



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗΣ
ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΓΡΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ
ΜΑΖΑΣ

ΚΟΥΤΡΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗΣ
ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΓΡΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ
ΜΑΖΑΣ**

ΚΟΥΤΡΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M. : 161303

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗΣ
ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΓΡΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ
ΜΑΖΑΣ**

**ΚΟΥΤΡΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Επιβλέπουσα: Μαρκοπούλου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής ΑΠΘ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μαρκοπούλου Αικατερίνη
2. Επίκουρος Καθηγητής, Ζαχαρίας Κωνσταντίνος
3. Επίκουρος Καθηγητής, Τζαναβάρας Παρασκευάς

«Η επιτυχία δεν μετριέται από αυτό που έχεις κατορθώσει, αλλά από την αντίσταση που συνάντησες και από το κουράγιο που έδειξες στη μάχη απέναντι σε αμέτρητες αντιξοότητες.»

Orison Swett Marden, 1848-1924, Αμερικανός συγγραφέας

Στην οικογένειά μου που πάντα με στηρίζει.

Ευχαριστώ που είστε δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών «Χημική ανάλυση – Έλεγχος ποιότητας». Το θέμα της εργασίας αυτής υποδείχθηκε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Αικατερίνη Μαρκοπούλου, την οποία ευχαριστώ θερμά για την εξαιρετική συνεργασία, τη συνεχή επίβλεψη, την καθοδήγηση, τις χρήσιμες και εποικοδομητικές συμβουλές της, καθώς και για τη στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

- τον κ. Ζαχαρή Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ, τόσο για την πολύτιμη βοήθειά του και τις εξαιρετικές συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας όσο και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του κατά τη διόρθωση αυτής.
- τον κ. Τζαναβάρα Παρασκευά, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΑΠΘ, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του κατά τη διόρθωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παπαδογιάννη Ιωάννη, Καθηγητή του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας ΑΠΘ και Υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Κούσκουρα Μαρία του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας παρέχοντας ορθές συμβουλές και υποδείξεις. Με βοήθησε πολύ στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου και την ευχαριστώ θερμά για αυτό.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Τσάμη Μαρία του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ για την άψογη συνεργασία μας κατά το τελικό στάδιο εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και το αρχικό στάδιο εκπόνησης της προπτυχιακής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακευτικής Ανάλυσης για την εξαιρετική συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τα δείγματα ελήφθησαν από τον κ. Ζησιμόπουλο Κωνσταντίνο, Ειδικό Παθολόγο και Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Πανεπιστημίου Πατρών, τον οποίο επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εξαιρετική του συνεργασία, την επιστημονική καθοδήγηση και τις παρατηρήσεις του.

Να σημειώσω εδώ ότι τα αποτελέσματα της διπλωματικής-ερευνητικής μου εργασίας παρουσιάστηκαν στο Διεθνές Συνέδριο Ήπατος 2019 (The International Liver Congress 2019, organized by the European Association for the Study of the Liver, EASL), Βιέννη, Αυστρία, 10-14 Απριλίου 2019 και καταγράφηκαν στο επιστημονικό περιοδικό *Journal of Hepatology*.

Όλη η πειραματική διαδικασία, η προκατεργασία καθώς και η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου καθώς με τη συμπαράσταση, την εμπιστοσύνη και την αγάπη τους, με βοήθησαν στο να ολοκληρωθεί η διπλωματική μου εργασία επιτυχώς.

Θεσσαλονίκη, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦ. 1: ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	2
1.1. ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗ.....	2
1.1.1. Βιοσύνθεση - Έκκριση	2
1.1.2. Μεταβολισμός - Φαρμακοκινητική.....	4
1.1.3. Φαρμακολογικές ιδιότητες - Δράση.....	6
1.1.4. Επιδράσεις υψηλής κορτιζόλης στο σώμα	9
1.1.5. Φυσικοχημικές ιδιότητες	13
1.1.6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό υδροκορτιζόνης.....	14
1.2. ΟΞΙΚΗ ΠΡΕΔΝΙΖΟΛΟΝΗ	17
1.2.1. Φαρμακολογικές ιδιότητες - Δράση	17
1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες	18
1.2.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό οξικής πρεδνιζολόνης.....	19
ΚΕΦ. 2: ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ	22
ΚΕΦ. 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	25
ΚΕΦ. 4: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	27
4.1. ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	27
4.2. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LLC).....	29
4.3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	32
4.3.1. Αρχές λειτουργίας HPLC	32
4.3.2. Διάταξη οργανολογίας HPLC	33
4.3.3. HPLC κανονικής και αντίστροφης φάσης.....	37
4.4. ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	40
ΚΕΦ 5: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SPE)	42
5.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	45
5.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	47
ΚΕΦ. 6: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)	50
6.1. ΔΙΑΤΑΞΗ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	50
6.2. ΙΟΝΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ	54
6.3. ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ	56
6.4. ΣΥΖΕΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ Ή ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

6.4.1. Διασύνδεση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC-MS)	59
6.4.2. Διασύνδεση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS).....	59
6.5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	61
6.5.1. Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan)	61
6.5.2. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM).....	62
ΚΕΦ. 7: ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ	63
Σκοπός Εργασίας	66
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
ΚΕΦ. 8: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΥΛΙΚΑ	68
8.1. ΟΡΓΑΝΑ	68
8.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΣΚΕΥΗ	69
8.3. ΥΛΙΚΑ	70
8.4. ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΠΡΟΤΥΠΟΣ ΟΥΣΙΑ	70
ΚΕΦ. 9: ΑΝΑΠΤΥΞΗ & ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	72
9.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	72
9.1.1. Διερεύνηση διαφορετικών κινητών φάσεων	73
9.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	74
9.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΛΥΣΗΣ	75
9.3.1. Έλεγχος συμπεριφοράς διαλύτη αραίωσης πρότυπων διαλυμάτων	77
9.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	78
9.5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	81
ΚΕΦ. 10: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ & ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	83
10.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ	83
10.1.1. Καμπύλη αναφοράς καθαρών προτύπων	83
10.1.2. Καμπύλη αναφοράς προτύπων επεξεργασμένων με SPE	85
10.1.3. Καμπύλη αναφοράς εμβολιασμένου ορού	87
10.2. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	90
10.3. ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	93
10.4. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) & ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOQ) ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	95
ΚΕΦ. 11: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96
11.1. ΤΡΟΠΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	96
11.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	100

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ (BATCH)	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	112
ABSTRACT	113

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1: ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

1.1. ΥΔΡΟΚΟΡΤΙΖΟΝΗ

1.1.1. Βιοσύνθεση - Έκκριση

Τα κορτικοστεροειδή ή κορτικοειδή είναι μία τάξη χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει τις στεροειδείς ορμόνες που παράγονται με φυσικό τρόπο στον φλοιό των επινεφριδίων του ανθρώπου και γενικά των σπονδυλωτών, καθώς και ανάλογες αυτών των ορμονών που παρασκευάζονται συνθετικά σε εργαστήρια. Τα κορτικοστεροειδή εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών, όπως την απόκριση στο στρες, στο ανοσοποιητικό σύστημα και στη ρύθμιση των φλεγμονών, τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, τον καταβολισμό των πρωτεϊνών, τη ρύθμιση των επιπέδων των ηλεκτρολυτών στο αίμα και τη συμπεριφορά. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

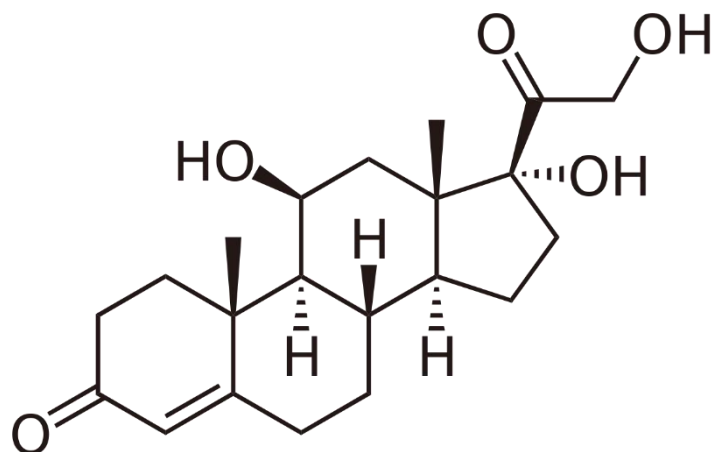
Τα *αλατοκορτικοειδή* (mineralcorticoids), όπως η αλδοστερόνη, ελέγχουν τα επίπεδα των ηλεκτρολυτών και του νερού, κυρίως προκαλώντας την κατακράτηση νατρίου στα νεφρά.

Τα *γλυκοκορτικοειδή*, όπως η κορτιζόλη, ελέγχουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, ενώ ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση αποτρέποντας την απελευθέρωση φωσφολιπιδίων, μειώνοντας τη δράση των ηωσινόφιλων κλπ.

Ορισμένες κοινές φυσικές κορτικοειδείς ορμόνες είναι η κορτικοστερόνη, η κορτιζόνη και η αλδοστερόνη.

Η υδροκορτιζόνη ή κορτιζόλη είναι η κύρια αδρενοκορτικοστεροειδής ορμόνη στον ανθρώπινο οργανισμό (αποτελεί το 75-95% των κορτικοειδών του πλάσματος) και πιο συγκεκριμένα γλυκοκορτικοστεροειδής ορμόνη. Στην πραγματικότητα, συνήθως οι δύο όροι, κορτιζόλη και υδροκορτιζόνη, αναγνωρίζονται ως ταυτόσημοι και διακρίνονται μόνο από την κοινή χρήση τους στην ιατρική (υδροκορτιζόνη) και στη βιοχημεία (κορτιζόλη).

Η κορτιζόλη συντίθεται στη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων, από την κορτιζόνη, η οποία είναι αδρανής μέχρι να μετατραπεί στη δραστική υδροκορτιζόνη. Ο μοριακός τύπος της τελευταίας είναι: $C_{21}H_{30}O_5$. Η χημική δομή της απεικονίζεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1. Χημική δομή της υδροκορτιζόνης.

Συνοπτικά, η βιοσύνθεση της κορτιζόλης λαμβάνει χώρα ως εξής: από τη χοληστερόλη σχηματίζεται πρεγνενολόνη, με την αποκοπή της πλάγιας αλυσίδας με σπάσιμο του δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα C-20 και C-22 και την προσθήκη μιας κετονικής ομάδας στο άτομο C-20. Η τελευταία αντίδραση αποτελεί και το καθοριστικό βήμα της ταχύτητας της συνολικής αντίδρασης και συντελείται από τη δεσμολάση της χοληστερόλης, που είναι συνδεδεμένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ανήκει στην ομάδα των ενζύμων P-450 του κυτοχρώματος.

Στη συνέχεια, η πρεγνενολόνη βγαίνει από το μιτοχόνδριο και μεταβολίζεται σε προγεστερόνη μέσω του ενζύμου 3β-υδροξυστεροϊδικής δεϋδρογονάσης, το οποίο ταυτόχρονα δρα και σαν ισομεράση, μεταφέροντας τον διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα C-5 και C-6 στα άτομα C-5 και C-4. Η προγεστερόνη μέσω ενός ενζύμου του κυτοχρώματος, την 17α-υδροξυλάση, μεταβολίζεται σε 17α-υδροξυπρογεστερόνη, η οποία με τη σειρά της θα υδροξυλιωθεί σε 11-δεσοξυκορτιζόλη μέσω του ενζύμου του κυτοχρώματος 21-υδροξυλάσης. Η 11-δεσοξυκορτιζόλη επιστρέφει πίσω στο μιτοχόνδριο για να μετατραπεί τελικά σε κορτιζόλη μέσω του ενζύμου του κυτοχρώματος 11β-υδροξυλάσης. Εναλλακτικά, η προγεστερόνη υδροξυλιώνεται στο άτομο C-21 σε 11-δεσοξυκορτικοστερόνη μέσω του ενζύμου του κυτοχρώματος 21-υδροξυλάση και στη συνέχεια στο άτομο C-11 σε κορτικοστερόνη με το ένζυμο του κυτοχρώματος 11β-υδροξυλάση. Η κορτικοστερόνη είναι το κύριο κυκλοφορούν γλυκοκορτικοειδές στους επίμυες και έχει τις ίδιες δράσεις που έχει η κορτιζόλη στους ανθρώπους [1,2].

1.1.2. Μεταβολισμός - Φαρμακοκινητική

Η κορτιζόλη και τα άλλα γλυκοκορτικοειδή είναι σημαντικές μεταβολικές ορμόνες [1]. Η κορτιζόλη αυξάνει τη διαθεσιμότητα όλων των υποστρωμάτων καυσίμων με κινητοποίηση γλυκόζης [2,3], ελεύθερων λιπαρών οξέων [4] και αμινοξέων από ενδογενείς αποθήκες [5,6]. Έτσι, όταν είναι σε πλεονάζουσα κατάσταση, η κορτιζόλη είναι μια συνολική καταβολική ορμόνη, η οποία μειώνει την άλιπη σωματική μάζα και τη μυϊκή μάζα και μπορεί να αυξήσει την ενεργειακή δαπάνη [7]. Ταυτόχρονα, τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την όρεξη και την πρόσληψη τροφής και μπορούν να αυξήσουν τη λιπώδη μάζα [7]. Η κορτιζόλη προκαλεί επίσης αντίσταση στην ινσουλίνη [2,3] και έχει προταθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στο μεταβολικό σύνδρομο και την καρδιαγγειακή νόσο [10,11]. Φυσιολογικά αυτές οι δράσεις είναι σημαντικές κατά τη διάρκεια του στρες, όπως η νηστεία και η άσκηση και κλινικά κατά τη διάρκεια της περίσσειας γλυκοκορτικοειδών (σύνδρομο Cushing), της αδρενοκορτικοποίησης, της υπογλυκαιμίας και της φλεγμονώδους νόσου [1,7,10,12]. Η κορτιζόλη ασκεί τα αποτελέσματά της μετά την πρόσληψη της ελεύθερης ορμόνης από την κυκλοφορία και τη δέσμευση σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς κορτικοειδών, που είναι μέλη της υπεροικογένειας ορμόνης υποδοχέα στεροειδών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων [1].

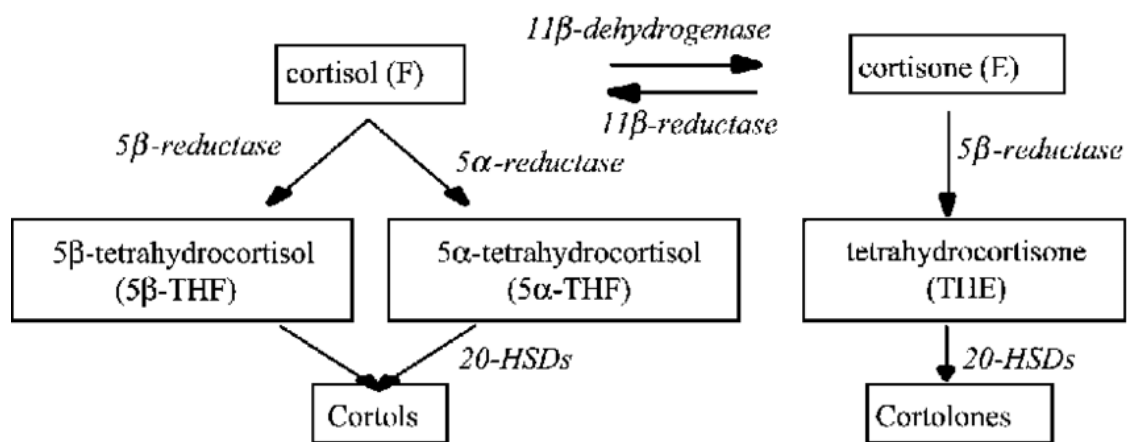
Οι γνώσεις σχετικά με τις μεταβολικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών βασίζονται κυρίως σε μελέτες στις οποίες δόθηκαν ποικίλες ποσότητες κορτιζόλης ή συνθετικών γλυκοκορτικοειδών ή σε μελέτες ασθενών με ενδογενή υπερέκκριση, ενώ πολύ λιγότερες είναι γνωστές για τις μεταβολικές επιδράσεις της ανεπάρκειας γλυκοκορτικοειδών. Γενικά, οι ασθενείς με νόσο του Addison εμφανίζουν κλινικά απώλεια βάρους, μυϊκή αδυναμία, κόπωση και τάση υπογλυκαιμίας [4], αλλά υπάρχει έλλειψη ελεγχόμενων μελετών στον τομέα και η φύση της απώλειας βάρους και των αλλαγών στο μεταβολισμό παραμένει αβεβαιότητα σε αυτούς τους ασθενείς. Μια μελέτη που στοχεύει στον εντοπισμό του ρόλου της κορτιζόλης στην υπογλυκαιμική αντίθετη ρύθμιση έδειξε ότι οι ασθενείς με αποφρακτική αδενόρροια έχουν φυσιολογική ενδογενή παραγωγή γλυκόζης και χρήση γλυκόζης όταν λαμβάνουν αντικατάσταση γλυκοκορτικοειδών [14].

Με βάση ελεγχόμενες παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια της περίσσειας γλυκοκορτικοειδών μαζί με εμπειρικές κλινικές παρατηρήσεις σε ασθενείς με νόσο του Addison, φαίνεται ότι η ανεπάρκεια γλυκοκορτικοειδών οδηγεί κατά κύριο λόγο σε αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και μειωμένη απώλεια πρωτεϊνών. Έτσι, η

αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη θα μπορούσε να εξηγήσει την τάση για υπογλυκαιμία, ενώ η απώλεια βάρους, η μυϊκή αδυναμία και η κόπωση από συμπεράσματα θα συνεπάγονταν άλλους μηχανισμούς, όπως μειωμένη όρεξη και λήθαργο.

Έχουν γίνει μελέτες που σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να καθορίσουν τις μεταβολικές επιδράσεις της οξείας απόσυρσης κορτιζόλης στον μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και των αμινοξέων σε ασθενείς με ανεπάρκεια των επινεφριδίων. Ο πρωταρχικός στόχος των μελετών αυτών ήταν να εξεταστεί κατά πόσο αυτοί οι ασθενείς θα παρουσίαζαν αυξημένη ηπατική και περιφερειακή ευαισθησία στην ινσουλίνη (οδηγώντας σε τάση υπογλυκαιμίας). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν ασθενείς με αδρενοκορτικοποιημένη ανεπάρκεια με και χωρίς οξεία απόσυρση κορτιζόλης και χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές με έμμεση θερμιδομετρία, γλυκόζη και ιχνηθέτη αμινοξέων, μικροδιάλυση και αρτηριοφλεβικό αντιβραχίδων και σφιγκτήρα γλυκόζης για τον εντοπισμό μεταβολικών ανωμαλιών [14].

Η κορτιζόλη μεταβολίζεται από διάφορα ένζυμα (Σχήμα 1.2), συμπεριλαμβανομένης της μη αναστρέψιμης αδρανοποίησης από τις αναγωγάσες του δακτυλίου Α (5α και 5β-αναγωγάσες) και την αναστρέψιμη ενδομετατροπή στην ανενεργή κορτιζόνη.



Σχήμα 1.2. Μεταβολισμός της κορτιζόλης [12].

Η ενδομετατροπή με κορτιζόνη καταλύεται από 11β-υδροξυστεροειδείς αφυδρογονάσες (11βHSDs), οι οποίες πλέον αναγνωρίζονται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των υποδοχέων κορτικοστεροειδών. Το 11βHSD τύπου 2 [1,2] απενεργοποιεί την κορτιζόλη, προστατεύοντας έτσι τους υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών από την ακατάλληλη ενεργοποίηση από την κορτιζόλη. Συγγενή ή επίκτητα ελαττώματα

στο 11βHSD2 οδηγούν σε περίσσεια κορτιζόλης [3-5]. Πιο πρόσφατα, έχει καθοριστεί ο ρόλος του 11βHSD τύπου 1 [6]. Αυτό το ένζυμο επανενεργοποιεί την κορτιζόνη σε πολλές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος και του λιπώδους ιστού [7], όπου φαίνεται να διατηρεί επαρκή έκθεση των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στην κορτιζόλη [10-12]. Τα ελαττώματα στο 11βHSD1 οδηγούν σε αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η αυξημένη δραστηριότητα της 11βHSD1 θεωρήθηκε σημαντική για τα σύνδρομα αντίστασης στην ινσουλίνη, ιδιαίτερα την παχυσαρκία [13,14].

1.1.3. Φαρμακολογικές ιδιότητες - Δράση

Μέχρι τώρα έχουμε μιλήσει για το πώς η κορτιζόλη «διαμεσολαβεί την ανταπόκριση στο στρες» που είναι μια πολύ αόριστη φράση. Τα γλυκοκορτικοειδή όπως η κορτιζόλη δρουν στους υποδοχείς των πυρηνικών ορμονών (πολύ όπως το I3) που δρουν ως παράγοντες μεταγραφής για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Οι επιπτώσεις από αυτό μπορεί να περιλαμβάνουν:

1) Αύξηση του σακχάρου στο αίμα:

- Κατά τη διάρκεια μιας αγχωτικής εμπειρίας, είναι φυσιολογικό να διατηρηθεί ή να αυξηθεί η ποσότητα του σακχάρου που υπάρχει στο αίμα. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της γλυκονεογένεσης: αυξημένη γονιδιακή έκφραση σημαντικών ενζύμων.
- Προωθεί την κατανομή των καθαρών πρωτεϊνών: χρησιμοποιεί τη μετατροπή αμινοξέων σε γλυκόζη.
- Αύξηση της μεσολαβούμενης από επινεφρίνη λιπόλυσης.

2) Αύξηση της αγγειακής συστολής:

- Αυξάνει τους υποδοχείς α1 στα αρτηρίδια (που αυξάνει την ευαισθησία στις κατεχολαμίνες).
- Διεγείρει τη σύνθεση της επινεφρίνης στο μυελό των επινεφριδίων.
- Αναστέλλει την πρόσληψη ιστών από κατεχολαμίνες: αυτό θα αφήσει περισσότερο ελεύθερο να δράσει σε λεπτές μυϊκές αρτηρίες που ελέγχουν τα αγγεία.

- Αναστέλλει τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (ένα ισχυρό αγγειοδιασταλτικό).

3) Καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω διαφόρων μηχανισμών:

- Αναστέλλοντας την παραγωγή λευκοτριενίων και προσταγλανδινών είτε τη προσκόλληση λευκοκυττάρων (WBC).
- Επίσης, αποκλείει την απελευθέρωση ισταμίνης από τα ιστιοκύτταρα, ενώ μειώνει τον αριθμό των ηωσινοφίλων.
- Ακόμα, μειώνει την παραγωγή IL-2.

4) Επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ).

- Μπορεί να επηρεάσει την όρεξη (με την αύξησή της) αλλά και τη συνολική νευρική λειτουργία.

5) Μειώνει τον σχηματισμό οστού.

- Μειώνει τη δράση των οστεοβλαστών.

Οι στεροειδείς ορμόνες των επινεφριδίων μπορούν όλες να μετρηθούν με ανοσοδοκιμασίες, ωστόσο κάποια επικάλυψη παρατηρείται μεταξύ κάποιων στεροειδών σε ορισμένες δοκιμασίες (π.χ. 11-δεοξυκορτιζόλη και κορτιζόλη).

Περίπου το 95% της κορτιζόλης στο αίμα είναι προσδεμένο σε πρωτεΐνες, κυρίως σε τρανσκορτίνη, μια σφαιρίνη που προσδένει ειδικά στην κορτιζόλη. Η συγκέντρωση της ελεύθερης κορτιζόλης και κατά συνέπεια το ποσό της ελεύθερης κορτιζόλης που εκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα, είναι πολύ μικρό. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις κορτιζόλης, η τρανσακορτίνη είναι σχεδόν πλήρως κορεσμένη διότι, αν αυξηθεί η παραγωγή της κορτιζόλης, η συγκέντρωση της ελεύθερης ορμόνης στο πλάσμα, επομένως και το ποσό που διηθείται στα εσπειραμένα σωληνάκια, αυξάνεται με ρυθμό δυσανάλογο από το συνολικό. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση της έκκρισης της κορτιζόλης στα ούρα 24ώρου, είναι ένας ευαίσθητος τρόπος διαπίστωσης αυξημένης και όχι ελαττωμένης έκκρισης της ορμόνης.

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης του πλάσματος δείχνουν ημερήσια διακύμανση, με υψηλότερες τιμές το πρωί και χαμηλότερες το βράδυ. Για τη μέτρηση της κορτιζόλης, το αίμα πρέπει να συλλέγεται μεταξύ 8-9 π.μ. Για να διαπιστωθεί η απώλεια του ημερήσιου ρυθμού, που αποτελεί πρώιμη ένδειξη της υπερλειτουργίας των επινεφριδίων (σύνδρομο

Cushing), τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται στις 11 μ.μ. Τυχαία δείγματα σπάνια έχουν αξία στη διάγνωση επινεφριδιακών νόσων, με εξαίρεση το ότι η υψηλή συγκέντρωση κορτιζόλης σε ασθενή συνήθως αποκλείει επινεφριδιακή ανεπάρκεια.

Η κορτιζόλη εκκρίνεται ως απάντηση σε στρες, με τη μεσολάβηση της ACTH, επομένως θα πρέπει να ελαχιστοποιείται το στρες ώστε να ερμηνευθούν σωστά τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Η διερεύνηση υπο- ή υπερλειτουργίας των επινεφριδίων συχνά περιλαμβάνει μετρήσεις κορτιζόλης κατόπιν προσπάθειας διέγερσης ή καταστολής της έκκρισης της.

Η κορτιζόλη είναι ένα ισχυρό αντιφλεγμονώδες, ακόμη και όταν εκκρίνεται σε κανονικά επίπεδα. Λειτουργεί γρήγορα για να απομακρύνει και να αποτρέψει την ερυθρότητα και το πρήξιμο σχεδόν όλων των ιστών. Η κορτιζόλη έχει παρόμοιο αντιφλεγμονώδη έλεγχο των αυτοάνοσων αντιδράσεων.

Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της κορτιζόλης του πλάσματος πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, πρεδνιζολόνη, μπορεί να δείξει διασταυρούμενη δραστικότητα στις ανοσοδοκιμασίες με την κορτιζόλη. Η διασταυρούμενη δραστικότητα δεν συμβαίνει με τη δεξαμεθαζόνη, ούτε με τη σπιρονολακτόνη.

Συνήθως απελευθερώνεται ως ανταπόκριση σε γεγονότα και περιστάσεις, όπως το πρωινό ξύπνημα, η άσκηση και το οξύ άγχος. Τα εκτεταμένα συστηματικά αποτελέσματα της κορτιζόλης παίζουν πολλούς ρόλους στην προσπάθεια του οργανισμού να διεξάγει τις διαδικασίες του και να διατηρεί την ομοιόσταση.

Ενδιαφέρον για τη διαιτολογική κοινότητα είναι το ότι η κορτιζόλη διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή. Ρυθμίζει την ενέργεια επιλέγοντας τον σωστό τύπο και την ποσότητα του υποστρώματος (υδατάνθρακες, λίπος ή πρωτεΐνες) που χρειάζεται ο οργανισμός για να ανταποκριθεί στις φυσιολογικές απαιτήσεις που τίθενται σε αυτόν. Όταν παραμένει για μεγάλο διάστημα σε αυξημένα επίπεδα, η κορτιζόλη μπορεί να έχει επιβλαβείς επιδράσεις στο βάρος, την ανοσολογική λειτουργία και υπάρχει κίνδυνος για εμφάνιση κάποιας χρόνιας ασθένειας.

Η κορτιζόλη (μαζί με τη συνεργάτιδά της επινεφρίνη) είναι περισσότερο γνωστή για τη συμμετοχή της στην αντίδραση ή την προσωρινή αύξηση της παραγωγής ενέργειας, εις βάρος διαδικασιών που δεν απαιτούνται για άμεση επιβίωση. Οι προκύπτουσες βιοχημικές και ορμονικές ανισορροπίες (ιδανικά) επιλύονται εξαιτίας ενός βρόχου αρνητικής ανάδρασης που οδηγείται από ορμόνες. Τα παρακάτω είναι ένα τυπικό παράδειγμα του

τρόπου με τον οποίο η απόκριση στρες λειτουργεί ως ο προβλεπόμενος μηχανισμός επιβίωσης:

1. Ένα άτομο αντιμετωπίζει άγχος.
2. Ο σύνθετος ορμονικός καταρράκτης ακολουθεί και τα επινεφρίδια εκκρίνουν κορτιζόλη.
3. Η κορτιζόλη προετοιμάζει το σώμα για μια ανταπόκριση «μάχης» γεμίζοντας με γλυκόζη, παρέχοντας μια άμεση πηγή ενέργειας στους μεγάλους μύες.
4. Η κορτιζόλη αναστέλλει την παραγωγή ινσουλίνης σε μια προσπάθεια να αποτρέψει την αποθήκευση γλυκόζης, ευνοώντας την άμεση χρήση της.
5. Η κορτιζόλη στενεύει τις αρτηρίες ενώ η επινεφρίνη αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό, και οι δύο αυτές αναγκάζουν το αίμα να αντλείται «σκληρότερα» και ταχύτερα.
6. Το άτομο απευθύνεται και επιλύει την κατάσταση.
7. Τα επίπεδα ορμονών επιστρέφουν στο φυσιολογικό.

Ποιο είναι το πρόβλημα; Εν ολίγοις, η θεωρία είναι ότι με τον συνεχώς αγχωμένο και γρήγορο τρόπο ζωής μας, τα σώματά μας αντλούν την κορτιζόλη σχεδόν συνεχώς, πράγμα που μπορεί να προκαλέσει όλεθρο στην υγεία μας. Αυτή η διαδικασία ολόκληρου του σώματος, με τη μεσολάβηση των ορμονών και του ανοσοποιητικού συστήματος, αναγνωρίζει την κορτιζόλη ως έναν από τους πολλούς παράγοντες. Ωστόσο, η απομόνωση του ρόλου της βοηθάει να τεθούν σε εφαρμογή πολλοί σύνθετοι μηχανισμοί που οδηγούν σε συγκεκριμένες φυσιολογικές βλάβες.

1.1.4. Επιδράσεις υψηλής κορτιζόλης στο σώμα

A) Η ανισορροπία του σακχάρου στο αίμα και ο διαβήτης.

Υπό συνθήκες άγχους, η κορτιζόλη παρέχει στο σώμα γλυκόζη, με τοποθέτηση σε αποθήκες πρωτεϊνών μέσω γλυκονογένεσης στο ήπαρ. Αυτή η ενέργεια μπορεί να βοηθήσει σε έναν μεμονωμένο αγώνα ή να φύγει από έναν άγχος. Ωστόσο, η αυξημένη κορτιζόλη

μακροπρόθεσμα παράγει σταθερά γλυκόζη, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα.

Θεωρητικά, αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 [12]. Δεδομένου ότι μια κύρια λειτουργία της κορτιζόλης είναι να αναχαιτιστεί η επίδραση της ινσουλίνης – ουσιαστικά καθιστώντας τα κύτταρα ανθεκτικά στην ινσουλίνη – το σώμα παραμένει σε μια γενική κατάσταση ανθεκτικότητας σε ινσουλίνη- όταν τα επίπεδα κορτιζόλης είναι χρονίως αυξημένα. Με την πάροδο του χρόνου, το πάγκρεας παλεύει να συμβαδίσει με την υψηλή ζήτηση ινσουλίνης, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα παραμένουν υψηλά, τα κύτταρα δεν μπορούν να πάρουν τη ζάχαρη που χρειάζονται και ο κύκλος συνεχίζεται.

B) Αύξηση βάρους και παχυσαρκία.

Η επαναλαμβανόμενη αύξηση της κορτιζόλης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του σωματικού βάρους [8]. Ένας τρόπος είναι μέσω της αποθήκευσης σπλαχνικού λίπους. Η κορτιζόλη μπορεί να κινητοποιήσει τα τριγλυκερίδια από την αποθήκευση και να τα μεταφέρει σε σπλαχνικά λιποκύτταρα (αυτά κάτω από τον μυ, βαθιά στην κοιλιακή χώρα). Η κορτιζόλη βοηθά επίσης την ανάπτυξη λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα. Η βιοχημική διαδικασία σε κυτταρικό επίπεδο έχει να κάνει με τον έλεγχο ενζύμων (11-υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση), ο οποίος μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη στο λιπώδη ιστό. Ακόμη, τα σπλαχνικά λιπώδη κύτταρα έχουν περισσότερους υποδοχείς κορτιζόλης από το υποδόριο λίπος.

Ένας δεύτερος τρόπος με τον οποίο η κορτιζόλη μπορεί να εμπλέκεται στο κέρδος του βάρους πηγαίνει πίσω στο πρόβλημα του σακχάρου στο αίμα-ινσουλίνη. Τα σταθερά υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μαζί με την καταστολή της ινσουλίνης οδηγούν σε κύτταρα που «λιμοκτονούν» από γλυκόζη. Αλλά αυτά τα κύτταρα «φωνάζουν» για ενέργεια και ένας τρόπος ρύθμισης είναι η αποστολή σήματος πείνας στον εγκέφαλο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερκατανάλωση τροφής. Και φυσικά, η αχρησιμοποίητη γλυκόζη αποθηκεύεται τελικά ως σωματικό λίπος.

Γ) Καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η κορτιζόλη λειτουργεί για να μειώσει τη φλεγμονή στο σώμα, κάτι που είναι καλό, αλλά με την πάροδο του χρόνου, αυτές οι προσπάθειες για τη μείωση της φλεγμονής καταστέλλουν επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα. Η χρόνια φλεγμονή, που προκαλείται από παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως η κακή διατροφή και το άγχος, βοηθά στη διατήρηση των επιπέδων κορτιζόλης να ανεβαίνουν, προκαλώντας όλεθρο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ένα ανεξέλεγκτο ανοσοποιητικό σύστημα που ανταποκρίνεται σε αμείωτη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα προβλήματα: αυξημένη ευαισθησία σε κρυολογήματα και άλλες ασθένειες, αυξημένο κίνδυνο καρκίνου, τάση ανάπτυξης τροφικών αλλεργιών, αυξημένος κίνδυνος ποικιλίας γαστρεντερικών προβλημάτων (επειδή ένα υγιές έντερο εξαρτάται από ένα υγιές ανοσοποιητικό σύστημα) και, ενδεχομένως, αυξημένο κίνδυνο αυτοάνοσης νόσου [4,5].

Δ) Γαστρεντερικά προβλήματα.

Η κορτιζόλη ενεργοποιεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα προκαλώντας όπως όπως φυσιολογικές αποκρίσεις που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Κατά κανόνα, το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα πρέπει να κατασταλεί, επειδή τα δύο συστήματα δεν μπορούν να λειτουργήσουν ταυτόχρονα. Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα διεγείρεται κατά τη διάρκεια ήσυχων δραστηριοτήτων, όπως η κατανάλωση φαγητού, η οποία είναι σημαντική για τον οργανισμό διότι πρέπει να χρησιμοποιήσει καλύτερα την ενέργεια των τροφίμων, αφού τα ένζυμα και οι ορμόνες που ελέγχουν την πέψη και την απορρόφηση πρέπει να δουλεύουν στην κορυφαία απόδοση.

Σε ένα σώμα με αυξημένη κορτιζόλη, όταν το φαγητό καταναλώνεται: Η πέψη και η απορρόφηση υποβαθμίζονται, αναπτύσσεται δυσπεψία και η επένδυση του βλεννογόνου ερεθίζεται και εμφανίζεται φλεγμονή. Τα έλκη είναι πιο συνηθισμένα κατά τη διάρκεια των αγωνιστικών χρόνων και πολλοί άνθρωποι με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και κολίτιδα παρουσιάζουν βελτίωση στα συμπτώματά τους όταν βελτιώνουν τη διαχείριση του άγχους [5]. Και, φυσικά, η προκύπτουσα φλεγμονή του βλεννογόνου οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή κορτιζόλης και ο κύκλος συνεχίζεται.

Ε) Καρδιαγγειακή νόσος.

Όπως είδαμε, η κορτιζόλη συσφίγγει τα αιμοφόρα αγγεία και αυξάνει την πίεση του αίματος για να ενισχύσει την παροχή οξυγονωμένου αίματος. Αυτό είναι επωφελές για καταστάσεις άμυνας αλλά όχι συνεχώς. Με την πάροδο του χρόνου, τέτοιου είδους αρτηριακή συστολή και υψηλή αρτηριακή πίεση μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη αγγείων και συσσώρευση πλάκας, αυξάνοντας τον κίνδυνο για καρδιακή προσβολή.

Ζ) Προβλήματα γονιμότητας.

Η αυξημένη κορτιζόλη που σχετίζεται με παρατεταμένο στρες μπορεί να προσδώσει στυτική δυσλειτουργία ή διακοπή της φυσιολογικής ωορρηξίας και των εμμηνορροϊκών κύκλων. Επιπλέον, οι ανδρογόνες σεξουαλικές ορμόνες παράγονται στους ίδιους αδένες με την κορτιζόλη και την επινεφρίνη, έτσι η περίσσεια παραγωγής κορτιζόλης μπορεί να παρεμποδίσει τη βέλτιστη παραγωγή αυτών των ορμονών φύλου.

Συνοπτικά, οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να παρουσιαστούν μετά από χρόνια ή οξεία λήψη κορτιζόλης είναι:

- Αύξηση της πίεσης και του σακχάρου.
- Εμφάνιση γλαυκώματος.
- Μεταβολές της διάθεσης.
- Γαστρικό έλκος.
- Οστεοπόρωση.
- Καταρράκτης.
- Σύνδρομο Cushing (αύξηση κατακράτησης νατρίου και νερού με πιθανή εμφάνιση οιδήματος, χαρακτηριστική διόγκωση προσώπου, αυξημένη αποβολή καλίου, αυξημένη αρτηριακή πίεση).
- Ευαισθησία του οργανισμού σε λοιμώξεις, καθώς καταστέλλεται το ανοσοποιητικό.
- Υποκαλιαιμία (διαταραχές ισοζυγίου του καλίου).
- Αύξηση της τριχοφυΐας.
- Ακμή.
- Οίδημα.
- Αύξηση της όρεξης.

1.1.5. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της υδροκορτιζόνης παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες υδροκορτιζόνης [8]

<u>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</u> Υδροκορτιζόνη (Hydrocortisone)
<u>ΑΛΛΕΣ ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ</u> Κορτιζόλη (Cortisol) 11β,17α,21-Trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione
<u>ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ</u> C ₂₁ H ₃₀ O ₅
<u>ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ</u> (1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-διυδροόξυ-14-(2-υδροξυακέτυλο)-2,15-διμεθυλτετράκυκλο [8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}] επτανεδεκ-6-εν-5-όνη
<u>ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΙUPAC</u> (11β)-11,17,21-trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione (8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-2,6,7,8,9,11,12,14,15,16-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one
<u>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</u> Αντιφλεγμονώδες
<u>ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ</u> 362,460 g/mol
<u>ΣΗΜΕΙΟ ΖΕΣΣΕΩΣ</u> 220 °C
<u>ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ</u> 320 mg/L (25 °C) ή 8,83 × 10 ⁻⁴ M
<u>ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ</u> 1,35 × 10 ⁻¹³ mm Hg (25 °C)
<u>ΔΙΠΟΦΙΛΙΑ/ΥΔΡΟΦΙΛΙΑ (Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού, logP)</u> 1,61

<u>pKa (Strongest Acidic)</u>
12,58
<u>pKa (Strongest Basic)</u>
-2,8
<u>ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ</u>
39,55 Å ³
<u>ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ</u>
Πιθανές παρενέργειες: παρεμπόδιση σχηματισμού οστών, καταστολή απορρόφησης ασβεστίου, καθυστέρηση επούλωσης τραυμάτων κ.ά.
<u>ΟΛΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ</u>
Τοπικά (δερματολογικά), δια στόματος, ενδοφλέβια, οφθαλμολογικά, δια του ορθού

1.1.6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό υδροκορτιζόνης

Αντικείμενο της φαρμακευτικής ανάλυσης είναι ο ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός μίας ή περισσοτέρων ουσιών σε ένα δείγμα φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Ο αναλύτης ή αναλυόμενη ουσία μπορεί να είναι μια ενεργός φαρμακευτική ουσία, φαρμακευτικά έκδοχα, ουσίες που επιμολύνουν το σκεύασμα, ή μεταβολίτες φαρμάκου. Το δείγμα που αναλύεται μπορεί να είναι υλικά που θα συνθέσουν ένα φαρμακευτικό σκεύασμα ή βιολογικό δείγμα το οποίο περιέχει φαρμακευτική/ές ουσία/ες. Η ανάλυση σε βιομηχανική κλίμακα προσβλέπει στον προσδιορισμό (ποιοτικό ή ποσοτικό) τόσο της δραστικής, όσο και των εκδόχων και αποτελεί ίσως το πιο κρίσιμο στάδιο για την απελευθέρωση μίας παρτίδας φαρμάκων. Η τυπική διαδικασία ελέγχου στη φαρμακευτική ανάλυση περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, διατήρηση δείγματος, προετοιμασία δείγματος και τη μέτρηση.

Τα στεροειδή υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις (pM έως nM) στον ανθρώπινο ορό και στους ιστούς, και συνεπώς απαιτούν πολύ ευαίσθητες μεθόδους για τις μετρήσεις τους [10]. Παρά τις χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων, εμπλέκονται σε διάφορες κεντρικές φυσιολογικές διεργασίες τόσο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στην ενηλικίωση, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία αρκετών ασθενειών. Εκτός από το ευρύ φάσμα των ενδογενών στεροειδών και των πολυάριθμων μεταβολιτών τους, υπάρχουν και

ενώσεις που βασίζονται σε στεροειδή και χρησιμοποιούνται ως παράγοντες ντόπινγκ στον αθλητισμό. Επιπλέον, διάφορα εξωγενή και συχνά συνθετικά στεροειδή χρησιμοποιούνται στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ή και ως αντισυλληπτικά. Έτσι, είναι δύσκολο να αναπτυχθούν αξιόπιστες και ευαίσθητες μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδογενών στεροειδών σε σωματικά υγρά και ιστούς [11-12].

Συνήθως οι συγκεντρώσεις στεροειδών μετρούνται με τη χρήση φασματομετρίας μάζας (MS), συνδεδεμένης με υγρή χρωματογραφία (LC) ή αέρια χρωματογραφία (GC), χρησιμοποιώντας ανοσομετρικές μεθόδους [30]. Οι ανοσοπροσδιορισμοί έχουν μια σχετικά υψηλή πιθανότητα σφάλματος, ενώ μια χρωματογραφική μέθοδος συνδεδεμένη με MS είναι πιο ασφαλής ως προς το αποτέλεσμα. Αυτό οφείλεται στις στενές δομικές ομοιότητες μεταξύ πολλών στεροειδών, καθώς και τις πιθανές παρεμβολές που προκαλούνται από άλλες ενδογενείς και εξωγενείς ενώσεις που επηρεάζουν τις ανοσοδοκιμασίες. Οι μετρήσεις που βασίζονται σε MS μπορούν να ενσωματωθούν σε διαφορετικές στρατηγικές παραγωγοποίησης για τη βελτίωση της ειδικότητας και της ευαισθησίας ή μπορούν να εκτελεστούν χωρίς παραγωγοποίηση [11-13,14].

Κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και όταν πρόκειται να μετρηθούν μερικά στεροειδή με την ίδια μέθοδο από ένα δείγμα ταυτόχρονα, ενδέχεται να χρειαστούν συμβιβασμοί, ενώ άλλες ενώσεις μπορεί να είναι, μετρώντας αξιόπιστα, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, η αποτελεσματικότητα του ιονισμού είναι φτωχή για ορισμένα στεροειδή και προκαλείται σύγκρουση. Η διάσπαση (CID) μπορεί να παρέχει μόνο μη ειδικά ή/και ιόντα θραυσμάτων χαμηλής έντασης, ενδεχομένως μειώνοντας την ευαισθησία και εξειδίκευση. Αν και η παραγωγοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση των χαρακτηριστικών ανίχνευσης στεροειδών, στη διαδικασία παραγωγοποίησης, μπορούν να σχηματιστούν αρκετά ισομερή και ο ρυθμός παραγωγοποίησης μπορεί να ποικίλει, οδηγώντας σε προβλήματα ποσοτικοποίησης εάν πολλαπλασιάζονται λειτουργικές ομάδες οι οποίες υπάρχουν στον αναλύτη [11,15]. Έτσι, οι βέλτιστες συνθήκες εξαρτώνται πάντα από την ανάλυση.

Η υδροκορτιζόνη έχει προσδιοριστεί, σύμφωνα με ξένη βιβλιογραφία με μία πληθώρα αναλυτικών τεχνικών. Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης έχει πραγματοποιηθεί σε βιολογικά υγρά, όπως πλάσμα, ούρα, σάλιο, μετά την κατεργασία των δειγμάτων με διάφορες τεχνικές προκατεργασίας.

Δημοσιεύσεις που αφορούν αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης, αναφέρουν τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC) με ανιχνευτή φασματογράφο υπεριώδους για τον προσδιορισμό της ουσίας στο πλάσμα. Η προκατεργασία των δειγμάτων έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) [10].

Επίσης, σύμφωνα με δημοσιεύσεις, η υδροκορτιζόνη έχει προσδιοριστεί σε ούρα με τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis, CE) με ανιχνευτή φασματογράφο υπεριώδους, μετά την προκατεργασία των δειγμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσης [11]. Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης σε δείγματα πλάσματος και ούρων, έχει επίσης επιτευχθεί με τη χρήση LC-MS/MS, μετά το διαχωρισμό με την τεχνική της υπερδιήθησης (ultrafiltration). Η προεργασία της υπερδιήθησης πριν την εφαρμογή της τεχνικής, είναι ταχύτερη και παρουσιάζει την καλύτερη επαναληψιμότητα [12]. Ακόμα έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προκατεργασίας των δειγμάτων ορού αίματος, η εκχύλιση με υπερήχους (ultrasonic extraction) [13] και η μέθοδος της εκχύλισης στερεάς φάσης σε δείγματα ούρων [14].

Άλλες δημοσιεύσεις αναφέρουν τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής GC-MS/MS για τον επιτυχή προσδιορισμό της κορτιζόλης στον ορό αίματος. Η αναλυτική τεχνική αυτή συνδυάζει σε ένα όργανο, σε σειρά, αυτόματο δειγματολήπτη, πέρασμα του δείγματος από στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και χρωματογραφική στήλη με ανιχνευτή φασματογράφο μαζών [15]. Ακόμα, έχει εφαρμοστεί, επίσης σε σειρά, μέθοδος που συνδυάζει την εκχύλιση στερεάς φάσης και την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μαζών τριπλού τετράπολου (triple quadrupole linear ion trap, LC-Qtrap) [16].

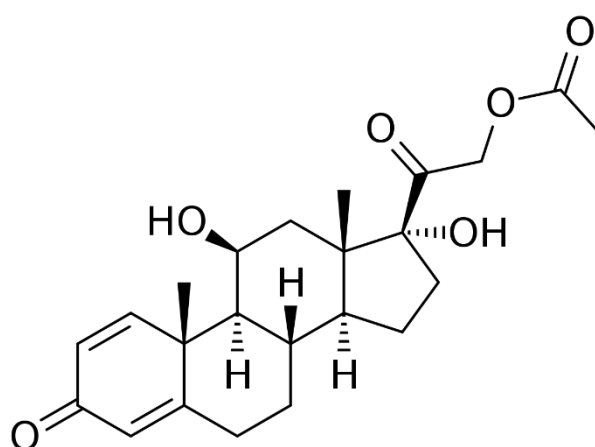
Η πιο συνηθισμένη μέθοδος φαρμακευτικής ανάλυσης της υδροκορτιζόνης είναι η LC-MS/MS, μέθοδος για την ταυτόχρονη ανάλυση των στεροειδών συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων (οιστραδιόλη, E2, οιστρόνη, E1), ανδρογόνων, προγεστογόνων, γλυκοκορτικοειδών (κορτιζόλη, F, κορτιζόνη, E, κορτικοστερόνη, B, 11-δεοξυκορτιζόλη κλπ.) και ενός μεταλλοκορτικοειδούς (αλδοστερόνη, A) σε ανθρώπινο ορό πλάσματος [10].

Μερικά παραδείγματα τέτοιων αναλύσεων με LC-MS/MS που υπάρχουν στη βιβλιογραφία είναι ο προσδιορισμός κορτιζόλης, κορτιζόνης και τετραϋδρομεταβολιτών σε ανθρώπινα ούρα [17], ο ταυτόχρονος προσδιορισμός κορτιζόλης και κορτιζόνης σε ανθρώπινο ορό [18], ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τεστοστερόνης και κορτιζόλης σε υγιείς άνδρες [19] και εκατοντάδες άλλες εφαρμογές.

1.2. ΟΞΙΚΗ ΠΡΕΔΝΙΖΟΛΟΝΗ

1.2.1. Φαρμακολογικές ιδιότητες - Δράση

Η οξική πρεδνιζολόνη (prednisolone acetate) είναι η μορφή οξικού άλατος της πρεδνιζολόνης, ενός συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς με αντιφλεγμονώδεις και ανοσοδιαμορφωτικές ιδιότητες και δομή που απεικονίζεται στο Σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3. Χημική δομή της οξικής πρεδνιζολόνης [9].

Η πρεδνιζολόνη (11β, 17α, 21-τριδροξυπρεγναν-1,4-διενο-3,20-διόνη), PRED, και η πρεδνιζόνη (17α, 21-διδροξυπρεγναν-1,4-διενο-3,11,20-τριόνη) ήταν τα πρώτα συνθετικά γλυκοκορτικοστεροειδή [11] και έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα από τη δεκαετία του 1950 [12]. Χρησιμοποιούνται ως αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες για ένα ευρύ φάσμα νοσηρών καταστάσεων. Συγκεκριμένα, η οξική πρεδνιζολόνη ενδείκνυται ως αντιφλεγμονώδης ή ανοσοκατασταλτικός παράγοντας για αλλεργικές, δερματολογικές, γαστρεντερικές, αιματολογικές, οφθαλμολογικές, νευρικού συστήματος, νεφρικές, αναπνευστικές, ρευματολογικές ή μολυσματικές καταστάσεις.

1.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η οξική πρεδνιζολόνη είναι μια λευκή σκόνη στην καθαρή της μορφή. Έχει καλή διαλυτότητα σε χλωροφόρμιο, μεθανόλη και αιθανόλη, ενώ έχει κακή διαλυτότητα στο νερό. Το σημείο τήξης της οξικής πρεδνιζολόνης είναι 240 °C. Η φασματοσκοπία UV-VIS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και την ταυτοποίηση, δίνοντας μια κορυφή γύρω στα 244 nm σε νερό.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της οξικής πρεδνιζολόνης παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες οξικής πρεδνιζολόνης [8].

<u>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</u> Οξική πρεδνιζολόνη (Prednisolone acetate)
<u>ΆΛΛΕΣ ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ</u> Prednisolone 21-acetate
<u>ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ</u> C ₂₃ H ₃₀ O ₆
<u>ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΙUPAC</u> [2-[(8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-Dihydroxy-10,13-dimethyl-3-oxo-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-2-oxoethyl] acetate
<u>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</u> Αντιφλεγμονώδες ή ανοσοκατασταλτικός παράγοντας
<u>ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ</u> 402,487 g/mol
<u>ΣΗΜΕΙΟ ΖΕΣΕΩΣ</u> 240 °C
<u>ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ</u> 17,2 mg/L (25 °C) ή 4,27 × 10 ⁻⁵ M
<u>ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ</u> 2,24 × 10 ⁻¹³ mm Hg (25 °C)
<u>ΔΙΠΟΦΙΛΙΑ/ΥΔΡΟΦΙΛΙΑ (Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού, logP)</u> 2,4

<u>pKa (Strongest Acidic)</u>
12,61
<u>pKa (Strongest Basic)</u>
-2,9
<u>ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ</u>
42,93 Å ³
<u>ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ</u>
Πιθανές παρενέργειες: παρεμπόδιση σχηματισμού οστών, καταστολή απορρόφησης ασβεστίου, καθυστέρηση επούλωσης τραυμάτων κ.ά.
<u>ΟΛΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ</u>
Τοπικά (δερματολογικά, ρινικά, ωτικά), δια στόματος, , ενδοφλέβια, οφθαλμολογικά, δια του ορθού

1.2.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό οξικής πρεδνιζολόνης

Η πρεδνιζολόνη, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, συγκεκριμένα ένα συνθετικό παράγωγο της κορτιζόλης, και χρησιμοποιείται κατά κόρον ως ενεργό φαρμακευτικό συστατικό είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με ένα επιπλέον ενεργό συστατικό σε φάρμακα παθήσεων ενδοκρινών αδένων, καθώς και σε φάρμακα οφθαλμικών παθήσεων [23].

Η πρεδνιζόνη (prednisone) είναι τόσο προφάρμακο όσο και μεταβολίτης του δραστικού φαρμάκου PRED [4]. Μερικοί μεταβολίτες της ανιχνεύτηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 50 με χρήση χρωματογραφίας χάρτου (Florisil) [14]. Ωστόσο ο αριθμός των ταυτοποιημένων μεταβολιτών αυξήθηκε σημαντικά με τη χρήση φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με χρωματογραφία [15-18].

Σύμφωνα με τη Διεθνή Διάσκεψη για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για την Καταχώριση των Φαρμακευτικών Προϊόντων για Ανθρώπινη Χρήση (ICH), αποτελεί απαίτηση τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά, καθώς και οι προσμείξεις που υπάρχουν σε αυτά αλλά και στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, να προσδιορίζονται και να ποσοτικοποιούνται. Για αυτό τον επιτακτικό λόγο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον

προσδιορισμό της οξικής πρεδνιζολόνης, με κυριότερες τεχνικές τις χρωματογραφικές, της φασματοσκοπίας και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης [24].

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα προσδιορισμού οξικής πρεδνιζολόνης περιγράφεται στην εργασία των Marley et al., στην οποία αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση οκτώ επιλεγμένων προσμείξεων τις οξικής πρεδνιζολόνης και προϊόντων αποικοδόμησης σε ένα οφθαλμικό εναιώρημα. Χρησιμοποιήθηκε στήλη Agilent Poroshell 120 EC-C18 100mm x 4,6mm, (dp: 2,7μm) στους 60° C, βαθμωτή έκλουση και κινητή φάση A: ακετονιτρίλιο/νερό (10:90 v/v) και κινητή φάση B: ακετονιτρίλιο, με ρυθμό ροής 1,2 mL/min. Χρόνος έκλουσης των κορυφών ήταν τα 33 min με ανάλυση (resolution) 1,5 [24].

Στην εργασία των Tawfik et al., αναπτύχθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν δύο ειδικές, ευαίσθητες ταχείες και ακριβείς χρωματογραφικές μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαμιδικού νατρίου και οξικής πρεδνιζολόνης στην καθαρή μορφή τους, αλλά και σε μείγμα μεταξύ τους. Η πρώτη μέθοδος είναι μια ισοκρατική μέθοδος αντίστροφης φάσης - υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας, όπου επιτεύχθηκε ένας γρήγορος διαχωρισμός σε στήλη Zorbax ODS χρησιμοποιώντας μία «πράσινη» κινητή φάση με μεθανόλη : νερό (80:20 v/v). Το pH ρυθμίστηκε στο $5,0 \pm 0,2$ με ορθοφωσφορικό οξύ και οι χρόνοι έκλουσης (t_R) ήταν 2,21 και 3,64 min για το σουλφαμίδιο του νατρίου και της οξικής πρεδνιζολόνης, αντίστοιχα. Οι διαχωρισμένες κορυφές ανιχνεύθηκαν στα 254 nm. Η δεύτερη μέθοδος είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε σύζευξη με πυκνομετρική ανάλυση, όπου τα δύο φάρμακα διαχωρίστηκαν σε silica gel πλάκες χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση χλωροφορμίο:μεθανόλη (90:10 v/v) και πραγματοποιήθηκε σάρωση των διαχωρισθέντων ζωνών στα 254 nm. Οι τιμές των παραγόντων επιβράδυνσης (Rf) ήταν 0,37 και 0,64 για το σουλφαμίδιο του νατρίου και της οξικής πρεδνιζολόνης, αντίστοιχα [25].

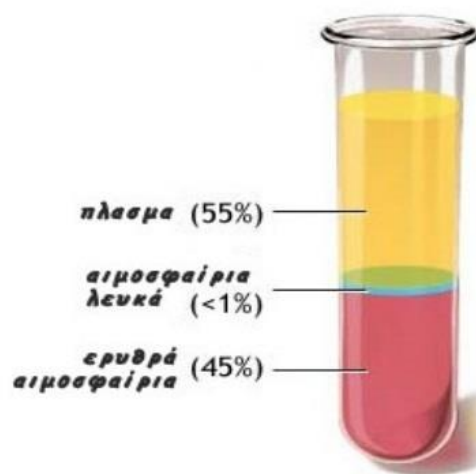
Σε γενικές γραμμές, έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες εργασίες για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό της οξικής πρεδνιζολόνης σε ιστούς, σε βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου ορού, του πλάσματος, των ούρων και του πλάσματος χοίρων [26,27]. Έχουν γίνει, ακόμη, αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό της οξικής πρεδνιζολόνης και των σχετικών προσμείξεων (που προέρχονται είτε από την παρασκευή ή λόγω προβλημάτων σταθερότητας του φαρμακευτικού προϊόντος / ουσίας φαρμάκου) σε οφθαλμικά εναιωρήματα [28]. Στην εργασία των Barot et al. πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του PAC (prednisolone acetate) και της οφλοξασίνης

στις οφθαλμικές σταγόνες χρησιμοποιώντας μια φασματοφωτομετρική μέθοδο. Οι Musharraf et al. ανέπτυξαν μια μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας για τον προσδιορισμό της PAC παρουσία των αποικοδομημένων προϊόντων, που παράγονται από όξινη, αλκαλική ή ουδέτερη υδρόλυση ή οξείδωση και αποικοδόμηση υγρής θέρμανσης, και εφαρμόστηκε σε πραγματικά «οφθαλμικά δείγματα» [24]. Ακόμη, έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες με ανάπτυξη μεθόδων μικκυλιακών ηλεκτροκινητικών τριχοειδών χρωματογραφικών τεχνικών από τους Gallego et al. για τον προσδιορισμό είτε της πρεδνιζολόνης είτε της οξικής πρεδνιζολόνης σε φαρμακευτικά προϊόντα. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 8 λεπτά και τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν 1,0 mg/L για όλα τα συστατικά [29].

ΚΕΦ. 2: ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Αίμα είναι το υγρό που κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων. Η κυκλοφορία του διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ορμονών, βιταμινών, θερμότητας και οξυγόνου στους ιστούς και την απομάκρυνση άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό και του διοξειδίου του άνθρακα. Επιπρόσθετα, παρέχει άμυνα κατά των λοιμώξεων μέσω της δράσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των αντισωμάτων. Το αίμα αποτελεί έναν εξαιρετικά εξειδικευμένο κυκλοφορούντα ιστό, ο οποίος αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων που συγκρατούνται μέσα σε ένα υγρό μέσο που ονομάζεται πλάσμα.

Το πλάσμα είναι το μεγαλύτερο κύριο συστατικό του αίματος και αποτελεί το 55% του όγκου του (Σχήμα 2.1). Είναι ένα υποκίτρινο υγρό μέσω του οποίου μεταφέρονται αιμοσφαίρια, πρωτεΐνες και άλλες ουσίες. Αποτελείται κατά 91,5% από νερό, κατά 7% από πρωτεΐνες, όπως η λευκωματίνη (αλβουμίνη), οι σφαιρίνες και το ινωδογόνο, και κατά 1,5% από άλλες ουσίες, όπως θρεπτικά συστατικά, ορμόνες, αναπνευστικά αέρια, ηλεκτρολύτες, βιταμίνες και άχρηστες αζωτούχες ουσίες. Τα κύτταρα αποθέτουν επίσης τα απόβλητά τους στο πλάσμα. Το πλάσμα, με τη σειρά του, βοηθά στην απομάκρυνση αυτών των αποβλήτων από το σώμα. Το πλάσμα αίματος οδηγεί επίσης στην κίνηση όλων των στοιχείων αίματος μέσω του κυκλοφορικού συστήματος.



Σχήμα 2.1. Τα κύρια συστατικά του αίματος.

Το πλάσμα είναι ένα κρίσιμο στοιχείο στη θεραπεία πολλών σοβαρών προβλημάτων υγείας. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο υπάρχουν συχνές αιματολογικές κινήσεις που ενθαρρύνουν τους ανθρώπους να δώσουν πλάσμα αίματος. Μαζί με το νερό, το άλας και τα ένζυμα, το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει επίσης σημαντικά συστατικά, όπως ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα), παράγοντες πήξης, πρωτεΐνες (π.χ. λευκωματίνη) και ινωδογόνο.

Οι πρωτεΐνες και τα αντισώματα στο πλάσμα χρησιμοποιούνται επίσης για τη δημιουργία θεραπειών για σπάνιες χρόνιες παθήσεις, όπως αυτοάνοσες διαταραχές και αιμορροφιλία (αιμοφιλία). Τα άτομα με αυτές τις συνθήκες μπορούν να ζήσουν μεγάλη και παραγωγική ζωή εξαιτίας αυτών των θεραπειών. Στην πραγματικότητα, ορισμένοι οργανισμοί υγείας καλούν το πλάσμα ως «το δώρο της ζωής».

Οι λειτουργίες του πλάσματος είναι σημαντικές:

- περιέχει και μεταφέρει ουσίες (λευκωματίνες, Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3 , Cl^-), ορμόνες και CO_2 ,
- είναι η «αποθήκη» πρωτεϊνών του σώματος.

Το πλάσμα αποτελεί το κυριότερο ομοιοστατικό μηχανισμό του ανθρώπινου οργανισμού και είναι από τους κυριότερους παράγοντες άμυνας του οργανισμού κατά των λοιμώξεων, καθώς περιέχει αντισώματα, λευκώματα, γ-σφαιρίνες.

Οποιαδήποτε φαρμακευτική ουσία στο αίμα μπορεί να υπάρξει σε δύο μορφές: δεσμευμένη ή μη δεσμευμένη (ελεύθερη) με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου μπορεί να επηρεαστεί από τον βαθμό δέσμευσης με τις πρωτεΐνες. Όσο λιγότερο δεσμευμένο είναι ένα φάρμακο τόσο πιο αποτελεσματική είναι η διάχυση αυτού από την κυτταρική μεμβράνη. Πρωτεΐνες, με τις οποίες δεσμεύονται τα φάρμακα, είναι η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, η λιποπρωτεΐνη, η γλυκοπρωτεΐνη και οι α, β, και γ-σφαιρίνες.

Στη φαρμακευτική ανάλυση, η μελέτη δειγμάτων πλάσματος και ούρων για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης, είναι από τις πιο δημοφιλείς διαδικασίες. Υψηλά ποσοστά κορτιζόλης (π.χ. νόσος Cushing) ή χαμηλά ποσοστά κορτιζόλης (π.χ. νόσος Addison) είναι αντικείμενο διερεύνησης. Στο πλάσμα η κορτιζόλη είναι κατά 90% περίπου δεσμευμένη σε αλβουμίνη, ερυθροκύτταρα ή γλοβουλίνη. Η ελεύθερη κορτιζόλη (free cortisol) ανέρχεται σε ποσοστό κοντά στο 10% και αυτή η κορτιζόλη είναι που μπορεί να περάσει την κυτταρική μεμβράνη και να δράσει στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, προκαλώντας φυσιολογική και φαρμακολογική δράση. Μόνο η ελεύθερη κορτιζόλη έχει πρόσβαση στα ένζυμα και σε

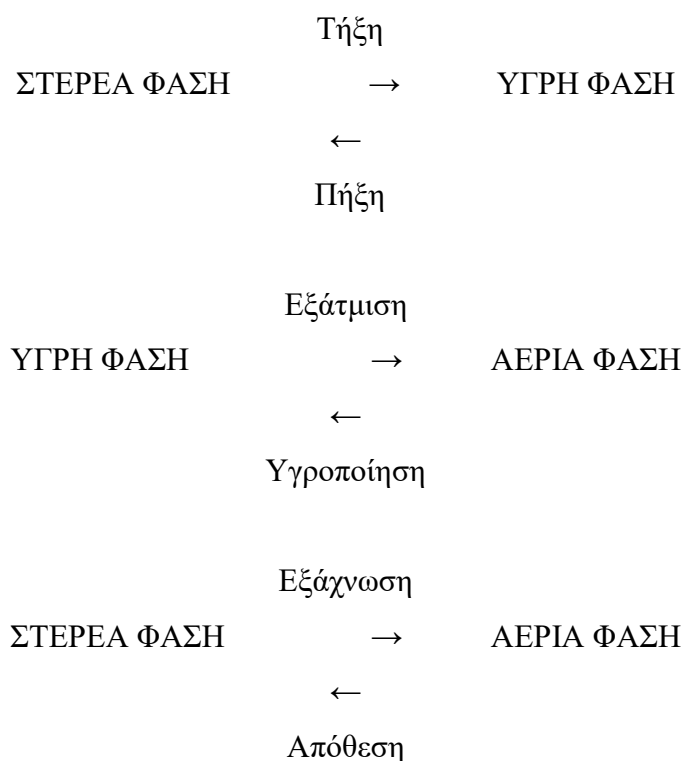
μεταφορείς του ήπατος, των νεφρών και άλλων ιστών που λαμβάνουν μέρος στη μεταβολική και εκκριτική διαδικασία. Ως εκ τούτου, η ελεύθερη κορτιζόλη είναι πιο ουσιώδες να προσδιοριστεί από ό,τι η δεσμευμένη κορτιζόλη.

Σε μερικούς ασθενείς αλλαγές στην πρωτεΐνη του πλάσματος, η οποία δεσμεύει την κορτιζόλη, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές της συγκέντρωσης της ελεύθερης κορτιζόλης. Σε μια τέτοια περίπτωση, η μέτρηση της ολικής κορτιζόλης (total cortisol) θα μας οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα και περαιτέρω συνέχεια κορτικοστεροειδούς θεραπείας, που είναι όμως μη αναγκαία.

ΚΕΦ. 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Η μελέτη της χημικής ανάλυσης αρχίζει με μια από τις παλιότερες παρατηρήσεις: οι ουσίες λειώνουν και βράζουν σε ορισμένες θερμοκρασίες, αλλάζοντας έτσι μορφή από στερεή σε υγρή ή από υγρή σε αέρια και αντίστροφα. Η μεταβολή μεταξύ αυτών των καταστάσεων της ύλης ή φάσεων μας δίνει πληροφορίες που βοηθούν στην αναγνώριση της ουσίας και στον προσδιορισμό της καθαρότητάς της. Επιπλέον, επειδή ο μηχανικός διαχωρισμός των δύο φάσεων είναι σχετικά απλός, η μελέτη της κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων αποτελεί τη βάση για όλες τις τεχνικές διαχωρισμού.

Η μεταβολή των φάσεων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1 συμβαίνει τόσο με απλές καθαρές ουσίες ή στοιχεία όσο και με μείγματα δύο ή περισσότερων ουσιών.



Σχήμα 3.1. Μεταβολές μεταξύ φάσεων.

Ο διαχωρισμός ενός μείγματος στα επιμέρους συστατικά του είναι βασικό εργαλείο της αναλυτικής χημείας για τη περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία των συγκεκριμένων συστατικών. Οι βασικές μέθοδοι διαχωρισμού ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις φυσικές και στις χημικές.

Πιο συγκεκριμένα οι φυσικές μέθοδοι βασίζονται στις φυσικές ιδιότητες των συστατικών των μειγμάτων.

Αρχικά, η εκχύλιση βασίζεται στο διαχωρισμό με θερμό νερό κάποιων συστατικών από μία ουσία (π.χ. τσάι, καφές), ενώ η διήθηση είναι ο διαχωρισμός ενός υγρού από ένα στερεό με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού (ή φίλτρου) όπου συγκρατείται το στερεό. Εφαρμόζεται σε ετερογενή μείγματα και συχνά υποβοηθείται και με τη δημιουργία κενού αέρος κάτω από το φίλτρο.

Από την άλλη, η εξάτμιση χρησιμοποιείται σε υγρά μείγματα ομογενή ή ετερογενή, όπου εξατμίζεται ο διαλύτης (με βρασμό ή χωρίς) και παραμένει η στερεή ουσία. Μια άλλη μέθοδος είναι η απόχυση στην οποία πραγματοποιείται διαχωρισμός υγρού από στερεό σε ετερογενές μείγμα χωρίς φίλτρο. Γίνεται καλύτερα όταν το στερεό είναι σε μεγάλα κομμάτια (π.χ. φύλλα τσαγιού). Για τον διαχωρισμό υγρού μείγματος (ομογενούς ή ετερογενούς) δύο ή περισσότερων συστατικών με διαφορετικά σημεία ζέσεως (συνήθως με διαφορά μεγαλύτερη των 15 βαθμών Κελσίου), χρησιμοποιείται η απόσταξη. Θερμαίνεται το μείγμα σε ειδική συσκευή και συλλέγονται ξεχωριστά οι ατμοί του κάθε συστατικού. Πρώτα αποχωρίζεται το συστατικό με το χαμηλότερο σημείο ζέσεως. Απόσταξη μπορούμε να κάνουμε και σε μείγμα υγρού-στερεού, οπότε μετά την πλήρη εξάτμιση του υγρού στην αρχική φιάλη μένει η στερεή ουσία.

Επιπλέον, η φυγοκέντρωση είναι ο κύριος τρόπος διαχωρισμού των γαλακτωμάτων. Αυτά είναι μείγματα μικροσκοπικών στερεών που αιωρούνται μέσα σε υγρά. Περιστρέφεται το μείγμα με μεγάλη ταχύτητα, οπότε τα συστατικά διαχωρίζονται σε «στρώματα».

Τέλος, η χρωματογραφία δεν χρησιμοποιείται τόσο πολύ για διαχωρισμό όσο για την εξακρίβωση της σύστασης ενός μείγματος, για να καταλάβουμε δηλαδή ποια συστατικά το απαρτίζουν. Βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα με την οποία τα συστατικά παρασύρονται από το νερό πάνω στο διηθητικό χαρτί. Έτσι, κάθε ουσία έχει τη δική της κουκίδα σε διαφορετικό ύψος στο χαρτί. Πιο συγκεκριμένα, η χρωματογραφία θα αναλυθεί παρακάτω.

Οι χημικές μέθοδοι διαχωρισμού μειγμάτων είναι οι μέθοδοι διαχωρισμού που περιλαμβάνουν και χημικές αντιδράσεις. Μια τέτοια μέθοδος είναι η διύλιση.

ΚΕΦ. 4: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές έρχονται να καλύψουν κυρίως την ανάγκη για αναλύσεις πολύπλοκων οργανικών μειγμάτων. Είναι κατ' ουσίαν μια μέθοδος διαχωρισμού που στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του μείγματος σ' ένα σύστημα κινητής και ακίνητης φάσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι άλλα συστατικά του δείγματος να κατακρατούνται περισσότερο και άλλα λιγότερο χρόνο στο χρωματογραφικό σύστημα. Η πρώτη μορφή χρωματογραφίας εφαρμόστηκε το 1906 από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tsvet, κατά την οποία το δείγμα χρωστικών που μελέτησε, δημιουργούσε κατά την έκλουσή του έγχρωμες ζώνες κατά το μήκος της στήλης και γι' αυτό ονομάστηκε χρωματογραφία.

4.1. ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν ως προς τη φύση της κινητής φάσεως, ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεώς του μέσα από αυτή [30]. Έτσι η ταξινόμηση μπορεί να γίνει:

I) Με βάση τη φύση της κινητής και στατικής φάσεως

Αν η κινητή φάση είναι αέρια, έχουμε την *αέρια χρωματογραφία* (GC), αν είναι υγρή, την *υγρή χρωματογραφία* (LC) και αν είναι αέρια σε υπερκρίσιμη κατάσταση την *υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία* (SFC).

Όσον αφορά τη στατική φάση, αυτή μπορεί να είναι στερεό (G) ή υγρό (L), μηχανικά ή χημικά προσδεδεμένο σε ένα στερεό υπόστρωμα. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν ανάλογα με τη φυσική κατάσταση της υγρής και αέριας φάσης, η αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC), η υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC) κλπ.

II) Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού σε:

1. *Χρωματογραφία προσρόφησης*: όταν ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του δείγματος στην επιφάνεια της ακίνητης φάσης, που είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου.
2. *Χρωματογραφία κατανομής*: που στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.
3. *Χρωματογραφία ιόντων*: όπου τα ιόντα του δείγματος εναλλάσσονται με τα ιόντα της στατικής φάσης.
4. *Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού*: όπου τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Αντίθετα, τα μικρά μόρια «περιπλανώνται» στους πόρους του πληρωτικού υλικού και συγκρατούνται περισσότερο.
5. *Χρωματογραφία συγγένειας*: βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο που έχει χημικά δεσμευτεί στη στατική φάση.

Στη χρωματογραφία κατανομής, η οποία μπορεί να είναι χρωματογραφία αερίου-υγρού ή υγρού-υγρού, η στατική φάση είναι κάποιο υγρό προσροφημένο ή χημικά στερεωμένο σε κάποιο στερεό, το οποίο, για το λόγο αυτό, είναι αδρανικοποιημένο. Σε πρώτη προσέγγιση η χρωματογραφία κατανομής είναι, σ' ό,τι αφορά στο μηχανισμό διαχωρισμού, παραπλήσια με την εκχύλιση [30].

III) Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσεως

Με βάση τη διάταξη της στατικής φάσης, η χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία στήλης, όπου η στατική φάση περιέχεται σε κυλινδρική στήλη και σε επίπεδη χρωματογραφία, όπου η στατική φάση είναι σε επίπεδο. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν η χρωματογραφία χάρτου (PC) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Διαχωρισμοί με αέρια χρωματογραφία μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο σε στήλη, ενώ με υγρή χρωματογραφία σε στήλη, σε χαρτί ή σε λεπτή στιβάδα. Πιο συγκεκριμένα, στην αέρια χρωματογραφία, η στήλη που χρησιμοποιείται είναι είτε πληρωμένη, είτε τριχοειδής.

Όσον αφορά την υγρή χρωματογραφία, για την πλήρωση της στήλης χρησιμοποιούνται μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2). Ο λόγος είναι γιατί αυτό το υλικό έχει μεγάλη πολικότητα και αποτελεί τη βάση για την υγρή χρωματογραφία προσρόφησης. Αν υπάρξει χημική σύνδεση με αλκύλια που φέρουν αμινο-, φαίνυλο-, κύανο- ομάδες τότε επιτυγχάνεται μείωση της πολικότητας της πηκτής. Αν η στατική φάση είναι περισσότερο πολική, σε σχέση με την κινητή φάση, τότε η υγρή χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως *κανονικής φάσης* ενώ αν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική τότε χαρακτηρίζεται ως *αντίστροφης φάσης*.

IV) Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος

α) μετωπική χρωματογραφία, στην οποία το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο διαλύτης δρα και ως κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή μετώπων.

β) χρωματογραφία εκτοπίσεως, όπου χρησιμοποιείται κινητή φάση που συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας έτσι σε διάφορο βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη.

γ) χρωματογραφία εκλούσεως, όπου τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης, οπότε εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους [30].

4.2. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LLC)

Η υγρή-υγρή χρωματογραφία (liquid-liquid chromatography, LLC) συνδυάζει τις αρχές διαχωρισμού της εκχύλισης υγρού-υγρού και της χρωματογραφίας. Όπως και στην εκχύλιση, χρησιμοποιείται ένα διφασικό υγρό σύστημα και η βάση για το διαχωρισμό είναι η διαφορετική συμπεριφορά κατανομής των διαλυμένων μειγμάτων μεταξύ των δύο φάσεων.

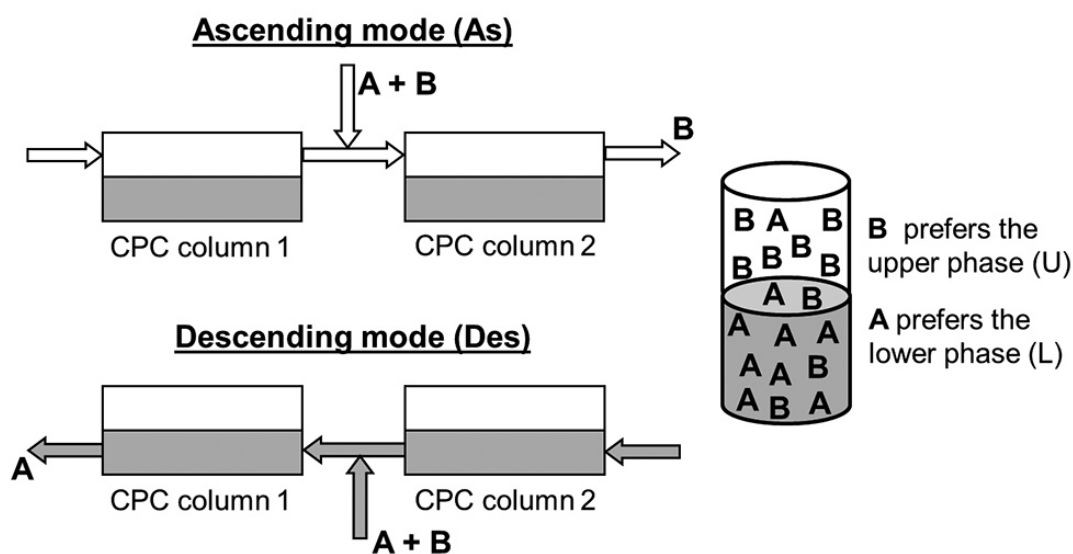
Στην LLC ο χρήστης προετοιμάζει και τις δύο φάσεις, την κινητή φάση και τη στατική, αναμειγνύοντας δύο ή περισσότερους διαλύτες που σχηματίζουν διφασικό σύστημα. Η υγρή στατική φάση διατηρείται στη θέση της κατά τη λειτουργία με εφαρμογή φυγόκεντρης δύναμης και συνήθως καταλαμβάνει το 60-80% του όγκου της στήλης. Υψηλή φόρτωση δείγματος είναι δυνατή εφόσον ολόκληρος ο όγκος της υγρής στατικής φάσης είναι προσβάσιμος στις διαλυμένες ουσίες. Μη αναστρέψιμη προσρόφηση δεν μπορεί να συμβεί, επιτρέποντας την πλήρη ανάκτηση του δείγματος [16-18].

Το πρώτο και το πιο κρίσιμο βήμα στην ανάπτυξη ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι η επιλογή των κινητών και στατικών φάσεων υπό τη μορφή ενός διφασικού συστήματος διαλυτών. Ο συντελεστής κατανομής του συστατικού στόχου χρησιμοποιείται ως κύρια παράμετρος διαλογής, με τις καλύτερες επιδόσεις να επιτυγχάνονται με συντελεστή διαίρεσης μεταξύ 0,5 και 2,5. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας διαθέσιμων διαλυτών, η επιλογή ενός διφασικού συστήματος διαλυτών για ένα συγκεκριμένο διαχωρισμό LLC διαρκεί συχνά μέχρι το 80% του χρόνου που δαπανάται για την ανάπτυξη ολόκληρης της διαδικασίας [18]. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες «οικογένειες» συστημάτων διαλύτη με τη χρήση συμβατικών διαλυτών όπως «HEMWat» (εξάνιο / μεθανόλη / οξικός αιθυλεστέρας / νερό) [16,17]. Μια ευρεία περιοχή πολικότητας μπορεί να επιτευχθεί μέσα σε μία οικογένεια αλλάζοντας τη σύνθεση του παγκόσμιου συστήματος. Τα διφασικά υγρά συστήματα μπορούν επίσης να είναι «ειδικά προσαρμοσμένα» για μια συγκεκριμένη εργασία διαχωρισμού. Τα υδατικά διφασικά συστήματα με βάση το πολυμερές [19] και ο βαθύς ευτηκτικός διαλύτης χωρίς ύδωρ [20] ή ιονικά υγρά συστήματα [21] έχουν επεκτείνει τις εφαρμογές της LLC.

Η πειραματική προσπάθεια που απαιτείται για να επιλεγεί ένα διφασικό σύστημα διαλυτών και η συνολική του σύνθεση μπορεί να μειωθεί σημαντικά, εάν δεν εξαλειφθεί, χρησιμοποιώντας θερμοδυναμικά μοντέλα όπως το COSMO-RS για την πρόβλεψη των συντελεστών κατανομής διαλυμένων ουσιών [22].

Στην LLC, σε οποιαδήποτε φάση του διφασικού συστήματος μπορεί να αποδοθεί ο ρόλος της στατικής φάσης και οι ρόλοι των φάσεων μπορεί να αλλάξουν κατά τη διάρκεια της λειτουργίας. Αυτό ανοίγει την πόρτα σε μια μεγάλη ποικιλία μοναδικών τρόπων λειτουργίας, που δεν είναι δυνατές χρησιμοποιώντας σταθερές στατικές φάσεις. Μια τέτοια λειτουργία είναι η συνεχής διαδικασία που κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 2005 [23]. Η αρχή λειτουργίας της παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 4.1 για τον

διαχωρισμό ενός δυαδικού μείγματος των συστατικών A και B. Υποτίθεται εδώ ότι τα A και B κατανέμονται κατά προτίμηση στην κατώτερη φάση και στην ανώτερη φάση του διφασικού συστήματος, αντίστοιχα. Αυτή η κυκλική διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο στήλες συνδεδεμένες σε σειρά. Η τροφοδοσία εισάγεται συνεχώς μεταξύ των δύο στηλών και τα δύο προϊόντα συλλέγονται διαδοχικά στα αντίθετα άκρα της ρύθμισης. Ένας κύκλος αποτελείται από δύο βήματα: φθίνουσα (Des) και αύξουσα (As) λειτουργία.



Σχήμα 4.1. Αρχή λειτουργίας αλλαγής φάσεων στην LLC [32].

Κατά τη φθίνουσα λειτουργία (*descending mode*), η κατώτερη φάση δρα ως κινητή φάση και εισάγεται στη μονάδα μέσω της στήλης 2. Το ρεύμα τροφοδοσίας αποτελείται από τα συστατικά A και B διαλυμένα στην κατώτερη φάση, τα οποία διέρχονται μεταξύ των δύο στηλών. Κατά τη διάρκεια της φθίνουσας λειτουργίας (Des), το A ταξιδεύει με την κινητή φάση προς το αριστερό άκρο της στήλης 1 ταχύτερα από το B και μπορεί να συλλεχθεί σε καθαρή μορφή. Λίγο πριν φτάσει το στοιχείο B στο σημείο συλλογής του προϊόντος, η μονάδα μεταβαίνει στη μέθοδο αύξουσας λειτουργίας (*ascending mode*), όπου οι ρόλοι φάσης και η κατεύθυνση ροής αντιστρέφονται. Η ανώτερη φάση χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και ως βάση για την τροφή. Το B ταξιδεύει πιο γρήγορα προς το δεξιό άκρο της στήλης 2 και συλλέγεται σε καθαρή μορφή. Πριν φύγει η στήλη A, η μονάδα επιστρέφει στην κατηφορική βαθμίδα, συμπληρώνοντας έναν κύκλο.

4.3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

4.3.1. Αρχές λειτουργίας HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography), που παλαιότερα αναφερόταν ως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high-pressure liquid chromatography), είναι μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών σε ένα μείγμα, για την αναγνώριση κάθε συστατικού και για την ποσοτικοποίηση κάθε συστατικού. Η HPLC, σε αντίθεση με μια σταθμική τεχνική, θεωρείται μια ενόργανη τεχνική της αναλυτικής χημείας.

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μία υγρή κινητή φάση προωθείται υπό πίεση μέσω μιας στήλης ανοξειδωτου χάλυβα που περιέχει σωματίδια στατικής φάσης διαμέτρου 3-10 μm. Ο αναλύτης φορτώνεται στην κορυφή της στήλης μέσω μιας βαλβίδας βρόγχου και ο διαχωρισμός του μείγματος λαμβάνει χώρα σύμφωνα με το σχετικό χρονικό διάστημα που τα συστατικά του παραμένουν στη στατική φάση.

Γενικά, η μέθοδος περιλαμβάνει ένα υγρό δείγμα που περνάει μέσα από ένα στερεό προσροφητικό υλικό, συμπιεσμένο μέσα σε μία στήλη, χρησιμοποιώντας μια ροή υγρού διαλύτη. Κάθε αναλύτης (αναλυόμενη ουσία) στο δείγμα αλληλεπιδρά κάπως διαφορετικά με το προσροφητικό υλικό, επιβραδύνοντας έτσι την ροή των αναλυτών. Αν η αλληλεπίδραση είναι αδύναμη, οι αναλύτες ρέουν από τη στήλη σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ αν η αλληλεπίδραση είναι ισχυρή, τότε ο χρόνος έκλουσης είναι μεγάλος.

Η HPLC χρησιμοποιείται στην ιατρική (π.χ. στην ανίχνευση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό του αίματος), στη νομική (π.χ. στην ανίχνευση αναβολικών ουσιών στα ούρα), στην έρευνα (π.χ. στο διαχωρισμό των συστατικών ενός σύνθετου βιολογικού δείγματος, ή παρόμοιων συνθετικών χημικών ουσιών μεταξύ τους) και στη βιομηχανία (π.χ. κατά τη διαδικασία παραγωγής φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων).

Η χρωματογραφία μπορεί να περιγραφεί ως μια διαδικασία μεταφοράς μάζας που περιλαμβάνει την προσρόφηση. Η HPLC βασίζεται σε αντλίες, για να περάσει ένα πιεσμένο υγρό και ένα μείγμα του δείγματος μέσα από μια στήλη, γεμάτη με ένα προσροφητικό υλικό, οδηγώντας έτσι στο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος. Το δραστικό συστατικό της στήλης, το προσροφητικό, είναι συνήθως ένα κοκκώδες υλικό,

φτιαγμένο από στερεά σωματίδια 2 - 50 μικρομέτρων (μm) σε μέγεθος, όπως π.χ. silica (διοξείδιο του πυριτίου, SiO_2), πολυμερή κ.ά. Τα συστατικά που αποτελούν το μείγμα του δείγματος διαχωρίζονται μεταξύ τους, λόγω των διαφορετικών βαθμών αλληλεπίδρασής τους με τα σωματίδια του προσροφητικού.

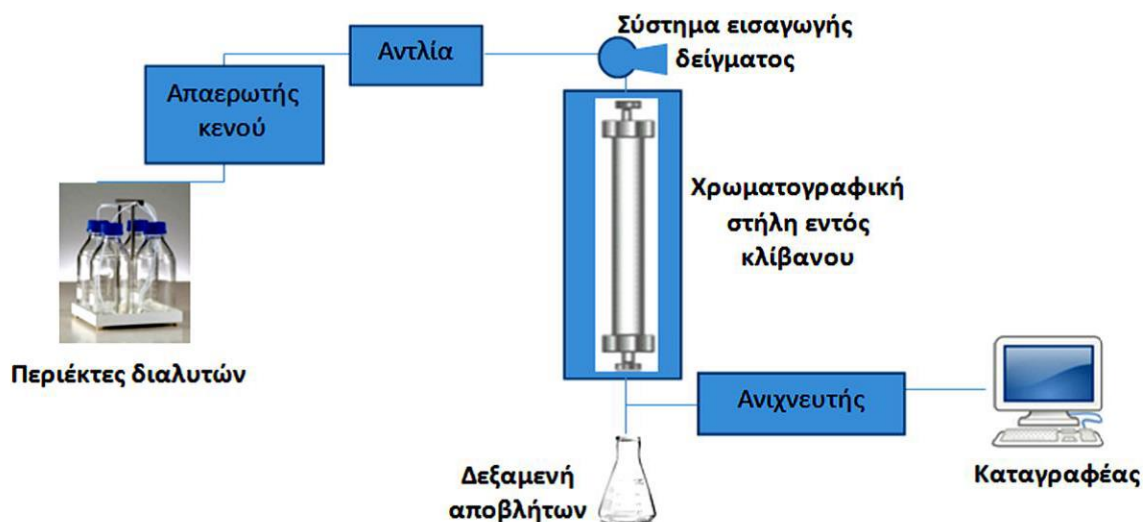
Το πεπιεσμένο υγρό είναι συνήθως ένα μείγμα διαλυτών (π.χ. νερό, ακετονιτρίλιο και/ή μεθανόλη) και αναφέρεται ως «κινητή φάση». Η σύνθεση και η θερμοκρασία του παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διαχωρισμού, επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών του δείγματος και του προσροφητικού. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι σωματιδιακής φύσης, όπως υδρόφοβες (διασποράς), διπόλου-διπόλου και ιοντικές, και τις περισσότερες φορές είναι ένας συνδυασμός αυτών.

Η HPLC διακρίνεται από την παραδοσιακή («χαμηλής πίεσης») υγρή χρωματογραφία, επειδή οι πιέσεις είναι σημαντικά υψηλότερες (50 - 350 bar), ενώ η απλή υγρή χρωματογραφία στηρίζεται, κατά κανόνα, στη δύναμη της βαρύτητας, για να περάσει η κινητή φάση μέσα από τη στήλη.

Λόγω της μικρής ποσότητας του δείγματος που διαχωρίζεται στην αναλυτική HPLC, οι τυπικές διαστάσεις της στήλης είναι 2,1 - 4,6 mm διάμετρος και 30 - 250 mm μήκος. Επίσης, οι στήλες HPLC γίνονται και με μικρότερα σωματίδια προσροφητικού (με μέσο μέγεθος σωματιδίων 2 - 5 μm). Αυτό δίνει στην HPLC ανώτερη διαχωριστική ικανότητα κατά τον διαχωρισμό μειγμάτων, που είναι και ο λόγος για τον οποίο αποτελεί μια τόσο δημοφιλή χρωματογραφική τεχνική.

4.3.2. Διάταξη οργανολογίας HPLC

Γενικά μια συσκευή LC αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα: 1) το σύστημα παροχής κινητής φάσης, 2) το σύστημα εισαγωγής δείγματος, 3) τη στήλη, 4) τον ανιχνευτή και 5) τον καταγραφέα. Μία τέτοια διάταξη απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2. Τυπική διάταξη LC.

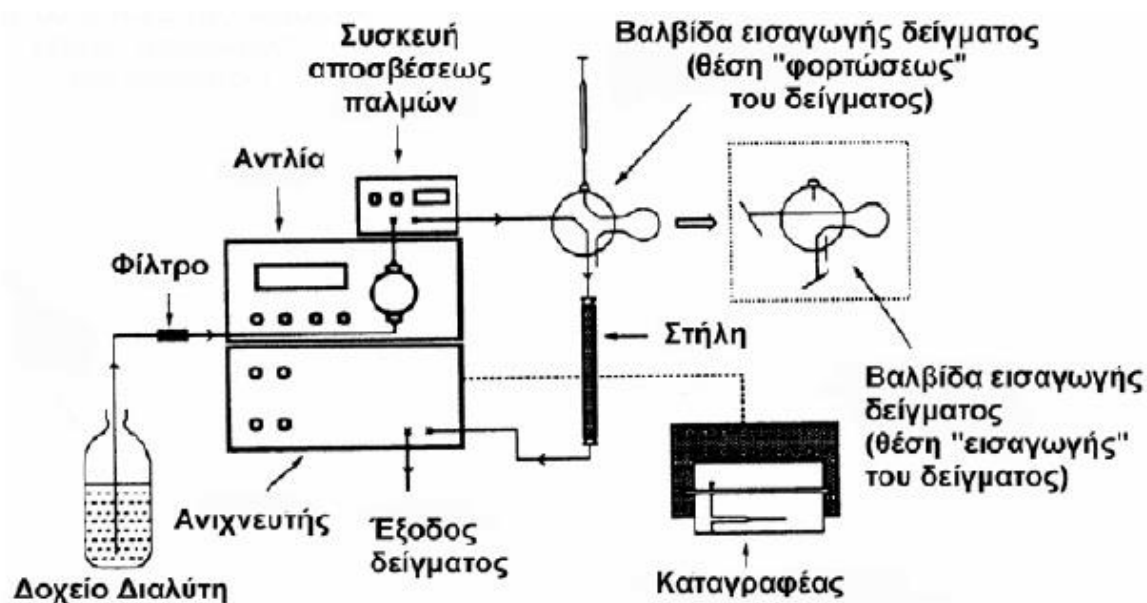
Με την ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) οι χρόνοι διαχωρισμού μειώθηκαν σημαντικά. Κατά την τεχνική αυτή, το υλικό πληρώσεως της στήλης είναι λεπτότατου διαμερισμού (σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου) και έχει υψηλή σφαιρική κανονικότητα, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται μεγάλο βαθμό ομοιομορφία και πυκνότητα πληρώσεως. Η υψηλή πυκνότητα πληρώσεως όμως, με αυτά τα πολύ μικρά σωματίδια, μειώνει τη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη (μεγάλη αντίσταση μεταφοράς), και για να επιτευχθεί μία λογική ταχύτητα ροής, απαιτείται η εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση.

Τα βασικά τμήματα μιας συσκευής HPLC είναι:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (pump) (σταθερής ροής και πίεσης)
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος, που μπορεί να είναι είτε βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (injector valve) είτε αυτόματος δειγματολήπτης (autosampler)
- Χρωματογραφική στήλη (column)
- Ανιχνευτής (detector)
- Καταγραφέας (Ηλεκτρονικός υπολογιστής με το κατάλληλο εγκατεστημένο ειδικό λογισμικό και εκτυπωτής).

Στην αναλυτική στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης γίνεται με την αντλία. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη μέσω της βαλβίδας ή μέσω ενός αυτόματου δειγματολήπτη.

Η σχηματική διάταξη μιας τυπικής συσκευής HPLC φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3. Σχηματική διάταξη HPLC [33].

Μια διάταξη HPLC περιλαμβάνει, κατά κανόνα, έναν δειγματολήπτη / βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αντλίες και έναν ανιχνευτή. Ο δειγματολήπτης φέρνει το μείγμα του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης, που το μεταφέρει στη στήλη. Οι αντλίες παρέχουν την επιθυμητή ροή και τη σύνθεση της κινητής φάσης μέσα στη στήλη. Ο ανιχνευτής παράγει ένα σήμα ανάλογο προς την ποσότητα του συστατικού του δείγματος που αναδύεται κάθε φορά από τη στήλη, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος. Ένας ψηφιακός μικροεπεξεργαστής και το λογισμικό χρήστη ελέγχουν το σύστημα HPLC και παρέχουν ανάλυση των δεδομένων.

Ορισμένα μοντέλα μηχανικών αντλιών σε ένα σύστημα HPLC μπορούν να αναμείξουν πολλούς διαλύτες μαζί, σε αναλογίες που μεταβάλλονται στον χρόνο, δημιουργώντας έτσι μια βαθμωτή μεταβολή σύνθεσης στην κινητή φάση.

Τα περισσότερα συστήματα HPLC έχουν επίσης και ένα φούρνο στήλης (column oven), που επιτρέπει τη ρύθμιση της θερμοκρασίας, στην οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός.

Το σύστημα παροχής κινητής φάσης αποτελείται από μία αντλία (pump) υψηλής πίεσης και ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση έχουμε **ισοκρατική έκλυση** (isocratic elution), ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία έχουμε **βαθμιδωτή έκλυση** (gradient elution). Για την επίτευξη της βαθμιδωτής έκλυσης, απαιτείται μια μονάδα προγραμματισμού και ελέγχου του συστήματος παροχής.

Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες (solvents) πρέπει να είναι διαφορετικής πολικότητας (πλήρως αναμείξιμοι), ή διαλύματα διαφορετικού pH, ή διαφορετικής ιοντικής ισχύος ή συγκεντρώσεως κάποιου άλατος, ανάλογα με το είδος του επιδιωκόμενου μηχανισμού διαχωρισμού. Επίσης, οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και γι' αυτό, πριν τη χρήση τους, διηθούνται από ειδικά φίλτρα υπό κενό και απαερώνονται.

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector) είναι μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης, με βρόχο δείγματος. Στη θέση «φορτώσεως» η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη χωρίς να περνά από το βρόχο, ο οποίος έχει πληρωθεί με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί προς τη στήλη.

Η τεχνική HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμούς βασισμένους σε προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή και μοριακό αποκλεισμό, ενώ για κάθε μία εφαρμογή διατίθενται από διάφορες παρασκευάστριες εταιρείες οι κατάλληλες στήλες. Οι χρησιμοποιούμενες στήλες (columns) είναι ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα, οι οποίες αγοράζονται έτοιμες από τις διάφορες παρασκευάστριες εταιρείες. Εξαιτίας των υψηλών πιέσεων που ασκούνται (μέχρι 5000 psi), τα κλασσικά υλικά πληρώσεως των στηλών, όπως Sephadex και Sepharose, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Έτσι, στην HPLC χρησιμοποιούνται συνήθως πολυμερή διοξειδίου του πυριτίου (silica) ή αλουμίνας (alumina).

Τα περισσότερα μείγματα ουσιών μπορούν να διαχωριστούν και να αναλυθούν με την HPLC, αρκεί να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης. Σε γενικές γραμμές επιδιώκεται η εύρεση συνθηκών, στις οποίες τα συστατικά ενός μείγματος συγκρατούνται σε κάποιο βαθμό στη στατική φάση, αλλά όχι πολύ ισχυρά. Αποδοτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο αν εξασφαλισθεί διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των ζωνών των συστατικών, λόγω του διαφορετικού

βαθμού συγκρατήσεώς τους στη στατική φάση. Προφανώς, οι χρωματογραφικές μέθοδοι θα πρέπει να συνδυάζονται με συστήματα ανίχνευσης των εκλούμενων συστατικών, π.χ. φασματοφωτόμετρα, για την ολοκλήρωσή τους ως τεχνικές ανάλυσης.

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μειγμάτων ουσιών ποικίλης προέλευσης. Αποτελεί σήμερα την τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης και ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνήθως πριν από την εισαγωγή του δείγματος στον χρωματογράφο προηγείται εκχύλιση ή άλλη τεχνική προκαταρκτικού διαχωρισμού.

4.3.3. HPLC κανονικής και αντίστροφης φάσης

Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση του υλικού πλήρωσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης. Ανάλογα με το μηχανισμό κατανομής των ουσιών του μείγματος μεταξύ των φάσεων διακρίνονται τα εξής είδη: i) Χρωματογραφία Προσρόφησης, ii) Χρωματογραφία Κατανομής, iii) Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής, iv) Χρωματογραφία Συγγένειας και v) Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού ή Διήθησης Πηκτής.

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: α. *Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης* και β. *Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης*.

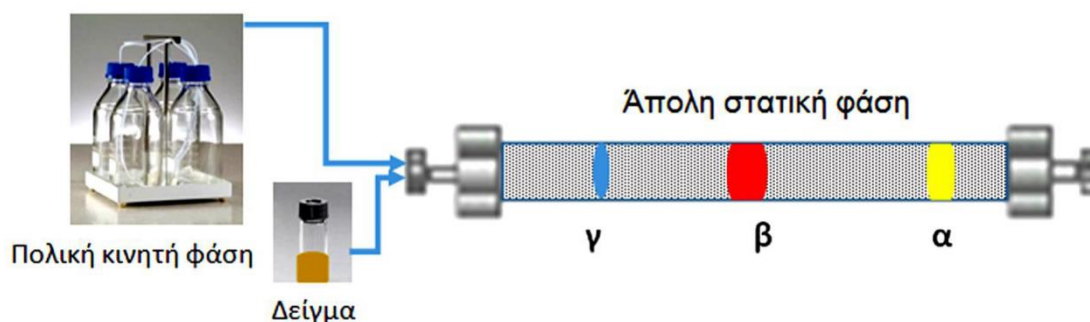
α. Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης

Στην περίπτωση εκείνη όπου η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή φάση, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.ά., και τα πολικότερα συστατικά του δείγματος προσκολλώνται ισχυρότερα στη στατική φάση και επομένως εκλούνται αργότερα από τα λιγότερο πολικά συστατικά, η τεχνική

ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (Normal Phase - High Performance Liquid Chromatography, NP-HPLC). Κατά την τεχνική αυτή, ο χρόνος έκλυσης (t_R) των συστατικών μπορεί να μεταβληθεί μεταβάλλοντας την πολικότητα του διαλύτη έκλυσης.

β. Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Στην περίπτωση εκείνη όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση και τα πολικότερα συστατικά του δείγματος προσκολλώνται ασθενέστερα στη στατική φάση και επομένως, εκλύονται γρηγορότερα από τα λιγότερο πολικά συστατικά, η τεχνική ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) (Σχήμα 4.4).



Σχήμα 4.4. HPLC αντίστροφης φάσης.

Κατά την τεχνική αυτή, η στατική φάση, η οποία είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου, συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό.

Έτσι, κατά την RP-HPLC, χρησιμοποιούνται υλικά πληρώσεως (κυρίως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (chemically bonded stationary phases). Τα σωματίδια αυτά είναι συνήθως διαμέτρου 5 - 10 μm με πόρους 20 nm και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια επαφής, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι στατικές φάσεις (αλκυλομάδες και άλλες δραστικές ομάδες). Στατικές

φάσεις αλκυλομάδων με αλυσίδες C₈H₁₇ (octyl) και C₁₈H₃₇ (octadecyl) δεσμευμένες στη silica είναι ευρέως διαδεδομένες και βρίσκουν εφαρμογές σε διαχωρισμούς αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, βιταμινών, λιπών, στεροειδών, αντιβιοτικών, νουκλεοτιδίων, σακχάρων κ.ά.

Κατά την RP-HPLC, η ισχύς έκλουσης αυξάνει με την παράλληλη μείωση της πολικότητας του διαλύτη, διότι έτσι ελαττώνεται η συγκράτηση μιας ουσίας στη στατική φάση. Στην περίπτωση ουσιών που μπορούν να υποστούν ιονισμό, μια αλλαγή στο pH μπορεί να επηρεάσει τη συγκράτηση και την εκλεκτικότητά τους.

Ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφιση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό.

Η έκλυση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο πιο άπολο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλεπιδράσει με την άπολη στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική έκλυση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Είναι προφανές ότι με αντιστροφή της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης, αντιστρέφεται και η σειρά έκλυσης των τριών συστατικών του μείγματος.

Όπως αναφέρθηκε, στη χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης, η επιφάνεια του προσροφητικού μέσου έχει τροποποιηθεί με την πρόσδεση μακρών αλυσίδων υδρόφοβων μορίων. Συνήθως, τέτοια μόρια είναι υδρογονάνθρακες - τυπικά αποτελούμενοι από 4 ή 8 ή 18 άτομα άνθρακα - μετατρέποντας τη στατική φάση σε άπολη. Οι στήλες με τα παραπάνω προσροφητικά μέσα ονομάζονται C4 ή C8 ή C18, αντίστοιχα. Περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RP-HPLC βρίσκουν οι στήλες C18.

Μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλούνται νωρίτερα. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC και γενικότερα η περισσότερο κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού ουσιών για αναλυτικούς σκοπούς.

Συνοψίζοντας, στη χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης, στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού βρίσκονται προσδεμένες μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα. Η κινητή φάση είναι πολική. Μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλούνται νωρίτερα. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC. Περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RP-HPLC βρίσκουν οι στήλες C18.

4.4. ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Οι βασικές έννοιες που χρησιμοποιούμε σε μια χρωματογραφική ανάλυση είναι οι παρακάτω:

Χρωματογράφημα: Η γραφική παράσταση του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους προς το χρόνο μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, καλείται χρωματογράφημα (chromatograph). Το εύρος της ζώνης λοιπόν είναι ανάλογο προς τον χρόνο παραμονής της ουσίας στη στήλη και αντιστρόφως ανάλογο προς την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Χρόνος κατακράτησης ή χρόνος ανάσχεσης, t_R : Ο χρόνος κατακράτησης (retention time) t_R , είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε μία συγκεκριμένη ουσία αφού εισαχθεί στη στήλη, να εμφανιστεί το μέγιστο της κορυφής της χρωματογραφίας. Ο χρόνος κατακράτησης αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Νεκρός χρόνος, t_0 : Ο χρόνος παραμονής των μορίων του δείγματος στην κινητή φάση είναι ο ίδιος για όλα τα συστατικά του δείγματος που δεν αλληλεπιδρούν καθόλου με τη στατική φάση της στήλης.

Διορθωμένος χρόνος κατακράτησης, t_R' : Είναι προφανές ότι ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού στη στατική φάση για ένα συστατικό (που αλληλεπιδρά σε κάποιο βαθμό με αυτήν) ισούται με τη διαφορά του χρόνου κατακράτησης και του νεκρού χρόνου, δηλαδή: $t_R' = t_R - t_0$.

Συντελεστής κατακράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας, k' : Αποτελεί ποσοτικό μέτρο της τάσης ενός συγκεκριμένου είδους μορίων να προσροφάται στη στατική φάση. Ισούται με τον λόγο του χρόνου που παραμένει η ουσία Α στη στατική φάση προς τον χρόνο που αυτή παραμένει στην κινητή φάση: $k' = t_R'/t_0 = (t_R - t_0)/t_0$.

Εύρος κορυφής, W : Απόσταση μεταξύ των σημείων τομής της γραμμής βάσης και των εφαπτομένων στα σημεία καμπής των πλευρών της κορυφής.

Διαχωριστική ικανότητα στήλης, R_s : Αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητας μίας στήλης να διαχωρίσει δύο προσδιοριζόμενες ουσίες (που αναλύονται υπό ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο). Δύο ουσίες θεωρείται ότι διαχωρίζονται πλήρως, όταν το R_s είναι ίσο τουλάχιστον με 1,5. Υπολογίζεται από τη σχέση: $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(W_2 + W_1)$.

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N , και το ύψος της θεωρητικής πλάκας H , είναι καθαρά θεωρητικά μεγέθη. Χρησιμοποιούνται προκειμένου να συγκριθεί η αποδοτικότητα χρωματογραφικών στηλών [30].

ΚΕΦ 5: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σύγχρονη τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση (δοκιμή ή ανάλυση) δείγματος [30]. Η εκχύλιση στερεάς φάσης αντικαθιστά αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού με υγρό και χρησιμοποιείται κυρίως για τις ακόλουθες αναλυτικές διαδικασίες:

1) Προσυγκέντρωση (pre-concentration) της προσδιοριζόμενης ουσίας (αναλυτή) από μεγάλους όγκους δειγμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις η ευαισθησία των διαφόρων αναλυτικών μεθόδων δεν επαρκεί για μετρήσεις σε πολλά δείγματα στα οποία η προς διαχωρισμό ουσία βρίσκεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η παρουσία διαφόρων 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 διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης, έτσι ώστε η συνολική ποσότητα της επιθυμητής ουσίας να «παγιδευτεί» στον 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.

2) Καθαρισμός δείγματος. Με τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης συχνά επιδιώκεται η δέσμευση ουσιών από τα δείγματα οι οποίες παρεμποδίζουν μια διαδικασία μέτρησης και όχι η δέσμευση της ουσίας που διαχωρίζεται.

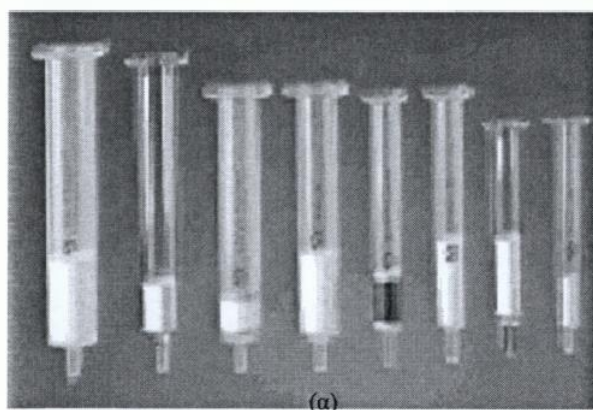
3) Χρονοπρογραμματιζόμενες δειγματοληψίες πεδίου. Η διαδικασία της SPE είναι σχετικά απλή και συχνά μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα εκτός εργαστηρίου. Έτσι, με την SPE μπορεί να πραγματοποιείται αυτοματοποιημένη/προγραμματισμένη δειγματοληψία (π.χ. αέρα μιας περιοχής ή φυσικών υδάτων σε ένα ή περισσότερα σημεία ενός ποταμού) σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στις μικροστήλες της SPE που τελικά συλλέγονται (ένας για κάθε δειγματοληψία), κατακρατούνται τα υπό μέτρηση συστατικά και μετά το πέρας όλων των δειγματοληψιών, οι μικροστήλες, Σχήμα 5.1(α), μεταφέρονται στο εργαστήριο και μετράται κατά μαζικό τρόπο το περιεχόμενο της κάθε μικροστήλης στην υπό μέτρηση ουσία.

Με την SPE αποφεύγονται πολλά προβλήματα που άλλες εκχυλίσεις (π.χ. εκχύλιση υγρού/υγρού) παρουσιάζουν. Ο ατελής διαχωρισμός φάσεων, η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών, η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες) και η απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και, κατά κανόνα, εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών. Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι κατά πολύ

αποτελεσματικότερη τεχνική από αυτήν της εκχύλισης υγρού/υγρού, καθώς με αυτήν επιτυγχάνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, είναι ταχύτερη στην εφαρμογή της και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί.

Η SPE χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και την εκχυλιστική δέσμευση από αυτά, ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά δείγματα, τα οποία προηγουμένως θα έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη.

Στο Σχήμα 5.1(β) απεικονίζεται μια τυπική συσκευή κενού ταυτόχρονου χειρισμού πολλών στηλών SPE.

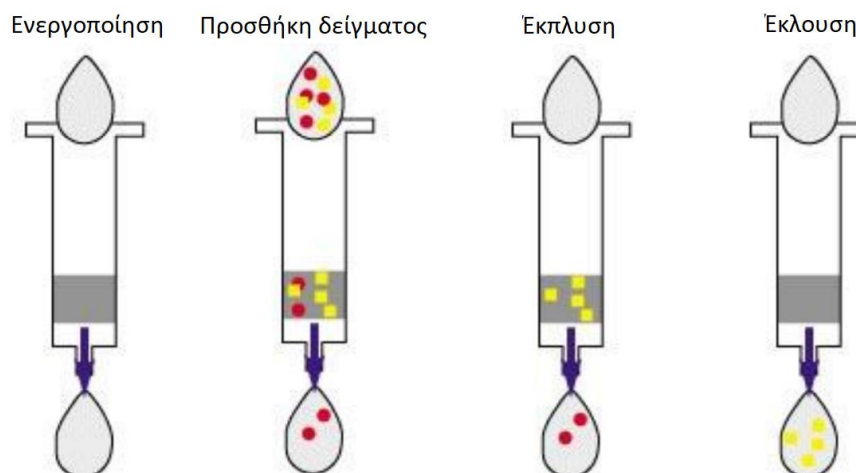


Σχήμα 5.1. (α) Σωλήνες-μικροστήλες SPE, (β) Συσκευή κενού, ταυτόχρονου χειρισμού πολλών στηλών SPE [34].

Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό, που είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, ώστε να αποκτά διάφορες προσροφητικές ιδιότητες. Ανάλογα με τις δραστικές ομάδες, που φέρει το προσροφητικό υλικό, μπορούν να γίνουν διάφορα είδη εκχυλίσεων, όπως μη πολικές, πολικές, ομοιοπολικές, κατιονανταλλακτικές και ανιονανταλλακτικές εκχυλίσεις. Η διαβίβαση των διαλυτών επιτελείται μέσα από τα προσροφητικά υλικά που περιέχονται μέσα σε κλειστά προσυσκευασμένα μικροφυσίγγια μιας χρήσης ή είναι στερεωμένα σε πλαστικές θήκες συριγγών που η ροή τους επιταχύνεται με εφαρμογή κενού.

Η γενικευμένη αρχή λειτουργίας της εκχύλισης στερεάς φάσης (αρχή διαχωρισμού με SPE) παρουσιάζεται γραφικά στο Σχήμα 5.2.

Αρχή Διαχωρισμού με SPE



Σχήμα 5.2. Αρχή διαχωρισμού με SPE.

Πιο αναλυτικά, για την εκτέλεση μιας εκχύλισης στερεάς φάσης ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- 1) Εξισορρόπηση (προετοιμασία) με διαβίβαση ενός διαλύτη για την ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού.
- 2) Διαβίβαση του διαλύματος του δείγματος, οπότε η επιθυμητή ουσία και ενδεχομένως και άλλες ουσίες του δείγματος κατακρατούνται στο υλικό προσρόφησης, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες εξέρχονται.
- 3) Έκπλυση με διαλύτη για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών, που έχουν κατακρατηθεί στο υλικό.
- 4) Εκλεκτική έκλουση της επιθυμητής ουσίας με κατάλληλο διαλύτη, που δεν εκλούει τις άλλες ουσίες που ενδεχομένως να έχουν προσροφηθεί στο υλικό.

Το έκλουσμα, που λαμβάνεται, περιέχει καθαρή την επιθυμητή ουσία, συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό δείγμα, εάν επιλεγούν κατάλληλα οι όγκοι των διαλυμάτων του δείγματος και του υγρού έκλουσης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εξισορρόπηση, έκπλυση και έκλουση της στήλης, εξαρτώνται από το είδος του προσροφητικού υλικού και της προς απομόνωση ουσίας και δίνονται από τους κατασκευαστές των στηλών ή επιλέγονται πειραματικά για την αποδοτικότερη και

εκλεκτικότερη εκχύλιση. Οι διάφορες τεχνικές εκχυλίσεως αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα πολλών αναλυτικών μεθόδων και συμβάλλουν στη σημαντική αύξηση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας των προσδιορισμών. Εκτός της Αναλυτικής Χημείας, η εκχύλιση χρησιμοποιείται ευρύτατα στη συνθετική Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία, για τον καθαρισμό πρώτων υλών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων σύνθεσης, σε ποσότητες της τάξεως του γραμμαρίου, ενώ στη Βιομηχανία απομονώνονται με εκχύλιση μεγάλες ποσότητες (τόνοι) διαφόρων ουσιών.

5.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αλλά σε άλλη κοκκομετρική σύσταση. Υπάρχουν 3 είδη εκχυλίσεων στερεής φάσης: κανονικής φάσης (normal phase), ιοντοανταλλακτικής (ion exchange) και αντίστροφης (reversed phase).

Η SPE κανονικής φάσης, που εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις και στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το δεσμευμένο προσροφητικό του silica gel με ομάδες, όπως CN-, NH₂-, -NH₂CH₂CH₂NH₂-.

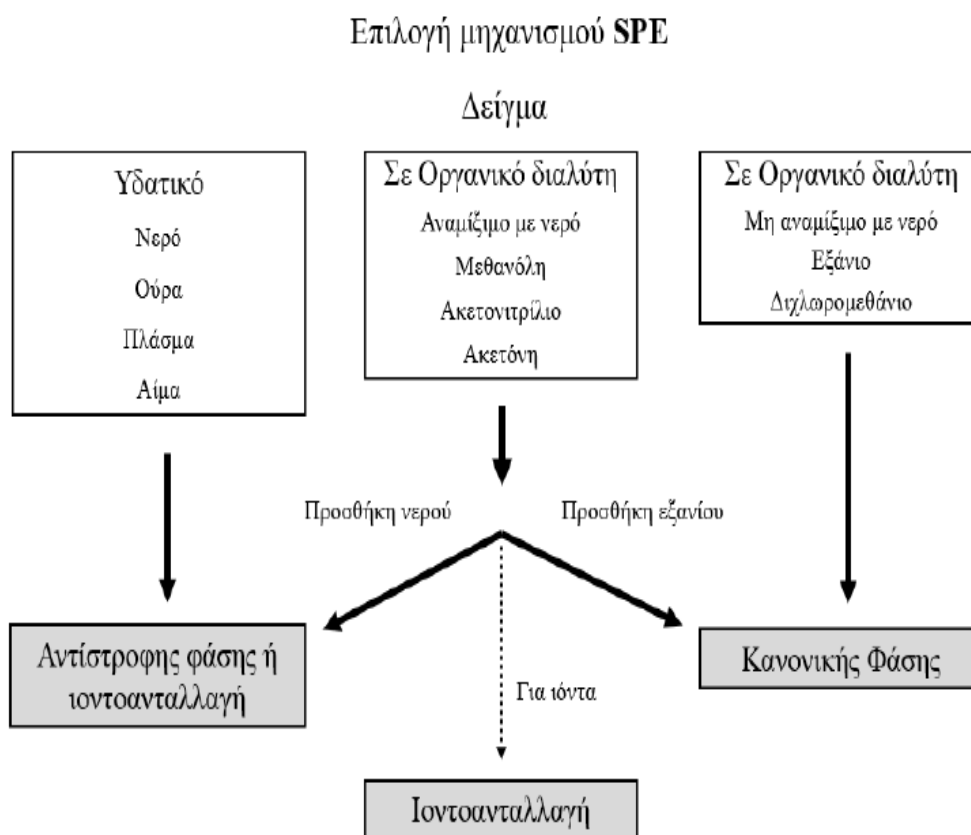
Η SPE με ιοντοανταλλαγή, χρησιμοποιείται για ενώσεις, που σε υδατικό διάλυμα είναι σε ιονισμένη μορφή. Ο κύριος μηχανισμός συγκράτησης της ένωσης βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού προς τις φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα του silica gel. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο- και τριμεθυλαμινο- ομάδες, για τη δημιουργία δεσμευμένης φάσης.

Για τη συγκράτηση μιας ένωσης στον ιοντοανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και η προσδιοριζόμενη ένωση και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο προσροφητικό να είναι φορτισμένες. Για την αποδέσμευση των συστατικών αρκεί είτε αυτά είτε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος ή διάλυμα, το οποίο περιέχει

ιόντα που αντικαθιστούν (άρα δρουν ανταγωνιστικά ως προς) την ένωση. Η επιλογή του κατάλληλου μηχανισμού εξαρτάται μεταξύ άλλων από το υπόστρωμα του δείγματος και τις ιδιότητες των συστατικών.

Στην SPE, εκτός από τα πυριτικά υλικά, χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο πολυμερικά υλικά, τα οποία πλεονεκτούν έναντι των πυριτικών προσροφητικών επειδή παραμένουν σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH. Τα υλικά αυτά, επίσης, χαρακτηρίζονται από τις μικτές τους ιδιότητες, καθώς περιέχουν ομάδες με υδρόφιλο και ομάδες με λιπόφιλο χαρακτήρα. Τέτοια υλικά είναι τα OASIS® HLB της Waters, τα ABSELUT NEXUS της Varian, τα Strata-X της Phenomenex κ.ά.

Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν και την SPE αντίστροφης φάσης όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3. Χρησιμοποιείται για τις μη πολικές ενώσεις με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού π.χ. κυκλοεξυλο-, οκτυλο-, δεκαοκτυλο-σιλάνιο. Ο διαχωρισμός στην SPE αντίστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη.



Σχήμα 5.3. Επιλογή κατάλληλου μηχανισμού SPE [30].

5.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ

Οι διαχωρισμοί αντίστροφης φάσης (reversed phase) πραγματοποιούνται με κατανομή της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταξύ ενός πολικού ή μετρίως πολικού διαλύτη (συνήθως ύδατος) ή «μήτρας» (matrix) και μιας μη πολικής στατικής φάσης. Ο αναλύτης μπορεί να είναι ουσία μέσης πολικότητας ή μη πολικός. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι: νερό, κ-εξάνιο, τετραχλωράνθρακας, βενζόλιο, διαιθυλαιθέρας, μεθυλενοχλωρίδιο, τετραϋδροφουράνιο (THF), αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ, ακετόνη, φορμαμίδιο, N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο, ακετονιτρίλιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) [30].

Από τις κυριότερες στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η silica, στην επιφάνεια της οποίας έχουν προσδεθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς αλκυλο- ή αρυλο- ομάδες. Η πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω των αρχικά ελεύθερων ομάδων σιλανόλης (Si-OH) που είναι υδρόφιλες (πολικές) και βρίσκονται στην επιφάνεια του πυριτικού πληρωτικού υλικού (υλικό που «γεμίζει» τη στήλη). Οι ομάδες αυτές αντιδρούν με κατάλληλα αντιδραστήρια σιλανοποίησης και μετατρέπονται χημικά σε υδρόφοβες αλκυλο- ή αρυλο- ομάδες.

Η κατακράτηση των οργανικών ενώσεων από πολικά διαλύματα (π.χ. υδατικά) σε αυτά τα υλικά, οφείλεται κυρίως στις ασθενείς ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των δεσμών C-H του αναλύτη και των αντίστοιχων δεσμών των υδρόφοβων ομάδων της σιλανοποιημένης επιφάνειας της πυριτίας. Αυτές οι ελκτικές δυνάμεις καλούνται δυνάμεις Van der Waals ή δυνάμεις διασποράς.

Για την έκλυση μιας προσροφημένης ουσίας από μία μικροστήλη ή δισκίο SPE αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης, τα μόρια του οποίου ανταγωνίζονται τα μόρια της προσροφημένης ουσίας και λόγω της μεγάλης περισσειάς τους, την «διώχνουν» από το υπόστρωμα. Τα υποστρώματα πυριτίας C-8 και C-18 (silica C-8 και C-18) είναι από τα πλέον ευρύτερα χρησιμοποιούμενα.

Η χρήση πολυμερών υλικών βοηθά στην πληρέστερη κάλυψη της πυριτικής επιφάνειας και στη χωρητικότητα της στήλης (μέγιστη ποσότητα κατακρατούμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους υλικού). Τα πολυμερή υλικά είναι ανθεκτικότερα σε ακραίες τιμές του pH και για αυτόν τον λόγο είναι περισσότερο κατάλληλα σε περιβαλλοντικές εφαρμογές για τον διαχωρισμό οργανικών ενώσεων από οξινισμένα υδατικά δείγματα. Όλα τα υλικά, τα οποία βασίζονται στην πυριτία, μετά τη διαδικασία της σιλανοποίησης εξακολουθούν να

περιέχουν έστω και ένα μικρό ποσοστό ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου (σιλανόλης), οι οποίες δρουν ως δευτερεύουσες θέσεις αλληλεπίδρασης. Αυτές οι δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι χρήσιμες για τον διαχωρισμό ή την κατακράτηση ισχυρά πολικών ουσιών ή προσμίξεων, αλλά επίσης μπορεί να προκαλέσουν το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της μη αντιστρεπτής δέσμευσης της προσδιοριζόμενης ουσίας.

Άλλα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται στην SPE αντίστροφης φάσης είναι ανθρακούχα υλικά, καθώς και πολυμερή υλικά, τα οποία συνδέονται με το πυριτικό υπόστρωμα. Τα ανθρακούχα υλικά αποτελούνται από μη πορώδη γραφίτη, ο οποίος παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα σε πολικές και μη πολικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε πολικές ή μη πολικές μήτρες. Η επιφάνεια του γραφιτικού άνθρακα αποτελείται από άτομα C, τα οποία είναι διατεταγμένα σε δομές εξαγωνικού δακτυλίου διασυνδεδεμένες μεταξύ τους. Η δομή εξαγωνικού δακτυλίου παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα προς επίπεδες αρωματικές ενώσεις, μόρια με αντίστοιχη δομή δακτυλίου καθώς και προς ανθρακικές αλυσίδες, οι οποίες παρουσιάζουν τάση ταυτόχρονης πρόσδεσης σε πολλά σημεία της επιφάνειας. Η κατακράτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών βασίζεται κυρίως στη δομή τους (μέγεθος και δομή), παρά στην ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δραστικών ομάδων του αναλύτη με την επιφάνεια του προσροφητικού. Η έκλυση στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται με διαλύτες μέσης πολικότητας ή μη πολικούς.

Αντί πυριτίας είναι εξίσου συνηθισμένη η χρήση πολυμερών υλικών ως υποστρωμάτων στήριξης των χαρακτηριστικών ομάδων κατά την SPE αντίστροφης φάσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το συμπολυμερές στυρολίου/διβινυλοβενζολίου, το οποίο χρησιμοποιείται για την κατακράτηση υδρόφοβων ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν μερικώς υδρόφιλο χαρακτήρα και ιδιαίτερα για αρωματικές οργανικές ενώσεις. Τυπική εφαρμογή αποτελεί η κατακράτηση των φαινολών, οι οποίες κατακρατούνται δύσκολα σε χημικώς τροποποιημένη πυριτία C18 σε συνθήκες αντίστροφης φάσης, κυρίως λόγω της μεγαλύτερης διαλυτότητάς τους στο νερό. Από αυτήν παραλαμβάνονται εύκολα με οργανικούς διαλύτες. Η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυτών μέσης πολικότητας ή μη πολικών, επειδή το πολυμερές πληρωτικό υλικό είναι σταθερό σε σχεδόν κάθε σύστημα διαλύτη.

Ο βέλτιστος διαχωρισμός κατά τις εκχυλίσσεις στερεάς φάσης επιτυγχάνεται όταν ληφθούν υπόψιν τα παρακάτω:

1. Η επιλογή του διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την κατακράτηση του αναλύτη στο προσροφητικό και την εν συνεχεία έκλουσή του. Η πολικότητα του διαλύτη καθορίζει την ικανότητά του να εκλούει τον αναλύτη από το προσροφητικό υλικό σε μικρότερο όγκο από αυτόν ενός ασθενέστερου διαλύτη. Σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται η χρήση μίγματος διαλυτών. Πρέπει να σημειωθεί ότι για έναν διαλύτη για SPE κανονικής φάσης η πολικότητα και η ικανότητά του συμπίπτουν. Το ίδιο δεν ισχύει για την περίπτωση SPE αντίστροφης φάσης και γι' αυτό οι διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε προσροφητικά αντίστροφης φάσης πρακτικά περιορίζονται στο ύδωρ, τη μεθανόλη, την ισοπροπυλική αλκοόλη και το ακετονιτρίλιο.
2. Η τιμή pH του δείγματος καθώς και του εκχυλιστικού επηρεάζει αναλόγως τη χρησιμοποιούμενη τεχνική SPE. Τα πληρωτικά υλικά που βασίζονται στην πυριτία (SiO_2) έχουν μια σταθερή περιοχή τιμών pH χρήσης 2 - 7,5. Σε τιμές εκτός αυτής της περιοχής μπορεί να παρατηρηθεί υδρόλυση της συνδεδεμένης φάσης ή διαλυτοποίηση του πυριτικού υποστρώματος. Στην SPE αντίστροφης φάσης, εάν είναι επιθυμητή η κατακράτηση του αναλύτη, τότε το pH του δείγματος και του διαλύτη εξισορρόπησης πρέπει να ρυθμιστούν για τη βέλτιστη κατακράτηση. Εάν ο αναλύτης είναι όξινη ή βασική ένωση, το pH ρυθμίζεται έτσι, ώστε αυτή να μην βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή. Η κατακράτηση ουδέτερων ενώσεων δεν επηρεάζεται από την τιμή του pH. Για τα προσροφητικά υλικά, τα οποία χρησιμοποιούνται στην SPE αντίστροφης φάσης, το pH ομοίως πρέπει να ρυθμίζεται για τη βέλτιστη κατακράτηση. Κατά την έκλυση του αναλύτη, η οποία πραγματοποιείται με οργανικό διαλύτη, το pH δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα.
3. Επιπλέον, η ταχύτητα ροής του δείγματος, καθώς και του εκχυλιστικού μέσου μέσω του πληρωτικού υλικού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής, λόγω του ότι απαιτείται καθορισμένος ελάχιστος χρόνος αλληλεπίδρασης αναλύτη και πληρωτικού υλικού (οι ετερογενείς χημικές ισορροπίες δεν αποκαθίστανται ακαριαίως). Συνήθεις ταχύτητες ροής, για την περίπτωση που το πληρωτικό βρίσκεται σε σωλήνα, είναι 3-10 mL/min [35].

ΚΕΦ. 6: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)

Η Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια δημοφιλής αναλυτική τεχνική η οποία έχει προσφέρει πολλά στο χώρο της οργανικής χημικής ανάλυσης, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με την αέρια ή την υγρή χρωματογραφία (GC-MS ή LC-MS). Επιπλέον, βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση ανόργανων ενώσεων, καθώς και σε αναλύσεις επιφάνειας [30].

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στο διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με τη δομή της πρόδρομης ένωσης.

Κύριο πεδίο εφαρμογής της είναι οι επιστήμες ζωής, των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

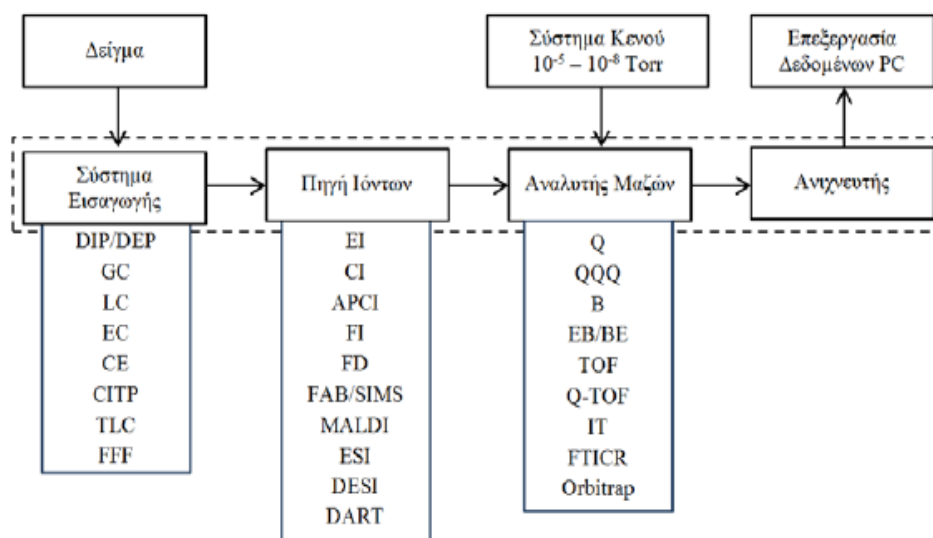
- α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μειγμάτων,
- β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,
- δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

6.1. ΔΙΑΤΑΞΗ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ

Η βασική οργανολογία ενός φασματογράφου μαζών είναι η εξής (Σχήμα 6.1):

- 1) Εισαγωγή του δείγματος
- 2) Παραγωγή ιόντων (σύστημα ιονισμού)
- 3) Επιτάχυνση ιόντων από ηλεκτρικό πεδίο

- 4) Διαχωρισμός ιόντων ανάλογα με τη μάζα τους
- 5) Ανίχνευση ιόντων
- 6) Επεξεργασία δεδομένων με ηλεκτρονικό υπολογιστή



Σχήμα 6.1. Τυπική διάταξη MS [30].

Στη διάταξη, το πρώτο σύστημα αφορά την εισαγωγή του δείγματος, όπου σκοπός είναι η προετοιμασία του δείγματος, ώστε να εισαχθεί στο χώρο ιονισμού σε αέρια κατάσταση και υπό συνθήκες σταθερής ροής. Η εξαέρωση των στερεών ή υγρών δειγμάτων επιτυγχάνεται με θέρμανση υπό κενό. Στις συνδυασμένες μεθόδους, το χρωματογραφικό σύστημα αποτελεί κατά κάποιο τρόπο το σύστημα εισαγωγής του δείγματος.

Στο δεύτερο βήμα, τα μόρια του δείγματος εισάγονται στο σύστημα ιονισμού και θρυμματίζονται σε ιόντα με διάφορες τεχνικές, με συνηθέστερες τις α) ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (Electron impact ionization, EI) με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια σε ηλεκτρικό πεδίο, β) φωτοϊονισμός (Photoionization, PI), με τη βοήθεια φωτός στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, και γ) χημικός ιονισμός (Chemical ionization, CI), μέσω κρούσεως με άλλα ιόντα.

Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας διευκολύνεται από τη λήψη του κατιόντος της χημικής ένωσης (μητρικό ιόν), που προϋποθέτει την επιβιωσιμότητα του συγκεκριμένου κατιόντος. Επιπλέον, σε περιπτώσεις ανάλυσης χημικών ενώσεων με ίδιο μοριακό βάρος ή

ισομερών, η θραυσματοποίηση του αρχικού μητρικού ιόντος σε ιόντα μικρότερης μάζας δίνει πληροφορίες για την δομή των χημικών ενώσεων.

Η θραυσματοποίηση (fragmentation) του μητρικού ιόντος είναι αναπόφευκτη για την πληθώρα των χημικών ενώσεων που ιονίζονται με την απλούστερη και συχνότερα απαντούμενη τεχνική της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων με κινητική ενέργεια στην περιοχή 40-70 eV. Οι ενέργειες ιονισμού των χημικών ενώσεων είναι συνήθως μικρότερες από 15 eV και εξαρτώνται από τη δομή της χημικής ένωσης. Σαν επακόλουθο, το μητρικό ιόν βρίσκεται διεγερμένο έχοντας ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων (>25 eV) και ακολουθεί πορείες μονομοριακής διάσπασης σε μικρότερα σωματίδια (θραύσματα), και αυτά με την σειρά τους σε άλλα μικρότερα, μέχρι είτε ιονισμένα άτομα, ή ιδιαίτερα σταθερά θετικά ιόντα. Οι πορείες διάσπασης εξαρτώνται από τη χημική δομή κάθε ιόντος και μπορούν να είναι είτε α) ισομερίωση ιόντος ή β) διάσπαση ιόντος σε άλλο μικρότερο ιόν και ουδέτερο σωματίδιο.

Οι παράμετροι που καθορίζουν τη συνεισφορά κάθε πορείας είναι: α) σταθερότητα προδρόμου ιόντος και προϊόντων (ισομερές ή θραύσματα) β) αντίστοιχο ενεργειακό φράγμα της θραύσης του ιόντος και γ) εσωτερική ενέργεια του προδρόμου ιόντος.

Η άμεση πρόβλεψη όλων των διαδικασιών θραυσματοποίησης ενός ιόντος δεν είναι απλή, ιδιαίτερα αν το ποσοστό θραυσματοποίησης σε κάθε πορεία είναι το κυρίως ζητούμενο. Μία απλή ποιοτική πρόβλεψη των κυριότερων πορειών είναι δυνατόν να επιτευχθεί με γνώμονα τη χημική δομή του ιόντος καθώς και των προϊόντων θραυσματοποίησης, χρησιμοποιώντας επιχειρήματα γενικής και οργανικής χημείας.

Η σταθερότητα ενός θετικά φορτισμένου ιόντος εξαρτάται από την ευκολία εξάπλωσης του φορτίου σε περισσότερα από ένα άτομα του μορίου (απεντόπιση φορτίου, π.χ. σταθερότητα κατιόντων σε συζυγιακά ή αρωματικά συστήματα) και την ύπαρξη ομάδων που ευνοούν ή απωθούν το θετικό φορτίο (π.χ. άτομα F απωθούν το θετικό φορτίο λόγω έντονης ηλεκτραρνητικότητας, ενώ άτομα N, O ευνοούν την ύπαρξη θετικού φορτίου λόγω των ζευγών ηλεκτρονίων που διαθέτουν σε αρκετά υψηλές ενεργειακές στάθμες - μακριά από τους πυρήνες, εύκολα ιονιζόμενα). Σε περιπτώσεις ύπαρξης θετικού φορτίου σε άτομο που συνδέεται με άλλες ομάδες, η ευκολία απεντοπισμού του θετικού φορτίου στις ομάδες μέσω υπερσυζυγιακού φαινομένου (π.χ. σταθερότητες καρβοκατιόντων $(\text{CH}_3)_3\text{C}^+ > (\text{CH}_3)_2\text{CH}^+ > \text{CH}_3\text{CH}_2^+$) είναι σταθεροποιός παράγοντας του κατιόντος και οδηγεί είτε σε εκλεκτική διάσπαση δίνοντας το σταθερότερο κατιόν ή οδηγεί σε ισομερίωση σε σταθερότερο κατιόν.

Η διάσπαση ενός κατιόντος με παραγωγή μικρού σταθερού ουδετέρου μορίου (π.χ. H₂O, CO₂, CO, HCN) ευνοείται λόγω συνολικής μείωσης της ενέργειας του συστήματος με την αποβολή του σταθερού μορίου.

Υπάρχουν διάφορα είδη αναλυτών μαζών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2. Καθένας από αυτούς έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και επιλέγεται βάσει αυτών και η ανάλογη εφαρμογή.

Τεχνική Ιονισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτής Μαζών	Τάξεις ενώσεων
Ιονισμός ηλεκτρονίων	M ⁺ , θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 datlon
MALDI	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	TOF, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Έως 10 ⁶ datlon
Electrospray (DESI, EESI)	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻ ιόντα προσθήκης π.χ. [M+NH ₄] ⁺	Q, TOF, IT, FTICR, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, πρωτεΐνες <200.000 datlon
APCI	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	Q, TOF, IT	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 datlon

Σχήμα 6.2. Διάφοροι αναλυτές μαζών ανάλογα με την τεχνική ιονισμού [30].

Ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z, να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιονισμού. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του αναλυτή μάζας είναι η διαχωριστική του ικανότητα (Resolution, R), η οποία δίνεται από τη σχέση: $R = m/\Delta m$,

όπου: Δm η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και m η μάζα της πρώτης κορυφής.

Δύο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν το ύψος της βασικής γραμμής μεταξύ τους είναι μικρότερο του 10% του ύψους τους. Επομένως, ένας φασματογράφος μαζών με διαχωριστική ικανότητα 1.000 μπορεί να διαχωρίσει το ιόν με τιμή m/z 100.1 από το 100.2 ή το ιόν με τιμή m/z 1001 από το 1000. Η διαχωριστική ικανότητα ενός φασματογράφου μαζών κατηγοριοποιεί τα όργανα σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα π.χ. R=300.000 και η υψηλή ευαισθησία δεν μπορούν να επιτευχθούν ταυτόχρονα. Για τον λόγο αυτό, σε όργανα πολύ υψηλής διαχωριστικής ικανότητας επιλέγεται συχνά από τον αναλυτή η λειτουργία σε χαμηλότερη διαχωριστική ικανότητα π.χ. R=60.000, όταν απαιτείται υψηλή ευαισθησία [30].

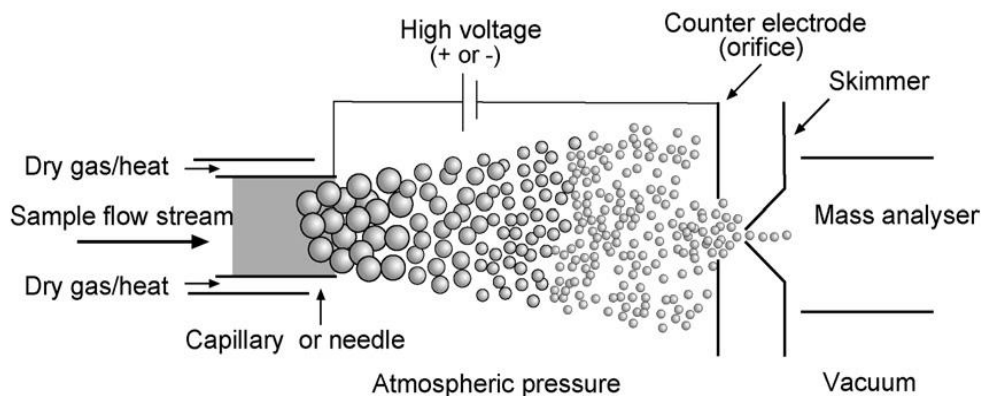
6.2. ΙΟΝΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ

Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray, ESI) αποτέλεσε μια τόσο σημαντική αλλαγή στη βιολογική ανάλυση, που ο John B. Fenn μοιράστηκε το βραβείο Νόμπελ Χημείας του 2002 για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού και ανάλυσης δομών βιολογικών μακρομορίων. Η ιδέα του ηλεκτροψεκασμού βασίστηκε στη βιομηχανική διεργασία μιας υγροσεροσόλης που παράγεται με ηλεκτροστατική φόρτιση για τον ψεκασμό αυτοκινήτων και μετάλλων. Αυτή η τεχνική προϋπήρχε για περίπου έναν αιώνα, αλλά υιοθετήθηκε ως μέθοδος ιονισμού από τους Dole et al. (1968). Ωστόσο, οι Fenn et al. (1989) έδειξαν ότι βρίσκει εφαρμογή στον ιονισμό βιολογικών μακρομορίων για φασματομετρία μάζας [35].

Η διαδικασία του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό γίνεται με εξαναγκασμό ρεύματος υγρού δείγματος μέσω βελόνας ή τριχοειδούς. Εμφανίζεται μια δυναμική διαφορά (είτε θετική είτε αρνητική) μεταξύ της εξόδου του ρεύματος του δείγματος και της εισόδου (ή του στόχου) του φασματόμετρου μάζας. Το υγρό μέσα στη βελόνα είναι ασταθές καθώς προσπαθεί να διατηρεί όλο και περισσότερο φορτίο. Στην άκρη της βελόνας το φορτισμένο σταγονίδιο έχει ένα κωνικό σχήμα που αναφέρεται ως κώνος Taylor. Ο κώνος Taylor παράγει ένα φινίρισμα που, με τη σειρά του, χτυπάει χωριστά σε ένα ρεύμα μικροσκοπικών σταγονιδίων, υψηλών φορτίων.

Τα μικρότερα σταγονίδια απωθούνται από το στόμιο του σωλήνα δειγματοληψίας στο αντίθετο ηλεκτρόδιο στον οπτικό άξονα του οργάνου. Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια διασχίζουν το χώρο μεταξύ της άκρης της βελόνας και του αποκορυφωτή (skimmer), εξατμίζεται ο διαλύτης προκαλώντας τη μείωση του μεγέθους τους. Αυτή η διαδικασία αποικοδόμησης βοηθιέται περαιτέρω από μια θερμή ροή αζώτου γνωστή ως αέριο ξήρανσης, η οποία διέρχεται από το μέτωπο του ιονιστή ρεύματος. Καθώς λαμβάνει χώρα η εξάτμιση του διαλύτη, το σταγονίδιο συρρικνώνεται μέχρι να φτάσει στο σημείο που η επιφανειακή τάση δεν μπορεί να διατηρήσει το φορτίο, γνωστό ως το όριο Rayleigh. Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται έκρηξη και το σταγονίδιο σχάζεται δημιουργώντας μικρότερα σταγονίδια. Ολόκληρη η διεργασία επαναλαμβάνεται κι έτσι τα μη φορτισμένα ιόντα δείγματος, ελεύθερα από διαλύτη, απελευθερώνονται από τα σταγονίδια. Ορισμένα από τα ιόντα διέρχονται μέσω του σωλήνα σε μια ενδιάμεση περιοχή κενού και από εκεί μέσω του ανοίγματος στο αναλυτή του φασματόμετρου μάζας, το οποίο κρατείται υπό υψηλό κενό. Αυτά τα φορτισμένα μόρια αναλύτη μπορούν να φορτωθούν μεμονωμένα ή πολλαπλά.

Η διαδικασία ηλεκτροψεκασμού απεικονίζεται στο Σχήμα 6.3.



Σχήμα 6.3. Διαδικασία ηλεκτροψεκασμού [35].

Αυτή είναι μια «μαλακή» μέθοδος ιονισμού, καθώς η υπολειμματική ενέργεια κατακρατείται από τον αναλύτη κατά τον ιονισμό. Τα μεγάλα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες περιέχουν πολλές βασικές ομάδες που μπορούν να οδηγήσουν σε πολυπρωτονίωση όταν υποβληθούν σε θετικό ιονισμό ηλεκτροψεκασμού. Υπάρχει μια μεταβλητότητα στην πρωτονίωση του αναλύτη, η οποία εξαρτάται από την πρωταρχική ακολουθία, την απόσταση βάσης και τη συμμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων εντός των σταγονιδίων που υφίστανται έκρηξη.

Μια διαδικασία γνωστή ως “deconvolution” (ξετύλιγμα) μπορεί να καθορίσει το μοριακό βάρος ενός μεγάλου πολλαπλά φορτισμένου είδους. Η αποκωδικοποίηση συνεπάγεται τη μετατροπή του πολλαπλά φορτισμένου φάσματος σε ένα χωριστά φορτισμένο φάσμα. Θεωρητικά, αυτή η διαδικασία είναι ευθεία και μπορεί να επιτευχθεί με απλές ταυτόχρονες εξισώσεις, που καλύπτονται επαρκώς από τους Mano και Goto (2003) και Bakhtiarand Tse (2000) στις ανασκοπήσεις τους. Ωστόσο, σε πραγματικές καταστάσεις, τα φάσματα των πολλαπλά φορτισμένων ειδών μπορεί να είναι πολύπλοκα. Τα περισσότερα εμπορικά όργανα της MS διαθέτουν λογισμικό που συμπληρώνει τους αλγορίθμους αποσυγκρότησης, καθιστώντας τη διαδικασία πιο ομαλή [35].

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (MS). Το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο 3-5 kV. Παράλληλα με τον τριχοειδή, διαβιβάζεται αέριο για δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες

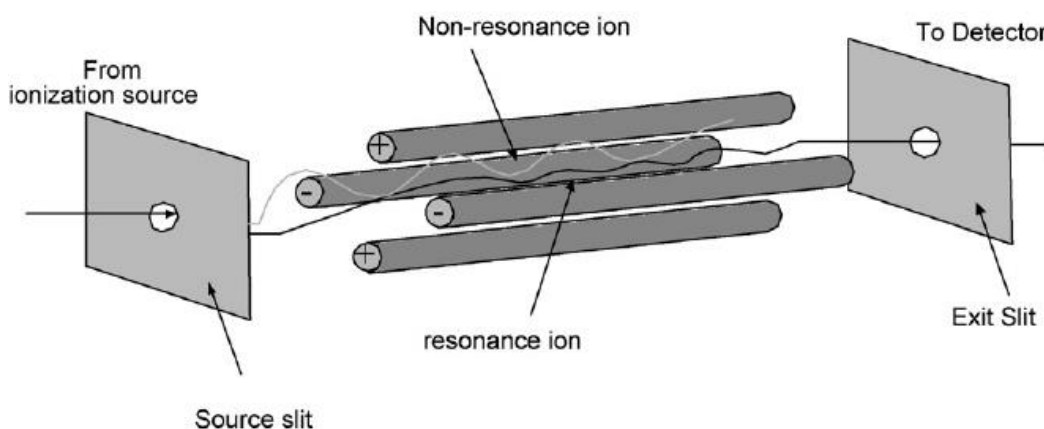
σταγόνες και ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται εξατμηση με ιονισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιονισμού. Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το δυναμικό μπορεί να λαμβάνει ή να μη λαμβάνει χώρα θραύση των μορίων, οπότε το φάσμα μπορεί να διαφέρει πολύ. Η διάταξη επιτρέπει την ανάλυση μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κλπ.). Η ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης πολικότητας έως υψηλής πολικότητας και μοριακά βάρη έως 100.000. Καλύπτει το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής για την ανάλυση βιομορίων καθώς επιτυγχάνει τον ιονισμό πολλών κατηγοριών βιομορίων, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, βιταμίνες, και σχεδόν όλες τις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών (αλκαλοειδή, φαινόλες, τερπενοειδή, γλυκοζίτες κλπ.). Επίσης, στη βιο-φαρμακευτική ανάλυση η χρήση του ESI επικρατεί, γιατί τα περισσότερα φάρμακα εμπίπτουν στις κατηγορίες μορίων τα οποία ιονίζονται αποδοτικότερα με ESI (βιομόρια, πεπτίδια ή και αντισώματα) [30].

6.3. ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ

Σταθμός για την εξέλιξη της φασματοφωτομετρίας αποτελεί η ανάπτυξη των τετραπολικών αναλυτών μάζας από τον Paul και τους συνεργάτες του. Οι τετραπολικοί αναλυτές αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους (πόλους), που είναι συμμετρικά τοποθετημένες ως προς τη δέσμη ιόντων. Εφαρμόζεται ένα εναλλασσόμενο δυναμικό (AC) στις δυο διαγώνια τοποθετημένες ράβδους και ένα συνεχές δυναμικό (DC) στις άλλες δύο.

Ένα δυναμικό ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται με την εφαρμογή μίας ταυτόχρονης ραδιοσυχνότητας (RF) η οποία είναι 180° από τη φάση στα αντίθετα ζεύγη ράβδων (αυτό σημαίνει ότι η μορφή ενός ημιτονοειδούς κύματος είναι το ανεστραμμένο ισοδύναμο του άλλου), κάθε ζεύγος αντίθετων ράβδων επίσης παρέχεται με συνεχές ρεύμα (DC) ίσου μεγέθους αλλά αντίθετες πολικότητες σε σχέση με το έδαφος. Ο ηλεκτρικός «φάκελος» που δημιουργείται στον ανιχνευτή μάζας λειτουργεί ως φίλτρο, επειδή επιτρέπει μόνο ιόντα συγκεκριμένων μαζών («ηχητικά ιόντα») να περάσουν κάτω από το διάκενο μεταξύ των

τεσσάρων ράβδων. Με τον έλεγχο της σχέσης των RF προς τις τάσεις, μπορεί να παραχθεί ένα στενό φίλτρο που επιτρέπει σε ένα ιόν (ένα m/z) να πάρει μια σταθερή τροχιά μεταξύ της ράβδου του ανιχνευτή. Ιόντα με διαφορετικές αναλογίες μάζας προς φόρτιση (μη-συντονισμένα) θα συγκρουστούν με τις ράβδους και θα εξουδετερωθούν. Με την παράκαμψη (αύξηση) των τάσεων DC και RF (Pedder, 2001) [36], σταθερές τροχιές για ιόντα διαφορετικών m/z τιμών περνούν από τον ανιχνευτή (Σχήμα 6.4).



Σχήμα 6.4. Σχηματική παρουσίαση του τετραπολικού φίλτρου μάζας [35].

Όλη αυτή η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη και μετά από λιγότερο από το 1/60 του δευτερολέπτου, ιόντα που υπερβαίνουν το ευρύ m/z μπορούν να αναλυθούν ή να σαρωθούν. Το εύρος μάζας του αναλυτή καθορίζεται από το μέγεθος των ράβδων, την απόσταση μεταξύ των ράβδων και τη συχνότητα του ραδιοκυμάτων, δημιουργώντας ένα ανώτερο όριο μεταξύ m/z 2000 και 4000 (ανάλογα με τον κατασκευαστή του οργάνου). Εάν απαιτείται αύξηση της ευαισθησίας (χαμηλότερο όριο ανίχνευσης), τα επιλεγμένα ιόντα μπορούν να καταμετρηθούν σε όλο το μήκος του ανιχνευτή για να ενσωματώσουν σήματα σχετικών ιόντων για χρονικό διάστημα κατά μήκος.

Τα τετραπολικά φασματομέτρα μάζας υπερέχουν πλέον από τους τριπλούς τετράπολους αναλυτές μάζας σε δυνατότητες. Το δεύτερο τετράπολο χρησιμοποιείται ως κύτταρο σύγκρουσης για να θραύσει τα πρόδρομα ιόντα που καταλύονται από το πρώτο τετράπολο (Q1) σε ιόντα προϊόντος που πρόκειται να φιλτραριστούν από το τρίτο τετράπολο (Q3). Η σάρωση όλων των ιόντων αποδίδει ένα πλήρες φάσμα σάρωσης που προσδίδει

συγκεκριμένη ιδιότητα “fingerprint” του αναλύτη που μπορεί να έχει τεράστια αξία π.χ. στα MS/MS πρωτεϊνών.

Άλλοι αναλυτές μαζών είναι η «παγίδα ιόντων» (ion trap) που βασίζεται στην αρχή λειτουργίας του τετραπολικού φίλτρου μάζας, χωρίς όμως τη χρήση DC δυναμικού. Επίσης, ο ανιχνευτής Fourier, ο οποίος στηρίζεται στη τεχνική του ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Το FT-MS έχει περιορισμένη χρήση, λόγω του υψηλού κόστους και της πολυπλοκότητας της κατασκευής του, αλλά πολύ μεγάλη ακρίβεια και υψηλή διακριτική ικανότητα.

Οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών έχουν σχετικά μικρή διακριτική ικανότητα, είναι όμως πολύ συμπαγείς, έχουν μικρό κόστος κατασκευής και το μεγαλύτερο πλεονέκτημά τους είναι ότι επιτρέπουν τη λήψη φάσματος σε χιλιοστά του δευτερολέπτου. Αυτή είναι και η ιδιότητα τους που τους καθιστά ιδανικούς ανιχνευτές σε χρωματογραφικά συστήματα (GS-MS ή LC-MS).

6.4. ΣΥΖΕΥΞΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ Ή ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον στην ενόργανη ανάλυση παρουσιάζουν οι ονομαζόμενες συνδυαστικές τεχνικές (hyphenated techniques). Οι τεχνικές αυτές αποτελούν συνδυασμό δύο ή περισσότερων αναλυτικών τεχνικών, που πολλές φορές δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Έτσι παρέχονται δύο ή περισσότερες σειρές πληροφοριών για το ίδιο δείγμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συνδυαστικές τεχνικές με φασματογράφο μάζας.

6.4.1. Διασύνδεση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC-MS)

Με μια πρώτη ματιά, ο συνδυασμός των δύο αυτών τεχνικών ανάλυσης παρουσιάζει προβλήματα, λόγω των διαφορετικών απαιτήσεών τους. Το MS απαιτεί υψηλό κενό, ενώ το GC απαιτεί συνεχή ροή αερίου υπό πίεση. Ευτυχώς, τα πράγματα απλοποιήθηκαν με την καθολική χρήση των τριχοειδών στηλών στην GC και τη μείωση της ροής του φέροντος αερίου από 30-80 ml/min σε 1 ml/min. Έτσι, είναι δυνατή η απευθείας σύνδεση του MS με την έξοδο της τριχοειδούς στήλης του αεροχρωματογράφου. Βέβαια, είναι σχεδόν αδύνατον να καταγραφεί όλο το φάσμα θραυσμάτων κατά την έκλυση μιας ουσίας από την άλλη.

Τα τετραπολικά φίλτρα και οι παγίδες ιόντων έχουν την απαιτούμενη ταχύτητα, όμως η διαχωριστική τους ικανότητα είναι σχετικά μικρή. Τα συστήματα αυτά GC-Q ή GC-IT έχουν αριστοποιηθεί και χαρακτηρίζονται ως αεροχρωματογράφοι με ανιχνευτές MSD. Η βάση στις αναλύσεις αυτές είναι η ρύθμιση του MS σε συγκεκριμένη μάζα που αντιστοιχεί στο ιόν της ουσίας που διερευνάται και κατόπιν η ταυτοποίηση αυτής σε κλάσματα έκλυσης από τη χρωματογραφική στήλη. Για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλών ουσιών χρησιμοποιούνται τα GC-FT, λόγω της εξαιρετικά υψηλής διαχωριστικής ικανότητας του μετασχηματισμού Fourier (FT).

6.4.2. Διασύνδεση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS)

Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τις ικανότητες φυσικού διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας (ή HPLC) με τις δυνατότητες ανάλυσης μάζας της φασματομετρίας μάζας (MS). Η σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με σύστημα MS είναι δημοφιλής στη χημική ανάλυση, επειδή οι ατομικές δυνατότητες κάθε τεχνικής ενισχύονται συνεργιστικά. Ενώ η υγρή χρωματογραφία διαχωρίζει μείγματα με πολλαπλά συστατικά, η φασματομετρία μάζας παρέχει δομική ταυτότητα των επιμέρους συστατικών με υψηλή μοριακότητα και ευαισθησία ανίχνευσης. Αυτή η διαδοχική τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση βιοχημικών, οργανικών και ανόργανων ενώσεων που βρίσκονται συνήθως σε σύνθετα δείγματα περιβαλλοντικής και βιολογικής προέλευσης. Ως εκ τούτου, η LC-MS μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα τομέων όπως η βιοτεχνολογία, η παρακολούθηση του περιβάλλοντος, η

επεξεργασία τροφίμων και οι φαρμακευτικές, αγροχημικές και καλλυντικές βιομηχανίες [36,37].

Παρ' όλα αυτά ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες σε σχέση με τη διασύνδεση GC-MS. Το βασικό πρόβλημα είναι ότι οι ποσότητες των ουσιών που εξέρχονται από την HPLC είναι πολλαπλάσιες από αυτές που μπορεί να δεχτεί το MS. Η διεπαφή είναι απαραίτητη επειδή οι συσκευές LC και MS είναι ουσιαστικά ασύμβατες. Ενώ η κινητή φάση σε ένα σύστημα LC είναι ένα υπό πίεση υγρό, οι αναλυτές MS λειτουργούν συνήθως υπό κενό ($\sim 10^{-6}$ Torr). Συνεπώς, δεν είναι δυνατόν να αντληθεί απευθείας το έκλουσμα από τη στήλη LC στην πηγή MS. Συνολικά, η διεπαφή είναι ένα μηχανικά απλό μέρος του συστήματος LC-MS που μεταφέρει τη μέγιστη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας, αφαιρεί ένα σημαντικό τμήμα της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται στην LC και διατηρεί τη χημική ταυτότητα των προϊόντων χρωματογραφίας (χημικά αδρανή). Ως απαίτηση, η διεπαφή δεν πρέπει να παρεμβάλλεται στις συνθήκες ιονίζουσας αποτελεσματικότητας και κενού του συστήματος MS [37]. Επίσης, η εξάτμιση μη πτητικών θερμικά ευαίσθητων ουσιών είναι ένα άλλο πρόβλημα.

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα διασύνδεσης. Μια κατηγορία τέτοιων διασυνδέσεων, στηρίζει τη λειτουργία της στην απομάκρυνση του φέροντος διαλύτη, πριν την εισαγωγή των προϊόντων έκλουσης στο MS. Αυτό μπορεί να γίνει με εκνέφωση υπό κενό ή με ιμάντα που μεταφέρει το δείγμα από την έξοδο της χρωματογραφικής στήλης στην πηγή ιονισμού του MS. Μια άλλη κατηγορία τεχνικής σύνδεσης είναι η άμεση εισαγωγή του εκλουόμενου κλάσματος στο MS μέσω τριχοειδούς θερμαινόμενου σωλήνα. Τέλος, η χρήση μικροστηλών HPLC, οι οποίες έχουν σχετικά χαμηλή ροή φέροντος διαλύτη, δίνουν κάποια λύση στο θέμα της απευθείας σύνδεσης της χρωματογραφικής στήλης με το MS [37].

6.5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η παρακολούθηση των ιόντων στη Φασματομετρία Μάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους σάρωσης:

- ❖ την πλήρη σάρωση (Full Scan),
- ❖ την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring, SIM),
- ❖ την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM ή Multiple Reaction Monitoring, MRM),
- ❖ τη σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning) και
- ❖ τη σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning).

Οι δυο κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη Φασματομετρία Μάζας είναι: η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan) και η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM).

6.5.1. Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan)

Στην τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan) λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Η πλήρης σάρωση βοηθάει στον προσδιορισμό της δομής/ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης με προσδιορισμό του μοριακού της βάρους ή σύγκριση με πρότυπα φάσματα. Αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης, καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων τα οποία φθάνουν στον ανιχνευτή. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται με μείωση του εύρους σάρωσης ή με αύξηση του χρόνου σάρωσης. Στην πρώτη περίπτωση όμως, είναι δυνατόν να χαθούν πληροφορίες [30].

6.5.2. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM)

Εάν η ανάλυση αποσκοπεί στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα, χρησιμοποιείται η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM). Για ένα συγκεκριμένο συστατικό επιλέγονται κάποιο ή κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματός του και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνον αυτές. Η τεχνική αυτή προσφέρει μεγάλη ευαισθησία, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα, καθώς οποιαδήποτε ένωση δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συμπεριοριστεί [30].

ΚΕΦ. 7: ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου (internal standard, IS) βασίζεται στην προσθήκη γνωστής ποσότητας πρότυπης ουσίας στο υπό ανάλυση δείγμα. Η πρότυπη αυτή ουσία πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Να διαχωρίζεται πλήρως από τα συστατικά του μείγματος που αναλύουμε, αλλά και να εκλούεται σε παραπλήσιους χρόνους με αυτά.
- Το ύψος και το πλάτος της κορυφής της πρότυπης ουσίας να είναι παραπλήσιο της ουσίας που προσδιορίζουμε.
- Πρότυπο και αναλυόμενο δείγμα να είναι της ίδιας χημικής φύσης, χωρίς όμως το αρχικό δείγμα να περιέχει την πρότυπη ουσία.

Ορισμένη ποσότητα προτύπου προστίθεται σε συνθετικά μείγματα που περιέχουν την προς ανάλυση ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η καμπύλη βαθμονόμησης, μεταξύ της ποσότητας της ουσίας και του λόγου των κορυφών, προκύπτει από τη σχέση:

$$m_X / m_S = K_{XS} (A_X / A_S), \text{ όπου:}$$

m_X είναι η μάζα (ή συγκέντρωση) της ουσίας X,

m_S είναι η μάζα (ή συγκέντρωση) της πρότυπης ουσίας S,

K_{XS} ο σχετικός συντελεστής απόκρισης της ουσίας X σε σχέση με την πρότυπη S, ο οποίος δίνεται από τη σχέση: $K_{XS} = (K_X/K_S)$.

Η ανάλυση του αγνώστου δείγματος επιτυγχάνεται με προσθήκη της ίδιας ποσότητας εσωτερικής πρότυπης ουσίας (με αυτή που προστίθεται στα συνθετικά μείγματα) σε αυτό και τον υπολογισμό του λόγου A_X/A_S .

Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου εφαρμόζεται στην περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της μετρητικής διατάξεως από μέτρηση σε μέτρηση και σε μη απόλυτα

επαναλαμβανόμενη επίδραση του μητρικού υλικού του δείγματος σε διαδικασίες της μεθόδου, όπως την εκχύλιση του αναλύτη και άλλες κατεργασίες του δείγματος. Η φιλοσοφία είναι ότι οι σχετικές αυξομειώσεις της ευαισθησίας της μεθόδου σε συστατικό Α του δείγματος θα είναι ίδιες και για το συστατικό Β.

Εφαρμόζεται κυρίως στις χρωματογραφικές τεχνικές (GLC, HPLC) και στις ηλεκτροχημικές τεχνικές (πολαρογραφία, αναδιαλυτική βολταμετρία), στις οποίες είναι δυνατή η σύγχρονη μέτρηση σημάτων περισσότερων του ενός συστατικού. Συνδυάζεται κυρίως με τη μέθοδο ενός ή πολλαπλών εξωτερικών προτύπων.

Στα πρότυπα και στα άγνωστα προστίθεται αυστηρά ίδια συγκέντρωση μιας ουσίας (εσωτερικό πρότυπο, internal standard, I.S.) που δεν υπάρχει στο δείγμα, με την ίδια αναλυτική συμπεριφορά με τον αναλύτη. Η συγκέντρωσή του επιλέγεται έτσι, ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα. Μετρούνται τα σήματα (το σήμα της άγνωστης ουσίας και το σήμα του προτύπου) και ο λόγος αυτών χρησιμοποιείται ως το «διορθωμένο σήμα» του αγνώστου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ή/και τον υπολογισμό του αγνώστου [17,37].

Στη μέθοδο αυτή τα εμβαδά (ή τα ύψη) των ενώσεων που θέλουμε να προσδιορίσουμε σε ένα άγνωστο δείγμα κανονικοποιούνται ως προς το εμβαδό (ή το ύψος) μιας ένωσης, που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο και η οποία εισάγεται ακριβώς σε ίση ποσότητα τόσο στο άγνωστο δείγμα, όσο και σε ένα πρότυπο διάλυμα που περιέχει τις ενώσεις στόχους.

Αναγκαία συνθήκη είναι ότι το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο πρέπει να παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τον αναλύτη και η μέθοδος να αποκρίνεται κατά τον ίδιο τρόπο με τον αναλύτη, αλλά να μπορεί να μετράται εκλεκτικά, ενώ στην περίπτωση ύπαρξης σταδίου κατεργασίας του δείγματος (π.χ. εκχύλισης), το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να δείχνει συμπεριφορά παρόμοια με τον αναλύτη. Ένας από τους κύριους ρόλους του εσωτερικού προτύπου, είναι να διορθωθούν οι αποκλίσεις στην ανάκτηση του αναλύτη κατά τη διάρκεια προεργασίας του δείγματος. Το εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει ως εκ τούτου να έχει χημικές ιδιότητες (συντελεστές εκχύλισης, pK_a , κλπ.) παρόμοιες με αυτές της προς ανάλυση ουσίας.

Όταν οι αναλύόμενες ουσίες είναι περισσότερες από μία, τότε είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθούν περισσότερα από ένα εσωτερικά πρότυπα. Η κορυφή-σήμα του I.S. πρέπει

να προσδιοριστεί πριν την ανάλυση του αγνώστου δείγματος, ώστε να μην διακυβεύονται οι κορυφές που αφορούν το αναλυόμενο δείγμα.

Η εξαίρεση είναι όταν εφαρμόζεται η μέθοδος I.S. στην Υγρή Χρωματογραφία Μαζών (LC-MS), όπου μια σταθερή (και σε μερικές περιπτώσεις επισημασμένη) ένωση χρησιμοποιείται συχνά ως το I.S. Τα πρότυπα αυτά συνεκλούνται με τον αναλύτη, δεν υπόκεινται σε αλλαγές κατά τον διαχωρισμό ή την αντίχρεωση. Έτσι, τα πρότυπα που συνεκλούνται, μιμούνται την αναλυόμενη ουσία, ενώ αυτά που δεν συνεκλούνται όχι.

Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μίας γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελεύθερης κορτιζόλης (υδροκορτιζόνης) σε πλάσμα αίματος 87 ασθενών (με κίρρωση του ήπατος, Ηπατίτιδα Β, Ηπατίτιδα Γ κ.ά.), με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS).

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 8: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΥΛΙΚΑ

8.1. ΟΡΓΑΝΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας (HPLC-MS). Πιο αναλυτικά, η διάταξη του οργανολογικού εξοπλισμού αποτελούταν από:

- Αντλία.
- Θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη.
- Αναλυτική στήλη: C₁₈, (4,6mm × 25cm), 5μm, Beckman Coulter, Inc., U.S.A. (Σχήμα 8.1)



Σχήμα 8.1. Χρωματογραφική στήλη [75].

- Σύστημα LCMS-2020 (Shimadzu Corporation, U.S.A.). (Σχήμα 8.2)

Χαρακτηριστικά:

Πηγή ιόντων: Ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray)

Αναλυτής μαζών: Τετραπολικός αναλυτής (απλό τετράπολο, Single Quadrupole)

- Ηλεκτρονικό υπολογιστή με λογισμικό ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων LCsolutions. (Σχήμα 8.2)



Σχήμα 8.2. Σύστημα LCMS-2020 και ηλεκτρονικός υπολογιστής [76].

- Σύστημα κενού, αντλία αζώτου.

8.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΣΚΕΥΗ

Για την εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction):

- Συσκευή κενού της SPE: Supelco (Sigma-Aldrich Corporation, U.S.A.) (Σχήμα 8.3)
- Μικροστήλες (στηλάκια) Bond Elut με C18 πληρωτικό υλικό των 500mg, 6mL (Agilent Technologies, Inc., U.S.A.) (Σχήμα 8.4)



Σχήμα 8.3. Συσκευή SPE Supelco [77].



Σχήμα 8.4. Μικροστήλες Bond Elut με C18 [78].

Για την παρασκευή διαλυμάτων και προκατεργασία δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Ηλεκτρονική φυγόκεντρος
- Αυτόματη πιπέτα (50-1000μL)
- Πιπέτες Pasteur
- Αναλυτικός ζυγός
- Συσκευή υπερήχων
- Συσκευή ομογενοποίησης (Vortex)

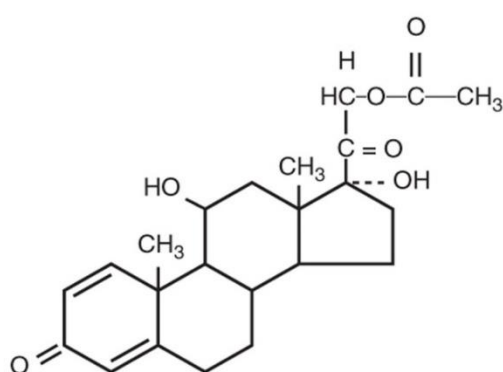
8.3. ΥΛΙΚΑ

- Νερό χρωματογραφίας (Panreac, Barcelona, Spain)
- Ακετονιτρίλιο (Panreac, Barcelona, Spain)
- Μεθανόλη (Panreac, Barcelona, Spain)
- Υδροχλωρικό οξύ (Scharlau, 0,1N)
- Οξική πρεδνιζολόνη - Prednisolone 21-acetate $\geq 97\%$ (Sigma Aldrich)
- Υδροκορτιζόνη - Hydrocortisone $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich)

8.4. ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΠΡΟΤΥΠΟΣ ΟΥΣΙΑ

Στην παρούσα έρευνα επιλέχθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου, διότι εξασφαλίζει μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Για την εφαρμογή της

μεθόδου υπολογίζεται ο λόγος της τιμής του εμβαδού της κορυφής που δίνει ο ολοκληρωτής για το προσδιοριζόμενο συστατικό προς την τιμή του εμβαδού της κορυφής του εσωτερικού πρότυπου. Η επιλογή της κατάλληλης ουσίας, που θα χρησιμοποιηθεί σαν εσωτερικό πρότυπο, είναι ιδιαίτερα σημαντική αφού έμμεσα θα καθορίσει το ποσοστό ανάκτησης της κορτιζόλης. Έτσι, μια από τις βασικές προϋποθέσεις που θα πρέπει να πληρεί η εσωτερική πρότυπος ουσία είναι να έχει ανάλογη χημική δομή και χρωματογραφική συμπεριφορά με την προσδιοριζόμενη ουσία. Ως τέτοια, επιλέχθηκε η οξική πρεδνιζολόνη (prednisolone acetate), η χημική δομή της οποίας φαίνεται στο Σχήμα 8.5.



Σχήμα 8.5. Χημική δομή της οξικής πρεδνιζολόνης.

Η επιλογή της οξικής πρεδνιζολόνης έγινε διότι:

- i. αναμειγνύεται πλήρως με τα συστατικά του αναλυόμενου δείγματος,
- ii. δίνει μία μόνο κορυφή,
- iii. δεν βρίσκεται στα πραγματικά δείγματα,
- iv. είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης,
- v. δεν εκλούεται σε χρόνο πολύ διαφορετικό από αυτόν της υδροκορτιζόνης.

Η οξική πρεδνιζολόνη ανήκει στην κατηγορία των κορτικοστεροειδών ορμονών και παρουσιάζει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες με την υδροκορτιζόνη. Επίσης, παρουσιάζει παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά κι αυτό την καθιστά κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο. Η οξική πρεδνιζολόνη προστίθεται στο αρχικό στάδιο σε όλα τα δείγματα, γνωστά και άγνωστα, σε σταθερή συγκέντρωση.

ΚΕΦ. 9: ΑΝΑΠΤΥΞΗ & ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

9.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι πολύ σημαντική για την επίτευξη ενός όσο το δυνατόν καλύτερου διαχωρισμού των ενώσεων, με το βέλτιστο σχήμα και ένταση των κορυφών τους. Δοκιμάστηκαν διάφορες αναλυτικές στήλες και τελικά έγινε η επιλογή στήλης C₁₈ (Beckman Coulter, Inc., U.S.A.) (4,6mm × 25cm) 5μm, η οποία έδωσε καλύτερο διαχωρισμό και πιο οξείες κορυφές. Ανάλογες δοκιμές έγιναν για την επιλογή της κινητής φάσης και σαν καταλληλότερη θεωρήθηκε το μείγμα 50% νερό : 50% ακετονιτρίλιο v/v. Η έκλουση ήταν ισοκρατική καθώς τόσο η υψηλή καθαρότητα των δειγμάτων όσο και η σχετικά υψηλή συμμετοχή του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση δεν επιβάρυνε τη στήλη.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 9.1, συνέβαλλαν στην εμφάνιση οξείων και συμμετρικών κορυφών, στην καλύτερη σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος και την αποφυγή σφαλμάτων. Η πίεση κυμάνθηκε μέσα σε αποδεκτές για το σύστημα τιμές. Ο χρόνος έκλουσης της υδροκορτιζόνης ήταν ~ 7 min και της οξικής πρεδνιζολόνης ~ 10,5 min αντίστοιχα ενώ ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος 13min.

Πίνακας 9.1. Χρωματογραφικές συνθήκες.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ
Κινητή φάση (mobile phase)	Ακετονιτρίλιο/νερό 50:50
Συνολική ροή (Total flow)	0,5 mL/min
Όγκος έγχυσης (Injection volume)	50 μL
Πίεση (Pressure)	800-1200 psi
Θερμοκρασία (Temperature)	δωματίου

Γενικότερα, οι χρωματογραφικές τεχνικές εκτός από τη διαχωριστική τους ικανότητα προσφέρονται και για ποσοτική ανάλυση και στο λόγο αυτόν οφείλεται και η μεγάλη εξάπλωσή τους. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη σύγκριση είτε του ύψους είτε του

εμβαδού των κορυφών των συστατικών του δείγματος, με το ύψος ή το εμβαδόν των κορυφών των πρότυπων ουσιών. Για να μετρηθεί η συγκέντρωση της ουσίας που εμφανίζει κορυφή σε ένα χρωματογράφημα, απαιτούνται: μια πρότυπη ουσία, δηλαδή μια γνωστή ποσότητα ή συγκέντρωση του συστατικού του οποίου τη συγκέντρωση θέλουμε να μετρήσουμε, και ένας αξιόπιστος τρόπος υπολογισμού του εμβαδού ή του ύψους. Σε αυτήν την εργασία ολοκληρώθηκαν οι κορυφές της υδροκορτιζόνης (άγνωστη ουσία) και της οξικής πρεδνιζολόνης (εσωτερικό πρότυπο) με το λογισμικό LCsolutions, με αποτέλεσμα τον υπολογισμό του εμβαδού κάθε ουσίας ($Area_{\text{cortisol}}$ και $Area_{\text{i.s.}}$ αντίστοιχα), καθώς και του λόγου των εμβαδών των δύο ουσιών ($Area_{\text{cortisol}} / Area_{\text{i.s.}}$).

9.1.1. Διερεύνηση διαφορετικών κινητών φάσεων

Κατά το στάδιο ανάπτυξης και διερεύνησης της μεθόδου, μελετήθηκε η ένταση και η ποιότητα του σήματος με διαφορετικές κινητές φάσεις.

Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν 4 κινητές φάσεις:

- 1) ACN / H₂O (50:50 v/v)
- 2) ACN / 0,1% formic acid (50:50 v/v)
- 3) MeOH / H₂O (70:30 v/v)
- 4) MeOH / 0,1% formic acid (70:30 v/v)

Συγκρίνοντας τις φάσεις 1 και 2 μεταξύ τους, το σήμα ήταν περίπου το ίδιο, με μια μικρή απώλεια στην έντασή του σήματος στην περίπτωση του φορμικού οξέος. Το ίδιο ισχύει και για τη σύγκριση των φάσεων 3 και 4.

Στη σύγκριση των φάσεων που περιείχαν ακετονιτρίλιο έναντι αυτών με μεθανόλη, διαπιστώθηκε ότι οι φάσεις 1 και 2 έδιναν μεγαλύτερο σήμα και πολύ καλύτερες κορυφές από ό,τι οι φάσεις 3 και 4. Κατόπιν αυτών, αποφασίστηκε η κινητή φάση της μεθόδου να είναι: **ACN / H₂O (50:50 v/v)**.

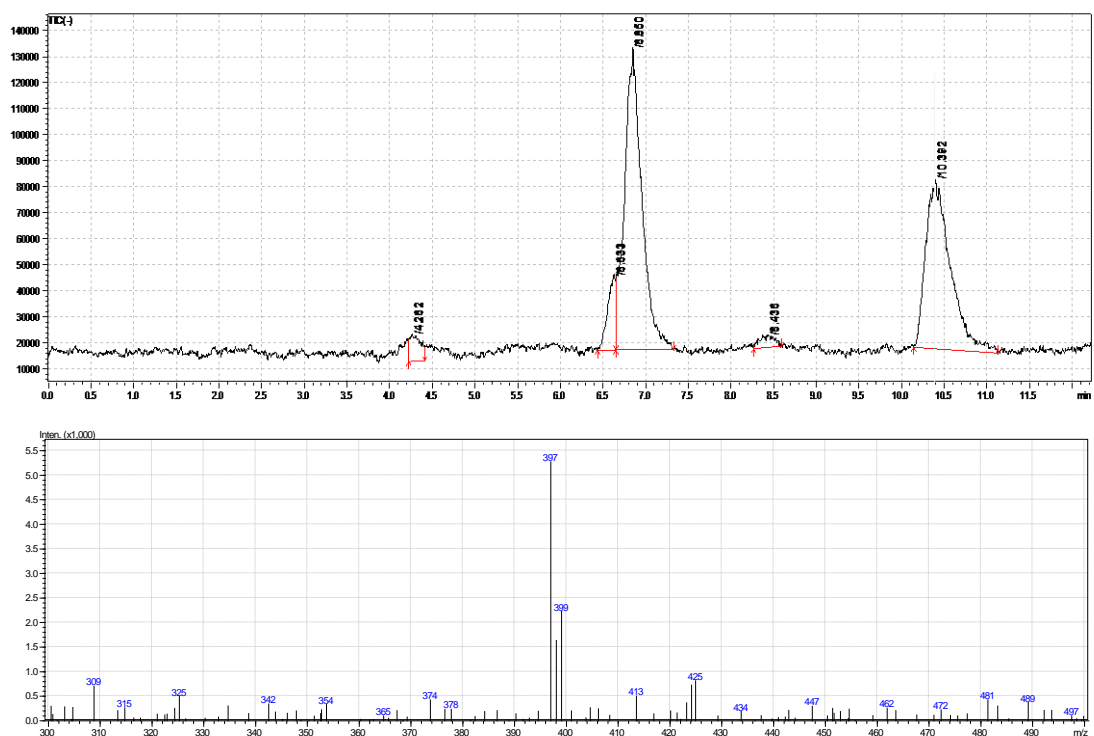
9.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ

Ως πηγή ιόντων επιλέχθηκε ο ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση έχει ως αναλυτή μαζών ένα απλό τετράπολο (Single Quadrupole). Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2. Συνθήκες MS.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ	ΡΥΘΜΙΣΗ	ΜΟΝΑΔΕΣ
Nebulizing Gas	1,5	1,5	L/min
Drying Gas Flow	15	15	L/min
DL Temperature	250	250	°C
Heat Block Temperature	200	200	°C
Detector Voltage		1,00	kV
PG Vacuum	1,5e+0,02		Pa
IG Vacuum	6,8e-0,04		Pa

Αρχικά, με τη βοήθεια της μεθόδου SCAN εντοπίστηκαν τα κύρια μοριακά ιόντα τόσο στην positive όσο και στη negative mode και για τις δύο δραστικές. Βάσει της μοριακής της δομής, η υδροκορτιζόνη δεν έχει την τάση να ιονίζεται σε τιμές pH 2-7 και συνεπώς υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες το σήμα της ουσίας στον ανιχνευτή να οφείλεται σε ιόντα προσθήκης. Πράγματι, ενώ το μοριακό βάρος της υδροκορτιζόνης είναι 362,46 g/mol η δραστική δίνει μεγαλύτερη ένταση σήματος σε αρνητικό ιονισμό $m/z = 397$, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 9.1. Το κύριο μοριακό ιόν της υδροκορτιζόνης λογικά περιέχει και ένα ιόν προσθήκης το Cl^- (ατομικό βάρος χλωρίου = 35,45 g/mol) για αυτό και ανιχνεύεται με τη μέθοδο αρνητικού ιόντος (negative mode). Αντίστοιχα, το μοριακό βάρος της οξικής περδνιζολόνης είναι 402,48 g/mol ($m/z = 402$), ενώ το κύριο ιόν της είναι το $m/z = 437$ (negative ion). Όπως ακριβώς και στην περίπτωση της υδροκορτιζόνης, το κύριο μοριακό ιόν της οξικής περδνιζολόνης περιέχει κι αυτό ένα ιόν Cl^- .



Σχήμα 9.1. Χρωματογράφημα από ανάλυση ενός πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης και οξικής πρεδνιζολόνης με τη μέθοδο SCAN. Παρατηρείται ότι η κορτιζόλη δίνει μεγαλύτερη ένταση σήματος σε αρνητικό ιονισμό $m/z = 397$.

9.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΛΥΣΗΣ

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων υδροκορτιζόνης και οξικής πρεδνιζολόνης, πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία. Ως παράδειγμα χρησιμοποιείται ο Πίνακας 1 από το Παράρτημα (Πίνακας 1. Batch file 3).

Αρχικά, σε ογκομετρικές φιάλες των 25mL ζυγίστηκαν επακριβώς 2,7mg κορτιζόλης και 2,5mg οξικής πρεδνιζολόνης, και αφού διαλυτοποιήθηκαν οι δραστικές με τη βοήθεια 5mL μεθανόλης, οι φιάλες συμπληρώθηκαν μέχρι τελικού όγκου με μεθανόλη (πυκνά διαλύματα δραστικών).

Στη συνέχεια, έγινε αραίωση του πυκνού διαλύματος της υδροκορτιζόνης με μεταφορά 1mL από την αρχική φιάλη σε νέα ογκομετρική φιάλη των 25mL (1^η αραίωση), με σιφόνιο

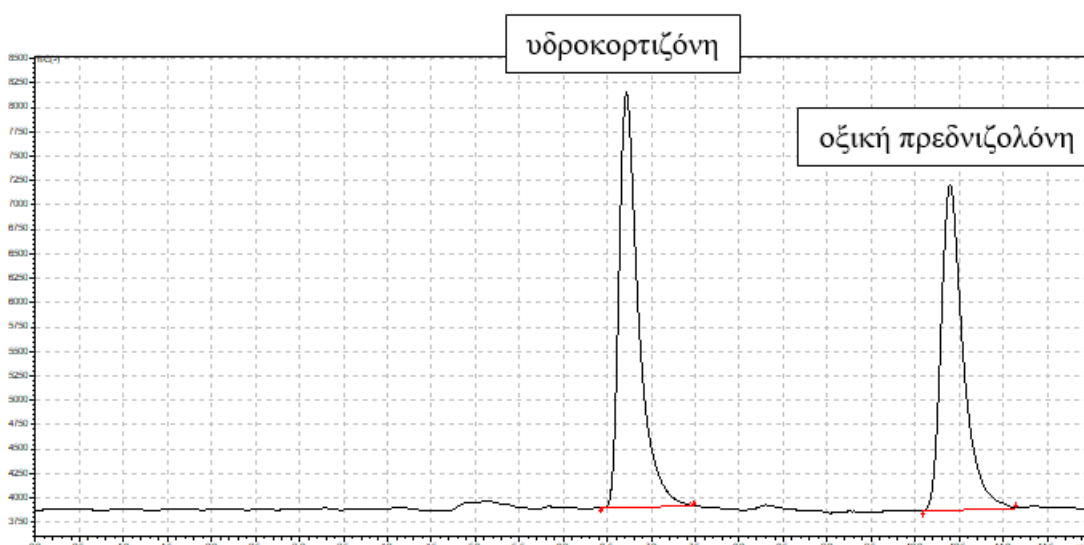
πληρώσεως του 1mL. Η 2^η ογκομετρική φιάλη πληρώθηκε μέχρι χαραγής με νερό. Στη συνέχεια, με σιφόνιο πληρώσεως των 2mL, έγινε εκ νέου αραιώση του διαλύματος της υδροκορτιζόνης σε τρίτη ογκομετρική φιάλη των 25mL (2^η αραιώση), η οποία και πληρώθηκε μέχρι χαραγής και πάλι με νερό (τελικό διάλυμα). Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για την αραιώση του πυκνού διαλύματος της οξικής πρεδνιζολόνης.

Τέλος, από τα τελικά διαλύματα υδροκορτιζόνης και οξικής πρεδνιζολόνης παρασκευάστηκαν:

- α) πρότυπα διαλύματα που εγχύθηκαν απευθείας στο LC/MS (standards Q1 ή stds mix),
- β) πρότυπα διαλύματα που μετρήθηκαν μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (standards Q2 ή stds mix SPE) και
- γ) πρότυπα διαλύματα, spiked σε ορό «καθαρισμένο» με SPE, τα οποία υποβάλλονται εκ νέου σε εκχύλιση στερεάς φάσης (standards Q3 ή stds spiked ορού). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο ανάκτησης της μεθόδου.

Τα καθαρά διαλύματα standards Q1 παρασκευάστηκαν απλά με την ανάμειξη 500μL τελικού διαλύματος υδροκορτιζόνης (21,6 - 691,2 ng/ml) και 500μL (172,8 ng/ml) τελικού διαλύματος οξικής πρεδνιζολόνης. Στο Σχήμα 9.2 βλέπουμε ένα χρωματογράφημα από την ανάλυση ενός καθαρού διαλύματος Q1.

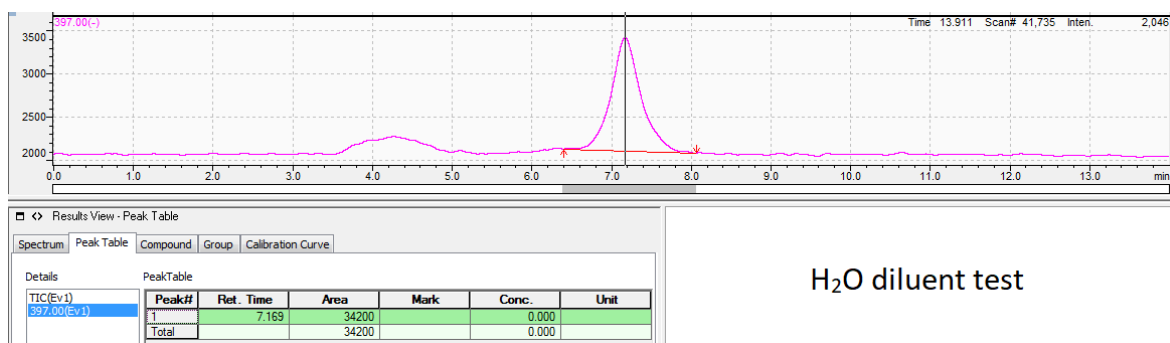
Αντίστοιχα, τα standards Q2 παρασκευάστηκαν με τη διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 9.4.



Σχήμα 9.2. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος (standard Q1 ή std mix).

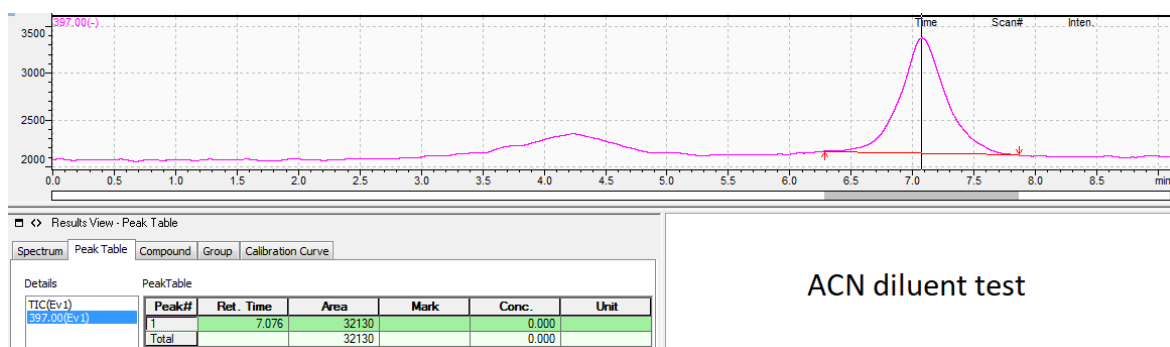
9.3.1. Έλεγχος συμπεριφοράς διαλύτη αραίωσης πρότυπων διαλυμάτων

Κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διάφορων διαλυτών αραίωσης (diluent) των πρότυπων διαλυμάτων. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν ως διαλύτες αραίωσης (1^η και 2^η αραίωσης) το νερό, το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Από τα χρωματογραφήματα φαίνεται ότι το εμβαδόν της κορυφής της κορτιζόλης ήταν και στις τρεις περιπτώσεις περίπου ισοδύναμο. Στην περίπτωση βέβαια του νερού και του ακετονιτρίλιου ως diluent, οι κορυφές της κορτιζόλης ήταν πιο οξείες, πιο συμμετρικές και λιγότερο ευρείες ενώ με τη μεθανόλη ήταν ασύμμετρη με ασαφή όρια ολοκλήρωσης. Ακολουθούν ενδεικτικά χρωματογραφήματα από τις δοκιμές αυτές (Σχήματα 9.3 - 9.5).



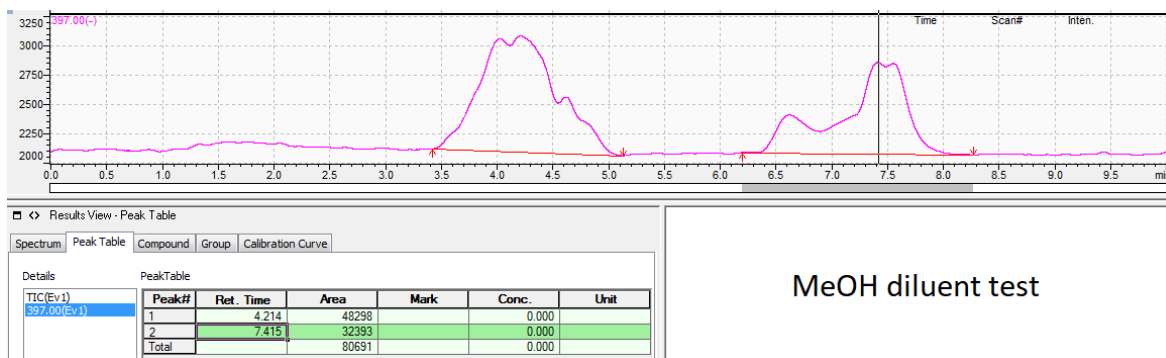
H₂O diluent test

Σχήμα 9.3. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης με νερό ως διαλύτη αραίωσης.



ACN diluent test

Σχήμα 9.4. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης με ακετονιτρίλιο ως διαλύτη αραίωσης.



MeOH diluent test

Σχήμα 9.5. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης με μεθανόλη ως διαλύτη αραίωσης.

Από τις δοκιμές αυτές κι από την ανάλυση των αντίστοιχων προτύπων διαλυμάτων στο LC-MS, κατέστη σαφές ότι καταλληλότεροι διαλύτες για την ανάλυση των δύο δραστικών ήταν το νερό και το ακετονιτρίλιο.

9.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα δείγματα είναι μια σημαντική και απαραίτητη διαδικασία προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση της στήλης και η αύξηση της πίεσης στο χρωματογραφικό σύστημα.

Η πρωτεϊνική καθίζηση που επιτυγχάνεται μετά από προσθήκη οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο), απότομη ψύξη και φύλαξη του δείγματος, είναι μια πρακτική που μπορεί να εφαρμοστεί για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα βιολογικά δείγματα ορού αίματος. Βέβαια, η καθίζηση πρωτεϊνών με αυτή την τεχνική μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του αναλύτη, λόγω πιθανής δέσμευσής του με λιπόφιλες θέσεις στο μόριο των πρωτεϊνών. Ένας τρόπος αποφυγής του συγκεκριμένου προβλήματος είναι να προηγηθεί ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού του δείγματος με την εφαρμογή μιας διαφορετικής τεχνικής. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) ως πιο αποτελεσματική μέθοδος για τον καθαρισμό του ορού και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τη τεχνική, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες

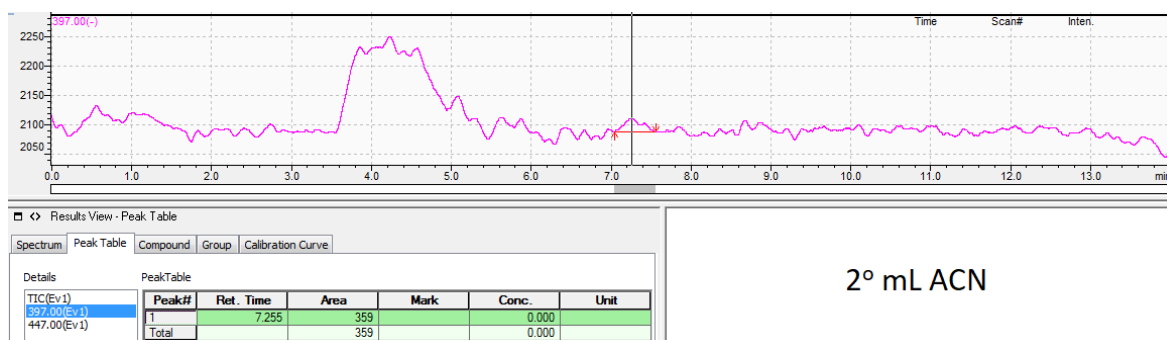
απομακρύνονται από το δείγμα (στην κατάλληλη τιμή pH), λόγω μη δέσμευσής τους με τη στατική φάση και εκλούνται ταχύτερα. Αντίθετα, στη μικροστήλη συγκρατείται η άγνωστη ποσότητα της υδροκορτιζόνης και η γνωστή σταθερή ποσότητα του εσωτερικού προτύπου, τα οποία στο τελικό στάδιο της εκχύλισης εκλούνται και αναλύονται.

Στο πρώτο στάδιο μελέτης για την ανάπτυξη της μεθόδου, έγιναν δοκιμές για την επιλογή της κατάλληλης μικροστήλης, ώστε να ληφθεί η βέλτιστη ανάκτηση. Ως καταλληλότερη θεωρήθηκε η χρήση των μικροστηλών Bond Elut, με πληρωτικό υλικό C18 (500mg), όγκου 6mL, Agilent Technologies.

Ακολούθως, μελετήθηκαν διάφορες επιλογές σύστασης εκλουστικών μέσων, ρύθμισης του pH και των όγκων των διαλυτών, με τελικό στόχο την αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης και τη βέλτιστη ανάκτηση και καθαρισμό των δειγμάτων (καλές χρωματογραφικές κορυφές), ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβής κι έγκυρος ο ποσοτικός προσδιορισμός.

Θα πρέπει σε αυτό το σημείο να διευκρινιστεί ότι παρόλο της αδυναμίας ιονισμού των δυο δραστικών σε τιμές pH 2-8, η χρήση 10% HCl 0,1N στο μείγμα έκπλυσης με ακετονιτρίλιο, οδήγησαν σε καλύτερο καθαρισμό των δειγμάτων. Επίσης, ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στον απαιτούμενο όγκο έκπλυσης του δείγματος (μετά τη φόρτισή του στη στήλη) αρχικά με ACN:HCl 0,1M (10%:90%) και στη συνέχεια με νερό. Τα διάφορα εκλούσματα συλλέγονταν και προσδιορίζονταν οι δραστικές.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για να εξακριβωθεί αν το 1^ο mL του διαλύτη έκλυσης (ακετονιτρίλιο) επαρκεί ώστε να ληφθεί όλη η ποσότητα της κορτιζόλης από τη μικροστήλη ή αν χρειάζεται και 2^ο mL διαλύτη. Για να διαπιστωθεί λοιπόν αν παραμένει ποσότητα κορτιζόλης στη μικροστήλη μετά την έκλυση της με το 1^ο mL ACN, έγινε επιπλέον έκλυση και με 2^ο mL διαλύτη, στο οποίο μετρήθηκαν τα επίπεδα κορτιζόλης (Σχήμα 9.6).



2^ο mL ACN

Σχήμα 9.6. Χρωματογράφημα 2^{οο} mL ACN

Όπως διαπιστώνουμε στο Σχήμα 9.6, δεν υπάρχει καμία κορυφή στο χρόνο έκλουσης της κορτιζόλης οπότε με βεβαιότητα μπορούμε να πούμε ότι όλη η ποσότητα της κορτιζόλης συλλέγεται με το 1^ο mL του διαλύτη έκλουσης. Συνεπώς, δεν χρειάζεται μεγαλύτερος όγκος διαλύτη έκλουσης.

Μετά τη διαμόρφωση της διαδικασίας, οι απώλειες της υδροκορτιζόνης (άγνωστο) και της οξικής πρεδνιζολόνης (εσωτερικό πρότυπο) στα ενδιάμεσα στάδια της SPE ήταν αμελητέες και μη υπολογίσιμες, αφού αυτές εξαλείφονταν με τη χρήση του λόγου $\text{Area}_{\text{cortisol}} / \text{Area}_{\text{internal standard}}$ (Area = εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής).

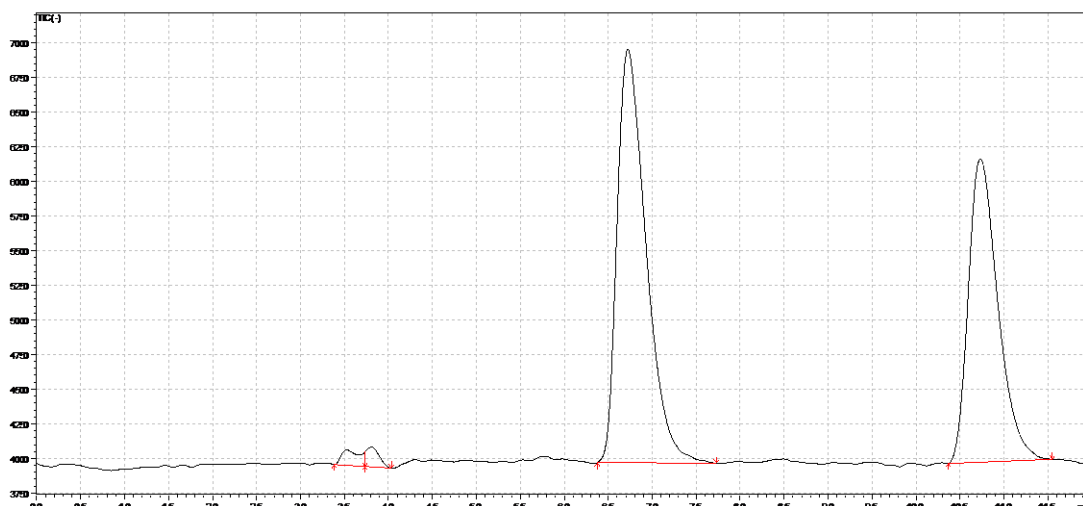
Τα στάδια της διαδικασίας εκχύλισης στερεάς φάσης που εφαρμόστηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων standards Q2 (ή stds mix SPE) μετά από εκχύλιση είναι τα ακόλουθα.

Στη μικροστήλη της συσκευής εκχύλισης στερεάς φάσης, υπό κενό, προστέθηκαν και εκλούστηκαν κατά σειρά:

- 2mL ακετονιτρίλιο (ACN),
- 1mL υδροχλωρικού οξέος (HCL 0,1M),
- 500μL διαλύματος υδροκορτιζόνης + 500μL διαλύματος οξικής πρεδνιζολόνης,
- 1mL διαλύματος ACN : HCl 0,1M (10% : 90%),
- 2mL νερό.
- Τα απόβλητα από όλα τα προηγούμενα βήματα απορρίπτονται.
- Παραλαβή του εκλούσματος με 1mL ακετονιτρίλιο.

Η ταχύτητα ροής ήταν περίπου 1 σταγόνα ανά 3-4 sec.

Το έκλουσμα που παραλαμβάνεται, μεταφέρεται σε vial και εγχέεται απευθείας στο σύστημα LC-MS (Σχήμα 9.7).



Σχήμα 9.7. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος που έχει υποστεί (επεξεργαστεί με) εκχύλιση στερεάς φάσης (standard Q2 ή std SPE).

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος διαπιστώθηκε ότι οι χρωματογραφικές συνθήκες ήταν αξιόπιστες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.

9.5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Κατ' αρχάς, το πρώτο στάδιο μετά την παραλαβή των άγνωστων δειγμάτων ήταν η αποθήκευσή τους σε βαθιά ψύξη (-80°C), μέχρις ότου επεξεργαστούν με τη διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης. Να τονιστεί ότι τα δείγματα ορού πλάσματος ήταν ήδη φυγοκεντρημένα όταν παρελήφθησαν.

Τα στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης για τα άγνωστα δείγματα ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα που ακολουθήθηκαν και για την εκχύλιση των προτύπων δειγμάτων.

Έτσι, στη μικροστήλη της συσκευής εκχύλισης στερεάς φάσης, υπό κενό, προστέθηκαν και εκλούστηκαν διαδοχικά τα ακόλουθα:

- 2mL ακετονιτρίλιο (ACN),
- 1mL υδροχλωρικού οξέος (HCL 0,1M),
- 500μL αγνώστου δείγματος από τον ορό + 500μL διαλύματος οξικής πρεδνιζολόνης,
- 1mL διαλύματος ACN : HCL 0,1M (10% : 90%),

- 2mL νερό.
- Τα απόβλητα από όλα τα προηγούμενα βήματα απορρίπτονται.
- Παραλαβή του εκλούσματος με 1mL ακετονιτρίλιο.

Η ταχύτητα ροής έκλουσης ήταν περίπου 1 σταγόνα ανά 3-4 sec.

Το έκλουσμα που παραλαμβάνεται, μεταφέρεται σε vial και εγχέεται απευθείας στο σύστημα LC-MS.

ΚΕΦ. 10: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ & ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η επικύρωση της μεθόδου εξασφαλίζει την αξιοπιστία των αναλύσεων. Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν οι παράμετροι: ακρίβεια, πιστότητα (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα), γραμμικότητα, όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

10.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Για την καλύτερη ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των δειγμάτων και την κατανόηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν 3 διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Η πρώτη κατασκευάστηκε με καθαρά πρότυπα διαλύματα που περιέχουν την προσδιοριζόμενη ουσία (κορτιζόλη) και το εσωτερικό πρότυπο (οξική πρεδνιζολόνη) σε αναλογία 50:50 (stds mix ή standards Q1). Η δεύτερη με πρότυπα διαλύματα επεξεργασμένα με SPE που περιέχουν την προσδιοριζόμενη ουσία και το εσωτερικό πρότυπο σε αναλογία 50:50 (stds mix SPE ή standards Q2) και η τρίτη με εμβολιασμένα δείγματα ορού πλάσματος απαλλαγμένου από ενδογενή κορτιζόλη (με SPE), τα οποία υποβλήθηκαν εκ νέου σε καθαρισμό με SPE (stds spiked ορού ή standards Q3).

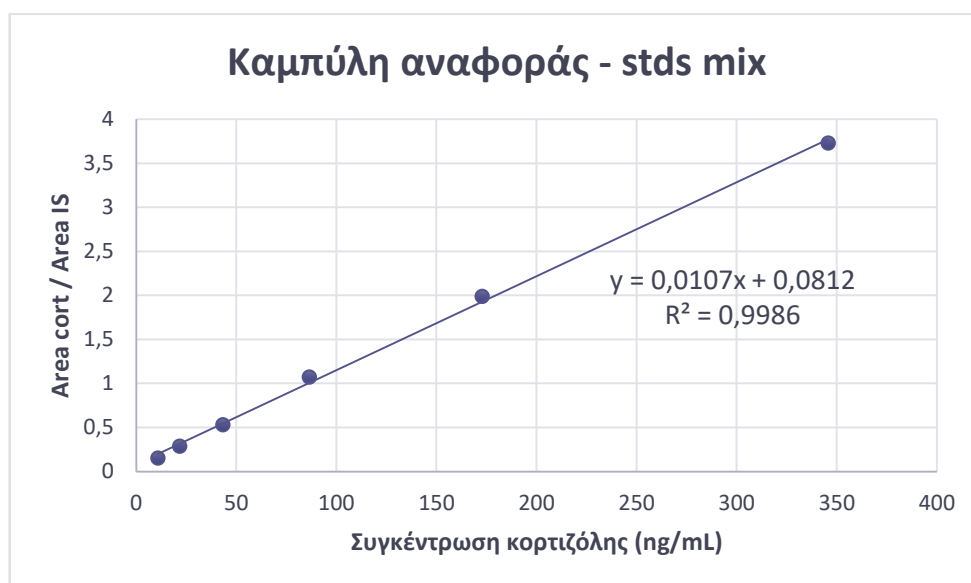
10.1.1. Καμπύλη αναφοράς καθαρών προτύπων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς από καθαρά πρότυπα (standards Q1 ή stds mix), παρασκευάστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα κορτιζόλης / οξικής πρεδνιζολόνης 50:50 v/v, με 6 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων για την κορτιζόλη (10,8 ng/mL, 21,6 ng/mL, 43,2 ng/mL, 86,4 ng/mL, 172,8 ng/mL, 345,6 ng/mL) και σταθερή τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου σε όλα τα πρότυπα διαλύματα (86,4 ng/mL). Τα πρότυπα διαλύματα μετρήθηκαν στο σύστημα LC-MS με τη μέθοδο και τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 9.2. και υπολογίστηκαν οι λόγοι εμβαδών $Area_{cort} / Area_{IS}$ για καθένα από

αυτά. Για την καμπύλη αναφοράς έγιναν 2 επαναλήψεις για κάθε πρότυπο. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 10.1, ενώ η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 10.1) και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis) (Σχήμα 10.2) παρουσιάζονται σε αντίστοιχα σχήματα.

Πίνακας 10.1. Οι συγκεντρώσεις κορτιζόλης στα καθαρά πρότυπα (stds mix) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυσή τους.

No	Όγκος 2ης αραιώσης	Άξονας χ C cort (ng/mL)	Άξονας γ Area cort / Area IS
1	no Cort (blank)	0	0
2	0,25mL	10,8	0,151652967
3	0,5mL	21,6	0,283969968
4	1mL	43,2	0,529586400
5	2mL	86,4	1,070273614
6	4mL	172,8	1,986397620
7	8mL	345,6	3,727384233



Σχήμα 10.1. Καμπύλη αναφοράς μετά από ανάλυση καθαρών προτύπων (standards Q1 ή stds mix) 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων κορτιζόλης.

SUMMARY OUTPUT								
<i>Regression Statistics</i>								
Multiple R	0,999309241							
R Square	0,998618958							
Adjusted R Square	0,998273698							
Standard Error	0,056848209							
Observations	6							
<i>ANOVA</i>								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	9,347309284	9,347309284	2892,3646	7,15558E-07			
Residual	4	0,012926875	0,003231719					
Total	5	9,360236159						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,081223173	0,032327747	2,512491009	0,065882	-0,00853304	0,1709794	-0,008533	0,17097939
X Variable 1	0,010673024	0,000198455	53,78070878	7,156E-07	0,010122026	0,011224	0,01012203	0,01122402

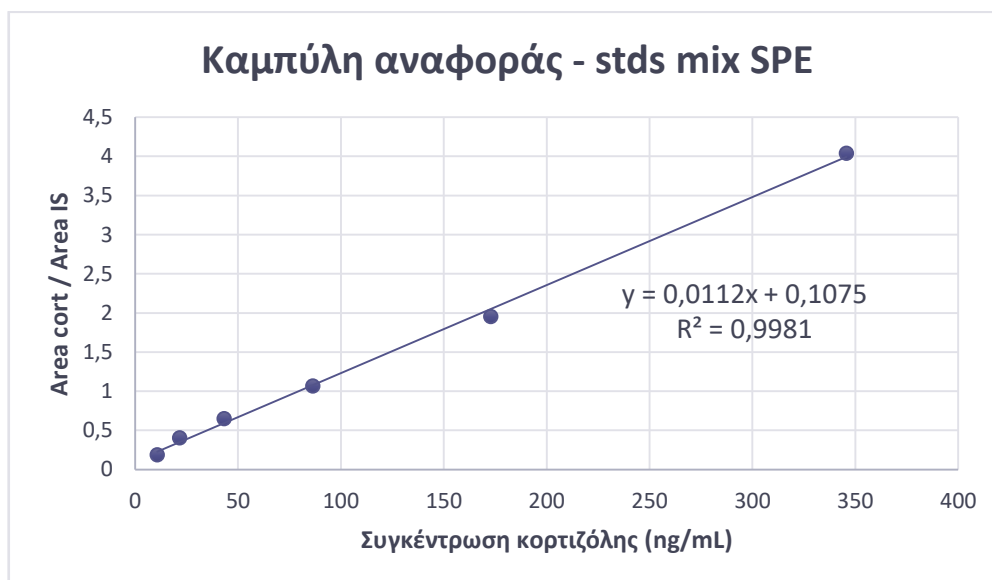
Σχήμα 10.2. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την καμπύλη αναφοράς καθαρών προτύπων (*standards Q1 ή stds mix*) με ανάλυση παλινδρόμησης.

10.1.2. Καμπύλη αναφοράς προτύπων επεξεργασμένων με SPE

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς από πρότυπα που έχουν υποστεί SPE (*standards Q2 ή stds mix SPE*), παρασκευάστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα κορτιζόλης / οξικής πρεδνιζολόνης 50:50 v/v, με 6 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων για την κορτιζόλη (10,8 ng/mL, 21,6 ng/mL, 43,2 ng/mL, 86,4 ng/mL, 172,8 ng/mL, 345,6 ng/mL) και σταθερή τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου σε όλα τα πρότυπα διαλύματα (86,4 ng/mL). Τα πρότυπα αυτά διαλύματα προστέθηκαν κατά τη διαδικασία της SPE, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 9.4. Τα εκλούσματα που παρελήφθησαν (με ακετονιτρίλιο) μετά από κάθε SPE, μετρήθηκαν στο σύστημα LC-MS με τη μέθοδο και τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 9.2 και υπολογίστηκαν οι λόγοι εμβαδών $Area_{cort} / Area_{is}$ για καθένα από αυτά. Για την καμπύλη αναφοράς έγιναν 2 επαναλήψεις για κάθε πρότυπο διάλυμα. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 10.2, ενώ η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 10.3) και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ανάλυση παλινδρόμησης (Σχήμα 10.4) παρουσιάζονται σε αντίστοιχα σχήματα.

Πίνακας 10.2. Οι συγκεντρώσεις κορτιζόλης στα πρότυπα που έχουν υποστεί SPE (stds mix SPE) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυσή τους.

No	Όγκος 2ης αραιώσης	Άξονας χ C cort (ng/mL)	Άξονας γ Area cort / Area IS
1	no Cort (blank)	0	0
2	0,25mL	10,8	0,185687008
3	0,5mL	21,6	0,405492438
4	1mL	43,2	0,650584851
5	2mL	86,4	1,064459719
6	4mL	172,8	1,954947508
7	8mL	345,6	4,038114797



Σχήμα 10.3. Καμπύλη αναφοράς μετά από ανάλυση προτύπων που έχουν υποστεί SPE (standards Q2 ή stds mix SPE) 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων κορτιζόλης.

SUMMARY OUTPUT								
<i>Regression Statistics</i>								
Multiple R	0,999061269							
R Square	0,99812342							
Adjusted R Square	0,997654275							
Standard Error	0,069863161							
Observations	6							
<i>ANOVA</i>								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	10,38421411	10,38421411	2127,5372	1,32141E-06			
Residual	4	0,019523445	0,004880861					
Total	5	10,40373756						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,107527576	0,039728931	2,706530795	0,0537298	-0,00277762	0,2178328	-0,0027776	0,21783277
X Variable 1	0,011249443	0,000243889	46,12523401	1,321E-06	0,010572298	0,0119266	0,0105723	0,01192659

Σχήμα 10.4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την καμπύλη αναφοράς προτύπων που έχουν υποστεί SPE (standards Q2 ή stds mix SPE) με ανάλυση παλινδρόμησης.

10.1.3. Καμπύλη αναφοράς εμβολιασμένου ορού

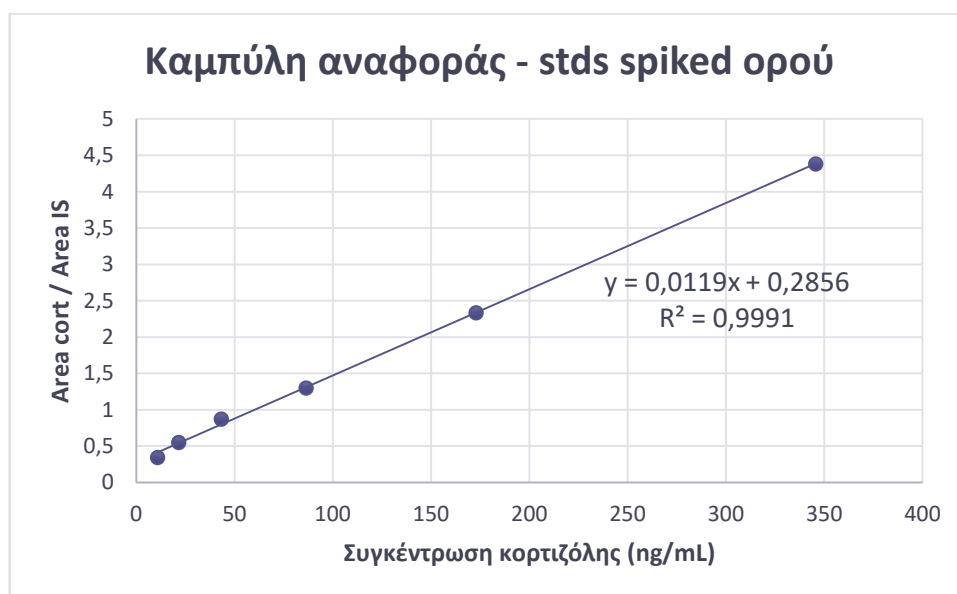
Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος (spiked ορός) ως εξής: 250 μ L πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης 43,2 ng/mL - 1,38 μ g/mL και 250 μ L οξικής πρεδνιζολόνης (345,6 ng/mL) προστέθηκαν σε 500 μ l ορού αίματος απαλλαγμένο από ενδογενή κορτιζόλη. Για την απομάκρυνση της κορτιζόλης από τον ορό, παρασκευάστηκε ένα μεικτό δείγμα ορού από υγιείς δότες και υποβλήθηκε σε μέθοδο καθαρισμού με την τεχνική της SPE. Έκτος από τα επιμολυσμένα δείγματα παρασκευάστηκε και ένα δείγμα ορού no Cort (blank), το οποίο δεν περιείχε ποσότητα κορτιζόλης, παρά μόνο εσωτερικού προτύπου.

Για την καμπύλη αναφοράς έγιναν 2 επαναλήψεις των επιμολυσμένων δειγμάτων ορού πλάσματος και τυφλού (blank). Ακολούθησε η εμβοδομέτρηση των κορυφών της κορτιζόλης και του εσωτερικού προτύπου για κάθε συγκέντρωση. Η καμπύλη αναφοράς χαραχτηκε με βάση τον λόγο του εμβαδού της κορυφής της κορτιζόλης προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου $Area_{cort} / Area_{IS}$. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 10.3, ενώ η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 10.5) και η στατιστική επεξεργασία των

αποτελεσμάτων με ανάλυση παλινδρόμησης (Σχήμα 10.6) παρουσιάζονται σε αντίστοιχα σχήματα.

Πίνακας 10.3. Οι συγκεντρώσεις κορτιζόλης στα εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος (spiked ορός) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυσή τους.

No	Όγκος 2ης αραιώσης	Άξονας χ C cort (ng/mL)	Άξονας γ Area cort / Area IS
1	no Cort (blank)	0	0,185590964
2	0,25mL	10,8	0,345642658
3	0,5mL	21,6	0,552361730
4	1mL	43,2	0,872202978
5	2mL	86,4	1,300533229
6	4mL	172,8	2,333137953
7	8mL	345,6	4,381522218

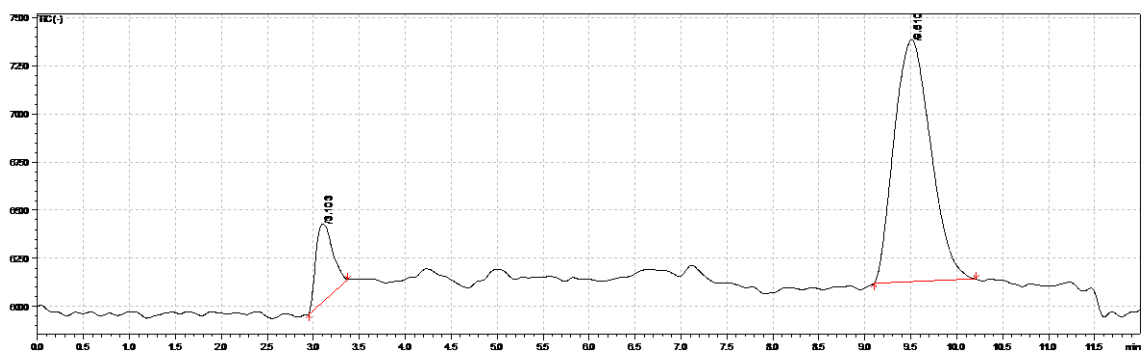


Σχήμα 10.5. Καμπύλη αναφοράς μετά από ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος (spiked ορός) 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων κορτιζόλης.

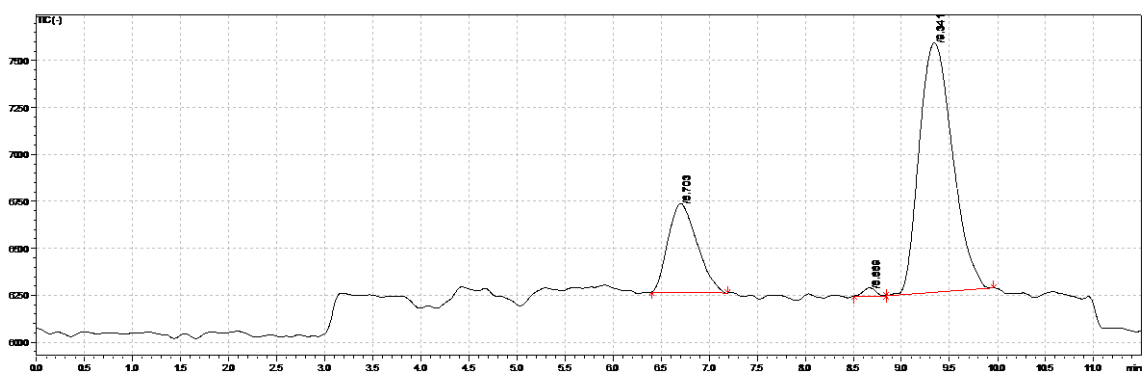
SUMMARY OUTPUT								
<i>Regression Statistics</i>								
Multiple R	0,99955172							
R Square	0,99910364							
Adjusted R Square	0,99887955							
Standard Error	0,050894454							
Observations	6							
<i>ANOVA</i>								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	11,54859436	11,54859436	4458,4942	3,01388E-07			
Residual	4	0,010360982	0,002590245					
Total	5	11,55895534						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,285591858	0,028942038	9,867717558	0,0005917	0,205235878	0,3659478	0,20523588	0,36594784
X Variable 1	0,011863389	0,00017767	66,77195637	3,014E-07	0,011370097	0,0123567	0,0113701	0,01235668

Σχήμα 10.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την καμπύλη αναφοράς εμβολιασμένων δειγμάτων ορού αίματος (*standards Q3 ή stds spiked ορός*) με ανάλυση παλινδρόμησης.

Αντιπαραβάλλοντας τις τρεις καμπύλες αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων Q1, Q2 και Q3 διαπιστώνουμε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση των τιμών ($R^2 > 0,9981$), ενώ οι κλίσεις τους είναι παρόμοιες, γεγονός που επαληθεύει την ορθότητα σχεδιασμού και εφαρμογής της πειραματικής διαδικασίας. Ωστόσο, αυτό που διαφοροποιεί σημαντικά την καμπύλη των δειγμάτων Q3 έναντι των δύο άλλων, είναι η μεγάλη τιμή της τομής επί του άξονα Y (intercept). Πράγματι, αυτή η επιπλέον τιμή στο σήμα διαπιστώθηκε και στη σύγκριση των δύο τυφλών δειγμάτων της καμπύλης Q2 και Q3 αντίστοιχα (Σχήματα 10.7 & 10.8). Δηλαδή το τυφλό δείγμα της καμπύλης Q2 που υποβλήθηκε σε SPE δεν έδινε κανένα σήμα υποβάθρου (Σχήμα 10.7), ενώ αντίθετα αυτό της Q3 έδινε σταθερά μια κορυφή στο χρόνο εξόδου της κορτιζόλης που οφειλόταν στο σήμα υποβάθρου ορού (Σχήμα 10.8). Το γεγονός αυτό λήφθηκε σοβαρά υπόψη για τον μετέπειτα υπολογισμό των συγκεντρώσεων της ενδογενούς κορτιζόλης στα δείγματα των ασθενών.



Σχήμα 10.7. Χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος (blank) της καμπύλης Q2 (stds mix SPE). Όπως παρατηρούμε, δεν δίνει κανένα σήμα υποβάθρου στο χρόνο συγκράτησης της κορτιζόλης.



Σχήμα 10.8. Χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος (blank) της καμπύλης Q3 (stds spiked ορού). Όπως παρατηρούμε, δίνει μια κορυφή στο χρόνο συγκράτησης της κορτιζόλης, που οφείλεται στο σήμα υποβάθρου του ορού.

10.2. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ακρίβεια (accuracy) μας δείχνει το βαθμό της απόκλισης του αποτελέσματος ενός προσδιορισμού από την πραγματική ή αληθή τιμή (true ή correct) της ουσίας που υπάρχει στο δείγμα ή, με άλλα λόγια, το βαθμό ταύτισης της προσδιοριζόμενης και της πραγματικής τιμής. Όσο πιο μικρή είναι η απόκλιση, τόσο πιο μεγάλη είναι η ακρίβεια. Η ακρίβεια αποτελεί κριτήριο για τα λεγόμενα «συστηματικά σφάλματα», δηλαδή σφάλματα που οφείλονται στα όργανα μέτρησης, στα αντιδραστήρια κ.ά., με αποτέλεσμα καλή επαναληψιμότητα και κακή ακρίβεια.

Η ακρίβεια της μεθόδου εκφράζεται με τον συντελεστή ανάκτησης R (recovery) ή καλύτερα με την ποσοστιαία ανάκτηση R και υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$R(\%) = (\chi / \mu) \times 100 ,$$

όπου: χ η προσδιορισμένη τιμή και μ η αληθής τιμή.

Έτσι, λοιπόν, από τα αποτελέσματά μας έχουμε:

i. Έλεγχος Ανάκτησης δειγμάτων τύπου Q1 με βάση την καμπύλη Q1

Έλεγχος ακρίβειας οργάνου (LC-MS):

Με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς των standards Q1 (ή αλλιώς stds mix):

$$y = 0,0107x + 0,0812$$

Για δείγμα συγκέντρωσης Cort = 86,4 ng/mL, ο λόγος $Area_{cort}/Area_{IS}$ που προέκυψε από τη μέτρησή του ήταν: $Area_{cort} / Area_{IS} = 0,9911$.

Τοποθετώντας στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, όπου y , το 0,9911 , παίρνουμε:

$$x = (0,9911 - 0,0812) / 0,0107 = 85,03 \text{ ng/mL.}$$

Άρα, η ανάκτηση θα είναι: $R(\%) = (\chi / \mu) \times 100 = (85,03 / 86,4) \times 100 = 98,7\%$.

Με την αντίστοιχη διαδικασία έγιναν έλεγχοι ανάκτησης δύο δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10,8 ng/mL, 86,4 ng/mL και 345,6 ng/mL). Το κάθε δείγμα μετρήθηκε 2 επαναλήψεις. Η μέση τιμή των ανακτήσεων ήταν **97,5%**.

ii. Έλεγχος Ανάκτησης δειγμάτων τύπου Q2 με βάση την καμπύλη Q2

Έλεγχος απόδοσης της SPE σε καθαρό υπόστρωμα:

Με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς των standards Q2 (ή αλλιώς stds mix SPE):

$$y = 0,0112x + 0,1075$$

Για δείγμα συγκέντρωσης Cort = 86,4 ng/mL, που έχει επεξεργαστεί με SPE (std mix SPE), ο λόγος $Area_{cort}/Area_{IS}$ που προέκυψε από τη μέτρησή του ήταν: $Area_{cort} / Area_{IS} = 1,0348$

Τοποθετώντας στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, όπου y, το 1,0348, παίρνουμε:

$$x = (1,0348 - 0,1075) / 0,0112 = 82,79 \text{ ng/mL}$$

$$\text{Άρα, } R(\%) = (x / \mu) \times 100 = (82,79 / 86,4) \times 100 = 95,8\%.$$

Με την αντίστοιχη διαδικασία έγιναν έλεγχοι ανάκτησης δύο δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10.8 ng/mL, 86.4 ng/mL και 345.6 ng/mL). Το κάθε δείγμα μετρήθηκε 2 επαναλήψεις. Η μέση τιμή των ανακτήσεων ήταν **93,2%**.

Επιπρόσθετοι έλεγχοι ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν και κατά τη διεξαγωγή των αναλύσεων προκειμένου να προσδιοριστεί η κορτιζόλη στους ασθενείς (batches). Στην προκειμένη περίπτωση η διαδικασία ελέγχου περιγράφεται διεξοδικά στο Κεφ. 11.1 και τα αποτελέσματα των ανακτήσεων δίνονται στο Παράρτημα (%**Recovery** = **91,9-111,5 %**).

iii. Έλεγχος Ανάκτησης δειγμάτων τύπου Q3 με βάση την καμπύλη Q3

Έλεγχος απόδοσης της SPE σε υπόστρωμα ορού αίματος:

Με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς των standards Q3 (ή αλλιώς stds spiked ορού):

$$y = 0,0119x + 0,2856$$

Για το εμβολιασμένο δείγμα ορού (std spiked ορού) τελικής συγκέντρωσης Cort = 86,4 ng/mL, ο λόγος $Area_{cort}/Area_{IS}$ που προέκυψε από τη μέτρησή του ήταν:

$$Area_{cort} / Area_{IS} = 1,2685.$$

Τοποθετώντας στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, όπου y, το 1,2685, παίρνουμε:

$$x = (1,2685 - 0,2856) / 0,0119 = 82,60 \text{ ng/mL}$$

$$\text{Άρα, } R(\%) = (\chi / \mu) \times 100 = (82,60 / 86,4) \times 100 = 95,6\%.$$

Με την αντίστοιχη διαδικασία έγιναν έλεγχοι ανάκτησης ενός δειγματος σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10,8 ng/mL, 86,4 ng/mL και 345,6 ng/mL). Το κάθε δείγμα μετρήθηκε 2 επαναλήψεις. Η μέση τιμή των ανακτήσεων ήταν **90,1%**.

10.3. ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η πιστότητα (precision) είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό ποιότητας μιας αναλυτικής μεθόδου. Η πιστότητα εκφράζει το βαθμό της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες. Ως μία παράμετρος ποιότητας της ανάλυσης, η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων μπορεί να προκληθεί από πολλές πηγές. Είναι κοινή πρακτική, στην περιγραφή της πιστότητας, να λαμβάνουμε υπόψη μόνο τις πηγές που προκαλούν τυχαίες διακυμάνσεις (random fluctuations) στη μεθοδολογία.

Η πιστότητα (precision) μιας μεθόδου εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (repeatability or intra assay) και την ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision). Η επαναληψιμότητα μαζί με την ακρίβεια, την οποία εξετάσαμε προηγουμένως, αποτελούν τις σημαντικότερες παραμέτρους που καθορίζουν την αξιοπιστία μιας μεθόδου.

Ως επαναληψιμότητα ορίζεται η δυνατότητα της μεθόδου να δίνει το ίδιο αποτέλεσμα σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου δειγματος και είναι συνώνυμο με τη συνέπεια (consistency). Η επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων μετρήσεων του ίδιου δειγματος που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος μέτρησης, ίδια όργανα μέτρησης, ίδιος αναλυτής, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των μετρήσεων (συνήθως

μέσα στην ίδια ημέρα). Η επαναληψιμότητα μας δείχνει το μέγεθος των «τυχαίων σφαλμάτων», που μπορεί να οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες, όπως αντιδραστήρια διαφορετικής προέλευσης, προσωπικά σφάλματα του αναλυτή, κ.ά.

Η ενδιάμεση πιστότητα εκφράζει την ενδοεργαστηριακή διακύμανση της πιστότητας όταν η ανάλυση εκτελείται από διαφορετικούς αναλυτές, σε διαφορετικές ημέρες και με διαφορετικό εξοπλισμό. Στην περίπτωση μας, οι διαφορετικές αυτές συνθήκες αφορούν μόνο το διαφορετικό χρόνο εκτέλεσης των μετρήσεων.

Η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα) της μεθόδου εκφράζεται με την % σχετική τυπική απόκλιση, που συμβολίζεται συνήθως ως RSD% (relative standard deviation), και είναι γνωστή και ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV).

i. Έλεγχος Επαναληψιμότητας

Για την επαναληψιμότητα (repeatability) της μεθόδου, που μας δείχνει τη διασπορά των αποτελεσμάτων από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσα στην ίδια ημέρα, η % σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) θα δίνεται από τον τύπο:

$$RSD(\%) = (SD / Mean) \times 100 ,$$

όπου: *SD* η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) και *Mean* η μέση τιμή.

Στην προκειμένη περίπτωση η διαδικασία ελέγχου προτύπων διαλυμάτων τύπου Q2 περιγράφεται διεξοδικά στο Κεφ. 11.1 και τα αποτελέσματα των %σχετικών τυπικών αποκλίσεων δίνονται στο Παράρτημα (%RSD = 6,0-15,2 %).

ii. Έλεγχος Ενδιάμεσης Πιστότητας

Η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) της μεθόδου δείχνει τη διασπορά των αποτελεσμάτων από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές ημέρες.

Στην προκειμένη περίπτωση, η διαδικασία ελέγχου προτύπων διαλυμάτων τύπου Q1 συγκέντρωσης 86,4 ng/mL έγινε για τέσσερις διαδοχικές μέρες (2 επαναλήψεις / μέρα) (%RSD = 7,2).

10.4. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) & ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOQ) ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου υπολογίστηκαν για την 3η καμπύλη αναφοράς (standards Q3).

i. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) ή αναλυτική ευαισθησία (analytical sensitivity) είναι μια ένδειξη ευαισθησίας της μεθόδου και ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού που μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99,7%. Με άλλα λόγια, το όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη ποσότητα αναλύτη που δίνει σήμα «στατιστικά σημαντικά διαφορετικό» από το λευκό δείγμα (blank). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται ως η συγκέντρωση που δίνει σήμα προς θόρυβο ίσο με 3 (S/N=3). Έτσι, έχουμε:

- Για την 3^η καμπύλη (standards Q3): **LOD_{μεθόδου} = 0,85 ng/mL**

ii. Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ή λειτουργική ευαισθησία (functional sensitivity) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, δηλαδή να προσδιοριστεί ποσοτικά, με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου υπολογίζεται ως η συγκέντρωση που δίνει σήμα προς θόρυβο ίσο με 10 (S/N=10). Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου θα δίνεται από τον τύπο:

$$\text{LOQ}_{\text{μεθόδου}} = 3,33 \times \text{LOD}_{\text{μεθόδου}}$$

Έτσι, έχουμε:

- Για την 3^η καμπύλη (standards Q3): **LOQ_{μεθόδου} = 2,81 ng/mL**

(Σημ. : πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 21,6 ng/mL έδινε τιμή S/N=166.)

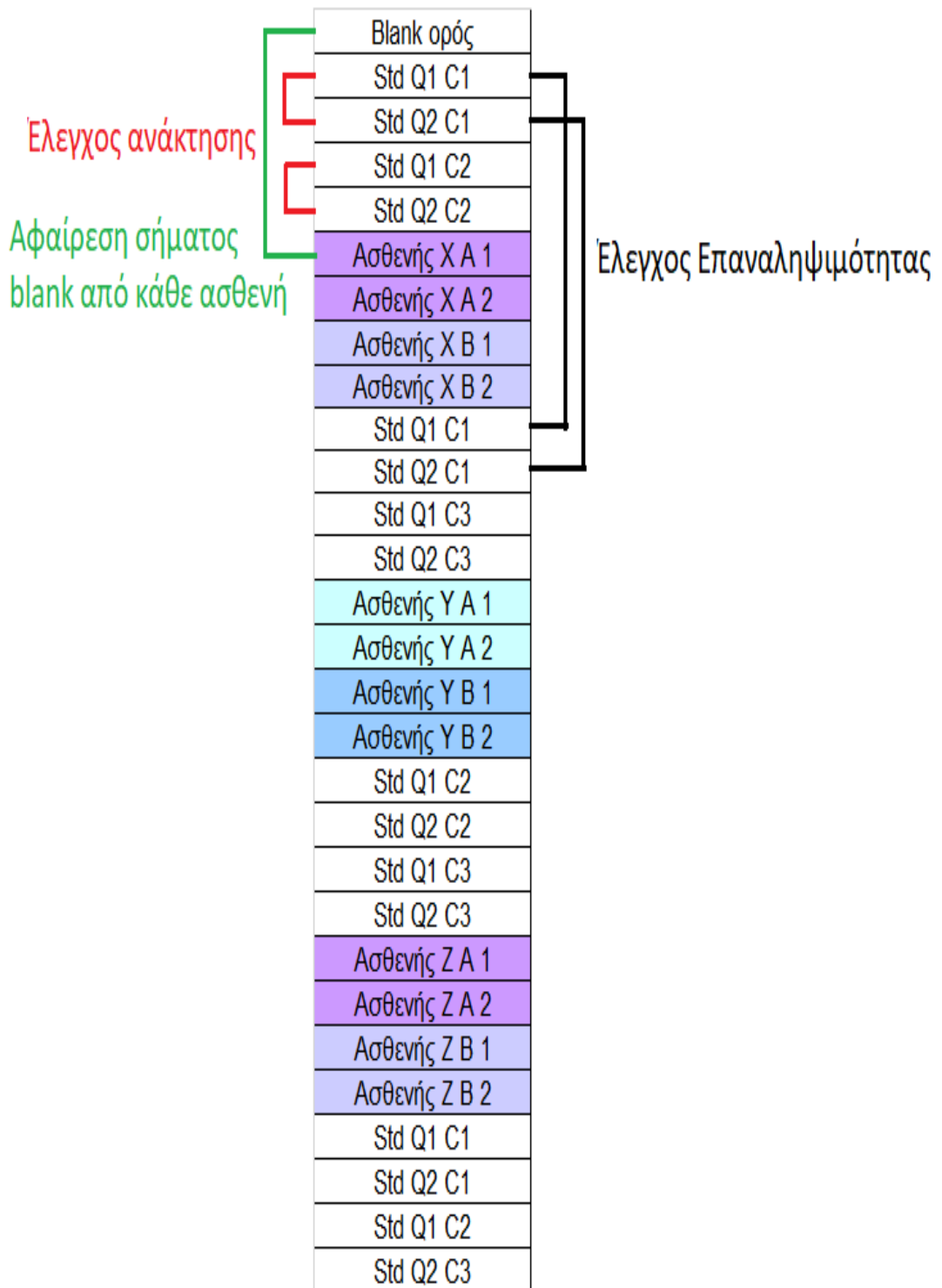
ΚΕΦ. 11: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1. ΤΡΟΠΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Κανονικά, η διαδικασία υπολογισμού αγνώστου δείγματος κορτιζόλης θα έπρεπε να γίνεται βάσει μιας καμπύλης αναφοράς τύπου Q3 η οποία θα έπρεπε να κατασκευάζεται για κάθε batch αναλύσεων ξεχωριστά. Φυσικά αυτό είναι πρακτικά ανέφικτο αφού τόσο ο χρόνος ανάλυσης όσο και ο χρόνος προετοιμασίας τέτοιων δειγμάτων είναι υπερβολικά μεγάλος. Επιπλέον το εργαστήριο θα έπρεπε να διαθέτει μεγάλα αποθέματα ορού, ώστε να καλύψουν όλες τις αναλυτικές ανάγκες.

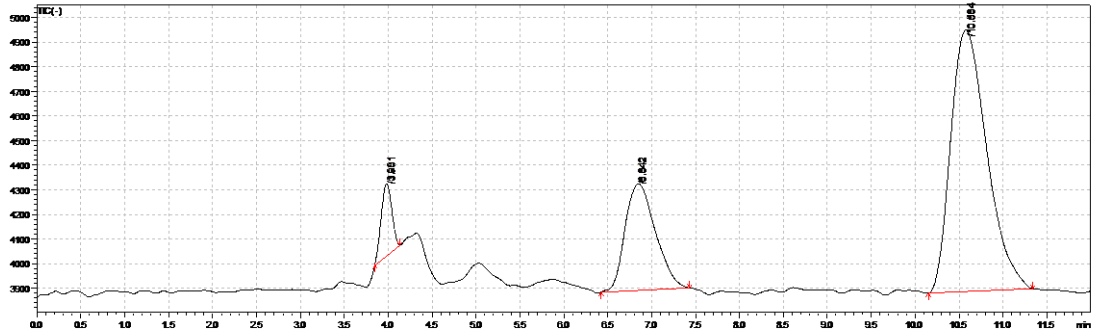
Δεδομένου λοιπόν ότι οι 3 καμπύλες αναφοράς έχουν παρόμοια κλίση επιλέχθηκε να κατασκευάζονται για κάθε μέρα εργασίας (batch) 2 καμπύλες αναφοράς, τύπου Q1 και Q2 κι από αυτές να γίνονται τόσο ο έλεγχος της ανάκτησης και επαναληψιμότητας όσο και η ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης στα άγνωστα δείγματα των ασθενών. Για να επιτευχθεί αυτό βέβαια, έπρεπε να λάβουμε υπόψιν το σήμα υποβάθρου του ορού (εδάφιο 10.1.3), το οποίο διαπιστώθηκε ότι συνεισφέρει στο σήμα της κορτιζόλης. Είναι αναγκαίο δηλαδή, από τη στιγμή που η ποσοτικοποίηση δεν θα γίνει με βάση την καμπύλη των stds spiked ορού, αυτή η σταθερή ενίσχυση σήματος που οφείλεται στον ορό και συνεπώς θα υπάρχει σε όλα τα άγνωστα δείγματα, να αφαιρεθεί. Έτσι, σε κάθε ημέρα εργασίας υπολογιζόταν στην αρχή το σήμα υποβάθρου με ανάλυση ενός τυφλού δείγματος ορού (η προετοιμασία του περιγράφεται στο εδάφιο 10.1.3) και στη συνέχεια αυτό αφαιρούνταν (εμβαδόν κορτιζόλης) από όλα τα δείγματα ασθενών (πράσινη ένδειξη στο σχήμα 11.1).

Ακολούθως, υπολογιζόταν ο λόγος των εμβαδών $Area_{cort} / Area_{IS}$ και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων γινόταν βάσει της καμπύλης τύπου Q2 (ή stds mix SPE). Αντίστοιχα, για τον έλεγχο ανάκτησης της μεθόδου στο batch ασθενών υπολογιζόταν η τιμή %Recovery για κάθε std τύπου Q2 βάσει των std τύπου Q1, αντίστοιχων συγκεντρώσεων (κόκκινη ένδειξη στο σχήμα 11.1). Τέλος, για τον έλεγχο της πιστότητας (inter/intra-day analysis) χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα τόσο από τα δείγματα Q1 όσο και από αυτά τύπου Q2 ιδίων συγκεντρώσεων (μαύρη ένδειξη στο σχήμα 11.1). Ακολούθως, δίνεται ένα σχεδιάγραμμα της δομής ενός τυπικού batch ασθενών (Σχήμα 11.1).

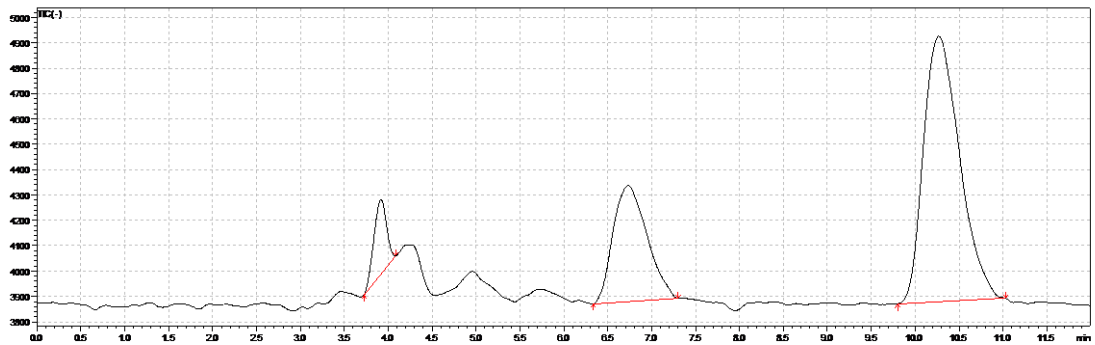


Σχήμα 11.1. Η δομή ενός τυπικού batch ασθενών.

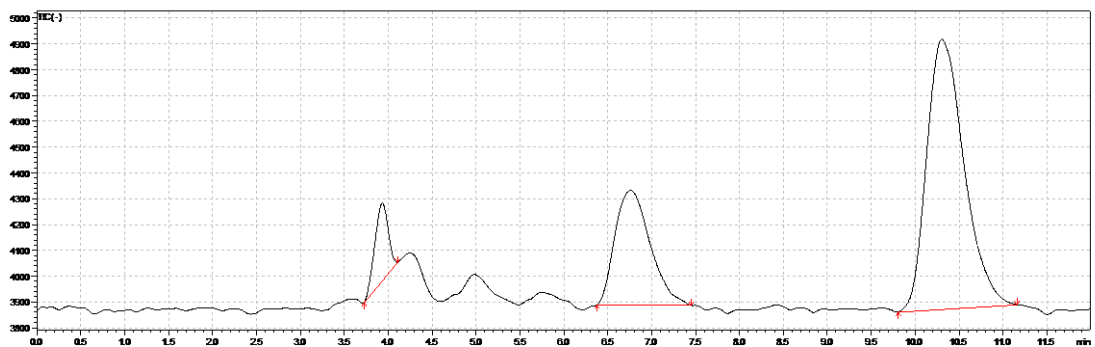
Παρακάτω παρατίθενται μερικά χρωματογραφήματα από άγνωστα δείγματα ασθενών (Σχήματα 11.2 - 11.7).



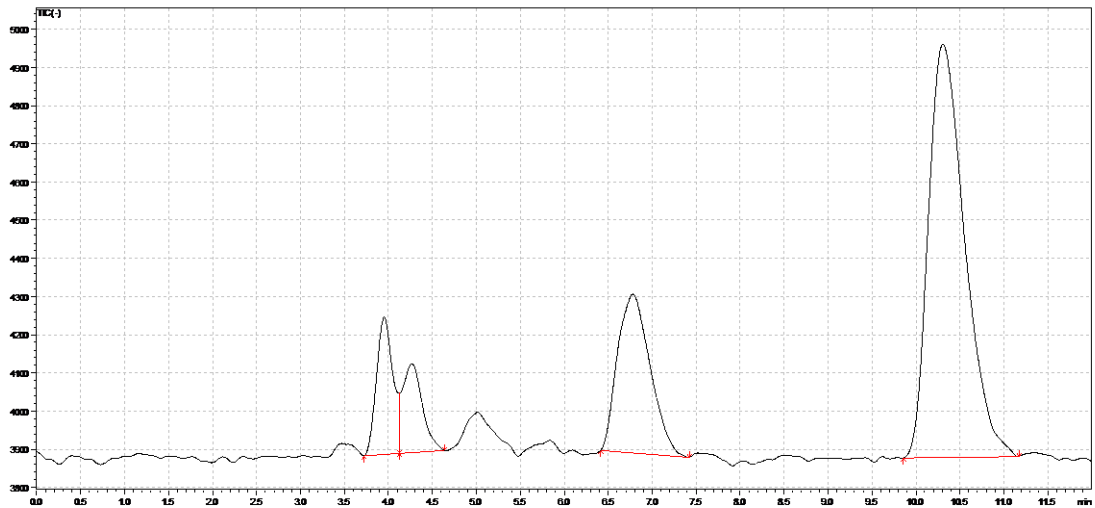
Σχήμα 11.2. Χρωματογράφημα Ασθενούς 5 (A2).



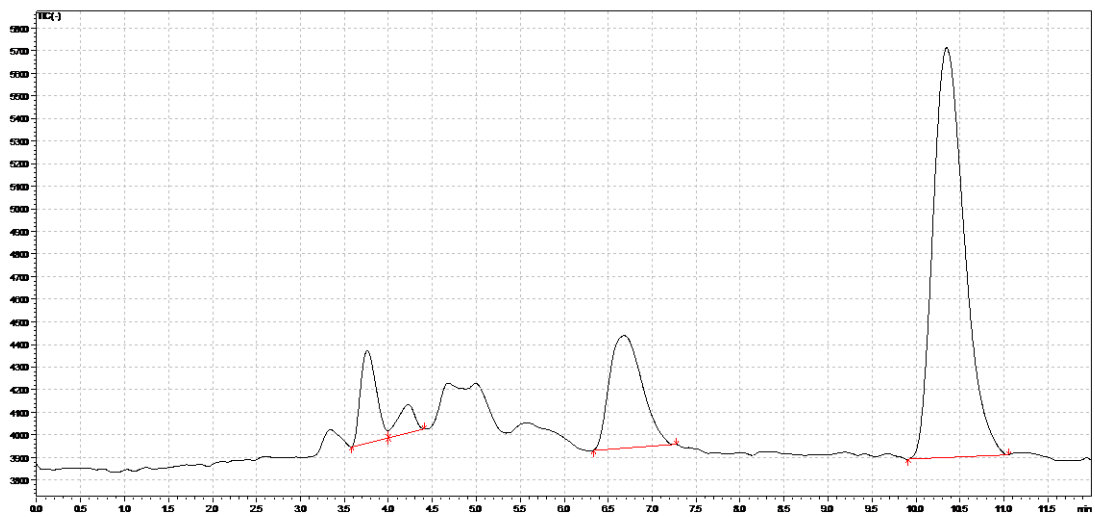
Σχήμα 11.3. Χρωματογράφημα Ασθενούς 5 (B2).



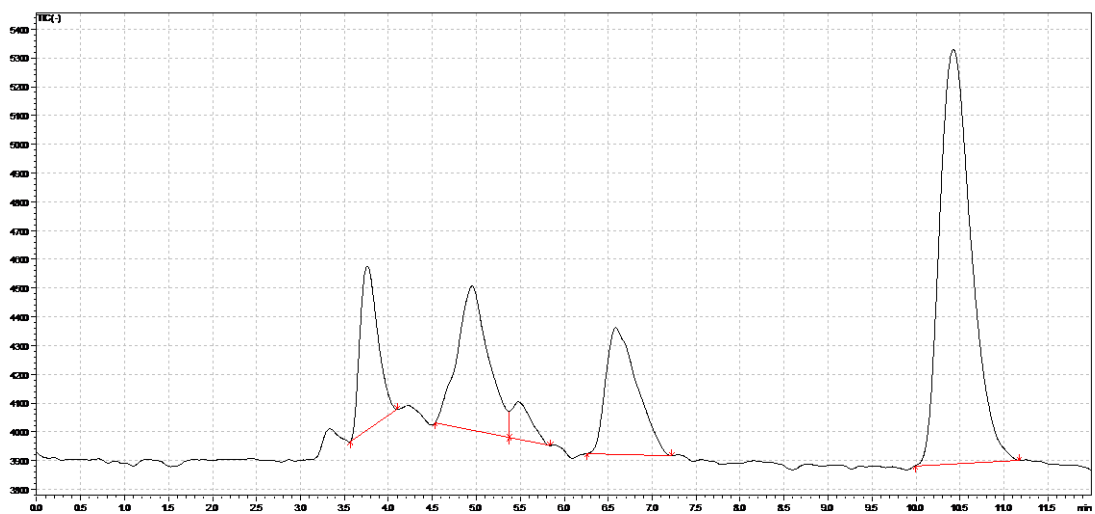
Σχήμα 11.4. Χρωματογράφημα Ασθενούς 6 (A1).



Σχήμα 11.5. Χρωματογράφημα Ασθενούς 6 (B1).



Σχήμα 11.6. Χρωματογράφημα Ασθενούς 8 (B1).



Σχήμα 11.7. Χρωματογράφημα Ασθενούς 10 (B1).

11.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για κάθε ασθενή δίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, που δείχνουν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα σε ng/mL. (Πίνακας 11.1).

Πίνακας 11.1. Συνοπτικός πίνακας συγκεντρώσεων κορτιζόλης στους ασθενείς.

Συνοπτικός πίνακας συγκεντρώσεων κορτιζόλης στους ασθενείς	
Ασθενής (No)	C κορτιζόλης (ng/mL πλάσματος)
1	25,4
2	15,5
3	52,8
4	27,9
5	107,1
6	83,6
7	82,8
8	42,3
9	39,4
10	64,5
11	72,1
12	38,8
13	34,8
14	82,7
15	40,2
16	55,7
17	46,9
18	70,6
19	71,5
20	77,0
21	70,6

Συνοπτικός πίνακας συγκεντρώσεων κορτιζόλης στους ασθενείς

Ασθενής (No)	C κορτιζόλης (ng/mL πλάσματος)
22	56,9
23	48,3
24	57,9
25	39,3
26	53,8
27	49,9
28	72,9
29	97,9
30	89,3
31	42,0
32	78,8
33	28,3
34	71,4
35	43,4
36	65,0
37	54,1
38	86,9
39	88,3
40	108,3
41	103,6
42	14,8
43	41,7
44	94,8
45	55,9
46	110,1
47	46,9
48	20,4
49	17,0
50	27,2

Συνοπτικός πίνακας συγκεντρώσεων κορτιζόλης στους ασθενείς

Ασθενής (No)	C κορτιζόλης (ng/mL πλάσματος)
51	54,0
52	32,6
53	66,3
54	32,1
55	72,1
56	80,0
57	80,3
58	49,1
59	44,0
60	8,7
61	10,7
62	46,5
63	62,5
64	32,0
65	25,7
66	92,1
67	52,8
68	101,8
69	79,4
70	55,1
71	43,0
72	84,5
73	104,5
74	102,9
75	104,7
76	23,2
77	67,5
78	85,7
79	25,7

Συνοπτικός πίνακας συγκεντρώσεων κορτιζόλης στους ασθενείς

Ασθενής (No)	C κορτιζόλης (ng/mL πλάσματος)
80	60,0
81	49,3
82	70,0
83	26,8
84	101,2
85	65,8
86	60,9
87	56,1

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας αναπτύχθηκε μία μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελεύθερης κορτιζόλης σε πλάσμα αίματος με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας, αντιστρόφου φάσεως, συζευγμένης με φασματομετρία μαζών ESI-Q LC/MS.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον καθορισμό επιπέδων κορτιζόλης στον οργανισμό 87 ασθενών (με κίρρωση του ήπατος, Ηπατίτιδα Β, Ηπατίτιδα Γ κ.ά.) που διατελούσαν υπό συγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή. Ως εσωτερική πρότυπος ουσία χρησιμοποιήθηκε η οξική πρεδνιζολόνη (prednisolone acetate), ενώ η προκατεργασία των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).

Όσον αφορά την επικύρωση της μεθόδου, ελέγχθηκαν η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η ενδιάμεση πιστότητα, η γραμμικότητα, το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης. Με βάση τα αποτελέσματα η μέθοδος ήταν αξιόπιστη, σύντομη, με καλή ακρίβεια (%Recovery = 91,9-111,5%) και επαναληψιμότητα (%RSD = 6,0-15,2%).

Τέλος, αναφορικά με τη συγκέντρωση ελεύθερης κορτιζόλης στα δείγματα των ασθενών, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στα επίπεδα κορτιζόλης από ασθενή σε ασθενή, γεγονός βέβαιο που οφείλεται τόσο στη διαφορετική βαρύτητα κάθε περίπτωσης (διαφορετική ασθένεια, διαφορετική φάση ίδιας ασθένειας κτλ) όσο και στο διαφορετικό στάδιο ή/και είδος φαρμακευτικής αγωγής που τους χορηγείτο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ (BATCH)

Τα 87 συνολικά δείγματα ασθενών (Ασθενής 1, Ασθενής 2, ... , Ασθενής 87) επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν βάσει της προαναφερθείσας διαδικασίας. Ο συνολικός αριθμός τους διαιρέθηκε σε 14 παρτίδες (batches). Για κάθε ασθενή αναλύθηκαν ξεχωριστά 2 δείγματα. Κάθε δείγμα εκχυλίστηκε με τη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης, με την ίδια ακριβώς διαδικασία (π.χ. Ασθενής 1A για την πρώτη εκχύλιση στερεάς φάσης και Ασθενής 1B για τη δεύτερη SPE). Κάθε δείγμα που προέκυψε από την εκχύλιση στερεάς φάσης, μετρήθηκε δύο φορές με LC-MS (επανάληψη μέτρησης). Τα εμβαδά των κορυφών της κορτιζόλης, του εσωτερικού προτύπου (internal standard) και οι λόγοι τους δίνονται στα πεδία $Area_{cortisol}$, $Area_{IS}$ και $Area_{cortisol} / Area_{IS}$ αντίστοιχα. Επίσης, ως Std (Std mix) ονομάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα τύπου Q1 (χωρίς SPE), ενώ ο αύξων αριθμός που τα συνοδεύει δηλώνει τις επαναλήψεις της μέτρησης στο LC-MS [π.χ. Std 1 (Std mix), Std 2 (Std mix), κ.ο.κ.]. Ως Std SPE ονομάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα τύπου Q2 τα οποία επεξεργάστηκαν με εκχύλιση στερεάς φάσης. Τα δείγματα μετρήθηκαν στο LC-MS με τη σειρά που παρατίθενται στον Πίνακα 11.1. Επίσης, στην αρχή κάθε batch σημειώνονταν όλες οι ποσότητες και οι αραιώσεις των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Ακολουθεί ένα αντιπροσωπευτικό batch (Batch file 3: Ασθενείς 11-15) από τα 14 συνολικά batches με τους ασθενείς (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Batch file 3

Batch file:		3rd
Standards		
Βάρος κορτιζόλης:		2,7 mg
V αρχικής φιάλης:		25 mL
C τελική std κορτιζόλης:		172,8 ng/mL
V σιφωνίου 1ης αραιώσης:		1 mL
V φιάλης 1ης αραιώσης:		25 mL
V σιφωνίου 2ης αραιώσης :		2 mL
V φιάλης 2ης αραιώσης:		25 mL
V σιφωνίου 3ης αραιώσης :		0,5 mL
V φιάλης τελικής αραιώσης (vial):		1mL
IS	prednisolone acetate	2,5mg / 25mL
dilution 3mL to 50mL		
Mean std %Recovery of SPE		97,22%

Standard deviation	0,1455
Mean	1,1013
%RSD std	13,21%

Batch file:	3
Βάρος κορτιζόλης:	2,7 mg

Αριθμός Ασθενούς	Ονομασία Δείγματος	Επαναλήψεις	Area cortisol	Area IS	Area cortisol / Area IS
	Std 1 SPE A 1		68516	49714	1,3782
	Std 1 (Std mix)		70345	52017	1,3523
	Std 1 SPE B 1		67986	51329	1,3245
11	Ασθενής 11 A	1	13552	50813	0,2667
	Ασθενής 11 A	2	13688	52028	0,2631
	Ασθενής 11 B	1	14144	52940	0,2672
	Ασθενής 11 B	2	14481	53250	0,2719
	Std 2 SPE A 2		65701	53254	1,2337
	Std 2 (Std mix)		67814	54824	1,2369
	Std 2 SPE B 2		63504	53409	1,1890
12	Ασθενής 12 A	1	6806	51999	0,1309
	Ασθενής 12 A	2	6993	52389	0,1335
	Ασθενής 12 B	1	7037	55534	0,1267
	Ασθενής 12 B	2	7085	57477	0,1233
	Std 3 SPE A 3		62482	56948	1,0972
	Std 3 (Std mix)		64542	58025	1,1123
	Std 3 SPE B 3		60858	57591	1,0567
13	Ασθενής 13 A	1	5823	58025	0,1004
	Ασθενής 13 A	2	5447	58409	0,0933
	Ασθενής 13 B	1	6663	60331	0,1104
	Ασθενής 13 B	2	6920	59838	0,1156
	Std 4 SPE A 4		59440	58381	1,0181
	Std 4 (Std mix)		63343	60211	1,0520
	Std 4 SPE B 4		57586	58084	0,9914
14	Ασθενής 14 A	1	11698	51599	0,2267
	Ασθενής 14 A	2	11757	50309	0,2337
	Ασθενής 14 B	1	14681	61171	0,2400
	Ασθενής 14 B	2	13787	58005	0,2377
	Std 5 SPE A 5		58072	60279	0,9634
	Std 5 (Std mix)		61052	62416	0,9781
	Std 5 SPE B 5		56975	59982	0,9499
15	Ασθενής 15 A	1	7205	59096	0,1219
	Ασθενής 15 A	2	6686	56934	0,1174
	Ασθενής 15 B	1	6089	55421	0,1099
	Ασθενής 15 B	2	5835	54218	0,1076
	Std 6 SPE A 6		63005	61590	1,0230
	Std 6 (Std mix)		66690	63628	1,0481
	Std 6 SPE B 6		60109	60659	0,9909

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. [1] Levy, E.D., Pereira-Leal, J.B., Chothia, C., and Teichmann, S.A., PLoS Comput. Biol., 2006, **2**, 1395-1406.
2. Krogan, N.J., Cagney, G., Zhong, H., Yu, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrín-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadian, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., StOnge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A. and Greenblatt, J.F., Nature, 2006, **440**, 637-643.
3. Ryan, C.J., Krogan, N.J., Cunningham, P., and Cagney, G., Genome Biol. Evol., 2013, **5**, 1049-1059.
4. Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B.D., Burston, H.E., Vizeacoumar, F.J., Snider, J., Phanse, S., Fong, V., Tam, Y.Y., Davey, M., Hnatshak, O., Bajaj, N., Chandran, S., Punna, T., Christopolous, C., Wong, V., Yu, A., Zhong, G., Li, J., Stagljar, I., Conibear, E., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt J.F., Nature, 2012, **489**, 585-589.
5. Netherton, C., Goodyer, I., Tamplin, A., and Herbert, J., Psychoneuroendocrinology, 2004, **29**, 125-140.
6. Purnell, J.Q., Brandon, D.D., Isabelle, L.M., Loriaux, D.L., and Samuels, M.H., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2004, **89**, 281-287.
7. VanBruggen, M.D., The Relationship between Plasma and Salivary Cortisol Levels in Response to Different Exercise Intensities, Chapel Hill, 2010.
8. Knight, R. P., Kornfeld, D. S., Glaser, G. H., and Bondy, P. K., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1955, **15**, 176-181.
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
10. Minic, Z., Dahms, T.E.S., and Babu, M., J. Chromatogr. B, 2018, **1102-1103**, 96-108.

11. Häkkinen, M. R., Heinosalo, T., Saarinen, N., Linnanen, T., Voutilainen, R., Lakka, T., Jääskeläinen, J., Poutanen, M., and Auriola, S., *J Pharmaceut. Biomed.*, 2018, **152**, 165-172.
12. Johnstone, A.M, Faber, P., Andrew, R., Gibney, E.R, Elia, M., Lobley, G., Stubbs, R.J. and Walker, B.R., *European Journal of Endocrinology*, 2004, **150**, 185-194.
13. Marchal, L., Legrand, J., and Foucault, A., *AIChE Journal*, 2002, **48**, 1692-1704.
14. Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, P.R.B., and Superti-Furga, G., *Nature*, 2006, **440**, 631-636.
15. Licata, L., Briganti, L., Peluso, D., Perfetto, L., Iannuccelli, M., Galeota, E., Sacco, F., Palma, A., Nardoza, A.P., Santonico, E., Castagnoli, L., and Cesareni, G., *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, D857-D861.
16. Berthod, A., Ruiz-Angel, M.J., and Carda-Broch, S., *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 4206-4217.
17. Foucault A. *Centrifugal Partition Chromatography*. M. Dekker, New York, 1995.
18. Ito, Y., *J. Chromatogr. A*, 2005, **1065**, 145-168.
19. Sutherland, I.A. *Curr. Opin. Drug Discov.*, 2007, **10**, 540-549.
20. Roehrer, S., Bezold, F., García, E. M., and Minceva, M., *J. Chromatogr. A*, 2016, **1434**, 102-110.
21. Bezold, F., Goll, J., and Minceva, M., *J. Chromatogr. A*, 2015, **1388**, 126-132.
22. Hopmann, E., Frey, A., and Minceva, M., *J. Chromatogr. A*, 2012, **1238**, 68-76.
23. <https://www.galinos.gr/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
24. Marley, A., Stalcup, A. M., and Connolly, D., *J. of Pharm. and Biomed. Anal.*, 2015, **102**, 261-266.
25. El-Ragehy, N. A., Hegazy, M. A., AbdelHamid, G., and Tawfik, S. A., *J. of Chromatogr. Science*, 2017, **55**, 1000-1005.
26. Gai, M. N., Pinilla, E., Paulos, C., Chavez, J., Puelles, V., and Arancibia, A., *J. of Chromatogr. Science*, 2005, **43**, 201-206.
27. Prasad, V. K., Ho, B., and Haneke, C., *J. of Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*, 1986, **378**, 305-316.

28. Raut, G. S., Shirkhedkar, A. A., Ugale, V. G., and Surana, S. J., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2013, **37**, 528-537.
29. Lemus Gallego, J. M., and Pérez Arroyo, J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **31**, 873-884.
30. Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β., *Βιοαναλυτική χημεία, Εκδόσεις Κάλλιπος, Θεσσαλονίκη*, 2015.
31. <https://www.chromedia.org/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
32. Couillard, F., Foucault, A., and Durand, A., *Method and Device for Separating Constituents of a Liquid Charge by Means of Liquid-Liquid Centrifuge Chromatography*. U.S. Patent, 2008, 7422685.
33. Παπαδογιάννης, Ν.Ι., Σαμανίδου, Φ.Β., *Ενόργανη χημική ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη*, 2001.
34. <https://www.scienceshop.gr/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
35. Kicman, A.T., Parkina, M.C., and Plesa, R.K., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007, **260-262**, 212-227.
36. Chaimbault, P., in *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products*, Jacob, C., Kirsch, G., Slusarenko, A., Winyard, P.G., and Burkholz, T., Springer Netherlands, 2014, pp. 31-94.
37. [Dass, C., "Hyphenated Separation Techniques". *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc. 2007, pp. 151-194.
38. Χατζηγιάννου, Π. Θ., Κουππάρης, Α.Μ., *Ενόργανη Ανάλυση, Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα*, 2014.
39. Στράτης, Ι.Α., Ζαχαριάδης, Γ.Α., Σαμανίδου, Β., Θεοδωρίδης, Γ., *Ειδικές μέθοδοι διαχωρισμού και χημικής ανάλυσης, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη*, 2004.
40. Θεοδωρίδης, Γ., *Φασματομετρία Μαζών σε Ειδικές και Διαχωριστικές Μεθόδους Ανάλυσης, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη*, 2005.
41. Higashi, T., and Ogawa, S., *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.*, 2016, **162**, 57-69.
42. Fülöp, I., Vari, C.E., Miklos, A., and Imre, S., *Farmacia*, 2017, **65**, 485-493.
43. Jeanneret, F., Tonoli, D., Rosier, M.F., Saugy, M., Bocard, J., and Rudaz, S., *J. Chromatogr. A*, 2016, **1430**, 97-112.
44. Marcos, J., and Pozo, O.J., *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.*, 2016, **162**, 41-56
45. Majors, R.E., *LC-GC Europe*, 2006, **19**, 284-292.
46. Παπαδοπούλου, Ε., Πατσιάς, Ι., *Χρωματογραφία και Εργαστηριακές Τεχνικές, Εκδόσεις Μέθεξις, Αθήνα*, 2009.

47. Skoog, H.N., Holler, F.J., Crouch, S.R., Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2000, pp. 816-837.
48. Λιοδάκης, Σ., Αναλυτική Χημεία, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα, 2001.
49. Harris D.C., Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Ηράκλειο Κρήτης, 2009.
50. Ceccato, F., Barbot, M., Zilio, M., Frigo, A.C., Albiger, N., Camozzi, V., Antonelli, G., Plebani, M., Mantero, F., Boscaro, M., and Scaroni, C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, **100**, 3856-3861.
51. Matsui, F., Koh, E., Yamamoto, K., Sugimoto, K., Sin, H.S., Maeda, Y., Honma, S., and Namiki, M., *Endocrine Journal*, 2009, **56**, 1083.
52. Gaudl, A., Kratzsch, J., and Ceglarek U., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2019, **192**, 105389.
53. Zhai, X., Chen, F., Zhu, C., and Lu, Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **107**, 450-455.
54. Lee, S., Lim, H.S., Shin, H.J., Kim, S.A., Park, J., Kim, H.C., Kim, H., Kim, H.J., Kim, Y.T., Lee, K.R., Kim, Y.J., *J. Anal. Methods Chem.*, 2014, **2014**, 1-6.
55. Handsen, S., Pedersen-Bjergaard, S., and Rasmussen, K., *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*, John Wiley and Sons Ltd, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK, 2012.
56. Dawson, Jr., R., Kontur, P., and Monjan, A., *Hormone Research*, 1984, **20**, 89-94.
57. Rao, L.V., Petersen, J.R., Bissell, M.G., Okorodudu, A.O., and Mohammad, A.A., *J. of Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, **730**, 123-128.
58. Huang, W., Kalhorn, T.F., Baillie, M., Shen, D.D., and Thummel, K.E., *Therapeutic Drug Monitoring*, 2007, **29**, 215-224.
59. Zhou, J., Dai, X., Fang, X., Li, H., Zhao, Y., and Gong, A., *Instrum. Sci. Technol.*, 2011, **39**, 522-533.
60. Andersen, J.H., Hansen, L.G., and Pedersen, M., *Anal. Chim. Acta*, **617**, 216-224.
61. Sibum, M., and Berhиту, A., *Determination of Cortisol in Plasma by XLC-MS-MS Using the Symbiosis Pharma, The Applications Notebook*, 2005.
62. Ceglarek, U., Kortz, L., Leichtle, A., Fiedler, G.M., Kratzsch, J., and Thiery, J., *Clin. Chim. Acta*, 2009, **401**, 114-118.
63. Kushnir, M.M., *Clin. Chem.*, 2003, **49**, 965-967.
64. Grebe, S.K.G., and Singh, R.J., *Clin. Biochem.*, 2011, **32**, 5-31.
65. Lee, S.H., Kwon, S.H., Shin, H.J., Lim, H.S., Singh, R.J., Lee, K.R., and Kim, Y.J., *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology: BMB Reports*, 2010, **43**, 506-511.

66. Scott, N.R., and Dixon, P.F., *J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*, 1979, **164**, 29-34.
67. VanBruggen, M.D., Hackney, A.C., McMurray, R.G., and Ondrak, K.S., *Int. J. Sport Physiol. Perform.*, 2011, **3**, 396-407.
68. Hopmann, E., and Minceva M., *J. Chromatogr. A*, 2012, **1229**, 140-147.
69. Ανθεμίδης, Α.Ν., Στράτης, Ι.Α., Βουλγαρόπουλος, Α.Ν, Ζαχαριάδης, Ι.Α., Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονικη, 1999.
70. <http://www.chemspider.com/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
71. <https://www.drugbank.ca/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
72. <http://www.markopoulou.gr/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
73. <https://www.pharm.auth.gr/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
74. <https://www.chem.auth.gr/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
75. <https://www.beckmancoulter.com/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
76. <https://www.shimadzu.com/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
77. <https://www.sigmaaldrich.com/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)
78. <https://www.agilent.com/> (τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2020)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού υδροκορτιζόνης σε πλάσμα αίματος με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό ελεύθερης κορτιζόλης σε πλάσμα αίματος.

Η οξική πρεδνιζολόνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Το εκχύλισμα αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με πηγή τετράπολο (ESI-Q), με τη μέθοδο προσθήκης αρνητικού ιόντος ($m/z=397$ για την κορτιζόλη και $m/z=437$ για την οξική πρεδνιζολόνη). Οι χρωματογραφικές συνθήκες περιλάμβαναν στήλη αντιστρόφου φάσεως (C18) και ισοκρατική έκλουση (ροή 0,5mL/min, ACN:H₂O 50:50 v/v). Για την ανάπτυξη της μεθόδου, ετοιμάστηκαν τρεις σειρές προτύπων διαλυμάτων: Α. πρότυπα καθαρά, Β. πρότυπα που υποβλήθηκαν σε SPE και Γ. πρότυπα που παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό ορού αίματος, και αφού μετρήθηκαν στο LC/MS, κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Οι ανακτήσεις της κορτιζόλης κυμαίνονταν από 91,9% έως 111,5%, και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις %RSD μεταξύ 6,0% και 15,2%. Το όριο ανίχνευσης για την κορτιζόλη ήταν 0,85ng/mL και το όριο ποσοτικοποίησης 2,81ng/mL. Η αναλυτική μέθοδος επέδειξε καλή γραμμικότητα σε συγκεντρώσεις από 10,8 έως 345,6ng/mL. Ο συντελεστής συσχέτισης (r^2) ήταν μεγαλύτερος από 0,9981.

Λέξεις-κλειδιά: κορτιζόλη, οξική πρεδνιζολόνη, πλάσμα αίματος, SPE, LC-MS

Κούτρας Νικόλαος

ABSTRACT

Development of a method of determination of hydrocortisone in blood plasma using liquid chromatography - mass spectrometry

A rapid, reliable and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method was developed for the quantification of free cortisol in blood plasma.

Prednisolone acetate was used as internal standard. The purification of the samples was performed by solid phase extraction (SPE) technique. The extract was analyzed by an electrospray source and a quadrupole analyzer (ESI-Q) using the negative ion addition method ($m/z=397$ for cortisol and $m/z=437$ for prednisolone acetate). Chromatographic conditions included a reversed-phase column (C18) and isocratic elution (0.5mL/min flow, ACN:H₂O 50:50 v/v). For the development of the method, three series of standard solutions were prepared: A. pure standards, B. standards submitted to SPE and C. standards prepared by blood serum spiking, and after measuring in LC/MS, their corresponding reference curves were constructed by the method of least squares.

Cortisol recoveries were 91.9-111.5% and %RSDs were 6.0-15.2%, respectively. The detection limit for cortisol was 0.85ng/mL and the quantification limit was 2.81ng/mL. The analytical method showed good linearity from 10.8 to 345.6ng/mL. The correlation coefficient (r^2) was greater than 0.9981.

Keywords: cortisol, prednisolone acetate, blood plasma, SPE, LC-MS

Koutras Nikolaos