτητα ανάδευσης. Ωστόσο, η ταχύτητα ανάδευσης είχε την αντίθετη επίδραση στη PENG. Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής παρουσιάζονται στο σχήμα 11.5. Με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα, η ταχύτητα ανάδευσης των 350 rpm επιλέχθηκε ως βέλτιστη.



**Σχήμα 11.5:** Επίδραση ταχύτητας μαγνητικής ανάδευσης

### **11.7 Τελικό βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο προκατεργασίας δείγματος FPSE**

Εν κατακλείδι, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου, όπως αυτό παρουσιάστηκε στην ενότητα 10.1 ως προς συγκεκριμένους παράγοντες που αναμφισβήτητα επιδρούν και καθορίζουν την αποδοτικότητα της μικροεκχύλισης και συνεπώς καθορίζουν όλες τις αναλυτικές παραμέτρους της αναπτυσσόμενης μεθόδου. Αυτοί οι παράγοντες είναι:

(α) το είδος του διαλύτη εκρόφησης/έκλουσης, (β) ο χρόνος έκλουσης, (γ) η εφαρμογή ανάδευσης κατά την έκλουση (δ) ο χρόνος εκχύλισης/προσρόφησης, (ε) και η ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Στον πίνακα 11.2 δίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της διαδικασίας βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου της τεχνικής προκατεργασίας FPSE, σε σύγκριση με το αρχικό πρωτόκολλο, καθώς επίσης και τις αρχικές τιμές των εξεταζόμενων παραμέτρων.

*Πίνακας 11.2: Συγκεντρωτικός πίνακας διαδικασίας βελτιστοποίησης των σταδίων της τεχνικής προκατεργασίας FPSE.*

	<i>Αρχικό Πρωτόκολλο</i>	<i>Εξεταζόμενες παράμετροι</i>	<i>Βελτιστοποιημένο Πρωτόκολλο</i>
<i>Διαλύτης έκλουσης</i>	ACN	8 συστήματα διαλυτών (σχήμα 11.1)	<b>90:10 (v/v) ACN:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub></b>
<i>Χρόνος έκλουσης</i>	10 min	5 min, 10 min, 15 min, 20 min	<b>10 min</b>
<i>Εφαρμογή ανάδευσης κατά την έκλουση</i>	Όχι	Όχι, 150 rpm, 350 rpm	<b>Όχι</b>
<i>Χρόνος εκχύλισης/προσρόφησης</i>	20 min	15 min, 20 min, 25 min	<b>25 min</b>
<i>Ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.</i>	350 rpm	350 rpm, 150 rpm	<b>350 rpm</b>

## **12. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ**

### **12.1. Διαδικασία προκατεργασίας δείγματος ορού ανθρώπινου αίματος με την τεχνική της FPSE**

Τα βήματα της διαδικασίας απορρέουν από το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 10.1, αφού λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα της διαδικασίας βελτιστοποίησης και ενσωματώθηκαν στο αρχικό πρωτόκολλο. Επίσης, λαμβάνει χώρα αντικατάσταση του απιονισμένου νερού με δείγμα ορού αίματος και η συνολική διαδικασία προχωράει ως εξής:

Πριν από τη φάση εκχύλισης, το μέσο PTHF FPSE με επιφάνεια  $1,5 \text{ cm}^2$  στην κάθε πλευρά ( $1,5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ ) εμβαπτίστηκε σε 2 mL διαλύματος ακετονιτριλίου:μεθανόλης (50:50 v/v) για 5 min για να απομακρυνθούν τυχόν ανεπιθύμητα κατάλοιπα που μπορεί να έχουν επικαθίσει στην επιφάνειά του κατά την αποθήκευση των μεμβρανών PTHF FPSE και για να ενεργοποιηθούν. Ο χειρισμός των υφασμάτων γίνεται με τη χρήση καθαρής λαβίδας, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση από την επαφή με τα χέρια ή με μολυσμένη επιφάνεια. Δεν κρίθηκε απαραίτητη η ανακίνηση, η περιδίνηση ή η ανάδευση, καθώς το μίγμα οργανικών διαλυτών μπορεί εύκολα να διαχέεται στην επίστρωση του πορώδους sol-gel προσροφητικού υλικού και στο διαπερατό υπόστρωμα υφάσματος κελουλόζης. Η καθαρή μεμβράνη FPSE στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 2 mL απιονισμένου νερό για άλλα 5 min, για να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα οργανικών διαλυτών.

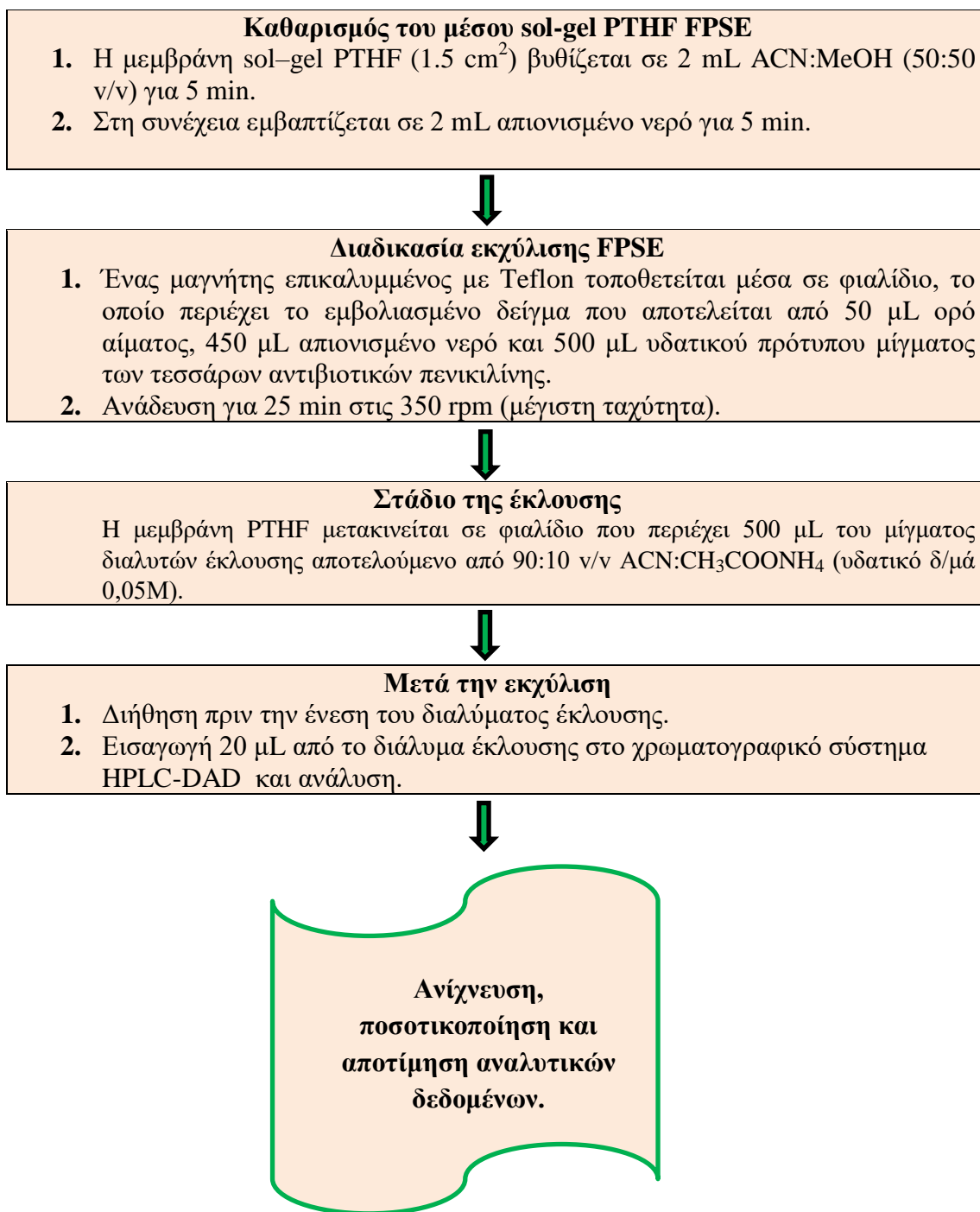
Στη συνέχεια, σε άλλο όμοιο γυάλινο φιαλίδιο μεταφέρονται 50  $\mu\text{L}$  ορού ανθρώπινου αίματος, 450  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού και 500  $\mu\text{L}$  πρότυπου υδατικού διαλύματος που περιείχε τα τέσσερα αντιβιοτικά πενικιλίνης Βενζυλο-πενικιλίνη, Οξακιλίνη, Κλοξακιλίνη και Δικλοξακιλίνη σε συγκέντρωση 10 ng/ $\mu\text{L}$  για την κάθε μία ένωση. Μία μικρή καθαρή μαγνητική ράβδος ανάδευσης επικαλυμμένη με Teflon εισήχθη εντός του φιαλιδίου, το οποίο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα, ο οποίος ρυθμίστηκε στα 350 rpm (υψηλότερη ταχύτητα) για να εξασφαλιστεί η αναγκαία διάχυση των αναλυτών μέσα στο δείγμα για 25 min. Αυτό ήταν το στάδιο της εκχύλισης-προσρόφησης.

Έπειτα, για το στάδιο της έκλουσης, η μεμβράνη PTHF FPSE στην οποία έχουν προσροφηθεί οι προσδιοριζόμενες ενώσεις, εισήχθη σε καθαρό φιαλίδιο με 500  $\mu\text{L}$  μίγματος 90:10 v/v ACN:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> και η έκλουση αφήνεται να διαρκέσει 10 min χωρίς μαγνητική ανάδευση. Τέλος, το έκλουσμα μπορεί να εγχυθεί απευθείας στο σύστημα HPLC για χρωματογραφική ανάλυση. Εάν κριθεί απαραίτητο, το έκλουσμα μπορεί να διηθηθεί πριν από την εισαγωγή στο σύστημα HPLC για να απομακρυνθούν τυχόν σωματιδιακά και στερεά υπολείμματα (πρωτεΐνες).



Εναλλακτικά, για επίτευξη μεγαλύτερου βαθμού προσυγκέντρωσης διοχετεύεται με πιπέτα σε φιαλίδιο Eppendorf και φυγοκεντρείται για 15 min, ενώ σε αυτή την περίπτωση ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και ανασύσταση του δείγματος χρησιμοποιώντας μικρότερο όγκο ακετονιτριλίου (π.χ. 50  $\mu$ L). Όπως αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα των δοκιμών, αυτό το βήμα δεν ήταν απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα και την απόδοση της μεθόδου που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία και επομένως δε συμπεριλήφθηκε στη ροή εργασίας της διαδικασίας προκατεργασίας του δείγματος. Η απόρριψη αυτού του χρονοβόρου βήματος είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα της αναπτυχθείσας μεθόδου, η οποία ταυτόχρονα με αυτό τον τρόπο εξάλειψε τον κίνδυνο απώλειας ποσότητας προσδιοριζόμενων ενώσεων που κρίνεται συνήθως εξαιρετικά πιθανή κατά τη διάρκεια αυτού του επιρρεπούς σε σφάλματα σταδίου.

Εν κατακλείδι, η μεμβράνη FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Μετά το τέλος της διαδικασίας βυθίζεται προκειμένου να πλυθεί για 5 min σε φιαλίδιο, το οποίο περιέχει 2 mL ACN:MeOH (50:50 v/v). Στη συνέχεια, αφήνεται να στεγνώσει σε ύαλο ρολογιού και αποθηκεύεται σε αεροστεγές γυάλινο φιαλίδιο μέχρι την επόμενη χρήση. Στο πλαίσιο των δοκιμών της παρούσας εργασίας, αποδείχτηκε πως η μεμβράνη PTHF FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 35 φορές στην απομόνωση των συγκεκριμένων τεσσάρων πενικιλινών από ανθρώπινο ορό αίματος, χωρίς πιθανότητα επιμόλυνσης και χωρίς εμφανή απώλεια στην αποδοτικότητα της εκχύλισης, με βάση το κριτήριο απώλειας της ανάκτησης 10%. Στο σχήμα 12.1, απεικονίζεται συνοπτικά η διαδικασία FPSE που αναπτύχθηκε.

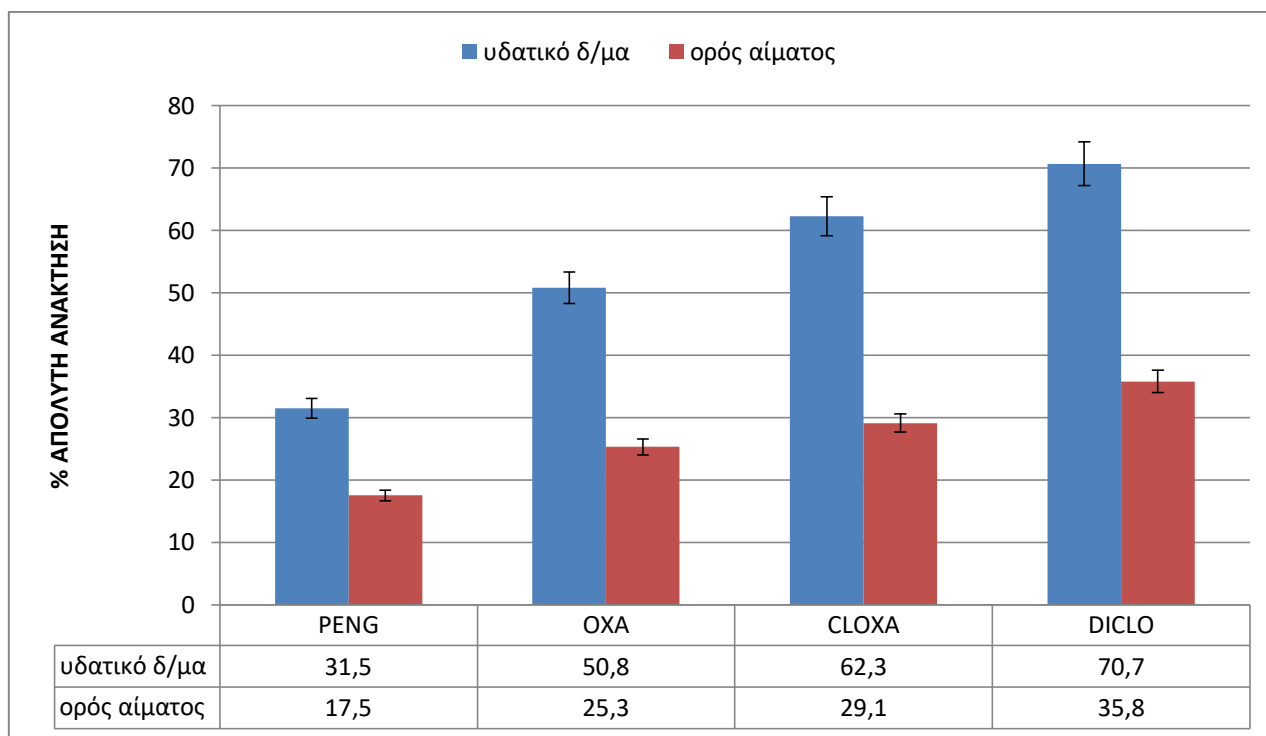


*Σχήμα 12.1: Στάδια διαδικασίας προκατεργασίας δείγματος FPSE*

### **12.2. Αποτελέσματα εφαρμογής της μεθόδου – Επίδραση υποστρώματος**

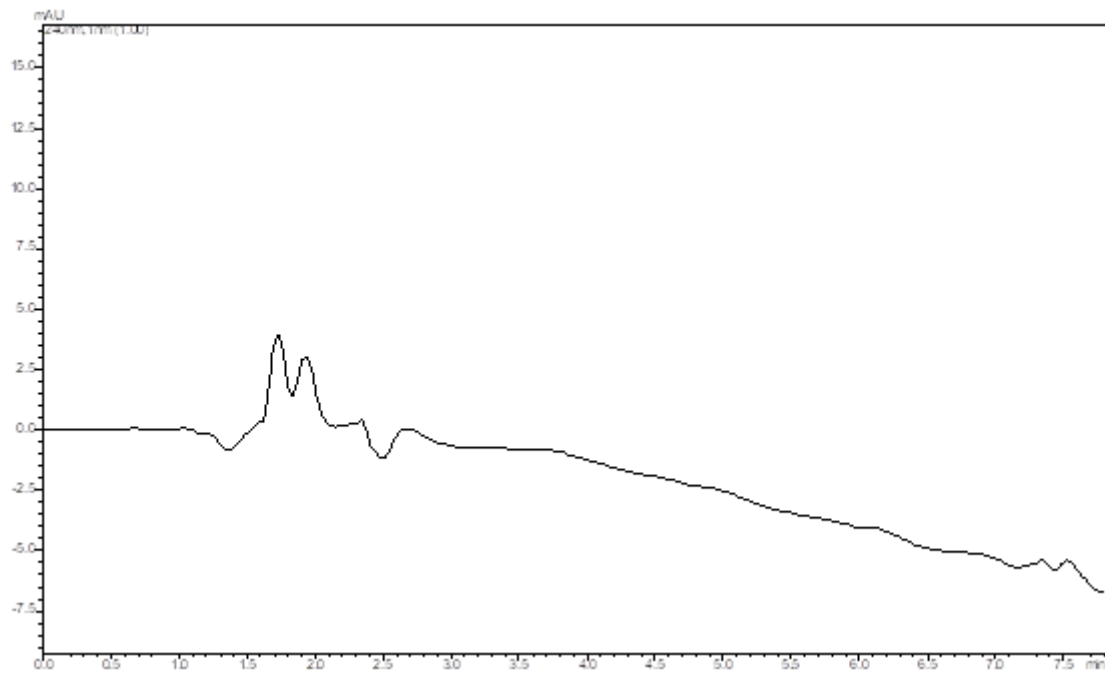
Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος, τα οποία περιλαμβάνουν τις προσδιοριζόμενες ενώσεις σε συγκέντρωση 10 ng/ $\mu\text{L}$  σε σύγκριση με τα στοιχεία από την εφαρμογή της μεθόδου σε υδατικό υπόστρωμα προτύπων, με βάση το κριτήριο των απόλυτων ανακτήσεων φαίνονται στο σχήμα 12.2. Συνεπώς, κατ' αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα να παρατηρηθεί και να εκτιμηθεί και η επίδραση του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα

αποκαλύπτουν την πολυπλοκότητα του ορού αίματος ως υπόστρωμα δείγματος, κάτι που προκαλεί μία απώλεια περίπου 50% των απόλυτων τιμών ανάκτησης σε σύγκριση με τις τιμές που λαμβάνονται από εμβολιασμένο υδατικό διάλυμα.

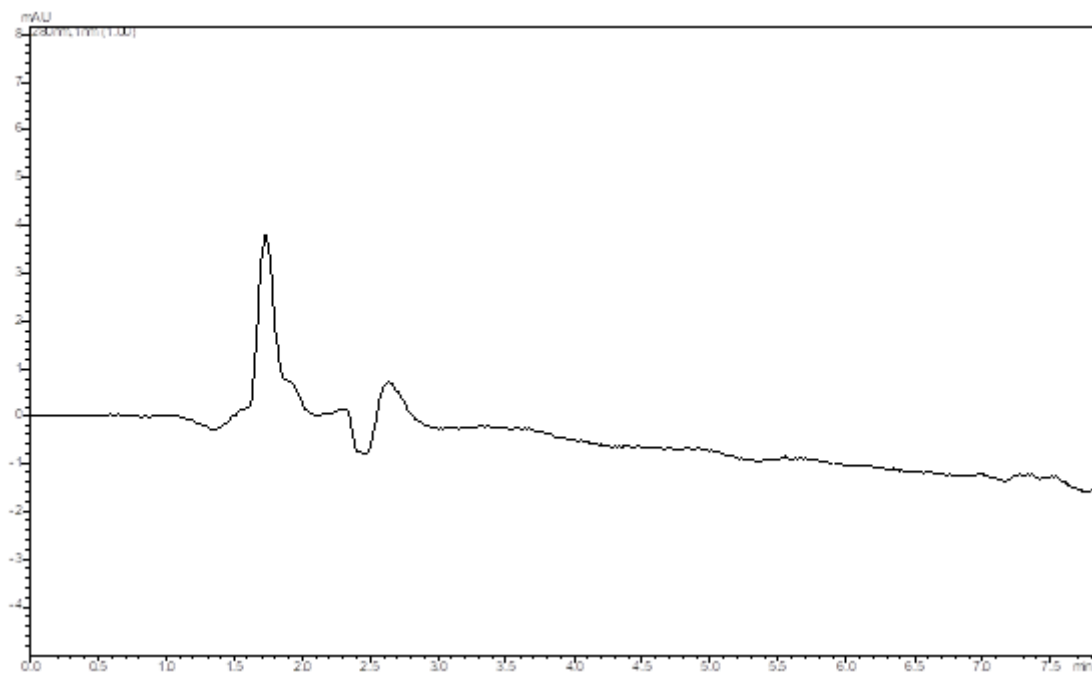


**Σχήμα 12.2:** Εφαρμογή της μεθόδου σε ορό αίματος και επίδραση υποστρώματος στις τιμές των απόλυτων ανακτήσεων των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης.

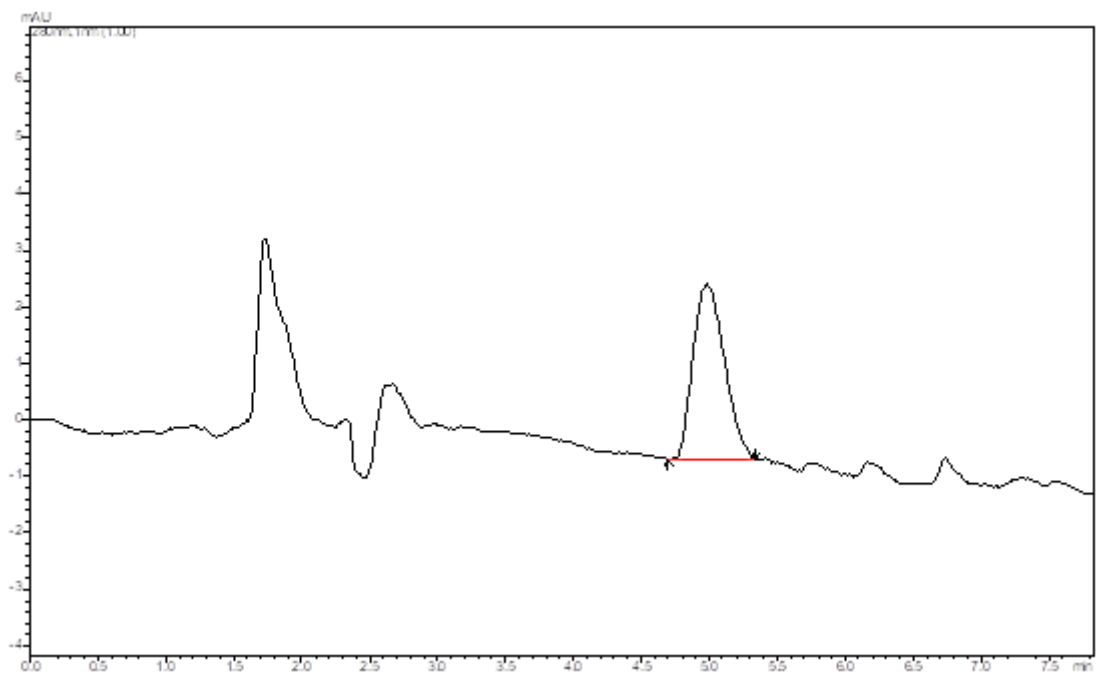
Στα σχήματα 12.2 έως 12.6 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα του λευκού (blank) δείγματος ανθρώπινου ορού αίματος και του εμβολιασμένου δείγματος ορού αίματος με τις τέσσερις ενώσεις, τη βενζυλοπενικιλίνη την οξακιλίνη, την κλοξακιλίνη και τη δικλοξακιλίνη σε συγκέντρωση 10 ng/μL για κάθε ένωση, στα 290 nm και στα 240 nm.



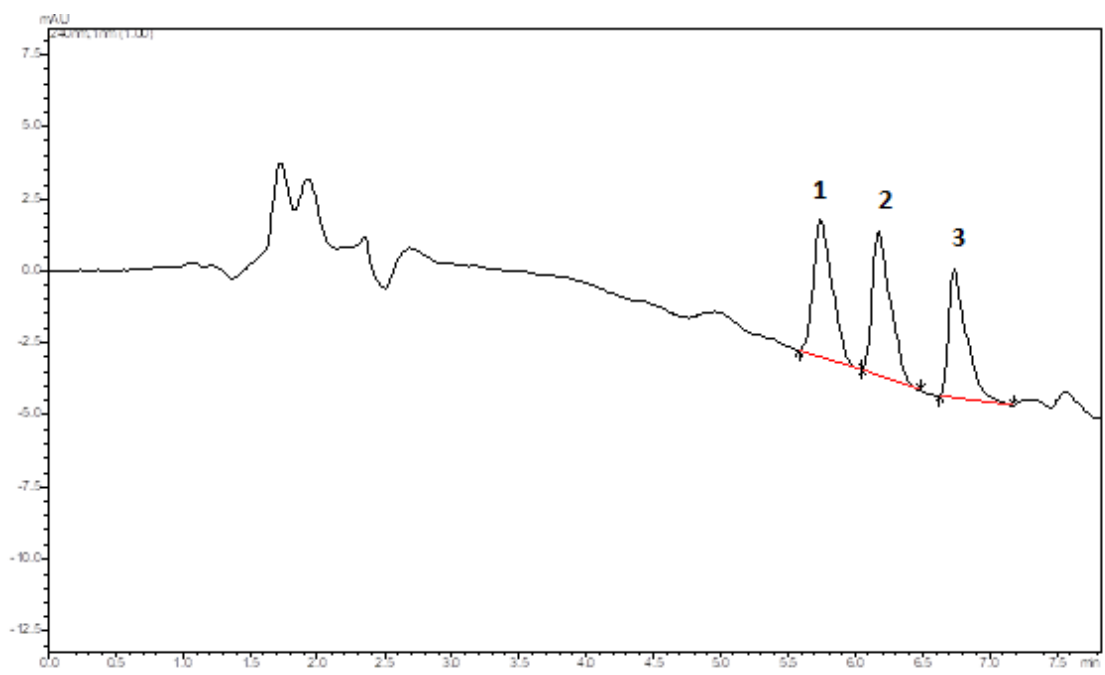
**Σχήμα 12.3:** Χρωματογράφημα εκχυλισμένου blank (λευκού) δείγματος ορού αίματος στα 290 nm



**Σχήμα 12.4:** Χρωματογράφημα εκχυλισμένου blank (λευκού) δείγματος ορού αίματος στα 240 nm



**Σχήμα 12.5:** Χρωματογράφημα εμβολιασμένου εκχυλισμένου δείγματος ορού αίματος (10 ng/μL) στα 290 nm.



**Σχήμα 12.6:** Χρωματογράφημα εμβολιασμένου εκχυλισμένου δείγματος ορού αίματος (10 ng/μL) στα 240nm. Οι διαδοχικές κορυφές είναι: 1:OXA, 2:CLOX, 3:DICLO.

Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα πρώτα 2,7 min δεν παρεμπόδισαν τις κορυφές ενδιαφέροντος, οι οποίες εμφανίστηκαν αργότερα. Οι χρόνοι συγκράτησης ήταν 4,776 min για PENG, 5,738 min για OXA, 6,169 min για CLO και 6,733 min για DICLO.

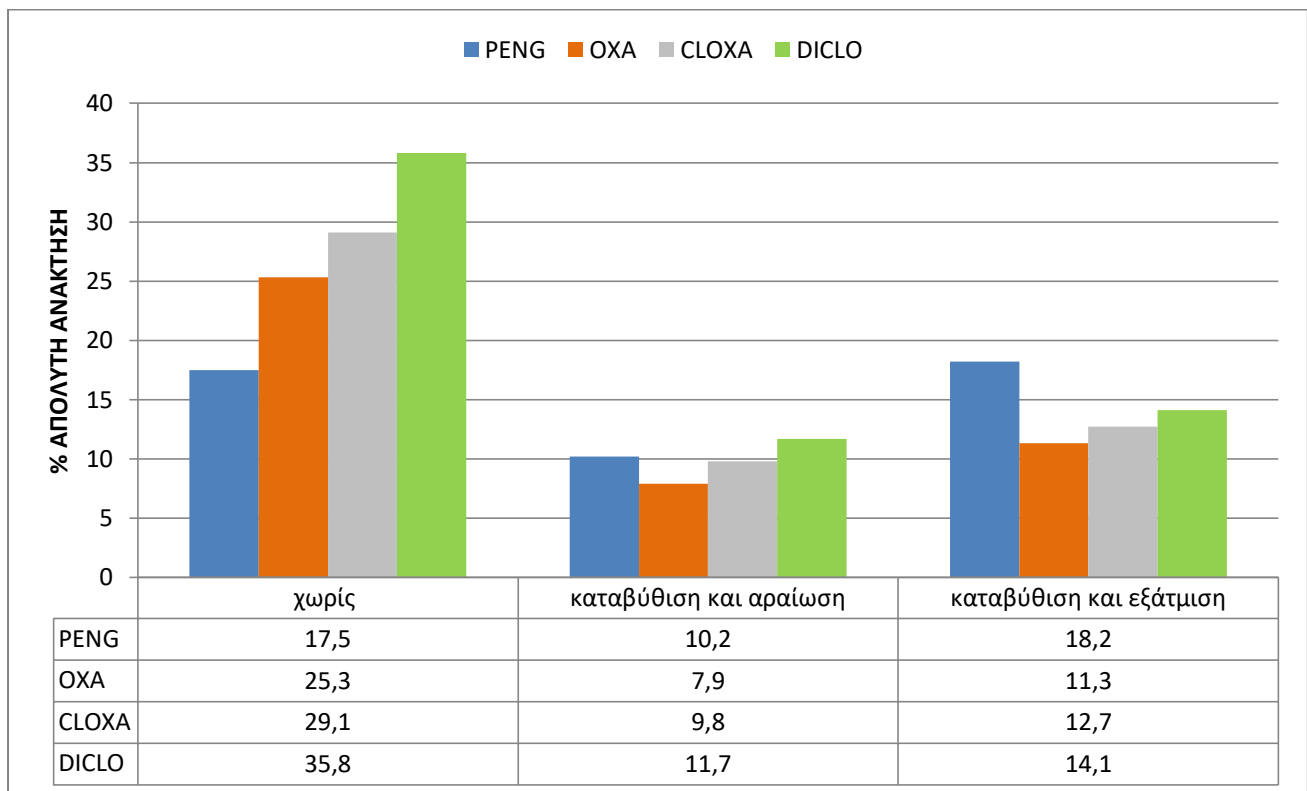
### **12.3. Έλεγχος της επίδρασης της αποπρωτεΐνωσης στην απόδοση της εκχύλισης FPSE**

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της καταβύθισης των πρωτεϊνών πριν την εκχύλιση και αν τελικά υπάρχει ανάγκη εφαρμογής του βήματος αυτού στα στάδια της διαδικασίας προκατεργασίας του δείγματος, η βελτιστοποιημένη διαδικασία FPSE εφαρμόστηκε επίσης στον αποπρωτεϊνωμένο ορό αίματος. Το στάδιο αυτό, αφού αποδειχθεί πως μπορεί να παραλειφθεί μειώνει σημαντικά το χρόνο της προκατεργασίας και συνεπώς το χρόνο της ανάλυσης, ενώ ταυτοχρόνως ελαττώνει τη πιθανότητα για απώλεια ποσότητας προσδιοριζόμενων ενώσεων, αφού παραλείπονται στάδια που συνήθως είναι επιζήμια.

Η καταβύθιση πρωτεϊνών διεξήχθη και δοκιμάστηκε με δύο ελαφρώς διαφορετικές προσεγγίσεις. Το πρώτο μέρος ήταν ακριβώς το ίδιο στις δύο περιπτώσεις. Ποσότητα 500  $\mu\text{L}$  υδατικού πρότυπου σε ονομαστική συγκέντρωση 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση αναμίχθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf με 50  $\mu\text{L}$  ορού ανθρώπινου αίματος και 200  $\mu\text{L}$  ACN. Στη συνέχεια, το μίγμα στροβιλίστηκε (vortex), έως ότου παρατηρήθηκε θρόμβωση. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 min. Στο σημείο αυτό εφαρμόστηκε διαφορετική συνέχεια μεταξύ των δύο διαφορετικών προσεγγίσεων.

**Στην πρώτη περίπτωση**, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο φιαλίδιο Eppendorf και αραιώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρις ότου να προκύψει η αναλογία 1:4 v/v. Στη συνέχεια, το προκύπτον διάλυμα υποβλήθηκε στη βέλτιστη ροή εργασίας προετοιμασίας του δείγματος FPSE.

**Στη δεύτερη περίπτωση**, το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου, μέχρις ότου μειώθηκε ο όγκος του 200  $\mu\text{L}$ . Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η διαδικασία προκατεργασίας δείγματος FPSE. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο σχήμα 12.7 συγκριτικά πάντοτε με τις τιμές απόλυτων ανακτήσεων των τεσσάρων ενώσεων. Παρατηρείται πως μόνο η εκχύλιση της βενζυλο-πενικιλίνης ευνοείται στα όρια του στατιστικού λάθους, με την καταβύθιση ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη. Ωστόσο, με βάση τη συνολική εικόνα των αποτελεσμάτων, η καταβύθιση πρωτεϊνών εκτιμήθηκε ως μη πρακτική, επιρρεπής σε ουσιαστική απώλεια ποσότητας προσδιοριζόμενων ενώσεων και χρονοβόρα, καθώς αυξάνει το χρόνο της συνολικής διαδικασίας προκατεργασίας και άρα το χρόνο της μεθόδου κατά τουλάχιστον 30 min. Συνεπώς δε βελτιώνει την αποδοτικότητα της εκχύλισης και έτσι δε συμπεριελήφθη στη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος FPSE. Αδιαμφισβήτητα, αυτό είναι ένα αξιοσημείωτο συγκριτικό πλεονέκτημα της μεθόδου που αναπτύσσεται και εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία, σε αντιπαράθεση με τις δημοσιευμένες εργασίες και περιλήψεις υπάρχουσας και αναφερόμενης εργασίας βιβλιογραφίας για τη βιοανάλυση αντιβιοτικών πενικιλίνης σε ανθρώπινο ορό αίματος.



**Σχήμα 12.7:** Επίδραση της καταβύθισης πρωτεϊνών πριν την εκχύλιση FPSE στις τιμές απόλυτων ανακτήσεων των ενώσεων και στην αποδοτικότητα της εκχύλισης.

### 13. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

#### 13.1. Καμπύλες αναφοράς εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος και γραμμικότητα

Οι καμπύλες αναφοράς και συνεπώς οι εξισώσεις παλινδρόμησης που αντιστοιχούν σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος με τις τέσσερις εξεταζόμενες πενικιλίνες, κατασκευάστηκαν με δείγματα ορού αίματος, τα οποία παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 8.5, σε συνδυασμό με τα πρότυπα υδατικά μίγματα του πίνακα 8.1. Προφανώς, υποβλήθηκαν στη βέλτιστη διαδικασία FPSE. Οι μελέτες γραμμικότητας της εκχύλισης διεξήχθησαν καλύπτοντας ολόκληρο το εύρος εργασίας αναφορικά με τις χρησιμοποιούμενες τιμές συγκέντρωσης των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης. Ο εμβολιασμός των δειγμάτων του ορού, έλαβε χώρα σε έξι επίπεδα συγκεντρώσεων από 0,5 – 15 ng/μL. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων συσχετίζοντας το εμβαδόν της περιοχής της κάθε κορυφής με την συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας σε ng/μL. Οι καμπύλες βαθμονόμησης ήταν γραμμικές έως τη συγκέντρωση των 15 ng/μL, με συντελεστές προσδιορισμού ( $r^2$ ) μεγαλύτερους από 0.997, στοιχείο το οποίο αποτελεί μέτρο της γραμμικότητας της μεθόδου. Αν ο συντελεστής αυτός είναι μεγαλύτερος από 0,99 θεωρείται πως η καμπύλη παρουσιάζει καλή γραμμικότητα, ενώ σε περίπτωση που είναι μεγαλύτερος από 0,999, θεωρείται πως η γραμμικότητα είναι εξαιρετική. Συνεπώς, οι καμπύλες αναφοράς για τη PENG και τη DCLO παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα, ενώ για την OXA και τη CLOXA εξαιρετική. Όλα τα αναφερόμενα δεδομένα παρουσιάζονται στον πίνακα 13.1

**Πίνακα 13.1:** Εξισώσεις καμπύλων αναφοράς για την κάθε ένωση και συντελεστής προσδιορισμού  $r^2$ . Όπου  $Y$ , το εμβαδό της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης και  $X$  η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης σε ng/μL.

ΕΝΩΣΗ	Εξίσωση Παλινδρόμησης	Συντελεστής Προσδιορισμού, $r^2$
Βενζυλοπενικιλίνη (PENG)	$Y = 2894,39 X - 593,85$	0.9982
Οξακιλίνη (OXA)	$Y = 2279,78 X + 1297,1$	1,000
Κλοξακιλίνη (CLOXA)	$Y = 2696,77 X + 865,39$	0.9993
Δικλοξακιλίνη (DICLO)	$Y = 2287,63 X - 212,85$	0.9979



### **13.2 Όριο ανίχνευσης (LOD), όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και εκλεκτικότητα (selectivity).**

Το όριο ανίχνευσης (LOD - *Level of Detection*) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση συστατικού, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από τη βασική γραμμή θορύβου του ανιχνευτή στην πιο ευαίσθητη ρύθμιση του οργάνου, αλλά όχι απαραίτητα να προσδιοριστεί ποσοτικά, με βεβαιότητα 95%. Στην πράξη, το όριο ανίχνευσης είναι η εισαγόμενη ποσότητα, που παρέχει κορυφή με ύψος διπλάσιο ή τριπλάσιο του ύψους θορύβου της βασικής γραμμής. Το LOD δίνεται από τη σχέση:  $LOD=3,3*S/N$ , όπου  $S=signal$  και  $N=noise$ . Σε αυτή την εργασία το LOD υπολογίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση (το LOQ) που ποσοτικοποιήθηκε διά του 3,3 και βρέθηκε **0,15 ng/μL** και για τις τέσσερις ενώσεις.

Το όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ – *Limit Of Quantification*) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά με ακρίβεια και πιστότητα. Εναλλακτικά, το LOQ είναι η χαμηλότερη ποσότητα εισαγόμενου συστατικού πάνω από το θόρυβο της βασικής γραμμής που παρέχει επαναλήψιμα εμβαδά κορυφής και μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά, με βεβαιότητα 95%. Το όριο ποσοτικής αποτίμησης συνεπάγεται ότι η μέτρηση παρέχει ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Και το LOQ από τη σχέση:  $LOQ=10*S/N$ , όπου  $S=signal$  και  $N=noise$ . Σε αυτή την εργασία ως LOQ θεωρείται η μικρότερη συγκέντρωση που ποσοτικοποιήθηκε. Και για τις τέσσερις εξεταζόμενες ενώσεις, η τιμή LOQ είναι **0,5 ng/μL**.

Η εκλεκτικότητα και η υψηλή διαχωριστική ικανότητα μεταξύ των χρωματογραφικών κορυφών των αντιβιοτικών πενικιλίνης προέκυψαν με ανάλυση πέντε λευκών δειγμάτων (blank) και έλεγχο τυχόν παρεμποδίσεων στο ίδιο χρωματογραφικό παράθυρο με τις εξεταζόμενες ενώσεις. Η εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας στα λευκά δείγματα ορού αίματος αποκάλυψε ότι δεν ανιχνεύθηκαν παρεμποδίσεις στο ίδιο χρωματογραφικό παράθυρο με τις εξεταζόμενες ενώσεις, όπως αποδεικνύεται στο κεφάλαιο 12.2. Η ταυτοποίηση της κάθε κορυφής έγινε τόσο με βάση τους χρόνους συγκράτησης, όσο και με φασματικές πληροφορίες που παρέχονται από τον ανιχνευτή. Κατά συνέπεια, η αναπτυγμένη μέθοδος είναι σε θέση να μετρήσει με ακρίβεια και εκλεκτικότητα τις τέσσερις ενώσεις σε υπόστρωμα ορού αίματος.

### **13.3 Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα της μεθόδου (intra-day repeatability)**

Η ακρίβεια της μεθόδου δείχνει το βαθμό της απόκλισης του αποτελέσματος ενός προσδιορισμού από την πραγματική ή αποδεκτή ως αληθή τιμή (true ή correct), ή με άλλα λόγια το βαθμό συμφωνίας της προσδιοριζόμενης και της πραγματικής τιμής. Όσο πιο μικρή η απόκλιση, τόσο πιο μεγάλη η ακρίβεια. Η ακρίβεια μπορεί να εκτιμηθεί, εφαρμόζοντας την αναλυτική μέθοδο σε

μίγματα του συστατικού και του υποστρώματος, στο οποίο προστέθηκαν γνωστές συγκεντρώσεις ποσότητας των προσδιοριζόμενων συστατικών. Στην παρούσα εργασία, η ακρίβεια εκτιμήθηκε με βάση την % σχετική ανάκτηση και υπολογίστηκε με βάση τη μετρούμενη τιμή συγκέντρωσης, όταν βεβαίως είναι γνωστή η τιμή της πραγματικής κάτι που συμβαίνει με τον εμβολιασμό με πρότυπο μίγμα των τεσσάρων ενώσεων. Ποσοτικά υπολογίζεται με τη σχέση 13.1. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%), και η διαφορά της υπολογισθείσας τιμής από το 100% αποτελεί τη εκτίμηση της ακρίβειας κατά τη διαδικασία προκατεργασίας και ανάλυσης του δείγματος.

$$\text{Σχετική ανάκτηση (\%)} = \frac{\text{Μετρούμενη τιμή συγκέντρωσης}}{\text{Πραγματική τιμή συγκέντρωσης}} \times 100 \quad (13.1)$$

**Η πιστότητα (precision)** μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζει το βαθμό συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται σε πολλαπλά δείγματα και διακρίνεται στην **επαναληψιμότητα (repeatability)**, στην **ενδιάμεση επαναληψιμότητα (intermediate precision)** και στην **αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)**. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, περιγράφονται και θεωρούνται συνολικά ως αβεβαιότητα του προσδιορισμού (uncertainty) ή πιστότητα (precision).

Η επαναληψιμότητα (within-day ή intra day precision), η οποία εξασφαλίζεται όταν η ανάλυση εκτελείται σε ένα εργαστήριο, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί το ίδιο όργανο, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και αντανακλά τις διακυμάνσεις των πολλαπλών αναλύσεων που διεξάγονται εντός μια μικρής χρονικής περιόδου με τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας.

Μαθηματικά εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση RSD (Relative Standard Deviation ή το συντελεστή διακύμανσης (Coefficient of Variance CV%) με τη σχέση:

$$RSD (\%CV) = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Η Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{όταν } n < 10$$

Όπου είναι η μέση τιμή των μετρήσεων.

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

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, έγινε ανάλυση των εκχυλισμένων με FPSE δειγμάτων ορού αίματος σε τρεις συγκεντρώσεις 1, 2, και 10 ng/μL. Για τον υπολογισμό του intra-day λήφθηκαν

τρεις μετρήσεις της κάθε συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια της ίδιας μέρας, ενώ ο προσδιορισμός της ακρίβειας inter-day περιελάμβανε δύο μετρήσεις σε τέσσερις διαφορετικές μέρες.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν μετά από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δίνονται στον πίνακα 13.2, όπου παρουσιάζονται η μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα, η τυπική απόκλιση (SD) της μέτρησης, η σχετική τυπική απόκλιση (RSD), καθώς και η % ανάκτηση της κάθε ένωσης σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος, με μίγματα των ενώσεων σε συγκεντρώσεις των 1, των 2 και των 10 ng/μL για 3 μετρήσεις, **κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας**. Τόσο η επαναληψιμότητα, όσο και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της, κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας, ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση RSD, η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, δεν ξεπερνάει για καμία ένωση το 11,7%, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου κυμαίνονται από 88,3 έως 109,1%.

*Πίνακας 13.2: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό των εξεταζόμενων αντιβιοτικών πενικιλίνης σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος (n=3)*

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/μL)	Ποσότητα που βρέθηκε ± SD (ng/μL)	RSD%	R%
<b>PENG</b>	1	1,07 ± 0,07	6,4	106,5
	2	1,77 ± 0,03	1,4	88,7
	10	10,45 ± 0,53	5,1	104,5
<b>OXA</b>	1	0,93 ± 0,08	9,0	92,7
	2	2,03 ± 0,14	7,1	101,5
	10	10,83 ± 0,28	2,6	104,5
<b>CLOXA</b>	1	0,88 ± 0,01	1,7	88,3
	2	2,14 ± 0,12	6,7	102,5
	10	10,59 ± 0,3	2,8	105,9
<b>DICLO</b>	1	0,94 ± 0,11	11,7	94,2
	2	1,81 ± 0,05	2,5	90,3
	10	10,91 ± 0,32	2,9	109,1

#### **13.4 Ακρίβεια και πιστότητα της μεθόδου σε διάρκεια τεσσάρων ημερών (inter-day precision)**

Ο έλεγχος της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου σε διαφορετικές ημέρες έγινε με τη μέτρηση τριών εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις **για τέσσερις ημέρες**. Κάθε μέρα, λαμβάνονταν δύο διαφορετικές μετρήσεις για κάθε επίπεδο

συγκέντρωσης. Στον πίνακα 13.3 παρουσιάζεται η ακρίβεια ως τυπική απόκλιση SD, η επαναληψιμότητα ως σχετική τυπική απόκλιση RSD, η % ανάκτηση του κάθε συστατικού και η μέση ευρεθείσα συγκέντρωση. Όπως φαίνεται, τόσο η ακρίβεια, όσο και η πιστότητα της μεθόδου, κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ορού αίματος κατά τη διάρκεια 4 ημερών, ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση RSD, η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, δεν ξεπερνάει για καμία ένωση το 11,7%, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου κυμαίνονται από 89,6 έως 110,3%.

**Πίνακας 13.3:** Πιστότητα και ακρίβεια μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος κατά τη διάρκεια τεσσάρων ημερών για δύο μετρήσεις ημερησίως. (n=4×2)

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/μL)	Ποσότητα που βρέθηκε ± SD (ng/μL)	RSD%	R%
<b>PENG</b>	1	1,04 ± 0,08	7,4	103,9
	2	1,79 ± 0,05	2,8	89,6
	10	10,39 ± 0,45	4,3	103,9
<b>OXA</b>	1	0,98 ± 0,12	12,1	92,7
	2	2,1 ± 0,14	6,9	105,1
	10	10,59 ± 0,53	5,00	105,9
<b>CLOXA</b>	1	0,94 ± 0,11	11,7	93,8
	2	2,11 ± 0,12	5,5	105,3
	10	10,32 ± 0,6	5,8	103,2
<b>DICLO</b>	1	0,96 ± 0,11	10,4	96,4
	2	1,96 ± 0,05	2,3	97,8
	10	11,03 ± 0,34	3,1	110,3

### 13.5 Ανθεκτικότητα της μεθόδου – Δοκιμασία Youden and Steiner

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε για μικρές αλλαγές μέσω του πειραματικού σχεδιασμού "επτά παραμέτροι / οκτώ πειράματα", γνωστού ως δοκιμασία Youden και Steiner.[61-62] Η βασική ιδέα είναι ότι εισάγονται πολλές μεταβολές ταυτόχρονα, αντί να μελετάται μία μεταβολή κάθε φορά. Επιλέχθηκαν επτά διαφορετικοί παράγοντες από τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος, οι οποίοι έχουν κρίσιμη επίδραση στην αποδοτικότητα της εκχύλισης και της μεθόδου συνολικότερα. Τα δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος εμβολιάστηκαν με το κατάλληλο υδατικού πρότυπο μίγμα των τεσσάρων ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/μL. Όπως προαναφέρθηκε, η μεταβολή των επτά

παραμέτρων έγινε ταυτόχρονα. Η πειραματική στρατηγική, οι παράγοντες που διερευνώνται και μεταβάλλονται, καθώς επίσης και τα επίπεδα διακύμανσής τους αναφέρονται στον πίνακα 13.4. Τα κεφαλαία A, B, C, D, E, F και G δείχνουν τους επιλεγμένους επτά παράγοντες στο ονομαστικό τους επίπεδο. Αν οι τιμές αυτών των παραγόντων αλλάξουν ελαφρά, σκόπιμα ή τυχαία, θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Οι εναλλακτικές τιμές (που σκόπιμα αλλάζουν από τις ονομαστικές τιμές) δίνονται από τα αντίστοιχα μικρά γράμματα a, b, c, d, e, f και g. Τα αποτελέσματα από αυτά τα οκτώ πειράματα παρουσιάζονται, ονομαζόμενα ως s, t, u, v, w, x, y, z αντίστοιχα. Εξετάστηκε η επίδραση των ακόλουθων παραμέτρων στην ευαισθησία εκχύλισης:

(1) η ταχύτητα της μαγνητικής ανάδευσης κατά το στάδιο της εκχύλισης – προσρόφησης, (2) ο χρόνος εκχύλισης, (3) ο χρόνος έκλουσης, (4) ο διαλύτης έκλουσης, (5) όγκος διαλύτη έκλουσης, (6) το μέγεθος (εμβαδόν) του μέσου FPSE και (7) η χρησιμοποίηση διαφορετικού μέσου FPSE (διαφορετική sol-gel επικάλυψη). Παρατηρείται επίσης η διακύμανση του παράγοντα, σύμφωνα με τον αριθμό του πειράματος και τα επίπεδα μεταβολής.

Οι τυπικές αποκλίσεις του κάθε παράγοντα υπολογίζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$SDi = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{Di^2}{7}\right)}$$

Όταν η SDi είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τυπική απόκλιση SD της μεθόδου για τη μελετημένη τιμή συγκέντρωσης και κατά τη διάρκεια του ελέγχου της επαναληψιμότητας, τότε θεωρείται ότι επηρεάζει τη μέθοδο, έστω και αν αυτός ο παράγοντας από μόνος του δε την επηρεάζει τη μέθοδο, και ότι η μέθοδος δεν είναι επαρκώς ανθεκτική έναντι των επιλεγμένων τροποποιήσεων.

**Πίνακας 13.4:** Πειραματικός σχεδιασμός για το τεστ ανθεκτικότητας Youden and Steiner

Μεταβαλλόμενοι Παράγοντες	Μονάδες	Τιμές μεταβολών – Μικρά γράμματα	Ονομαστικές ή βέλτιστες τιμές – Κεφαλαία Γράμματα	Αριθμός Πειράματος							
				1	2	3	4	5	6	7	8
A= Ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης	350/150 rpm	150 rpm	350 rpm	A	A	A	A	a	a	a	a
B= Χρόνος εκχύλισης	min	20	25	B	B	b	b	B	B	b	b
C= Χρόνος έκλουσης	min	5	10	C	c	C	c	C	c	C	c
D= Διαλύτης έκλουσης	είδος	ACN	90% ACN : 10% CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	D	D	d	d	d	d	D	D
E= Όγκος δ/τη έκλουσης	μL	750	500	E	e	E	e	e	E	e	E
F= Μέγεθος μέσου FPSE	cm <sup>2</sup>	0.75	1.5	F	f	f	F	F	f	f	F
G= Είδος μέσου FPSE	είδος	CHITOSAN	PTHF	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Results</b>				<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία Youden και Steiner των οκτώ πειραμάτων ανθεκτικότητας της μεθόδου αναφέρονται στον πίνακα 13.5. Και σε αυτή την περίπτωση, κριτήριο αποτίμησης των δεδομένων, αποτέλεσε η τιμή απόλυτης ανάκτησης για την κάθε ένωση σε κάθε ένα από τα οκτώ πειράματα. Από την αξιολόγηση των δεδομένων, είναι προφανές ότι η PENG ήταν η ένωση, της οποίας η εκχύλιση φάνηκε να επηρεάστηκε κατά μέσο όρο περισσότερο από όλες τις μεταβολές, ενώ για τις άλλες τρεις, OXA, CLOXA και DICLO, η επίδραση των μεταβολών στην αποδοτικότητα της εκχύλισης ήταν παρόμοια και σε μέτρια έκταση. Το επιλεγμένο βέλτιστο μέσο FPSE επικαλυμμένο με sol-gel PTHF, ως μεταβλητός παράγοντας της δοκιμασίας Youden είχε τη μεγαλύτερη θετική επίδραση. Επιπλέον, το μέγεθος (εμβαδόν) του μέσου FPSE είχε έντονη θετική επίδραση. Η ταχύτητα ανάδευσης κατά την προσρόφηση της εκχυλιζόμενης ένωσης στη μεμβράνη FPSE, ο

χρόνος εκχύλισης, ο χρόνος έκλουσης, ο διαλύτης έκλουσης και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης εκτιμήθηκε ότι έχει μικρό θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο. Η εκχύλιση της OXA φάνηκε πιο σταθερή σε σχέση με όλες τις μεταβολές που αξιολογήθηκαν, με μικρή διαφορά από CLOXA και DICLO, οι οποίες εμφάνισαν παρόμοια σταθερότητα. Γενικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι ανθεκτική, καθώς όλες οι τιμές τυπικής απόκλισης των παραγόντων ήταν κοντά στην SD της μεθόδου για το συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης. Επιπλέον, αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητα της επιλεγμένης μεμβράνης FPSE και συνεπώς επιβεβαιώθηκε για μία ακόμη φορά η σωστή επιλογή μέσου, δεδομένου ότι η εναλλακτική μεμβράνη που επιλέχθηκε ως παράγοντας μεταβολής στη δοκιμασία αυτή, το μέσο FPSE επικαλυμμένο με sol-gel CHITOSAN, ήταν αυτό που ήρθε δεύτερο, κατά μέσο όρο ως προς τις τιμές απόλυτης ανάκτησης των τεσσάρων ενώσεων, κατά τη διαδικασία επιλογής του καταλληλότερου μέσου για τα τέσσερα αντιβιοτικά πενικιλίνης, όπως παρουσιάστηκαν στον πίνακα 10.1 και την παράγραφο 10.2.

**Πίνακας 13.5:** Αποτελέσματα πειράματος ανθεκτικότητας Youden και Steiner

Ένωση	SD μεθόδου	SDi	Da	Db	Dc	Dd	De	Df	Dg
<b>PENG</b>	0.53	5.59	0.6	0.09	0.25	-0.01	-0.28	1.04	10.38
<b>OXA</b>	0.28	2.59	-1.6	-0.40	-0.99	-1.19	-1.23	0.75	4.04
<b>CLOXA</b>	0.3	2.86	-1.2	-0.24	-1.07	-1.27	0.08	0.56	4.90
<b>DICLO</b>	0.32	2.54	-0.6	0.46	-0.45	-0.75	-0.56	1.43	4.35

### **13.6 Μελέτη σταθερότητας των ενώσεων στον ορό αίματος σε θερμοκρασία -18 ° C κατά τη διάρκεια έξι κύκλων ψύξης-απόψυξης**

Η μελέτη σταθερότητας είναι μια σημαντική παράμετρος, επειδή πολλές φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως. Από την άλλη πλευρά, η σταθερότητα αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την επικύρωση μιας βιοαναλυτικής μεθόδου και η γνώση της έχει πρακτική σημασία στον προσδιορισμό ενώσεων και ειδικότερα αντιβιοτικών σε ορό αίματος. Συγχρόνως, η γνώση της σταθερότητας είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποφυγή σφαλμάτων στο βιοαναλυτικό εργαστήριο και διασφαλίζει την αποτελεσματικότερη διαχείριση ενός ασθενούς, την έγκαιρη και έγκυρη επιλογή και εφαρμογή της θεραπείας της νόσου, την καλύτερη κλινική παρακολούθηση και την πρόληψη των ασθενειών. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του κόστους του προγράμματος βιοαναλυτικής επικύρωσης και για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των φαρμάκων και αντιβιοτικών σε βιολογικά υποστρώματα, καθώς είναι επίσης βασικό εργαλείο μελέτης του τρόπου αποδόμησης

τους. Ένας τρόπος για να διερευνηθεί η σταθερότητα, είναι να εκτιμηθεί πειραματικά η επίδραση των κύκλων ψύξης-απόψυξης στη σταθερότητα ενός δείγματος. Η σταθερότητα των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης σε δείγματα ορού αίματος δοκιμάστηκε και αποτιμήθηκε μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής. Ένα δείγμα ορού αίματος εμβολιάστηκε με πρότυπο υδατικό μίγμα των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης σε συγκέντρωση 10 ng/μL για την κάθε ένωση. Το δείγμα αυτό, αρχικά υποβλήθηκε στη βέλτιστη διαδικασία προκατεργασίας FPSE και έπειτα αναλύθηκε αμέσως μετά την προκατεργασία.

Η πειραματική ροή εργασίας ακολούθησε από εκεί και έπειτα περιλαμβάνει τα επόμενα στάδια:

(α) 50 μL ορού αίματος αναμίχθηκαν σε φιαλίδιο Eppendorf με 450 μL απιονισμένου νερού και 500 μL πρότυπου μείγματος σε τιμή συγκέντρωσης 10 ng/μL ανά πενικιλίνη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έξι φορές σε έξι φιαλίδια Eppendorf.

(β) Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -18 ° C.

(γ) Διαδοχικά, τα φιαλίδια αποψύχθηκαν και ένα από αυτά υποβλήθηκε σε διαδικασία προκατεργασίας δείγματος FPSE, ενώ τα υπόλοιπα πέντε φιαλίδια αποθηκεύτηκαν και πάλι στην κατάψυξη στους -18 ° C.

(δ) Αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε για άλλες πέντε φορές, έως ότου ολοκληρωθούν οι έξι κύκλοι.

Ως κριτήριο για τον έλεγχο της σταθερότητας ορίστηκε η ευρεθείσα συγκέντρωση του αποθηκευμένου δείγματος να βρίσκεται στο -10% της αρχικής συγκέντρωσης του φρέσκου δείγματος. Το ποσοστό της κάθε ένωσης υπολογίστηκε με βάση τη σχέση:

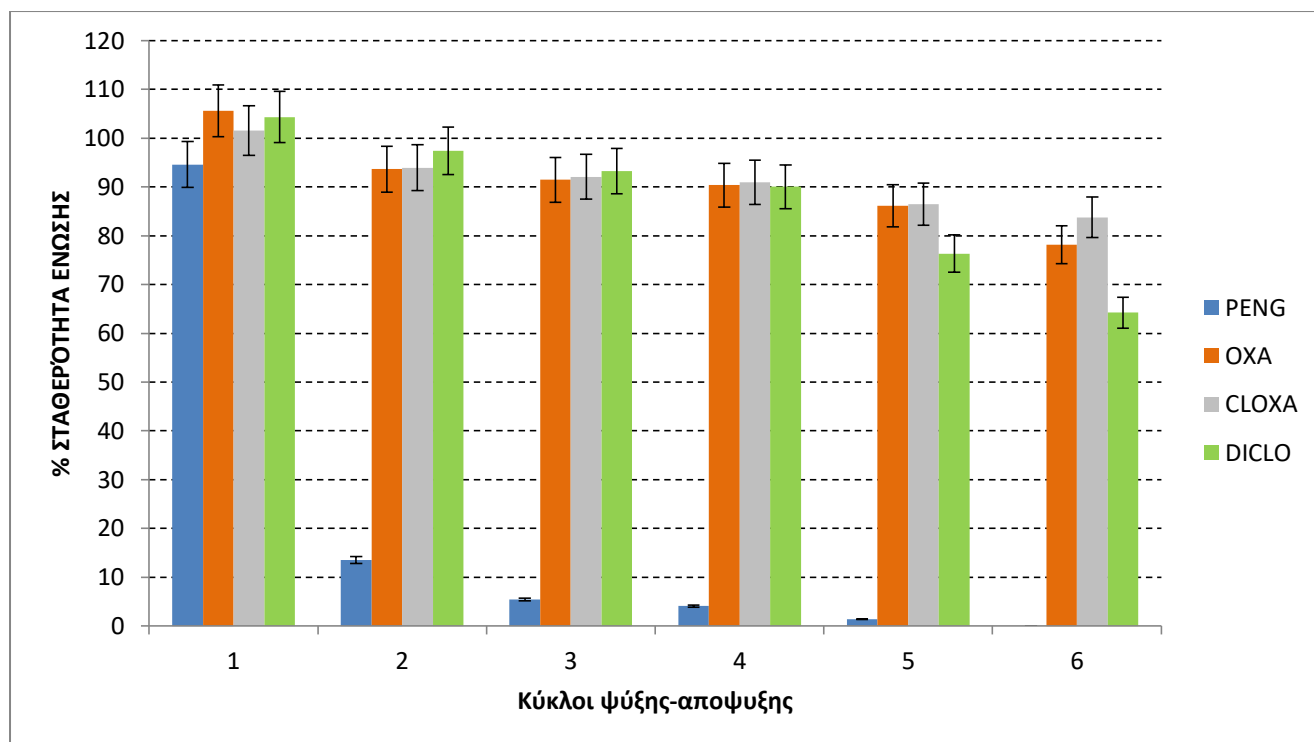
$$\text{Συγκέντρωση ένωσης που παραμένει (\%)} \text{ ή } \% \text{ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ} = C_i \times 100 / C_{\text{fresh}}$$

όπου  $C_i$  = συγκέντρωση (σε μg/kg) τη χρονική στιγμή  $i$  και

$C_{\text{fresh}}$  = συγκέντρωση (σε μg/kg) του φρέσκου διαλύματος

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 13.1 και στον πίνακα 13.6. Η αξιολόγηση των κύκλων ψύξης και απόψυξης έδειξε ότι η οξακιλίνη, η κλοξακιλίνη και η δικλοξακιλίνη ήταν σταθερές για τέσσερις διαδοχικούς κύκλους, ενώ η βενζυλοπενικιλίνη παρέμεινε σταθερή μόνο για έναν κύκλο.





**Σχήμα 13.1:** Διάγραμμα σταθερότητας εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος μετά από 6 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

**Πίνακας 13.6:** Μελέτη σταθερότητας εμβολιασμένων δειγμάτων σε 6 κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Αριθμός Κύκλου	% ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΕΝΩΣΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΜΕΝΕΙ ΣΤΑΘΕΡΗ			
	PENG	OXA	CLOXA	DICLO
1	94,6	105,6	101,6	104,3
2	13,5	93,6	93,9	97,4
3	5,4	91,5	92,1	93,2
4	4,1	90,4	91,0	90,1
5	1,4	86,1	86,5	76,3
6	0,0	78,2	83,8	64,2

Υπό αυτό το πρίσμα και με μία παρόμοια διαδικασία παρασκευής του εμβολιασμένου δείγματος, εξετάστηκε η σταθερότητα των τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης σε δείγμα ορού αίματος, όταν αυτό αποθηκεύεται στην κατάψυξη στους  $-18^{\circ}\text{C}$  για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μετά από 35 ημέρες, το αποθηκευμένο μίγμα αποψύχθηκε, υπέστη τη βέλτιστη διαδικασία προκατεργασίας δείγματος FPSE ακολουθούμενη από χρωματογραφική ανάλυση. Με βάση το κριτήριο της 10% αποικοδόμησης και χρησιμοποιώντας τη μαθηματική σχέση της % ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ, βγαίνει το συμπέρασμα πως οι ενώσεις παρέμειναν σταθερές, και συνεπώς το δείγμα χαρακτηρίζεται από σταθερότητα για τουλάχιστον 35 ημέρες.

Τέλος, ελέγχθηκε η σταθερότητα των ενώσεων των πυκνών υδατικών προτύπων (100 ng/μL). Με βάση τη βιβλιογραφία και προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου, η σταθερότητα είχε βρεθεί και ήταν το χρονικό διάστημα του ενός μήνα. Επαληθεύθηκε, λοιπόν, ότι η σταθερότητα των αντιβιοτικών πενικιλίνης σε υδατικά πυκνά διαλύματα είναι εφικτή για τουλάχιστον ένα μήνα, όταν αποθηκεύονται στους 4 ° C, απουσία φωτός.

### **13.7 Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του μέσου FPSE**

Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης του μέσου FPSE επικαλυμμένου με PTHF (πολυτετρά-υδροφουράνιο) με την τεχνική sol-gel, διεξήχθη χρησιμοποιώντας το ίδιο υφασμάτινο μέσο, και πραγματοποιώντας τη βέλτιστη μέθοδο προκατεργασίας FPSE ακολουθούμενη από χρωματογραφική ανάλυση. Το υπό ανάλυση και προκατεργασία δείγμα σε κάθε διαδικασία ήταν δείγμα ορού αίματος εμβολιασμένο με 10 ng/μL για την κάθε ένωση, το οποίο παρασκευάζεται, όπως περιγράφηκε και στις προαναφερθείσες μελέτες και δοκιμές που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία. Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης του μέσου καθορίζεται από τη δυνατότητα που έχει να διατηρεί την εκχυλιστική του ικανότητα και να δίνει αποδοτικές εκχυλίσεις και συνεπώς υψηλές τιμές ανάκτησης, παράγοντα εμπλουτισμού ή προσυγκέντρωσης.

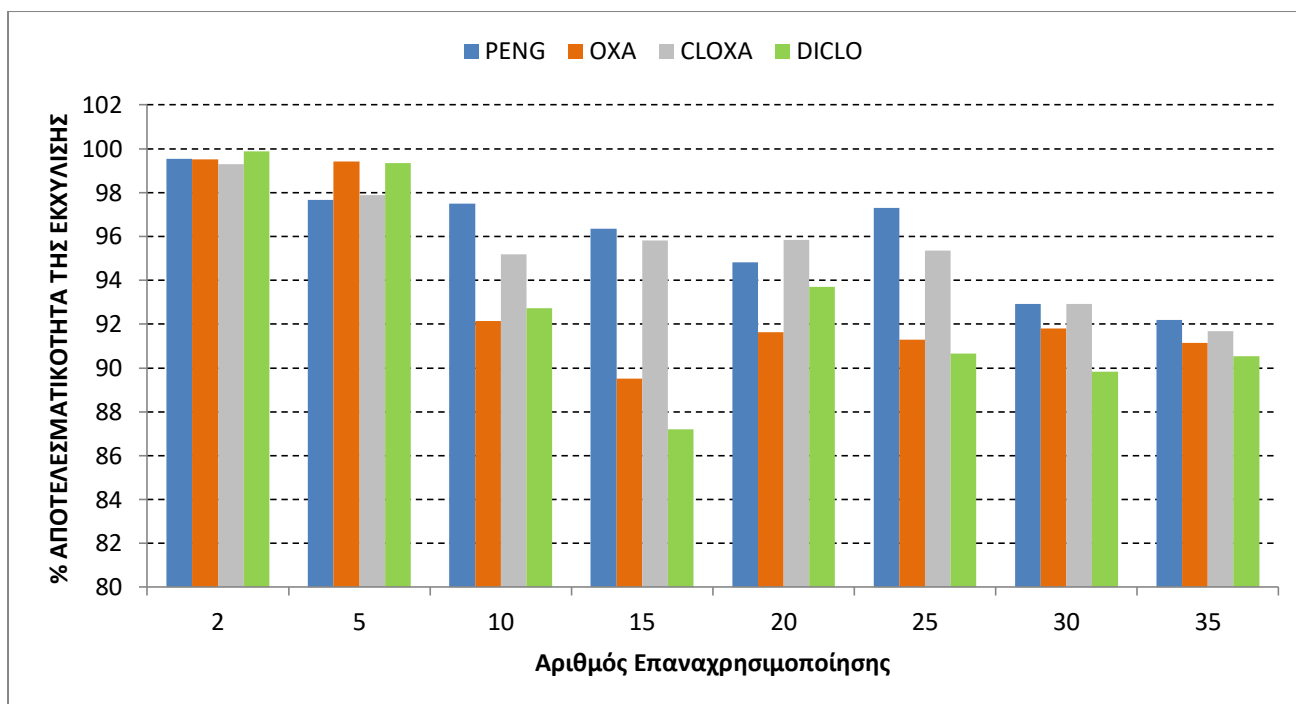
Ως κριτήριο για τον έλεγχο της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης, ορίστηκε η ευρεθείσα συγκέντρωση του αναλυόμενου εκχυλισμένου δείγματος να βρίσκεται στο -10% της συγκέντρωσης του πρώτου σε σειρά δείγματος, το οποίο παρασκευάστηκε και προκατεργάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και με το ίδιο ακριβώς υφασμάτινο μέσο FPSE με το εξεταζόμενο. Το ποσοστό της κάθε ένωσης υπολογίστηκε με βάση τη σχέση:

$$\% \text{ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ} = C_i \times 100 / C_{\text{ΑΡΧΙΚΟ}},$$

όπου  $C_i$  = συγκέντρωση (σε ng/μL) τη φορά επαναχρησιμοποίησης του μέσου ( $i=1,2,\dots,35$ )

$C_{\text{ΑΡΧΙΚΟ}}$  = συγκέντρωση (σε ng/μL) του πρώτου δείγματος που εκχυλίστηκε με το συγκεκριμένο μέσο FPSE.

Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης έδειξε ότι το επιλεγμένο μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 35 φορές, χωρίς απώλεια της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 13.2, χρησιμοποιώντας το κριτήριο της 10% απώλειας της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Το συμπέρασμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς αναμφισβήτητα καθιστά την ανεπτυγμένη μέθοδο προκατεργασίας οικονομική και «πράσινη».



*Σχήμα 13.2: Ραβδόγραμμα της μελέτης επαναχρησιμοποίησης του ίδιου μέσου sol-gel PTHF FPSE.*

## **14. ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ FPSE**

### **14.1 Περιγραφή του μοντέλου – Η εξίσωση του μέσου sol-gel PTHF**

Η τεχνική της FPSE, ως μια σύγχρονη «πράσινη» προσέγγιση προετοιμασίας δείγματος, έχει τη δυνατότητα να απλοποιήσει αξιοσημείωτα τη διαδικασία επιλογής του καταλληλότερου μέσου επικαλυμμένου με την τεχνολογία sol-gel με το πιο συμφέρον και αποτελεσματικό προσροφητικό υλικό, για ένα δεδομένο σύνολο ή μια ομάδα ενώσεων, με γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες. Γενικά, όπως συμβαίνει στις περισσότερες τεχνικές μικροεκχύλισης, οι οποίες στηρίζονται στην προσρόφηση, η αξιολόγηση της ευαισθησίας της εκχύλισης των μέσων FPSE για μια δεδομένη ομάδα ενώσεων, όπως είναι τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πενικιλίνης βασίζεται στη συμβατική στρατηγική επιλογής, η οποία στηρίζεται στη μέθοδο πειραματικής δοκιμής και αποτίμησης του αποτελέσματος, υπό το πρίσμα ενός κοινού κριτηρίου, το οποίο είναι οι τιμές απόλυτης ανάκτησης. Αναντίλεκτα, η διαδικασία αυτή είναι δαπανηρή, επίπονη, χρονοβόρα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία και τις γνώσεις του αναλυτή.

Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές μικροεκχύλισης, όπως η SPME, η SPE και οι διάφορες παραλλαγές και προσεγγίσεις τους, η FPSE προσφέρει μια προηγμένη και χρήσιμη θεωρητική μαθηματική εναλλακτική λύση για να αποφευχθεί η χρονοβόρα και δαπανηρή πειραματική προσέγγιση και να αυξηθεί ο «πράσινος» χαρακτήρας της νέας αυτής τεχνικής μικροεκχύλισης και συνεπώς της οποιασδήποτε αναπτυσσόμενης μεθόδου. Αυτή η προηγμένη στρατηγική επιλογής βασισμένη σε ένα ήδη υπάρχον μαθηματικό μοντέλο επιτρέπει την επιλογή του καταλληλότερου μέσου, από έναν αρκετά μεγάλο αριθμό διαθέσιμων μέσων FPSE (πίνακας 4.1). [50]

Για κάθε μεμβράνη FPSE έχει αναπτυχθεί μία εξίσωση υπολογισμού της % απόλυτης ανάκτησης, η οποία αναπαριστά μαθηματικά το αποτέλεσμα του συνδυασμού του υποστρώματος και του ροφητικού κολλοειδούς διαλύματος sol-gel, καθώς αμφότερα συμβάλλουν στη συνολική επιλεκτικότητα και συνεπώς στην ευαισθησία της εκχύλισης της μεμβράνης FPSE. Αυτή η εξίσωση προέκυψε και υπολογίστηκε πειραματικά ομοίως για όλα τα μέσα με σχεδίαση διαγράμματος συσχέτισης των λογαριθμικών τιμών του συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού ( $\log K_{ow}$ ) για 10 δοκιμαστικές αντιπροσωπευτικές ενώσεις, έναντι των αντίστοιχων τιμών απόλυτης ανάκτησης που λαμβάνονται υπό βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα δείγματος το απιονισμένο νερό. Οι τιμές  $\log K_{ow}$  των ενώσεων αυτών ποικίλουν, κυμαίνονται μεταξύ 0,3 και 5,07 και καλύπτουν ένα πολύ μεγάλο φάσμα πολικότητας και για αυτόν το λόγο θεωρούνται αντιπροσωπευτικές του εύρους πολικότητας των προσδιοριζόμενων ενώσεων που μπορεί να

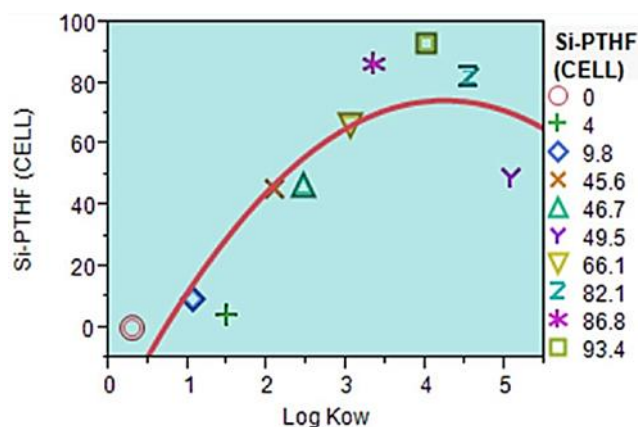
συναντήσει κανείς σε αναλύσεις τέτοιου τύπου. Οι ενώσεις αυτές, καθώς και ορισμένα χαρακτηριστικά τους, παρουσιάζονται στον πίνακα 14.1.[50]

**Πίνακας 14.1:** Οι δέκα ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου για τη μεμβράνη FPSE επικαλυμμένη με PTHF.

ΕΝΩΣΗ ( ΔΙΕΘΝΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑ)	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (g/mol)	Log K <sub>ow</sub>
Furfuryl Alcohol	(FA)	98.10	0.3
Piperonal	(PIP)	150.13	1.05
Phenol	(PHE)	94.11	1.5
Benzodioxole	(BDO)	122.12	2.08
4-Nitrotoluene	(4NT)	137.14	2.45
9-Anthracene methano	(9AM)	208.26	3.04
Naphthalene	(NAPH)	128.17	3.35
1,2,4,5-tetramethyl benzene	(TMB)	134.22	4,00
Triclosan	(TCL)	289.54	4.53
Diethylstilbestrol	(DESB)	268.35	5.07

Έτσι λοιπόν, η χάραξη της καμπύλης της τιμής ανάκτησης μιας μεμονωμένης ένωσης από τις παραπάνω, η οποία έχει εκχυλιστεί με FPSE, έναντι της αντίστοιχης αξίας logK<sub>ow</sub>, αποδίδει μια δευτεροβάθμια εξίσωση, συσχετίζοντας την απόλυτη τιμή ανάκτησης με την logK<sub>ow</sub> τιμή μιας οποιασδήποτε ένωσης. Αυτή η μαθηματική εξίσωση δεύτερου βαθμού για το μέσο sol-gel PTHF επικαλυμμένο σε υφασμάτινο μέσο κελουλόζης 100%, το οποίο χρησιμοποιήθηκε από την παρούσα εργασία, απεικονίζεται στο σχήμα 14.1 και μπορεί να εκφραστεί ως:

$$\text{ΑΠΟΛΥΤΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ \%} = 12,40054 + 17,848979 * \text{Log } K_{ow} - 5,9644673 * (\text{Log } K_{ow} - 2,737)^2$$

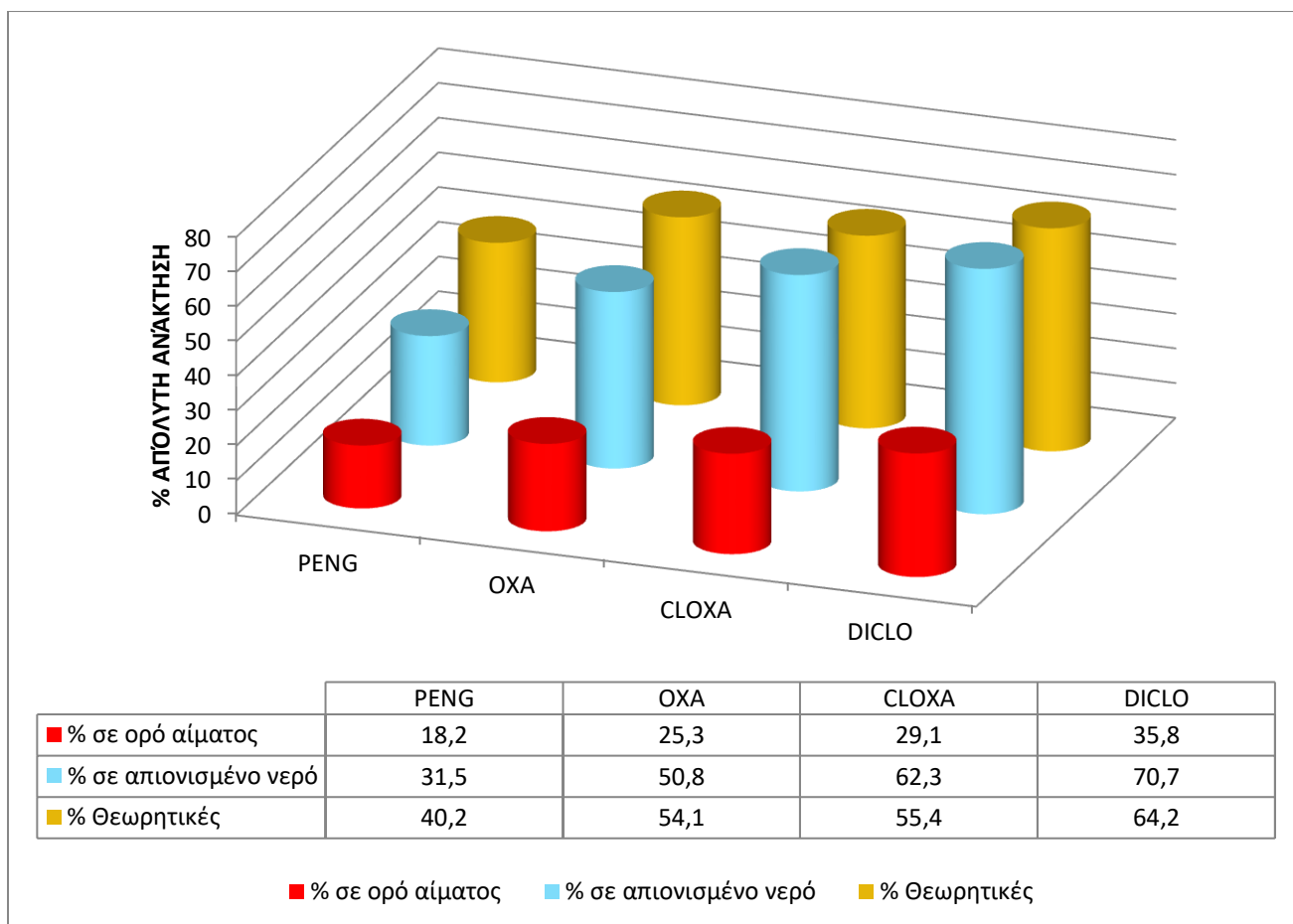


**Σχήμα 14.1:** Διάγραμμα μαθηματικής εξίσωσης πρόβλεψης της % απόλυτης ανάκτησης κατά την εκχύλισης με μέσο FPSE υποστρώματος υφάσματος κελουλόζης επικαλυμμένης με sol-gel PTHF.

Αυτή η εξίσωση μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί η % απόλυτη ανάκτηση μιας προσδιοριζόμενης ένωσης εάν είναι γνωστή η τιμή  $\log K_{ow}$ . Επιπλέον, αυτή η απλοποιημένη προσέγγιση επιλογής προσροφητικού όχι μόνο συμβάλλει στην αναγνώριση του καλύτερου μέσου FPSE, όταν είναι διαθέσιμη μία ποικιλία συνδυασμών προσροφητικού/υποστρώματος, αλλά επίσης μετριάζει τον κίνδυνο πειρατικού σφάλματος που συνδέεται με τη συμβατική στρατηγική επιλογής, εξαλείφοντας την πιθανότητα εσφαλμένης εκτίμησης.

### 14.2 Σύγκριση δεδομένων θεωρητικού μαθηματικού μοντέλου και πειραματικών δοκιμών

Η εξίσωση συσχέτισης απόλυτης ανάκτησης και τιμής  $\log K_{ow}$  του μεσου sol-gel PTHF FPSE χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της θεωρητικά αναμενόμενης % απόλυτης ανάκτησης για τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πενικιλίνης. Η σύγκριση μεταξύ των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών ανάκτησης, των πραγματικών τιμών ανάκτησης που προέκυψαν από τα δείγματα προτύπων σε απιονισμένο νερό και των πραγματικών τιμών ανάκτησης που προέκυψαν από εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος σε συγκέντρωση 10 ng /  $\mu\text{L}$  δίνονται στον σχήμα 14.2.



**Σχήμα 14.2:** Σύγκριση των τιμών απόλυτης ανάκτηση μαθηματικού μοντέλου, εμβολιασμένων δειγμάτων απιονισμένου νερού και εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος. Ονομαστική τιμή συγκέντρωση 10 ng/μL.

Οι πειραματικές τιμές ανάκτησης και συνεπώς αποδοτικότητας της εκχύλισης των εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος για όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά βρέθηκαν να είναι περίπου στο ήμισυ των τιμών που προβλέφθηκαν με το μοντέλο. Ωστόσο, οι πειραματικές τιμές % απόλυτης ανάκτησης που προέκυψαν από τα εμβολιασμένα δείγματα σε υπόστρωμα απιονισμένου νερού αποκλίνουν αισθητά λιγότερο από την εξίσωση συσχέτισης.

Οι παρατηρήσεις αυτές αναδεικνύουν για ακόμη μια φορά την πολυπλοκότητα του ορού αίματος ως υποστρώματος, και αποτελούν επιβεβαίωση των συμπερασμάτων που αναδείχθηκαν στην παράγραφο 12.2 για την επίδραση του υποστρώματος. Οι πρωτεΐνες και άλλα συστατικά του υποστρώματος ενεργούν σαν μικρές παγίδες και συγκρατούν σημαντικό τμήμα των προσδιοριζόμενων ενώσεων κάτι που στην περίπτωση του απιονισμένου νερού δε συμβαίνει. Η απώλεια ποσότητας των ενώσεων είναι ακόμη πιο σημαντική, όταν είναι είτε οργανικά οξέα, είτε βάσεις, καθώς τα πρωτεϊνικά μόρια είναι αμφολύτες και τείνουν να απορροφούν άλλα φορτισμένα

είδη, κατιόντα ή ανιόντα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί απολύτως δικαιολογημένα, ότι οι χαμηλές πραγματικές τιμές ανάκτησης των αντιβιοτικών πενικιλίνης, σε σύγκριση με τις θεωρητικά αναμενόμενες από τη δευτεροβάθμια εξίσωση, οφείλονται στον πολύπλοκο χαρακτήρα του ορού αίματος ως υπόστρωμα δείγματος και κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει η απόκλιση, η οποία είναι περίπου 50%.

Αυτή η επίδραση δεν υπήρχε και συνεπώς δεν παρατηρείται, όταν χρησιμοποιούνται υδατικά πρότυπα διαλύματα σε απιονισμένο νερό. Παρατηρώντας τα πειραματικά δεδομένα σε αυτή την περίπτωση και αξιολογώντας τις τιμές ανάκτησης που προέκυψαν, είναι φανερό ότι οι πειραματικές τιμές για την PENG και την OXA βρέθηκαν χαμηλότερες από τις προβλεπόμενες τιμές που ελήφθησαν με το μοντέλο, ενώ για την CLO και την DICLO ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες σε σύγκριση με τις προβλεπόμενες τιμές του μοντέλου. Αυτή η πειραματική παρατήρηση μπορεί να δικαιολογηθεί, αφού ληφθούν υπόψη τόσο οι τιμές  $pK_a$  των μορίων όσο και οι συνθήκες pH κατά τη διάρκεια του σταδίου της εκχύλισης FPSE, η οποία λαμβάνει χώρα κάτω από ουδέτερες συνθήκες (pH 7). Η PENG και η OXA έχουν σχετικά υψηλή πολικότητα, καθώς επίσης και χαμηλές τιμές  $pK_a$ . Από την άλλη πλευρά, οι CLO και DICLO έχουν υψηλότερες τιμές  $pK_a$ , κατά μέσο όρο για περίπου 1,01. Κατά τη διάρκεια της φάσης εκχύλισης, η PENG και η OXA διατηρούνται σε ιονισμένη (αποπρωτονιωμένη) μορφή κατά τουλάχιστον δέκα φορές περισσότερο από τις CLO και DICLO. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι ενώσεις αυτές δε μπορούν να εκχυλιστούν πλήρως αποτελεσματικά με την επίδραση των συνηθέστερων αναπτυσσόμενων ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως δυνάμεις London, οι δεσμοί υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, οι π-π αλληλεπιδράσεις κ.τ.λ.. Εναντιθέτως, σχετικά χαμηλότερη πολικότητα και οι υψηλότερες τιμές  $pK_a$  για τη CLO και τη DICLO συντελούν στην πιο αποτελεσματική εκχύλιση και συνεπώς στις αυξημένες τιμές % απόλυτης ανάκτησης.



### **15. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΑΝΑΦΕΡΟΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

Μια συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση επιλεγμένων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των πενικιλινών και άλλων αντιβιοτικών β-λακτάμης παρουσιάζεται στον πίνακα 15.1 σε σύγκριση με την ανεπτυγμένη μέθοδο που παρουσιάστηκε από την εργασία αυτή. Αναμφισβήτητα, η νέα μέθοδος FPSE έχει επιδείξει εξαιρετική ευαισθησία εκχύλισης, αποτελεσματική ικανότητα προσυγκέντωσης, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και απλότητα. Ειδικότερα, το σημαντικότερο πλεονέκτημα της αναπτυχθείσας μεθόδου έναντι όλων των άλλων είναι η πειραματικά αποδεδειγμένη απαλοιφή ως μη πρακτικού, του σταδίου της καταβύθισης των πρωτεϊνών πριν το στάδιο της εκχύλισης, μειώνοντας τα στάδια της προκατεργασίας, το χρησιμοποιούμενο όγκο και το συνολικό χρόνο της ανάλυσης. Επιπλέον, μετά το στάδιο της έκλουσης δεν απαιτείται εξάτμιση του διαλύτη και επανασύσταση του δείγματος, κάτι που είναι εξίσου σημαντικό για τη μείωση του χρόνου και την οικονομία, αλλά και για τον περιορισμό της πιθανότητας απώλειας ποσότητας προσδιοριζόμενων ενώσεων εξαιτίας αυτών των σταδίων. Όλα αυτά επιτυγχάνονται χωρίς καμία αρνητική επίπτωση στην απόδοση της αναλυτικής μεθόδου.

*Πίνακας 15.1: Συνοπτική παρουσίαση επιλεγμένων μεθόδων προσδιορισμού αντιβιοτικών πενικιλίνης σε ανθρώπινο ορό αίματος.*

Αναλυτική Τεχνική	Μέθοδος Προκατεργασίας Δείγματος	Καταβύθιση Πρωτεϊνών PP (protein precipitation)	% Σχετική Ανάκτηση	RSD%	LOD	Βιβλιογραφική Πηγή
HPLC-UV	LLE με 700 $\mu$ L ACN	ACN και φυγοκέντρωση στις 3.000 $\times$ g για 10 min στους 4°C	> 90%	<8%	2 $\mu$ g/mL	[16]
LC-MS/MS	PP με ACN το οποίο περιέχει 0.1% HCOOH	ACN που περιέχει 0.1% HCOOH και φυγοκέντρωση στις 12.000 $\times$ g για 6 min στους 4 °C	>96%	<14%	0,1 $\mu$ g/mL	[15]
HPLC-UV	PP με ACN, LLE με CHCl <sub>3</sub> και φυγοκέντρωση	ACN ανακίνηση για 30s και φυγοκέντρωση στις 14.000 $\times$ g για 5 min,	$\Delta$ /A	<7,9%	5 $\mu$ g/mL	[14]
LC-MS/MS	Solid Phase Extraction (SPE)	Φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 10 min στους 4 °C	80,2 εως 98,6%	<14,3	0,001 εως 0,1 $\mu$ g/mL	[17]
HPLC-DAD	SPE, εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύματος αερίου N <sub>2</sub> στους 30°C και επανασύσταση δείγματος με MeOH	ACN και φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 5 min	91 έως 103%	<10%.	3,3 ng/ $\mu$ L	[63]
HPLC-DAD	FPSE με μέσο sol-gel PTHF	Όχι	> 88,3%	<11,7%	0,15 ng/ $\mu$ L	Προτεινόμενη Μέθοδος

## 16. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια νέα μέθοδος FPSE-HPLC-DAD για τη σύγχρονη εκχύλιση και τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και προσδιορισμό τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης, της βενζυλοπενικιλίνης, της οξακιλίνης, της κλοξακιλίνης και της δικλοξακιλίνης από ορό ανθρώπινου αίματος. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν αντιβιοτική δράση και εξαιτίας της δομής τους ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία αντιβιοτικών β-λακτάμης. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών αυτών σε υπόστρωμα ορού αίματος, ήταν η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης σε συνδυασμό με την τεχνική προκατεργασίας δείγματος Fabric Phase Sorptive Extraction, η οποία εφαρμόζεται για πρώτη φορά σε αυτή την κατηγορία ενώσεων.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων αντιβιοτικών ενώσεων στον ορό αίματος ήταν LiChroCART-LiChrospher®100 RP-18e (5 μm, 250 × 4 mm) της Merck. Ο συνολικός χρόνος έκλουσης και ανάλυσης ήταν 7,8 min. Η δυαδική κινητή φάση αποτελούμενη από οξικό αμμώνιο 0,05 M και CH<sub>3</sub>CN μεταβλήθηκε από την αρχική αναλογία 80:20 (v/v) στην τελική των 40:60 (v/v). Για το βέλτιστο διαχωρισμό των ενώσεων και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης, η ροή ακολούθησε έναν σταδιακό ρυθμό αύξησης, ξεκινώντας από τα 1.2 mL/min και φθάνοντας μέχρι τα 1.3 mL/min στο έβδομο λεπτό τιμή η οποία παρέμενε σταθερή μέχρι και το τέλος του διαχωρισμού στα 7,8 min. Η παρατηρούμενη πίεση κυμάνθηκε από 190 × 10<sup>5</sup> Pa (έναρξη) έως 115 × 10<sup>5</sup> Pa (λήξη). Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL. Οι χρόνοι συγκράτησης ήταν 4.976 min για την PENG, 5.738 min για την OXA, 6.169 min για την CLO και min για την DICLO. Η ανίχνευση των ενώσεων και ο ποσοτικός προσδιορισμός της πραγματοποιήθηκε σε ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων. Το μήκος κύματος ρυθμίστηκε στα 265 nm για παρακολούθηση, ενώ η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε στα 290 nm για την PENG και στα 240 nm για OXA, CLO και DICLO.

Η τεχνική προκατεργασίας δείγματος που επιλέχθηκε ήταν η Fabric Phase Sorptive Extraction, μια νέα τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί την επικάλυψη επιφανειών με την τεχνολογία λύματος-πηκτής (sol-gel) και δημιουργεί νέα προσροφητικά υλικά μικροεκχύλισης. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για πρώτη φορά για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων σε ορό αίματος. Μετά από πειραματική δοκιμή δεκατεσσάρων (14) διαφορετικών μέσων FPSE, τα οποία διαφοροποιούνταν ως προς το συνδυασμό υφασμάτινου υποστρώματος και υλικού sol-gel επικάλυψης, επιλέχθηκε το πλέον κατάλληλο, το οποίο ήταν το μέσο sol-gel PTHF. Δημιουργείται με επίστρωση sol-gel πολυτετραυδροφουρανίου σε υφασμάτινο υπόστρωμα κελουλόξης. Όλα τα ειδικά χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του μέσου sol-gel PTHF FPSE, όπως η διαπερατότητα, λόγω του εγγενούς πορώδους του

υφάσματος κελουλόζης, οι προηγμένες ιδιότητες του υλικού και το πορώδες δίκτυο, εξαιτίας της επικάλυψης με PTHF με την τεχνική sol-gel, η κατάλληλη πολικότητα, δρουν συνεργιστικά για την προώθηση της ταχείας αλληλεπίδρασης, μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων και του sol-gel προσροφητικού, με αποτέλεσμα ένα πολύ βραχύ χρόνο εκχύλισης υψηλής απόδοσης.

Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του μέσου sol-gel PTHF FPSE, εκτιμήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης, το εμβαδόν των κορυφών που προέκυπταν στα χρωματογραφήματα και άρα την απόλυτη ανάκτηση. Αυτές οι παράμετροι ήταν (α) ο διαλύτης έκλουσης, (β) ο χρόνος έκλουσης, (γ) η εφαρμογή ανάδευσης κατά την έκλουση (δ) ο χρόνος εκχύλισης / προσρόφησης, (ε) και η ταχύτητα ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε μέσα από κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, η δυνατότητα δικαιολογημένης παράλειψης των σταδίων της καταβύθισης των πρωτεϊνών πριν το στάδιο της εκχύλισης και της εξάτμισης του διαλύτη και επανασύστασης του δείγματος μετά την εκχύλιση. Αποδείχθηκε πως και οι δυο διαδικασίες, όχι μόνο μπορούν να παραλειφθούν, αλλά τυχόν εφαρμογή τους θα προκαλέσει μείωση της απόλυτης ανάκτησης για την κάθε ένωση. Η παράλειψη αυτών των σταδίων είναι αξιοσημείωτη διαφοροποίηση σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και μειώνει σημαντικά το χρόνο της προκατεργασίας και συνεπώς το χρόνο της ανάλυσης, ενώ ταυτοχρόνως ελαττώνει την πιθανότητα για απώλεια ποσότητας αναλυτών, αφού παραλείπονται στάδια που συνήθως είναι επιζήμια. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση του υποστρώματος ορού αίματος, ενώ διεξήχθη μια μελέτη επαναχρησιμοποίησης της μεμβράνης FPSE. Τα πειράματα βελτιστοποίησης διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας πρότυπο υδατικό μίγμα των εκχυλιζόμενων ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/μL.

Μίγμα 500 μL ακετονιτριλίου και υδατικού διαλύματος οξικού αμμωνίου 0,05 M σε αναλογία όγκων 90:10 v/v βρέθηκε ως το πιο αποτελεσματικό σύστημα διαλυτών έκλουσης και για τις τέσσερις ενώσεις. Το μέσο FPSE, μετά από πλύση και ενεργοποίηση για 5 min, πρώτα σε μίγμα 2 mL ακετονιτριλίου-μεθανόλης σε αναλογία όγκων 50:50 και ακολούθως σε 2 mL απιονισμένου νερό, τοποθετείται σε 1 mL μίγματος, το οποίο αποτελείται από 50 μL ορού ανθρώπινου αίματος, 450 μL απιονισμένου νερού και 500 μL πρότυπου υδατικού διαλύματος που περιείχε τα τέσσερα αντιβιοτικά πενικιλίνης στην επιθυμητή συγκέντρωση εμβολιασμού για την κάθε ένωση. Μία μικρή καθαρή μαγνητική ράβδος αναδούσης επικαλυμμένη με Teflon εισήχθη εντός του φιαλιδίου, το οποίο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα, ο οποίος ρυθμίστηκε στα 350 rpm (υψηλότερη ταχύτητα), για να εξασφαλιστεί η αναγκαία διάχυση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μέσα στο δείγμα για 25 min. Αυτό ήταν το στάδιο της εκχύλισης-προσρόφησης. Έπειτα, για το στάδιο της έκλουσης, η μεμβράνη PTHF FPSE, στην οποία έχουν προσροφηθεί οι τέσσερις ενώσεις αντιβιοτικών πενικιλίνης, εισήχθη σε καθαρό φιαλίδιο με 500 μL μίγματος 90:10 v/v ACN:

CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> και η έκλουση αφήνεται να διαρκέσει 10 min, χωρίς μαγνητική ανάδευση. Τέλος, το έκλουσμα μπορεί να εγχυθεί απευθείας στο σύστημα HPLC για χρωματογραφική ανάλυση. Εάν κριθεί απαραίτητο, το έκλουσμα μπορεί να διηθηθεί πριν από την εισαγωγή στο σύστημα HPLC, για να απομακρυνθούν τυχόν σωματιδιακά και στερεά υπολείμματα.

Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα κριτήρια της γραμμικότητας, της επαναληψιμότητας, της πιστότητας, της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας, της σταθερότητας των δειγμάτων μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η επικύρωση της μεθόδου έγινε με εμβολιασμό δειγμάτων ορού αίματος με τις τέσσερις ενώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης βρέθηκαν από την καμπύλη αναφοράς στα 0,15 και 0,5 ng/μL για όλες τις ενώσεις. Επίσης, ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου. Η σχετική τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 11,7% για τις μετρήσεις της ίδιας μέρας και οι ανακτήσεις βρέθηκαν από 88,3 έως 109,1%. Για τις μετρήσεις που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια 4 ημερών με δύο επαναλήψεις ημερησίως βρέθηκε σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη από 12,1% και ανάκτηση από 89,6 έως 110,3%.

Η αξιολόγηση των κύκλων ψύξης και απόψυξης έδειξε ότι η οξακιλίνη, η κλοξακιλίνη και η δικλοξακιλίνη ήταν σταθερές για τέσσερις διαδοχικούς κύκλους, ενώ η βενζυλοπενικιλίνη παρέμεινε σταθερή μόνο για έναν κύκλο. Προέκυψε πως οι ενώσεις παρέμειναν σταθερές, και συνεπώς το δείγμα χαρακτηρίζεται από σταθερότητα για τουλάχιστον 35 ημέρες. Τέλος, ελέγχθηκε η σταθερότητα των ενώσεων των πυκνών υδατικών προτύπων (100 ng/μL). Με βάση την βιβλιογραφία και προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου, η σταθερότητα είχε βρεθεί και ήταν το χρονικό διάστημα του ενός μήνα. Επαληθεύθηκε, λοιπόν, ότι η σταθερότητα των αντιβιοτικών πενικιλίνης σε υδατικά πυκνά διαλύματα είναι εφικτή για τουλάχιστον ένα μήνα, όταν αποθηκεύονται στους 4 ° C απουσία φωτός. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη επαναχρησιμοποίησης του μέσου sol-gel PTHF, η οποία έδειξε ότι το επιλεγμένο μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 35 φορές, χωρίς απώλεια της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Το συμπέρασμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς αναμφισβήτητα καθιστά τη μέθοδο προκατεργασίας που αναπτύχθηκε οικονομική και πράσινη.

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τη μέθοδο Youden, κατά την οποία επτά παράγοντες μεταβλήθηκαν κατά την προκατεργασία του δείγματος. Επιλέχθηκαν επτά διαφορετικοί παράγοντες από τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος, οι οποίοι έχουν κρίσιμη επίδραση στην αποδοτικότητα της εκχύλισης και της μεθόδου συνολικότερα. Η μεταβολή των επτά παραμέτρων έγινε ταυτόχρονα. Αν οι τιμές αυτών των παραγόντων αλλάξουν ελαφρά, σκόπιμα ή τυχαία, θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν: (1) η ταχύτητα της μαγνητικής ανάδευσης κατά το στάδιο της εκχύλισης – προσρόφησης, (2) ο

χρόνος εκχύλισης, (3) ο χρόνος έκλουσης, (4) ο διαλύτης έκλουσης, (5) ο όγκος διαλύτη έκλουσης, (6) το μέγεθος (εμβαδόν) του μέσου FPSE και (7) η χρησιμοποίηση διαφορετικού μέσου FPSE (διαφορετική sol-gel επικάλυψη). Από την αξιολόγηση των δεδομένων, είναι προφανές ότι η PENG ήταν η ένωση, της οποίας η εκχύλιση φάνηκε να επηρεάστηκε κατά μέσο όρο περισσότερο από όλες τις μεταβολές, ενώ για τις άλλες τρεις, OXA, CLOXA και DICLO, η επίδραση των μεταβολών στην αποδοτικότητα της εκχύλισης ήταν παρόμοια και σε μέτρια έκταση. Το επιλεγμένο βέλτιστο μέσο FPSE επικαλυμμένο με sol-gel PTHF, ως μεταβλητός παράγοντας της δοκιμασίας Youden είχε τη μεγαλύτερη θετική επίδραση. Επιπλέον, το μέγεθος (εμβαδόν) του μέσου FPSE είχε έντονη θετική επίδραση. Η ταχύτητα ανάδευσης κατά την προσρόφηση των εκχυλιζόμενων μορίων στη μεμβράνη FPSE, ο χρόνος εκχύλισης, ο χρόνος έκλουσης, ο διαλύτης έκλουσης και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης εκτιμήθηκε ότι έχει μικρή θετική ή αρνητική επίδραση. Η εκχύλιση της OXA φάνηκε πιο σταθερή σε σχέση με τις άλλες μεταβολές που αξιολογήθηκαν, με μικρή διαφορά από CLOXA και DICLO, που και οι δύο εμφάνισαν παρόμοια σταθερότητα. Γενικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι ανθεκτική, καθώς όλες οι τιμές τυπικής απόκλισης των παραγόντων ήταν κοντά στην SD της μεθόδου για το συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης.

Τέλος, εξετάστηκε η συμφωνία των πειραματικών τιμών απόλυτης ανάκτησης για τις τέσσερις ενώσεις μετά από FPSE προκατεργασία με το μέσο sol-gel PTHF, με τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές ανάκτησης που θα προέκυπταν χρησιμοποιώντας το ανεπτυγμένο μαθηματικό μοντέλο, από το οποίο προκύπτουν αυτές, δηλαδή την εξίσωση συσχέτισης απόλυτης ανάκτησης και τιμής  $\log K_{ow}$  της κάθε ένωσης. Η σύγκριση μεταξύ των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών ανάκτησης, των πραγματικών τιμών ανάκτησης που προέκυψαν από τα δείγματα προτύπων σε απιονισμένο νερό και των πραγματικών τιμών ανάκτησης που προέκυψαν από εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος σε συγκέντρωση 10 ng/mL, έδειξε πως οι πειραματικές τιμές ανάκτησης και συνεπώς αποδοτικότητας της εκχύλισης των εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος για όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά βρέθηκαν περίπου στο ήμισυ των τιμών των προβλεπόμενων τιμών που ελήφθησαν με το μοντέλο. Ωστόσο, οι πειραματικές τιμές % απόλυτης ανάκτησης που προέκυψαν από τα εμβολιασμένα δείγματα σε υπόστρωμα απιονισμένου νερού αποκλίνουν αισθητά λιγότερο από την εξίσωση συσχέτισης.

Οι πρωτεΐνες και άλλα συστατικά του υποστρώματος, συγκρατούν σημαντικό τμήμα των προσδιοριζόμενων ενώσεων κάτι που στην περίπτωση του απιονισμένου νερού δε συμβαίνει. Συνεπώς αποκαλύπτεται η σημαντική επίδραση υποστρώματος. Στην άλλη περίπτωση, η απόκλιση από τη θεωρητική εξίσωση μπορεί να δικαιολογηθεί αφού ληφθούν υπόψη τόσο οι τιμές pKa των ενώσεων, όσο και οι συνθήκες pH κατά τη διάρκεια του σταδίου της εκχύλισης FPSE, η οποία λαμβάνει χώρα κάτω από ουδέτερες συνθήκες (pH 7).

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι αναπτύχθηκε μια μέθοδος, η οποία είναι:

- ★ **Απλή:** για την προκατεργασία του δείγματος δεν απαιτείται κάποια προεργασία για τον καθαρισμό του και την απομόνωση των ενώσεων, όπως η αποπρωτεΐνωση.
- ★ **Γρήγορη:** Ο χρόνος προκατεργασίας είναι μικρός με ελάχιστα βήματα και εξαλείφονται τυχόν πηγές σφαλμάτων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε 7,8 min.
- ★ **Δεν απαιτούνται μακρόχρονα στάδια και τεχνικά σύνθετα στάδια** (π.χ. διαδικασία της καταβύθισης πρωτεϊνών και της εξάτμισης υπό ρεύμα αζώτου)
- ★ **Οικονομική και και σύμφωνη με άλλες μοντέρνες τάσεις για πράσινες τεχνικές:** Χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες διαλυτών σε σχέση με άλλες μελέτες που υπάρχουν σχετικά με τον προσδιορισμό πενικιλινών στον ορό αίματος. Δεν γίνεται χρήση τοξικών διαλυτών (εξάνιο, χλωριωμένοι διαλύτες κλπ).
- ★ **Το μέσο FPSE είναι επαναχρησιμοποιήσιμο για πολλαπλή χρήση.**
- ★ **Αποτελεσματική και Ευαίσθητη:** Δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων ήταν επαναλήψιμη.

## 17. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ HPLC ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION (FPSE)

Η Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE), μια σύγχρονη τεχνική προσροφητικής μικροεκχύλισης, εκτιμήθηκε ως η βάση για την ανάπτυξη μιας «πράσινης», απλής, ευαίσθητης, αξιόπιστης και γρήγορης αναλυτικής μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ανίχνευσης παράταξης φωτοδίοδων (HPLC-PDA) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων αντιβιοτικών πενικιλίνης (βενζυλοπενικιλίνη, οξακιλίνη, κλοξακιλίνη και δικλοξακιλίνη) σε ορό ανθρώπινου αίματος. Η FPSE συνδυάζει αποτελεσματικά τις προηγμένες ιδιότητες των σύγχρονων προσροφητικών υλικών, η παραγωγή των οποίων στηρίζεται στην επικάλυψη επιφανειών με την τεχνολογία λύματος-πηκτής (sol-gel), με τις σημαντικές χημικές ιδιότητες της επιφάνειας ενός εγγενώς πορώδους και υδρόφιλου υποστρώματος κελουλόζης, με αποτέλεσμα μια ευέλικτη, εξαιρετικά ευαίσθητη συσκευή μικροεκχύλισης, αποτελεσματική στην εκχύλιση των ενώσεων στόχων απευθείας από το δείγμα. Οι χρονοβόρες διαδικασίες εξάτμισης του διαλύτη και επανασύστασης του δείγματος απορρίφθηκαν ως μη πρακτικές από τη διαδικασία της προετοιμασίας του δείγματος πράγμα που συνέβη και για τη διαδικασία της καταβύθισης των πρωτεϊνών. Η κατανάλωση οργανικών διαλυτών περιορίστηκε στο ελάχιστο δυνατό. Έτσι, η τεχνική FPSE που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε πληροί τα κριτήρια της «πράσινης» αναλυτικής χημείας (GAC). Λόγω της ισχυρής χημικής σύνδεσης μεταξύ του κολλοειδούς προσροφητικού sol-gel και του υποστρώματος, η μεμβράνη μικροεκχύλισης παρουσιάζει πολύ υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα. Σε αυτή την εργασία, μέσο FPSE αποτελούμενο από υπόστρωμα υφάσματος κελουλόζης επικαλυμμένο με κολλοειδές διάλυμα πολυτετραϋδροφουράνιου (PTHF) απέδωσε τη βέλτιστη ευαισθησία εκχύλισης για τα επιλεγμένα αντιβιοτικά πενικιλίνης και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση τεσσάρων πενικιλινών από ανθρώπινο ορό αίματος, χωρίς προηγούμενη καταβύθιση πρωτεϊνών και χωρίς εξάτμιση διαλύτη και επανασύσταση του δείγματος μετά την εκχύλιση. Ο διαχωρισμός έγινε με μια μέθοδο RP-HPLC σε 7,8 min. Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την εκλεκτικότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα και τη σταθερότητα των δειγμάτων. Για τα τέσσερα αντιβιοτικά πενικιλίνης, το LOD και το LOQ ήταν 0,15 ng/μL και 0,5 ng/μL, αντίστοιχα. Επιπλέον, μελετήθηκε και αποδείχθηκε η δυνατότητα πολλαπλής επαναχρησιμοποίησης του μέσου FPSE. Ακόμη, διενεργήθηκε συγκριτική μελέτη συμφωνίας διαφόρων πειραματικών δεδομένων με το κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για το μέσο sol-gel PTHF. Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εξετάστηκε με το test Youden.



## ***18. SUMMARY***

### **FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION FOR SIMOULTANEOUS OBSERVATION OF FOUR PENICILLIN ANTIBIOTICS RESIDUES FROM HUMAN BLOOD SERUM PRIOR TO HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND PHOTO-DIODE ARRAY DETECTION**

Fabric phase sorptive extraction (FPSE), a current and up-to-date technique of solid sorbent-based microextraction, is regarded to be the basis of the development and advancement of an environmentally friendly, simple, sensitive, trustworthy, and fast analytical method by making use of high performance liquid chromatography and photo-diode array detection (HPLC-PDA) for the concurrent determination of four penicillin antibiotics residues (benzylpenicillin, cloxacillin, dicloxacillin and oxacillin) in human blood serum. By means of FPSE, the sophisticated material properties of sol-gel derived extraction and microextraction sorbents and the rich surface chemistry of an inherent porous and hydrophilic cellulose fabric substrate are successfully combined, leading to a flexible microextraction device which is characterized by high efficiency in extracting target analytes directly from complex sample matrices. Solvent evaporation and reconstitution steps, which are considered to be rather time-consuming, were eradicated successfully from the sample preparation workflow, organic solvent consumption was brought to a minimum while protein precipitation was assessed as impractical. Thus, FPSE complies with all green analytical chemistry (GAC) criteria. The microextraction device is characterized by a very high chemical and solvent stability owing to the strong chemical bonds formed between the sol-gel sorbent and the substrate. Thus, any organic solvent/solvent mixture can serve as the eluent/back-extraction solvent. Herein, sol-gelpoly(tetrahydrofuran) coated FPSE membrane provided optimum extraction sensitivity for the selected penicillin antibiotics, which were analyzed using an RP-HPLC method, validated in terms of sensitivity, linearity, accuracy, precision, and selectivity. For all four penicillin antibiotics, the limit of detection and the limit of quantitation were 0.15 ng/ $\mu$ L and 0.5 ng/ $\mu$ L, respectively.

## 19. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας προέκυψαν η ακόλουθη δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό:

Fabric phase sorptive extraction for simultaneous observation of four penicillin antibiotics from human blood serum prior to high performance liquid chromatography and photo-diode array detection.

Vasileios Alampanos, Abuzar Kabir, Kenneth G. Furton, Victoria Samanidou, Ioannis Papadoyannis. *Microchemical Journal*, Volume 149, September 2019, 103964.

Επιπροσθέτως, δημοσιεύτηκε και το ακόλουθο άρθρο ανασκόπησης:

Trends in Sample Preparation for the HPLC Determination of Penicillins in Biofluids.

Vasileios Alampanos, Victoria Samanidou, Ioannis Papadoyannis.

*Journal of Applied Bioanalysis*. Volume 5, No. 1. January 2019.

## 20. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lax E: "The Mold in Dr. Florey's Coat: The Story of the Penicillin Miracle", Holt Paperback & Co, New York, 2004.
2. Tames R: "Penicillin: A Breakthrough in Medicine", Heinemann-Raintree, London, 2007
3. Victoria Samanidou. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Journal of Separation Science*, 2006.
4. Fleming, A. (Ed.), *Penicillin: Its Practical Application*, Blakiston, Philadelphia, PA 1946, pp. 1–33
5. <http://nobelprize.org/medicine/educational/penicillin/readmore.html>.
6. P.T. Reeves, *Antibiotics: groups and properties*, in: J. Wang, J.D. MacNeil, J.F. Kay (Eds.), *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*, John Wiley & Sons Inc., 2012, pp. 1–60.
7. *The Merck Veterinary Manual*, Merck & Co. 2009. ([http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial\\_agents/penicillins.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial_agents/penicillins.html)), (Accessed 5 December 2016).
8. Wright A.J. The penicillins. *Mayo Clin Proc.* 1999 Volume 74, Issue 3, Pages 290–307.
9. Giguère, Steeve, Prescott, John F. and Dowling, Patricia M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th Edition. s.l. : John Wiley & Sons, Inc, 2013.
10. Jason A. Roberts, Marta Ulldemolins, Michael S. Roberts, Brett McWhinney, Jacobus Ungerer, David L. Paterson, Jeffrey Lipman. Therapeutic drug monitoring of  $\beta$ -lactams in critically ill patients: proof of concept. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (2010) 332–339.
11. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med* 2009;37:840–51.
12. Michael Osthoff, Martin Siegemund, Gianmarco Balestra, Mohd H. Abdul-Aziz, Jason A. Roberts. *Swiss Med Wkly*. Prolonged administration of  $\beta$ -lactam antibiotics – a comprehensive review and critical appraisal 2016;146:w14368 .
13. Mahipal G Sinnollareddy, Michael S Roberts, Jeffrey Lipman and Jason A Roberts.  $\beta$ -Lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and strategies for dose optimization: A structured review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2012) 39, 489–496.
14. Brett C. McWhinney, Steven C. Wallis, Tara Hillister, Jason A. Roberts, Jeffrey Lipman, Jacobus P.J. Ungerer. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 2039–2043.
15. Fekade Bruck Sime, Michael S. Roberts, Jason A. Roberts, Thomas A. Robertson. Simultaneous determination of seven  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, 960 (2014) 134–144.

16. Marie-Clemence Verdier, Olivier Tribut, Pierre Tattevin, Yves Le Tulzo, Christian Michelet, and Daniele Bentue-Ferrer. Simultaneous Determination of 12  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 2011, p. 4873–4879.
17. Tomofumi Ohmori, Akio Suzukia, Takashi Niwa Hiroaki Ushikoshi, Kunihiro Shirai , Shozo Yoshida, Shinji Ogura, Yoshinori Itoh. Simultaneous determination of eight  $\beta$ -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 1038–1042.
18. Francisco J. Lara, Monsalud del Olmo-Iruela, Carmen Cruces-Blanco, Carolina Quesada-Molina, Ana M. Garcia-Campana. Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 38, 2012.
19. V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1879.
20. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens. Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast high-resolution liquid chromatography and luminescence detection. *Talanta* 170 (2017) 343–349.
21. Niu Z, Zhang W, Yu C et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends Anal Chem* 102, 123-146 (2018).
22. Novakova L, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, *J Chrom A* 1292, 25-37 (2013).
23. A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.
24. Olga Filippou, Dimitrios Bitas, Victoria Samanidou. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, 1043 (2017) 44–62.
25. Alampanos V, Samanidou V, Papadoyannis I. Trends in sample preparation for the HPLC determination of penicillins in bio-fluids. *J Appl Bioanal* 5(1), 9-17 (2019).
26. <http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/elisa-sample-preparation-protocols/plasma-and-serum-preparation.html>.
27. Collins Dictionary of Biology. 2005.
28. Παπαδογιάννης, Ιωάννης Ν. και Σαμανίδου, Βικτώρια Φ. Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Θεσσαλονίκη : s.n., 2001.

29. Παπαδογιάννης, Ιωάννης Ν. Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Θεσσαλονίκη : Πήγασος, 2004. ISBN:960-317-078-X.
30. [http://www.chem.auth.gr/content/organic\\_lab/CHEM/EXTRACT.pdf](http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf).
31. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990)2145–2148.
32. H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in amicrodrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821.
33. S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 71(2015) 2–8.
34. Baltussen E, Sandra P, David F et al. Stir bar sorptive extraction SBSE, a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J Microcolumn Sep* 11(10), 737-747 (1999).
35. Płotka-Wasyłka J, Szczepanska N, de la Guardia M, Namiesnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends Anal Chem* 73, 19–38 (2015).
36. Asgharinezhad AA, Karami S, Ebrahimzadeh H et Al. Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. *Int J Pharm* 494, 102–112 (2015).
37. Safaríková M, Safarík I. Magnetic solid-phase extraction. *J Magn Mater* 194, 108–112 (1999).
38. Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). *Trends Anal Chem* 67, 34–44 (2015).
39. Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Anal Chim Acta* 668, 87–99 (2010).
40. Namera A, Nakamoto A, Nishida M et al. Extraction of amphetamines and methyl-ene dioxy amphetamines from urine using a monolithic silica disk-packed spin column and high-performance liquid chromatography-diode array detection. *J Chrom A* 1208,71-75 (2008).
41. A. Kabir, K.G. Furton. Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE). s.l. : United States Patent and Trademark Office, 2014. 14,216,121.
42. Kabir, A., Furton, K. G. and Malik, A. Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry.* 2013, 4.
43. Chong, S. L., et al., et al. Sol-gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability. *Analytical Chemistry.* 1997, Vol. 69, (19).
44. Viktoria Kazantzi and Aristidis Anthemidis. Fabric Sol-gel Phase Sorptive Extraction Technique: A Review. *Separations* 2017, 4, 20.

45. Abuzar Kabir, Rodolfo Mesa, Jessica Jurmain and Kenneth G. Furton. Fabric Phase Sorptive Extraction Explained. *Separations* 2017, 4, 21.
46. Alcudia-Leon, M.C.; Lucena, R.; Cardenas, S.; Valcarcel, M. Stir membrane extraction: A useful approach for liquid sample pretreatment. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8957–8961.
47. Abuzar Kabir, Christina Hamlet, Abdul Malik. Parts per quadrillion level ultra-trace determination of polar and nonpolar compounds via solvent-free capillary microextraction on surface-bonded sol-gel polytetrahydrofuran coating and gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1047 (2004) 1–13.
48. Rajesh Kumar, Gaurav, Heena, Ashok Kumar Malik, Abuzar Kabir, Kenneth G. Furton. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1359 (2014) 16–25.
49. Abuzar Kabir, Kenneth G. Furton. Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE): A New Direction In Sorptive-Microextraction. Conference Paper, May 2014.
50. Kabir, A. (2014), FPSE Sorbent Selection Guide, unpublished work.
51. Youden, W. J., & Steiner, E. H. (1975). *Statistical manual of AOAC*. Association of Official Analytical Chemists, AOAC-I.
52. Karageorgou, E., & Samanidou, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*, 1353, 131–139.
53. Hansch, C., & Leo, A. (1987). *The log P database*. Claremont, CA: Pomona College.
54. Hansch, C., Leo, A., & Hoekman, D. (1995). *Exploring QSAR hydrophobic, electronic and steric constants*. Washington, DC: ACS.
55. Kumar, R.; Gaurav; Heena; Malik, A.K.; Kabir, A.; Furton, K.G. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2014, 1359, 16–25.
56. Kumar, R.; Gaurav; Kabir, A.; Furton, K.G.; Malik, A.K. Development of a fabric phase sorptive extraction with high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection method for the analysis of alkyl phenols in environmental samples. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 3228–3238.
57. Guedes-Alonso, R.; Ciofi, L.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J.; Del Bubba, M.; Kabir, A.; Furton, K.G. Determination of androgens and progestogens in environmental and biological samples using fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2016, 1437, 116–126.
58. Heena Kaur, R.; Rani, S.; Malik, A.K.; Kabir, A.; Furton, K.G. Determination of cobalt (II), nickel (II) and palladium (II) Ions via fabric phase sorptive extraction in combination with high-performance liquid chromatography-UV detection. *Sep. Sci. Technol.* 2017, 52, 81–90.

59. Furton, K.G.; Rani, S.; Malik, A.K.; Kabir, A.; Furton, K.G. Speciation of Cr (III) and Cr (VI) ions via fabric phase sorptive extraction for their quantification via HPLC with UV detection speciation of Cr (III) and Cr (VI) ions via fabric phase sorptive extraction for their quantification via HPLC with UV. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 2016.
60. Aznar, M.; Alfaro, P.; Nerin, C.; Kabir, A.; Furton, K.G. Fabric phase sorptive extraction: An innovative sample preparation approach applied to the analysis of specific migration from food packaging. *Anal. Chim. Acta* 2016, 936, 97–107.
61. Youden, W. J., & Steiner, E. H. (1975). *Statistical manual of AOAC*. Association of Official Analytical Chemists, AOAC-I.
62. Karageorgou, E., & Samanidou, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*, 1353, 131–139.
63. Samanidou VF, Evaggelopoulou EN, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of four penicillin antibiotics in pharmaceuticals and human biological fluids. *J Sep Sci.* 2006 Jul;29(11):1550-60.