



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ  
**Μ.Δ.Ε.: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ  
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ  
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΡΙΟΓΛΙΤΑΖΟΝΕ, ΡΕΡΑΓΛΙΝΙΔΕ ΚΑΙ  
ΝΑΤΕΓΛΙΝΙΔΕ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HILIC-ESI/MS**

Παναγιώτης Στάμου  
Φαρμακοποιός, ΕΚΠΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αθήνα, 2022

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ  
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΡΙΟΓΛΙΤΑΖΟΝΕ, ΡΕΡΑΓΛΙΝΙΔΕ ΚΑΙ ΝΑΤΕΓΛΙΝΙΔΕ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ  
ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HILIC-ESI/MS**

**Παναγιώτης Στάμου**

**Επιβλέπουσα:** Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΠΑΝΤΕΡΗ ΕΙΡΗΝΗ,	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
ΛΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ,	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ,	ΟΜ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

## Ευχαριστίες

- Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον ομότιμο καθηγητή κ. Μιχαήλ Κουππάρη, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ιωάννη Λουκά και την καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου.
- Ευχαριστώ την καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή για την ανάθεση του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την επιστημονική της καθοδήγηση και την άριστη συνεργασία μας σε όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μου άσκησης.
- Ευχαριστώ τους ερευνητές Abuzar Kabir Kenneth G. Furton καθώς και την καθηγήτρια κα Βικτωρία Σαμανίδου για την ευγενική προσφορά των προσροφητικών μέσων FPSE.
- Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Άνθη Παρλά για τη στήριξη, τις συμβουλές της και το ευχάριστο κλίμα που διατήρησε σε όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μου άσκησης.
- Ευχαριστώ τους φίλους μου και την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη τους.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Κεφάλαιο 1: Φασματομετρία μαζών (Mass spectrometry).....	8
1.1 Εισαγωγή και ιστορική αναδρομή.....	8
1.2 Οργανολογία.....	10
1.3 Τεχνικές ιοντισμού.....	12
1.3.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electron spray ionization-ESI).....	12
1.4 Αναλυτές μαζών.....	13
1.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole analyzer).....	13
Κεφάλαιο 2: Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE).....	16
2.1 Εισαγωγή.....	16
2.2 Επισκόπηση προσροφητικών μέσων FPSE.....	17
2.3 Εφαρμογή τεχνικής FPSE.....	19
2.4 Ανάπτυξη μεθόδου FPSE.....	20
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> Υδρογρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC).....	22
3.1 Εισαγωγή.....	22
3.2 Μηχανισμός.....	23
3.3 Κινητές φάσεις.....	25
3.4 Στατικές φάσεις.....	27
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments-DOE).....	29
4.1 Εισαγωγή.....	29
4.2 Παραγοντικοί σχεδιασμοί (factorial designs).....	31
4.3 Κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί.....	34
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (Diabetes mellitus type 2-T2DM).....	36
5.1 Εισαγωγή.....	36
5.2 Αιτιολογία.....	36
5.3 Συμπτώματα.....	37
5.4 Διάγνωση.....	37
5.5 Θεραπεία.....	38
5.6 Θειαζολιδινεδιόνες (Thiazolidinediones).....	39
5.6.1 Pioglitazone.....	39
5.6.2 Μηχανισμός δράσης.....	40
5.6.3 Απορρόφηση και κατανομή.....	41
5.6.4 Μεταβολισμός και απέκκριση.....	42
5.6.5 Δοσολογία-Ενδείξεις.....	43
5.6.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	43
5.7 Μεγλιτινίδια (Meglitinides).....	44

5.7.1 Repaglinide .....	44
5.7.2 Μηχανισμός δράσης.....	45
5.7.3 Απορρόφηση και κατανομή .....	45
5.7.4 Μεταβολισμός και απέκκριση.....	46
5.7.5 Δοσολογία- Ενδείξεις .....	47
5.7.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες .....	48
5.8 Nateglinide.....	48
5.8.1 Μηχανισμός δράσης.....	49
5.8.2 Φαρμακοκινητικά δεδομένα .....	49
5.8.3 Δοσολογία-ενδείξεις.....	50
5.8.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες .....	51
Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με χρήση πειραματικού σχεδιασμού για τον ποσοτικό προσδιορισμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων σε ανθρώπινο πλάσμα.....	52
6.1 Εισαγωγή.....	52
6.2 Οργανολογία συστήματος LC-MS .....	53
6.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες- Εξοπλισμός .....	53
6.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός - αναλώσιμα.....	53
6.3.2 Αντιδραστήρια – διαλύτες .....	54
6.3.3 Φαρμακευτικές ουσίες .....	54
6.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων .....	54
6.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης .....	54
6.4.2 Διαλύματα εργασίας.....	56
6.4.3 Εμβολιασμένα δείγματα σε βιολογικό υλικό (spiked samples).....	56
6.4.4 Δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC samples) .....	57
6.5 Ανάπτυξη βιοαναλυτικής μεθόδου.....	57
6.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά προσδιοριζόμενων ουσιών .....	58
6.5.2 Επιλογή στατικής φάσης.....	59
6.5.3 Βελτιστοποίηση κινητής φάσης.....	61
6.5.4 Βελτιστοποίηση φασματομέτρου μαζών .....	68
6.6 Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) για την ανάκτηση των υπογλυκαιμικών ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.....	72
6.6.1 Ανθρώπινο πλάσμα.....	72
6.6.2 Καταλληλότητα εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.....	72
6.6.3 επιλογή προσροφητικού μέσου FPSE .....	73
6.6.4 Διαστάσεις προσροφητικού μέσου.....	76
6.7 Εφαρμογή κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού στην ανάπτυξη της μεθόδου FPSE .....	77

6.7.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{RPG}$ .....	81
6.7.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{PGL}$ .....	91
6.7.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{NTG}$ .....	95
Κεφάλαιο 7: Αξιολόγηση χαρακτηριστικών ποιότητας της βιοαναλυτικής μεθόδου.....	102
7.1 Έλεγχος γραμμικότητας .....	102
7.2 Έλεγχος ορθότητας & πιστότητας .....	105
7.3 Όριο ποσοτικοποίησης.....	108
7.4 Αξιολόγηση επίδρασης υλικού μήτρας (Matrix effect).....	110
7.5 Αξιολόγηση ανάκτησης .....	112
7.6 Έλεγχος εκλεκτικότητας .....	113
7.7 Έλεγχος σταθερότητας .....	113
7.8 Εφαρμογή μεθόδου στην ανάλυση κλινικών δειγμάτων.....	115
7.9 Συμπεράσματα.....	116
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	118
Βιβλιογραφία .....	122

## Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μια χρόνια διαταραχή του μεταβολισμού που χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απορρύθμιση του μηχανισμού ομοιόστασης των επιπέδων γλυκόζης αίματος, με αποτέλεσμα την εκδήλωση υπεργλυκαιμίας. Στα πρώιμα συμπτώματα περιλαμβάνεται η πολυουρία και η πολυδιψία, ενώ σταδιακά λαμβάνουν χώρα μακροχρόνιες επιπλοκές της νόσου που οφείλονται σε φαινόμενα αθηροσκλήρωσης των αγγείων μεγάλης και μικρότερης διαμέτρου, οδηγώντας σε ανεπαρκή αιμάτωση και δυσλειτουργία των περιφερειακών ιστών και των μείζονων οργάνων. Για τη διαχείριση του σακχαρώδους διαβήτη συστήνεται η εφαρμογή μιας ολιστικής προσέγγισης, η οποία περιλαμβάνει αλλαγή διατροφικών συνηθειών, μείωση σωματικού βάρους, αύξηση σωματική δραστηριότητας κ.ά. σε συνδυασμό με την κατά περίπτωση χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Οι δραστικές ουσίες *rioglitazone*, *repaglinide* και *nateglinide* αποτελούν ενδεικτικούς εκπροσώπους της κατηγορίας των χορηγούμενων από το στόματος υπογλυκαιμικών φαρμάκων και συνταγογραφούνται συστηματικά στην καθημερινή κλινική πράξη για την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκε μια βιοαναλυτική μέθοδος HILIC-ESI/MS με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό *rioglitazone*, *repaglinide* και *nateglinide* σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Για την ανάκτηση των αναλυτών εφαρμόστηκε η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE), κατά την οποία γίνεται χρήση εύκαμπτων υφασμάτινων υποστρωμάτων, αποτελούμενων από κυτταρίνη ή άλλες φυσικές ή συνθετικές ίνες, τα οποία έχουν επικαλυφθεί μέσω της τεχνολογίας λύματος-πηκτής (*sol-gel*) με ένα υβριδικό προσροφητικό πολυμερές υπό τη μορφή λεπτής επίστρωσης. Κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας έγινε εφαρμογή τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού με σκοπό τον εντοπισμό των κρίσιμων παραμέτρων των σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης και τη βελτιστοποίηση της ανάκτησης. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) και ως ανιχνευτής στο χρωματογραφικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών με ανιχνευτή απλού τετραπλού και πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης δεν υπερβαίνει τα 10 λεπτά και η περιοχή γραμμικότητας της μεθόδου κυμαίνεται από 25-2000 ng mL<sup>-1</sup> για το *rioglitazone*, 6,25-500 ng mL<sup>-1</sup> για *repaglinide* και 125-10000 ng mL<sup>-1</sup> για το *nateglinide*. Η προτεινόμενη μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη ενός μεγάλου φάσματος κλινικών μελετών με σκοπό τον έλεγχο των θεραπευτικών επιπέδων των ανωτέρω φαρμάκων.

**Λέξεις κλειδιά:** σακχαρώδης διαβήτης, HILIC, FPSE, πειραματικός σχεδιασμός,

## **Abstract**

Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by the progressive dysregulation of the homeostasis mechanisms of blood glucose, resulting in the manifestation of hyperglycemia. Early symptoms include polyuria and polydipsia, while gradually the long-term complications of the disease occur due to atherosclerosis phenomena of large and small diameter vessels, leading to insufficient irrigation and dysfunction of peripheral tissues and major organs. Management of diabetes mellitus requires the application of a holistic approach, which includes appropriate lifestyle interventions (reduction of body weight, increased physical activity, etc.), in combination with the occasional administration of medication. Pioglitazone, repaglinide and nateglinide constitute some indicative representatives in the group of orally administered hypoglycemic agents and are routinely prescribed in daily clinical practice to treat hyperglycemia.

Thus, in the context of the present thesis, the development of a bioanalytical method for the quantitative determination of the hypoglycemic agents pioglitazone, repaglinide and nateglinide in human plasma samples is described. Recovery of target analytes from the biological matrix was achieved through the implementation of novel microextraction technique FPSE, which utilizes permeable fabric substrates made of cellulose or other natural or synthetic textiles, that have undergone chemical coating via sol-gel technology with a hybrid adsorptive polymeric material. A Design of Experiments approach was implemented during the development of the sample preparation method in order to assess the significance of various parameters on extraction and desorption efficiency and to optimize the recovery of the analytes. Chromatographic analysis of the compounds was performed by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in combination with mass spectrometry. The mass detector of the chromatographic system was equipped with a single quadrupole mass analyzer and an electrospray interface. Total run time did not exceed 10 min and the linearity range of the method is 25-2000 ng mL<sup>-1</sup> for pioglitazone, 6.25-500 ng mL<sup>-1</sup> for repaglinide and 125-10000 ng mL<sup>-1</sup> for nateglinide. The proposed method was evaluated in terms of its main quality characteristics and may be used to support a wide range of clinical studies regarding the monitoring of therapeutic levels of the above drugs.

**Key-words:** Diabetes mellitus, FPSE, HILIC, Design of Experiment



## Κεφάλαιο 1: Φασματομετρία μαζών (Mass spectrometry)

### 1.1 Εισαγωγή και ιστορική αναδρομή

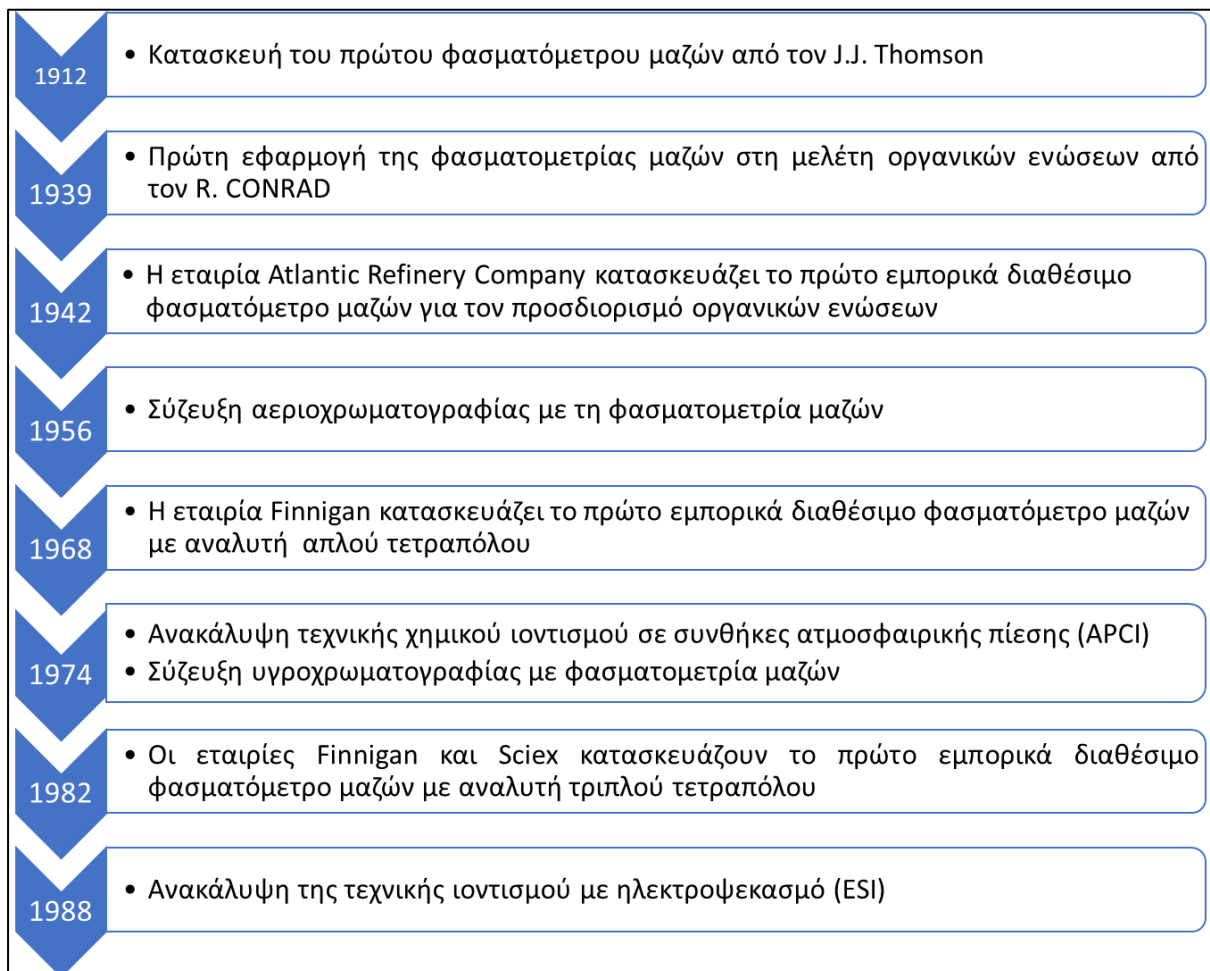
Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μια ενόργανη αναλυτική τεχνική, που επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων, μέσω του σχηματισμού ιόντων στην αέρια φάση και τον διαχωρισμό τους, συναρτήσει του λόγου  $m/z$  (μάζα προς φορτίο ιόντος). Η πρώτη εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών σημειώθηκε το 1912 από τον ερευνητή J.J. Thomson, ο οποίος χρησιμοποιώντας μια πρώιμη εκδοχή του φασματομέτρου μαζών, επωνομαζόμενο ως παραβολικός φασματογράφος, έλαβε τα φάσματα μαζών των ενώσεων  $O_2$ ,  $N_2$  και  $CO_2$ . Η πρώτη εφαρμογή της τεχνικής στη μελέτη οργανικών ενώσεων έγινε το 1939 από τον ερευνητή R. Conrad, ενώ μέχρι τα μέσα το 20<sup>ου</sup> αιώνα οι κύριες εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών εντοπιζόνταν κυρίως στη βιομηχανία του αργού πετρελαίου και αφορούσαν την ποσοτική ανάλυση μειγμάτων υδρογονανθράκων που παράγονται από την καταλυτική σχάση [1].

Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον που σημειώθηκε κατά τον 20<sup>ο</sup> αιώνα σχετικά με τη φασματομετρία μαζών συνέβαλε καθοριστικά στην αλματώδη πρόοδο της τεχνικής, οδηγώντας σε σημαντικές βελτιώσεις στην υφιστάμενη οργανολογία και την τεχνολογία της λήψης φασμάτων μαζών. Παράλληλα, η ανακάλυψη νέων συστημάτων ιοντισμού και αναλυτών μαζών, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη κατάλληλων διατάξεων για τη σύζευξη των συστημάτων αεριοχρωματογραφίας και υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών ενίσχυσαν σημαντικά τη δυναμική της τεχνικής, διευρύνοντας θεαματικά το υφιστάμενο πεδίο εφαρμογών [2].

Σήμερα, η φασματομετρία μαζών θεωρείται τεχνική εκλογής στον τομέα της βιοανάλυσης και αξιοποιείται σε πλήθος διαφορετικών εφαρμογών, ορισμένες από τις οποίες αφορούν στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων φαρμακολογικού και τοξικολογικού ενδιαφέροντος σε βιολογικά δείγματα, την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων καθώς και την απεικόνιση της κατανομής βιομορίων σε ιστούς (*MS imaging*). Παράλληλα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η αξιοποίηση της φασματομετρίας μαζών στο ερευνητικό πεδίο της μεταβολομικής και πρωτεομικής, όπου χρησιμοποιείται για τη διενέργεια μη-στοχευμένων πολυπαραμετρικών αναλύσεων, με σκοπό την ταυτοποίηση βιοδεικτών και την κατανόηση σύνθετων βιοχημικών διεργασιών. Οι παραπάνω εφαρμογές απορρέουν από τα εγγενή πλεονεκτήματα της τεχνικής και επικεντρώνονται στα εξής σημεία [3]:

- Υψηλή εκλεκτικότητα, η οποία επιτρέπει την αξιόπιστη διάκριση των αναλυτών από τα συνυπάρχοντα συστατικά του υλικού μήτρας, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, γεγονός που οφείλεται στον ακριβή προσδιορισμό των σχετικών μοριακών μαζών των σχηματιζόμενων ιόντων.
- Υψηλή ευαισθησία, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις επιτρέπει τον προσδιορισμό ενώσεων ακόμα και σε επίπεδα femtomole ( $10^{-15}$  mole).

- Καθολικότητα ανίχνευσης, καθώς δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη χρωμοφόρων ή άλλων λειτουργικών ομάδων στο μόριο του αναλύτη για την ανίχνευσή του με τη συγκεκριμένη τεχνική.
- Παροχή δομικών πληροφοριών, μέσω του ακριβούς προσδιορισμού του μοριακού βάρους των αναλυτών, με χρήση οργάνων υψηλής διακριτικής ικανότητας.

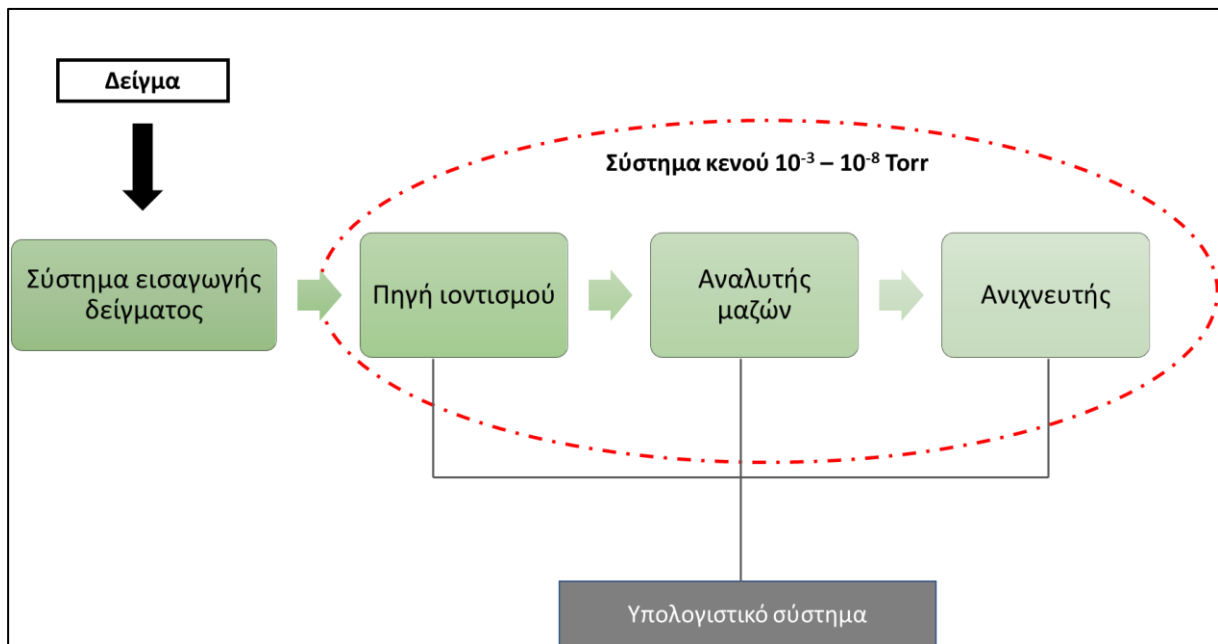


**Σχήμα 1.1** Ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη της φασματομετρίας μαζών.

## 1.2 Οργανολογία

Σε κάθε φασματοόμετρο μαζών εντοπίζονται τα εξής βασικά τμήματα (σχήμα 1.2):

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Πηγή ιοντισμού
3. Αναλυτής μαζών
4. Ανιχνευτής



**Σχήμα 1.2** Σχηματική αναπαράσταση των κύριων τμημάτων ενός φασματομέτρου μαζών.

Παράλληλα, εντοπίζονται μια σειρά συνοδών διατάξεων, όπως αντλίες κενού και γεννήτριες αζώτου, οι οποίες συμβάλλουν στη διαμόρφωση των απαιτούμενων συνθηκών για τη λειτουργία του οργάνου και τη διευκόλυνση του ιοντισμού των αναλυτών. Τα επιμέρους τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών ελέγχονται από κεντρικό υπολογιστικό σύστημα, το οποίο επιτρέπει την τροποποίηση των σχετικών παραμέτρων λειτουργίας ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής, όπως επίσης την καταγραφή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η μεταφορά μιας μικρής ποσότητας δείγματος στην πηγή ιοντισμού χωρίς διατάραξη των συνθηκών κενού που επικρατούν στο όργανο. Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος εισαγωγής εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών (πολικότητα, τάση ατμών κ.ά.), οι φυσικές ιδιότητες του υλικού μήτρας και οι αρχές λειτουργίας του συστήματος ιοντισμού. Για παράδειγμα, στην περίπτωση συστημάτων ιοντισμού που προϋποθέτουν τη μετάβαση των αναλυτών στην αέριο φάση είναι απαραίτητη η εξαέρωση των υγρών και στερεών δειγμάτων με την εφαρμογή ισχυρής θέρμανσης, ενώ αέρια και πτητικά δείγματα μπορεί να εισαχθούν απευθείας στην πηγή ιοντισμού,

γεγονός το οποίο διευκολύνει σημαντικά τη σύζευξη των συστημάτων αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Αντιθέτως, η σύζευξη της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη φασματομετρία μαζών αποτέλεσε μια ιδιαίτερη τεχνολογική πρόκληση καθώς προϋπέθετε την αντιμετώπιση ορισμένων σημαντικών ασυμβασιών ανάμεσα στις δυο τεχνικές, που σχετίζονται με την υψηλή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, την υψηλή κατά περίπτωση περιεκτικότητα των χρωματογραφικών εκλουσμάτων σε νερό και τις συνθήκες υψηλού κενού που απαιτούνται για την λειτουργία του φασματόμετρου μαζών.

Η κύρια λειτουργία της πηγής ιοντισμού είναι η παραγωγή των ιόντων του αναλύτη και η προώθησή τους στον αναλυτή μαζών. Ανάλογα με τα φυσικοχημικές ιδιότητες, τη χημική σταθερότητα και το αναμενόμενο εύρος μοριακών βαρών των αναλυτών ο ιοντισμός μπορεί να λάβει χώρα σε υγρή, στερεή ή σε αέρια κατάσταση. Μια ιδιαίτερως σημαντική προσθήκη, στο πεδίο των συστημάτων ιοντισμού αποτέλεσε η ανακάλυψη των τεχνικών ιοντισμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, καθώς κατέστησαν εφικτή την άμεση εισαγωγή δείγματος στην πηγή ιοντισμού, διευκολύνοντας σημαντικά την σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τη διαμεσολάβηση μιας σειράς ενδιάμεσων χώρων σταδιακά ελαττωμένης πίεσης, ούτως ώστε να αποτραπεί η διατάραξη των συνθηκών υψηλού κενού που επικρατούν στον αναλυτή μαζών.

Ο αναλυτής μαζών αποτελεί το τμήμα του οργάνου στο οποίο λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των αέριων ιόντων με βάση τον λόγο  $m/z$ . Ανάλογα με την αρχή λειτουργίας τους οι αναλυτές διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

1. Αναλυτές συνεχούς λειτουργίας, όπως οι τετραπολικόι αναλυτές (quadrupole, Q) και οι αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector).
2. Αναλυτές παλμικής λειτουργίας, στους οποίους περιλαμβάνεται η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight) καθώς και οι αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η επίτευξη συνθηκών ισχυρού κενού, της τάξης των  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  Torr αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία των αναλυτών μαζών καθώς σε αντίθετη περίπτωση οι συγκρούσεις των ιόντων με τα συστατικά της ατμόσφαιρας θα οδηγούσαν σε αποφόρτισή τους, καθιστώντας αδύνατη την ανίχνευση τους, αλλά και απόκλιση από τις τροχιές τους. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης η μέση απόσταση που μπορεί να διανύσει ένα ιόν πριν εκτραπεί από την πορεία του υπολογίζεται στα  $10^{-8}$  m, ενώ σε συνθήκες ισχυρού κενού η αντίστοιχη απόσταση ανέρχεται στα 10 m, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό των ιόντων που φτάνουν στον ανιχνευτή και κατά συνέπεια την ευαισθησία της τεχνικής.

Ο ανιχνευτής του φασματόμετρου μαζών είναι υπεύθυνος για την μετατροπή της προσπίπτουσας δέσμης ιόντων που εξέρχεται από τον αναλυτή σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα, το οποίο είναι ανάλογο της σχετικής αφθονίας των ιόντων στο δείγμα. Οι διαθέσιμοι τύποι ανιχνευτών διαφέρουν μεταξύ τους σε ορισμένα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας που σχετίζονται με την απόδοσή τους, όπως το δυναμικό εύρος λειτουργίας, η ταχύτητα απόκρισης, τα επίπεδα θορύβου, το όριο κορεσμού της απόκρισης κ.ο.κ. Συνεπώς, η επιλογή του κατάλληλου ανιχνευτή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την οργανολογία του φασματόμετρου μαζών και το πεδίο των εφαρμογών για το οποίο αυτό προορίζεται [4–6].

### 1.3 Τεχνικές ιοντισμού

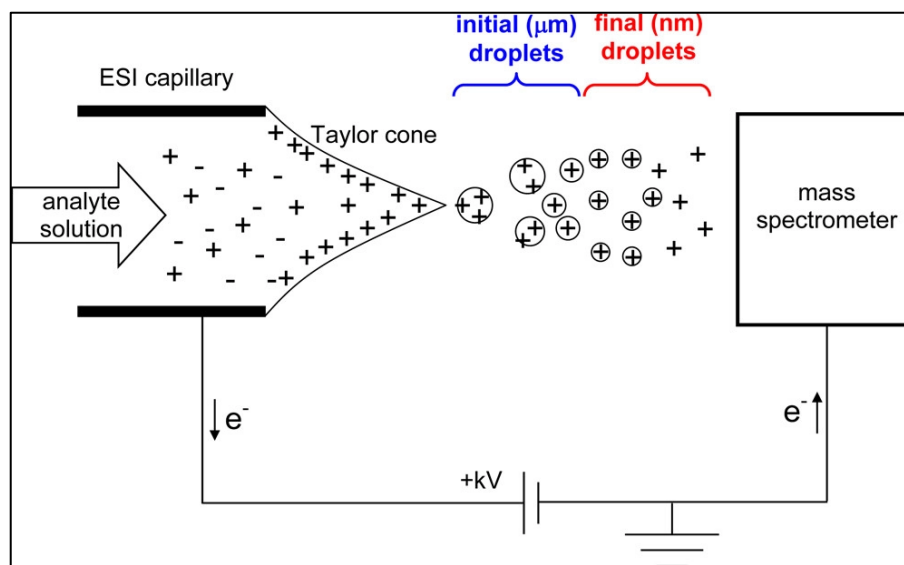
#### 1.3.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electron spray ionization-ESI)

Η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ανήκει στις τεχνικές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και ανακαλύφθηκε από τον ερευνητή J. Fenn το 1988 (βραβείο Nobel 2002) [7]. Η συγκεκριμένη τεχνική συνέβαλε καθοριστικά στη διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών και την αύξηση της δημοτικότητας της φασματομετρίας μαζών στη βιοανάλυση καθώς συγκεντρώνει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα που καθιστούν την αξιοποίησή της ιδιαίτερα αποτελεσματική. Σε αυτά περιλαμβάνεται η ικανότητα πολλαπλής φόρτισης των αναλυτών, η οποία επιτρέπει την ανάλυση ενώσεων μοριακού βάρους άνω των 20000 Dalton και η συμβατότητα με υψηλότερες ταχύτητας ροής, που επιτρέπει την εύκολη σύζευξη της φασματομετρίας μαζών με συστήματα LC και τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα, η τεχνική ESI είναι ήπια τεχνική ιοντισμού και επομένως είναι κατάλληλη για την ανάλυση θερμοευαίσθητων αναλυτών μέτριας και υψηλής πολικότητας. [8–10].

Τα κύρια στάδια της τεχνικής περιλαμβάνουν εν συντομία την εκνέφωση της κινητής φάσης με χρήση προωθητικού αερίου εντός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός αερολύματος φορτισμένων νανοσταγονιδίων, από την επιφάνεια των οποίων τα ιόντα των αναλυτών θα μεταβούν στην αέριο φάση.

Αναλυτικότερα, η βασική διάταξη του συστήματος ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό αποτελείται από ένα μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα (βελόνα ηλεκτροψεκασμού), στην άκρη του οποίου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, της τάξης των 2-6 kV, με την βοήθεια ενός κατάλληλου αντιηλεκτροδίου (κώνος εισόδου). Ανάλογα με το εάν είναι επιθυμητή η ανάλυση κατιόντων ή ανιόντων, εφαρμόζεται αντίστοιχα θετικό ή αρνητικό δυναμικό. Στην περίπτωση του θετικού ιοντισμού, καθώς το υγρό διέρχεται από το τριχοειδές, λαμβάνει χώρα η μεταφορά ηλεκτρονίων από τον κύριο όγκο του διαλύματος προς τα τοιχώματα του τριχοειδούς, οδηγώντας στον σχηματισμό θετικά φορτισμένων ιόντων. Η έκθεση του υγρού στο ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας δομής κωνοειδούς συμμετρίας στην άκρη του τριχοειδούς (κώνος Taylor). Τα σχηματιζόμενα κατιόντα, ωθούμενα από απωστικές ηλεκτροστατικές

αλληλεπιδράσεις κατευθύνονται προς την επιφάνεια του κώνου, οδηγώντας σε αύξηση της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας. Όταν το μέτρο των απωστικών αλληλεπιδράσεων υπερβεί αυτό της επιφανειακής τάσης (όριο Rayleigh) λαμβάνει χώρα η αποκοπή θετικά φορισμένων σταγονιδίων, διαμέτρου μερικών μικρομέτρων από το άκρο του κώνου, τα οποία κατευθύνονται προς το αντιηλεκτρόδιο (σχήμα 1.3). Απαραίτητη προϋπόθεση για τον σχηματισμό των μικροσταγονιδίων είναι η χρήση αερίου εκνέφωσης (άζωτο), το οποίο εφαρμόζεται γύρω από το τριχοειδές διευκολύνοντας την σχάση του κώνου.



**Σχήμα 1.3** Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος ιοντισμού ESI σε λειτουργία θετικού ιοντισμού[11].

Καθώς τα μικροσταγονίδια κινούνται προς την επιφάνεια του αντιηλεκτροδίου η διάμετρος τους σταδιακά ελαττώνεται λόγω εξάτμισης των μορίων του διαλύτη, η οποία συχνά υποβοηθείται από την εφαρμογή θέρμανσης και ρεύματος αζώτου, επιφέροντας αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην επιφάνειά τους. Κατά αντιστοιχία με τα παραπάνω, όταν το σύστημα ξεπεράσει το όριο Rayleigh πραγματοποιείται η διαίρεση των μικροσταγονιδίων σε μικρότερα σταγονίδια. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες διερεύνησης του μηχανισμού του ηλεκτροψεκασμού, τα θυγατρικά σταγονίδια δεν παράγονται μέσω μηχανισμού τύπου «έκρηξης» αλλά αποκόπτονται κατά συνεχή τρόπο από επιμήκεις προεκβολές που δημιουργούνται στα μικροσταγονίδια εξαιτίας της ανομοιόμορφης κατανομής του φορτίου στην επιφάνειά τους. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται διαρκώς, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός αερολύματος φορισμένων σταγονιδίων, διαμέτρου μερικών νανομέτρων, από την επιφάνεια των οποίων τα ιόντα του αναλύτη μεταβαίνουν στην αέρια φάση [11–13].

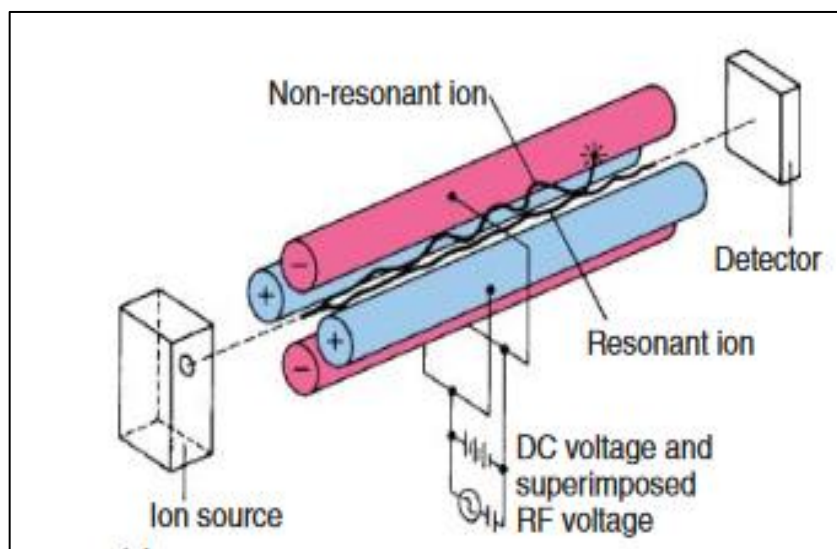
## 1.4 Αναλυτές μαζών

### 1.4.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole analyzer)

Οι πρώτοι εμπορικά διαθέσιμοι τετραπολικοί αναλυτές μαζών κυκλοφόρησαν στα μέσα της δεκαετίας του '60 και σύντομα επικράτησαν έναντι των καθιερωμένων αναλυτών μαγνητικού τομέα

καθώς συγκέντρωναν ορισμένα χαρακτηριστικά που έκαναν την χρήση τους ιδιαίτερα βιώσιμη και αποδοτική. Σε αυτά περιλαμβάνονται το χαμηλό κόστος παραγωγής και λειτουργίας, η συμπαγής δομή τους, η υψηλή ταχύτητα σάρωσης και οι μειωμένες απαιτήσεις σε κενό, που καθιστούν σημαντικά ευκολότερη την σύζευξη με χρωματογραφικά συστήματα. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, οι τετραπολικόι αναλυτές μαζών αποτελούν σήμερα την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία αναλυτών στα σύγχρονα φασματοόμετρα.

Η αρχή λειτουργίας του τετραπολικού αναλυτή περιλαμβάνει τη χρήση συνεχούς και εναλλασσόμενου ρεύματος με σκοπό τη δημιουργία ενός ταλαντούμενου ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο σταθεροποιεί τις τροχιές ιόντων με συγκεκριμένες τιμές  $m/z$ , εκτρέποντας παράλληλα τα υπόλοιπα ιόντα από την πορεία τους. Αναλυτικότερα, η διάταξη του αναλυτή αποτελείται από 4 παράλληλες μεταλλικές ράβδους, κυλινδρικής ή υπερβολικής διατομής, οι οποίες τοποθετούνται σε μια τετραγωνική διευθέτηση περιμετρικά της εισερχόμενης δέσμης ιόντων (σχήμα 1.4). Τα αντιδιαμετρικά ζεύγη ράβδων συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους και σε κάθε ηλεκτρικό ζεύγος εφαρμόζεται τάση, αποτελούμενη από μια συνεχή ( $V_{dc}$ ) και μια εναλλασσόμενη υψίσυχνη συνιστώσα (ραδιοσυχνότητα,  $V_{rf}$ ) ευρισκόμενη σε διαφορά φάσης  $180^\circ$  μοιρών.



**Σχήμα 1.4** Σχηματική αναπαράσταση ενός τετραπολικού αναλυτή μαζών[14].

Τα ιόντα που σχηματίζονται στην πηγή ιοντισμού επιταχύνονται και εστιάζονται σε μια στενή δέσμη διερχόμενα μέσα από ένα σύστημα εστίασης που προηγείται του αναλυτή μαζών και ακολούθως εισάγονται στον τετραπολικό αναλυτή κατά τον άξονα ( $z$ ) του συστήματος. Ρυθμίζοντας την τιμή της συχνότητας και των συνιστωσών  $V_{dc}$  και  $V_{rf}$  επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση της τροχιάς ιόντων με συγκεκριμένη τιμή  $m/z$ , ενώ τα υπόλοιπα ιόντα διαγράφουν ασταθείς πορείες, με αποτέλεσμα την πρόσκρουσή στις ράβδους του αναλυτή και την αποφόρτισή τους. Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η διενέργεια σάρωσης μαζών, αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί

μεταβάλλοντας την τιμή των δυναμικών DC και RF κατά τέτοιον τρόπο ώστε ο μεταξύ τους λόγος να διατηρείται σταθερός. Με την ολοκλήρωση ενός κύκλου σάρωσης όλα τα ιόντα θα έχουν διέλθει από τον αναλυτή σε διαφορετικές χρονικές περιόδους [4,5,15,16].



## Κεφάλαιο 2: Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE)

### 2.1 Εισαγωγή

Η τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction) αναπτύχθηκε το 2014 από τους ερευνητές Abuzar Kabir και Kenneth G. Furton. Πρόκειται για μια καινοτόμα τεχνική προκατεργασίας δείγματος κατά την οποία τα μόρια των αναλυτών προσροφώνται στην επιφάνεια ενός υφασμάτινου υποστρώματος κυτταρίνης, ή κάποιου άλλου συνθετικού υλικού (πχ. πολυεστέρα, υαλοβάμβακα κ.ά.), το οποίο έχει επικαλυφθεί μέσω της τεχνολογίας λύματος-πηκτής (sol-gel) με μια λεπτή επίστρωση ενός υβριδικού οργανικού-ανόργανου πολυμερούς [17].

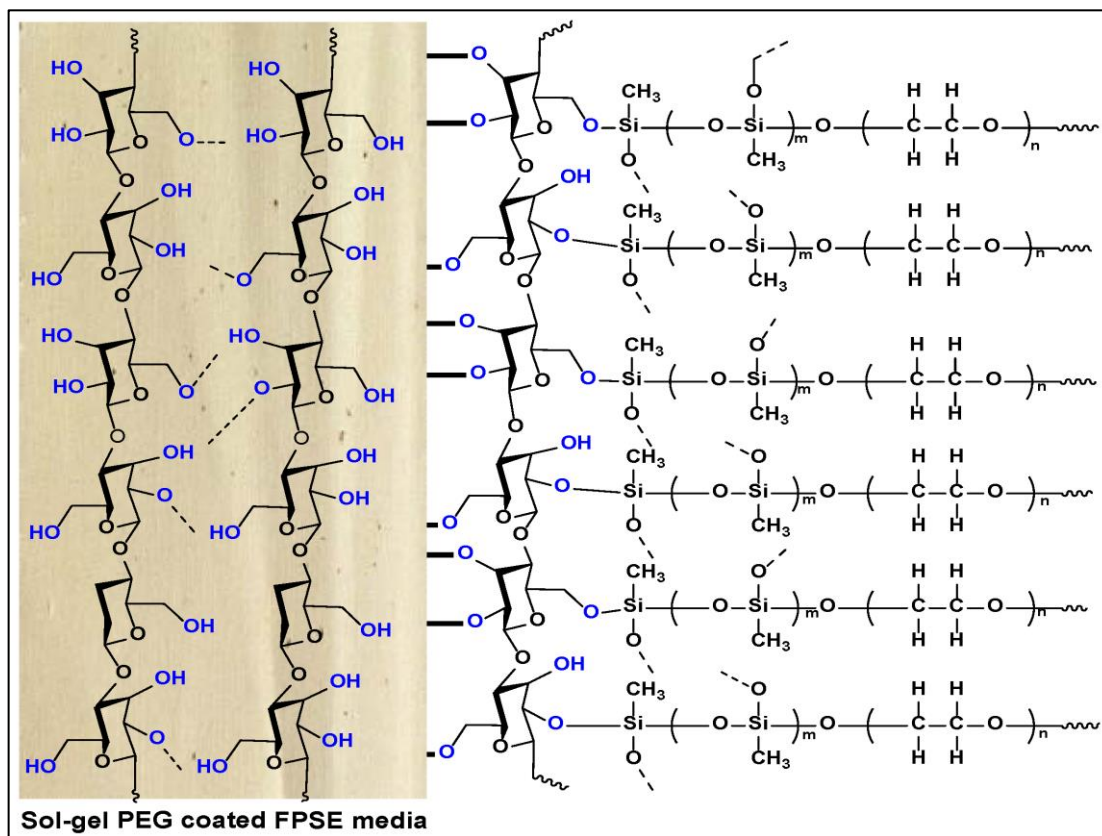
Η FPSE συνιστά μια περιβαλλοντικά βιώσιμη τεχνική μικροεκχύλισης, η οποία είναι πλήρως εναρμονισμένη με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας (Green Analytical Chemistry), καθώς η αξιοποίησή της μπορεί να περιορίσει σημαντικά την κατανάλωση οργανικών διαλυτών και ενεργειακών πόρων. Παράλληλα, επιδεικνύει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα, που εξηγούν το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με τη χρησιμοποίησή της. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι μειωμένες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό, η απλότητα εφαρμογής της, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των προσροφητικών μέσων και η εύκολη ρύθμιση της προσροφητικής τους χωρητικότητας, μέσω της τροποποίησης των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των προσροφητικών μεμβρανών. Το υφιστάμενο πεδίο εφαρμογών της παρούσας τεχνικής είναι ιδιαίτερα ευρύ και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών σε βιολογικά δείγματα, όπως ολικό αίμα, πλάσμα, μητρικό γάλα και ούρα, τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων και λοιπών ρύπων σε αστικά λύματα, καθώς και στον προσδιορισμό συστατικών των τροφίμων [18–21].

Η ιδιαιτερότητα της τεχνικής FPSE έγκειται στο γεγονός ότι επιτυγχάνει να συνδυάσει σε μία ενιαία πλατφόρμα ορισμένα σημαντικά γνωρίσματα από τις επικρατέστερες τεχνικές μικροεκχύλισης στο πεδίο της βιοανάλυσης, όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction) και η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro Extraction). Αναλυτικότερα, η εφαρμογή της τεχνικής FPSE προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό την τεχνική SPME άμεσης εμβάπτισης (direct-immersion SPE), καθώς και στις δύο περιπτώσεις οι συσκευές μικροεκχύλισης παραμένουν βυθισμένες στο αναλυόμενο δείγμα σε όλη τη διάρκεια της προκατεργασίας, με σκοπό την επίτευξη μιας θερμοδυναμικής ισορροπίας κατανομής των αναλυτών ανάμεσα στην υγρή φάση του δείγματος και την προσροφητική επίστρωση (equilibrium-based extraction). Παράλληλα, η πορώδης δομή των sol-gel επιστρώσεων σε συνδυασμό με την πορώδη φύση των υφασμάτινων

υποστρωμάτων δημιουργούν ένα εκτεταμένο δίκτυο πόρων ποικίλης διαμέτρου το οποίο διατρέχει όλη την έκταση των προσροφητικών μέσων και επιτρέπει την ανάπτυξη ενός συστήματος ροής που προσομοιάζει αυτό της τεχνικής SPE, οδηγώντας στη σημαντική ενίσχυση της κινητικής της εκχύλισης. Ο συνδυασμός των παραπάνω γνωρισμάτων συμπληρωματικά με την υψηλή προσροφητική χωρητικότητα των sol-gel επιστρώσεων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας τεχνικής προκατεργασίας υψηλής ευελιξίας, η οποία είναι ικανή υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις να επιτύχει μια ολοκληρωμένη εκχύλιση υπό συνθήκες ισορροπίας [22].

## 2.2 Επισκόπηση προσροφητικών μέσων FPSE

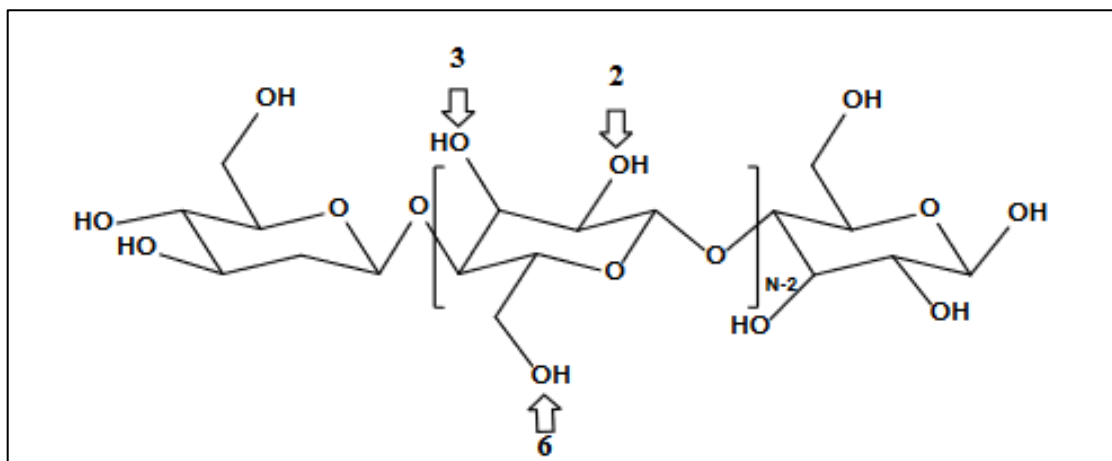
Η βασική δομή ενός προσροφητικού μέσου FPSE αποτελείται από το υφασμάτινο υπόστρωμα και την sol-gel επίστρωση, η οποία συνιστά ένα υβριδικό οργανικο-ανόργανο προσροφητικό πολυμερές (σχήμα 2.1).



**Σχήμα 2.1** Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός προσροφητικού μέσου FPSE με υπόστρωμα κυτταρίνης και επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης. Το οργανικό πολυμερές βρίσκεται ενσωματωμένο στο ανόργανο πολυμερές δίκτυο[23]

Το ανόργανο τμήμα του πολυμερούς προκύπτει από τον πολυμερισμό πρόδρομων χημικών ενώσεων (precursors), ύστερα από ενεργοποίησή τους μέσω υδρόλυσης με έναν όξινο ή βασικό καταλύτη. Ως πρόδρομες ενώσεις συνήθως χρησιμοποιούνται ανόργανα ή οργανικά τροποποιημένα ανόργανα μόρια, όπως τα αλκοξειδία του πυριτίου (πχ. methyltrimethoxysilane-MTMS, phenyltriethoxysilane-PhTES), τα οποία αποτελούν και μια από τις ευρύτερα

χρησιμοποιούμενες κατηγορίες πρόδρομων ενώσεων στην τεχνολογία sol-gel. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των τελικών χαρακτηριστικών της sol-gel επίστρωσης διαδραματίζει το είδος του χρησιμοποιούμενου καταλύτη, καθώς αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους για τη ρύθμιση του πορώδους στο πολυμερές δίκτυο. Η χρήση όξινων καταλυτών οδηγεί στον σχηματισμό γραμμικών πολυμερών με περιορισμένο βαθμό διακλάδωσης, ενώ η χρήση καταλυτών με βασικές ιδιότητες οδηγεί στη δημιουργία έντονα διακλαδισμένα πολυμερών με αυξημένο πορώδες [24]. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων πολυσυμπύκνωσης, τα οργανικά πολυμερή ενσωματώνονται με τυχαίο τρόπο στο αναπτυσσόμενο ανόργανο δίκτυο, οδηγώντας στη δημιουργία ενός άμορφου υβριδικού πολυμερούς. Αντίστοιχα, η πρόσδεση της sol-gel επίστρωσης στην επιφάνεια του υποστρώματος επιτυγχάνεται μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες του υποστρώματος και του πολυμερούς, οδηγώντας στην ανάπτυξη ενός εκτεταμένου δικτύου ομοιοπολικών δεσμών. Ως υποστρώματα στη τεχνική FPSE χρησιμοποιούνται υφασμάτινα μέσα, αποτελούμενα από φυσικές ίνες (κυτταρίνη, κερατίνη) ή συνθετικές (πολυεστέρας, πολυαμίδιο, υαλοβάμβακας κοκ), με τα υποστρώματα κυτταρίνης να αποτελούν τη συνηθέστερη επιλογή, καθώς επιτρέπουν την εύκολη πρόσδεση της sol-gel επίστρωσης στην επιφάνειά τους (σχήμα 2.2).



**Σχήμα 2.2** Χημική δομή του μορίου της κυτταρίνης και επισήμανση των λειτουργικών ομάδων που συμμετέχουν στις αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης κατά την επικάλυψη μέσω της τεχνολογίας sol-gel [23].

Η αξιοποίηση της τεχνολογίας sol-gel για την επικάλυψη των υφασμάτινων υποστρωμάτων, προσδίδει στα προσροφητικά μέσα FPSE ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία απλοποιούν σε μεγάλο βαθμό την εφαρμογή της τεχνικής και επιτρέπουν τη διενέργεια εκχυλίσεων υψηλής εκλεκτικότητας. Το σημαντικότερο ίσως εξ αυτών έγκειται στην αυξημένη χημική και μηχανική σταθερότητα που προσδίδει η ομοιοπολική σύνδεση των sol-gel επιστρώσεων στην επιφάνεια του υφασμάτινου υποστρώματος, δεδομένου ότι καθιστά εφικτή τόσο την άμεση εμφύτευση των συσκευών FPSE σε δείγματα που φέρουν ακραίες τιμές pH (εύρος 1-13), όσο και την άμεση επαφή τους με ένα μεγάλο αριθμό οργανικών διαλυτών ποικίλης πολικότητας, χωρίς την εκδήλωση φαινομένων υδρόλυσης ή διόγκωσης της πολυμερικής επίστρωσης. Παράλληλα, η

τεχνολογία sol-gel χαρακτηρίζεται από υψηλή αναπαραγωγιμότητα και διασφαλίζει την απαιτούμενη σταθερότητα στην απόδοση της εκχύλισης μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων συσκευών FPSE. Τέλος, είναι δυνατή η εύκολη παραμετροποίηση ορισμένων κρίσιμων χαρακτηριστικών του πολυμερούς δικτύου, όπως το πορώδες και η ειδική επιφάνεια επαφής, ρυθμίζοντας προσεκτικά την αναλογία και το είδος των σχετικών αντιδραστηρίων, καθώς επίσης και τις πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα σύνθεση των υβριδικών πολυμερικών επιστρώσεων[23].

### 2.3 Εφαρμογή τεχνικής FPSE

Η FPSE αποτελεί μια ευέλικτη τεχνική προκατεργασίας δείγματος και ως εκ τούτου είναι δυνατή η υιοθέτηση μιας σειράς διαφορετικών προσεγγίσεων για την εφαρμογή της, ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε μεθόδου. Ωστόσο, στην πλειονότητα των δημοσιευμένων μεθόδων ακολουθείται η προσέγγιση της άμεσης εμβάπτισης (direct immersion FPSE), που αποτελείται από τέσσερα διακριτά στάδια, τα οποία συνοψίζονται περιληπτικά στα ακόλουθα σημεία:

- Στάδια 1<sup>ο</sup>-Έκπλυση με σύστημα οργανικών διαλυτών: Το υφασμάτινο μέσο εμβαπτίζεται σε σύστημα οργανικών διαλυτών, με σκοπό την εμβροχή της sol-gel επίστρωσης και την απομάκρυνση τυχόν εναπομεινάντων υπολειμμάτων προσροφημένων ουσιών. Οι συνηθέστεροι οργανικοί διαλύτες έκπλυσης είναι το ACN και η MeOH σε αναλογία όγκων 50/50 v/v.
- Στάδιο 2<sup>ο</sup> -Έκπλυση με H<sub>2</sub>O: Το υφασμάτινο μέσο εκπλένεται με χρήση υδροβολέα και ακολούθως εμβαπτίζεται σε H<sub>2</sub>O κατάλληλης καθαρότητας (πχ Type 1 H<sub>2</sub>O) με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων οργανικών διαλυτών πριν το στάδιο της κατεργασίας δείγματος.
- Στάδιο 3<sup>ο</sup> – Εκχύλιση: Το προσροφητικό μέσο εισάγεται άμεσα στον περιέκτη που φέρει το αναλυόμενο δείγμα, χωρίς τη διαμεσολάβηση ενδιάμεσων σταδίων προκατεργασίας όπως κατακρήμνιση πρωτεϊνών ή φυγοκέντρωση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάδευση του αναλυόμενου δείγματος κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, καθώς έχει αποδειχθεί πως αυξάνει σημαντικά το ρυθμό αλληλεπίδρασης των αναλυτών με το πολυμερές προσροφητικό δίκτυο, μειώνοντας κατά συνέπεια τον απαιτούμενο χρόνο για την ολοκλήρωση της εκχύλισης.
- Στάδιο 4<sup>ο</sup> – Εκρόφηση: Κατά το στάδιο της εκρόφησης λαμβάνει χώρα η ανάκτηση των αναλυτών από το προσροφητικό μέσο με κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος ενδέχεται να ποικίλει ανάλογα με την πολικότητα και τα λοιπά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι δυνατή η άμεση παραλαβή των αναλυτών στον διαλύτη εργασίας της χρωματογραφικής μεθόδου, γεγονός το οποίο

απλοποιεί τη μέθοδο προκατεργασίας σε σημαντικό βαθμό, δεδομένου ότι αποφεύγεται η διενέργεια πρόσθετων σταδίων συμπίκνωσης και ανασύστασης.

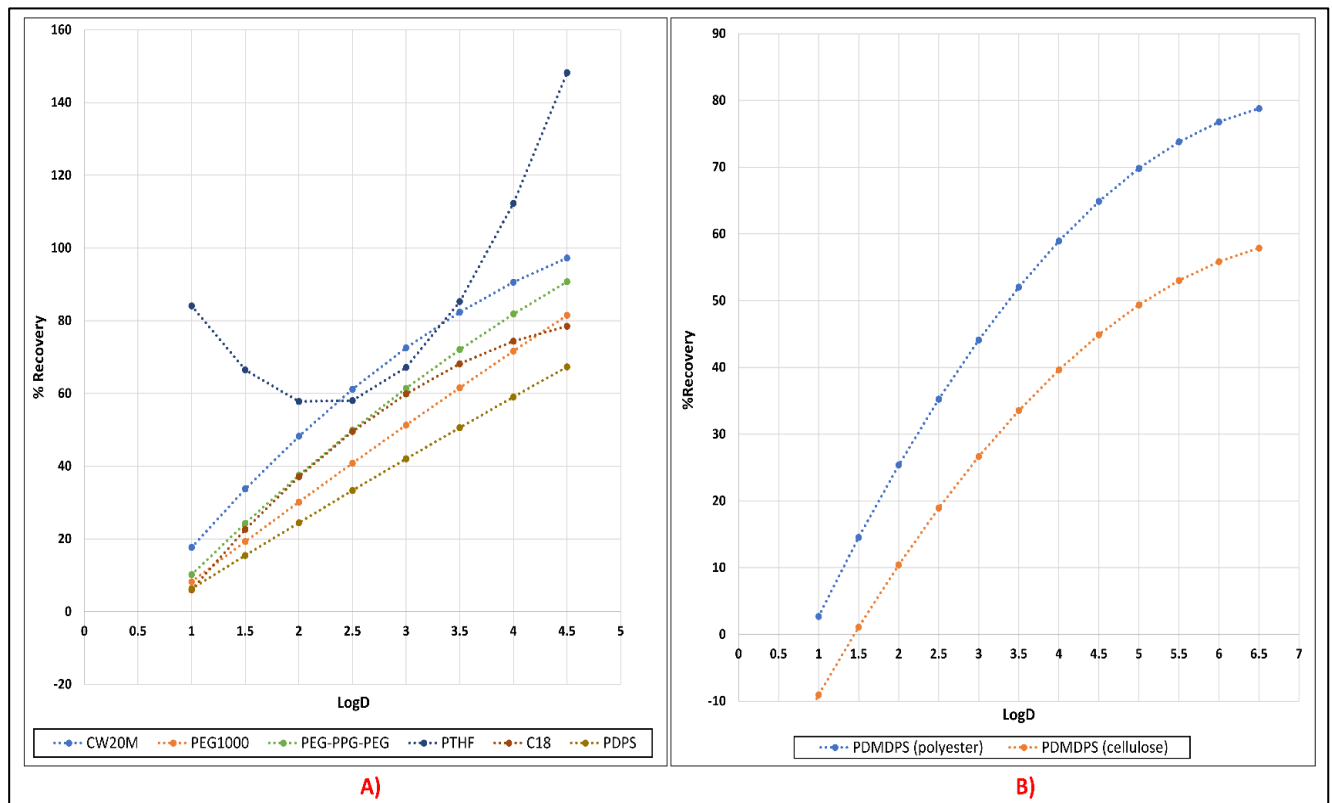
Καθένα από τα προαναφερόμενα στάδια λαμβάνει χώρα σε ξεχωριστό υάλινο περιέκτη και ο χειρισμός των προσροφητικών μέσων μεταξύ των επιμέρους σταδίων συνιστάται να πραγματοποιείται με κατάλληλο εργαστηριακό εξοπλισμό από αδρανή υλικά (πχ. εργαστηριακές λαβίδες), με σκοπό την αποφυγή εκδήλωσης φαινομένων επιμόλυνσης στο αναλυόμενο δείγμα.

#### **2.4 Ανάπτυξη μεθόδου FPSE**

Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού μέσου αποτελεί το πρώτο και καθοριστικότερο βήμα για την επιτυχή ανάπτυξη μιας μεθόδου FPSE. Ιδιαίτερη έμφαση στο σημείο αυτό θα πρέπει να δοθεί μεταξύ άλλων και στις ιδιότητες του υφασμάτινου υποστρώματος, καθώς έχει διαπιστωθεί πως πέραν της sol-gel επίστρωσης συμμετέχει και αυτό ενεργά στην προσρόφηση των αναλυτών. Συνεπώς, είναι δυνατή η εκδήλωση σημαντικών διαφορών ως προς την εκλεκτικότητα και την απόδοση της εκχύλισης μεταξύ προσροφητικών μέσων που φέρουν όμοιες sol-gel επιστρώσεις αλλά διαφέρουν ως προς την πολικότητα και τις χημικές ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος, γεγονός το οποίο διαφοροποιεί ουσιαστικά την τεχνική FPSE από τις υπόλοιπες τεχνικές μικροεκχύλισης και περιπλέκει σημαντικά τη διαδικασία επιλογής του βέλτιστου μέσου για την ανάκτηση των αναλυτών. Για παράδειγμα, η χρήση υποστρωμάτων κυτταρίνης αυξάνει την πολικότητα των προσροφητικών μέσων και ενισχύει τη συγκράτηση πολικών αναλυτών μέσω της ανάπτυξης πρόσθετων αλληλεπιδράσεων προσρόφησης ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες των αναλυτών και τις υπολειπόμενες μη-τροποποιημένες ομάδες υδροξυλίου του μορίου της κυτταρίνης. Αντίθετα, η χρήση υποστρωμάτων πολυεστέρα προσδίδει μειωμένη πολικότητα στα προσροφητικά μέσα και συνιστάται στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η ανάκτηση λιπόφιλων ενώσεων.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν δημοσιευθεί ορισμένες ερευνητικές εργασίες σχετικά με την κατανόηση και την πρόβλεψη της εκλεκτικότητας των ευρύτερα χρησιμοποιούμενων προσροφητικών μέσων, οδηγώντας στην ανάκτηση χρήσιμων μαθηματικών μοντέλων, τα οποία επιτρέπουν τον υπολογισμό της θεωρητικής ανάκτησης των αναλυτών συναρτήσει της πολικότητάς τους (σχήμα 2.3). Η αξιοποίηση των σχετικών μοντέλων μπορεί να επιταχύνει σημαντικά την πορεία ανάπτυξης νέων μεθόδων FPSE καθώς και να συμβάλλει στην εξοικονόμηση εργαστηριακών πόρων, μέσω του περιορισμού των πειραματικών δοκιμών που διενεργούνται κατά το στάδιο των προκαταρκτικών πειραμάτων με σκοπό την εύρεση του βέλτιστου υποστρώματος και της ενδεικνυόμενης sol-gel επίστρωσης για τη συγκράτηση των αναλυτών. Εφόσον επιλεγεί το βέλτιστο προσροφητικό μέσο στη συνέχεια συνιστάται η διερεύνηση της επίδρασης μιας σειράς πειραματικών συνθηκών στην απόδοση της εκχύλισης, με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων

τιμών των επιμέρους παραμέτρων που θα επιτρέψουν τη μεγιστοποίηση της ανάκτησης. Ορισμένες από τις συνηθέστερες πειραματικές παραμέτρους που εξετάζονται κατά το στάδιο αυτό περιλαμβάνουν τον χρόνο εκχύλισης, τη συγκέντρωση άλατος, τον ρυθμό ανάδευσης δείγματος, τον χρόνο εκρόφησης, το είδος του διαλύτη παραλαβής, καθώς και το pH του μέσου εκχύλισης. Συνολικά, η διερεύνηση της επίδρασης των εξεταζόμενων παραμέτρων μπορεί να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με την καθιερωμένη μονοπαραμετρική προσέγγιση μεταβολής κατά έναν παράγοντα (OFAT), καθώς και μέσω της αξιοποίησης τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiments). Η τελευταία προσέγγιση υπερτερεί σημαντικά έναντι της πρώτης καθώς συνάδει σε μεγάλο βαθμό με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας και παράλληλα παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη θεώρηση του εξεταζόμενου συστήματος, επιτρέποντας την ανίχνευση φαινομένων αλληλεπίδρασης μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων, τα οποία ενδέχεται να επηρεάσουν την εγκυρότητα των εξαγόμενων συμπερασμάτων και να οδηγήσουν σε ανεπαρκώς ανεπτυγμένες μεθόδους σε περίπτωση που δε γίνουν αντιληπτά από τον ερευνητή.



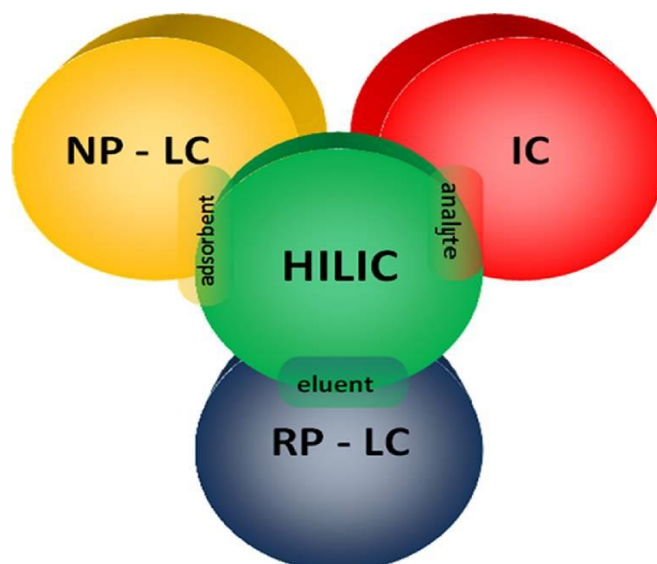
**Σχήμα 2.3** Α) Γραφική απεικόνιση μαθηματικών μοντέλων για την εκτίμηση της θεωρητικής ανάκτησης σε προσροφητικά μέσα με υποστρώματα κυτταρίνης και διαφορετικές sol-gel επιστρώσεις. Β) Γραφική απεικόνιση μαθηματικών μοντέλων για την εκτίμηση της θεωρητικής ανάκτησης

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Υγροχρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC)

### 3.1 Εισαγωγή

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πολικών συστατικών αποτελεί συχνά μια απαιτητική διαδικασία, καθώς η μειωμένη συγκράτηση που επιδεικνύουν τα υδρόφιλα μόρια στην τεχνική της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-LC) καθιστά επιβεβλημένη την υιοθέτηση εναλλακτικών προσεγγίσεων για την ανάλυσή τους. Για παράδειγμα, η ανάλυση ενώσεων που φέρουν ιοντίσιμες λειτουργικές ομάδες μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας (IC) ή την τεχνική ζεύγους ιόντων (IP), η οποία επιτρέπει την ανάλυσή τους σε συστήματα αντιστρόφου φάσης με την προσθήκη κατάλληλων επιφανειοδραστικών αντιδραστηρίων. Αρκετά πιο απαιτητική και συχνά προβληματική είναι η ανάλυση πολικών ουδέτερων ενώσεων, καθώς η απουσία ιοντικών λειτουργικών ομάδων δεν επιτρέπει την εφαρμογή των παραπάνω τεχνικών. Μέχρι και τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα οι κύριες προσεγγίσεις που υιοθετήθηκαν για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων αναλυτών περιλάμβαναν την τεχνική της χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP-LC) και την εφαρμογή τεχνικών παραγωγοποίησης για την μετατροπή τους σε άπολα προϊόντα. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες προσεγγίσεις είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και εμφανίζουν σημαντικούς περιορισμούς, όπως η μειωμένη διαλυτότητα των αναλυτών στις μη-υδατικές κινητές φάσεις της NP-LC, που δυσχεραίνουν την αξιοποίησή τους σε μεγάλο βαθμό[25].

Το κενό αυτό μεταξύ των χρωματογραφικών τεχνικών συμπληρώνει η τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC), η οποία επιδεικνύει συμπληρωματική εκλεκτικότητα ως προς την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ενδείκνυται για την ανάλυση ενώσεων μέτριας και υψηλής πολικότητας. Στην τεχνική HILIC χρησιμοποιούνται πολικά υποστρώματα για τη συγκράτηση των αναλυτών, κατά αντιστοιχία με την τεχνική NP-LC, ενώ οι κινητές φάσεις προσομοιάζουν αυτές της τεχνικής αντίστροφης φάσης και αποτελούνται από υδατο-οργανικά μείγματα διαλυτών με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή. Παράλληλα, η τεχνική HILIC επιτρέπει την ανάλυση ιοντικών ενώσεων, εμφανίζοντας σημαντικές ομοιότητες με την τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας ως προς το πεδίο εφαρμογών (σχήμα 3.1) [26].



**Σχήμα 3.1** Η χρωματογραφία HILIC συμπληρώνει το κενό μεταξύ των κύριων χρωματογραφικών τεχνικών, ενώ παράλληλα εμφανίζει κοινά στοιχεία με καθεμιά από αυτές [26].

Οι πρώτες εφαρμογές της HILIC ήταν περιορισμένες και αφορούσαν κυρίως στον προσδιορισμό υδατανθράκων, αμινοξέων και πεπτιδίων σε φυσικά προϊόντα και βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, από το 2003 και μετά σημειώθηκε ραγδαία αύξηση στον αριθμό των σχετικών εφαρμογών, με αποτέλεσμα πλέον η χρωματογραφία HILIC να χαρακτηρίζεται συχνά ως τεχνική εκλογής για την ανάλυση πολικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα που τη χαρακτηρίζουν, όπως η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης ουδέτερων και ιοντικών ενώσεων, καθώς και η υψηλή συμβατότητα των κινητών φάσεων της με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών. Σήμερα, το υφιστάμενο πεδίο εφαρμογών της HILIC περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τον προσδιορισμό ενώσεων με φαρμακευτική δράση σε βιολογικά δείγματα και σε φαρμακευτικά προϊόντα, την ανάλυση ενώσεων τοξικολογικού και περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος σε διάφορα υλικά μήτρας, ενώ αρκετές εφαρμογές εντοπίζονται και στο πεδίο της χημείας τροφίμων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η αξιοποίηση της HILIC στη μεταβολομική, καθώς η ορθογωνιότητα που εμφανίζει με την RP-HPLC επιτρέπει δισδιάστατους διαχωρισμούς μέσω της συνδυαστικής χρήσης των δύο τεχνικών, παρέχοντας έτσι πολύτιμες πληροφορίες για τα αναλυόμενα δείγματα [26,27].

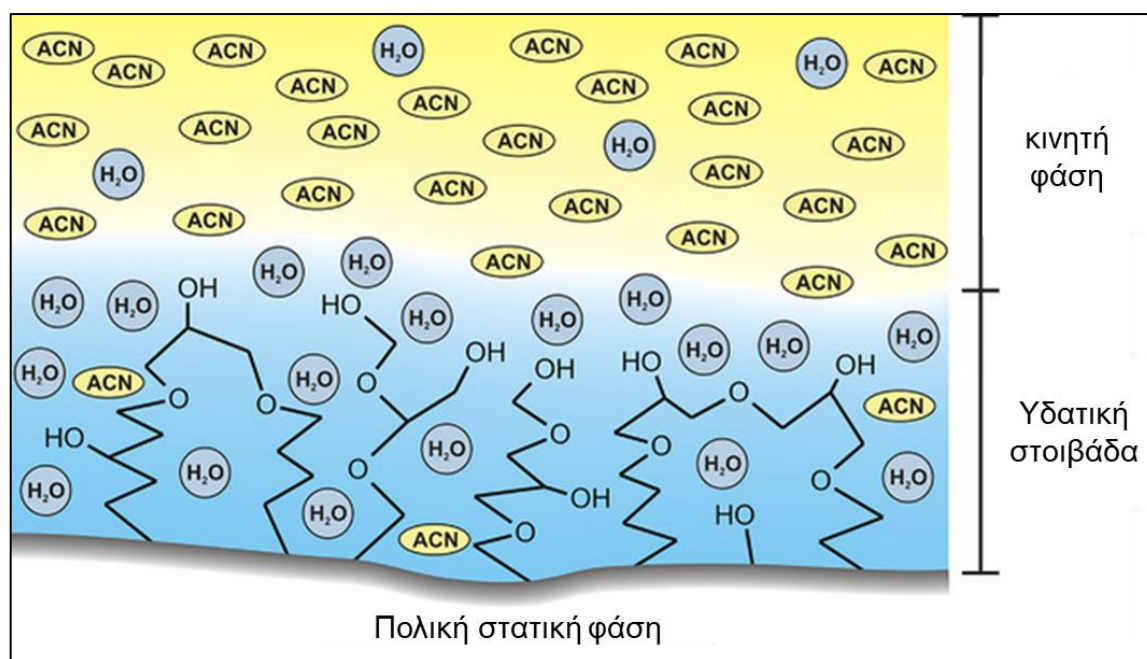
### 3.2 Μηχανισμός

Η χρωματογραφία HILIC χαρακτηρίζεται συχνά, για ιστορικούς κυρίως λόγους, ως μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP-HPLC), λόγω των κοινών στοιχείων που εντοπίζονται ως προς τη χρήση πολικών στατικών φάσεων. Ωστόσο, οι δύο τεχνικές δεν πρέπει να συγχέονται, καθώς έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός συγκράτησης της HILIC είναι σημαντικά πιο περίπλοκος και διαφέρει σημαντικά από τον μηχανισμό συγκράτησης της NP-HPLC όπου η συγκράτηση των αναλυτών επιτυγχάνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω του μηχανισμού προσρόφησης [26].



Αναλυτικότερα, οι πολικές στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη HILIC προσροφούν μόρια νερού στην επιφάνειά τους και έτσι σχηματίζεται μία υδατική ψευδοστοιβάδα, που βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πλούσια σε οργανικό τροποποιητή κινητή φάση (σχήμα 3.2). Κατά αυτόν τον τρόπο συντελείται η ανάπτυξη ενός συστήματος υγρών φάσεων διαφορετικής πολικότητας, που επιτρέπει τη συγκράτηση των αναλυτών μέσω της αποκατάστασης μιας θερμοδυναμικής ισορροπίας κατανομής ανάμεσα στον κύριο όγκο της κινητής φάσης και την ημι-ακίνητοποιημένη υδατική ψευδοστοιβάδα, η οποία δρα ως αναπόσπαστο μέρος της στατικής φάσης [28,29]. Η θεωρία της υδατικής ψευδοστοιβάδας κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην κατανόηση του μηχανισμού συγκράτησης που διέπει τη HILIC και διατυπώθηκε από τον ερευνητή Alpert το 1990 [30]. Η πειραματική επιβεβαίωση της σχετικής θεωρίας πραγματοποιήθηκε το 2011 από τους ερευνητές Irgum K. και Wikberg E., οι οποίοι ανέδειξαν μέσω της διεξαγωγής πειραμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δευτερίου ( $^2\text{H-NMR}$ ) την ύπαρξη μιας ομάδας μορίων νερού τα οποία εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες από τα μόρια νερού της κινητής φάσης, ως αποτέλεσμα της ισχυρής αλληλεπίδρασής τους με τις λειτουργικές ομάδες του πληρωτικού υλικού [31].

Πέραν όμως από την ανάπτυξη φαινομένων κατανομής έχει αποδειχθεί ότι στη HILIC επικρατεί μεικτός μηχανισμός συγκράτησης ο οποίος περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και μια σειρά σημαντικών δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες μπορεί να αναπτυχθούν ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες της στατικής φάσης και τα μόρια των αναλυτών. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι αλληλεπιδράσεις προσρόφησης, όπως δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, κατά αντιστοιχία με τη χρωματογραφία κανονικής φάσης, ενώ στην περίπτωση που εντοπίζονται ιοντίσιμες λειτουργικές ομάδες είναι δυνατή η ανάπτυξη ελκτικών ή απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η συνεισφορά της κάθε αλληλεπίδρασης στο μηχανισμό συγκράτησης της HILIC δεν είναι σταθερή αλλά καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών, τη σύσταση της κινητής φάσης και τα χαρακτηριστικά της στατικής φάσης, γεγονός το οποίο εξηγεί τις σημαντικές διακυμάνσεις στον μηχανισμό συγκράτησης και στην εκλεκτικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού που παρατηρούνται όταν μεταβάλλεται κάποιος από τους παραπάνω παράγοντες [32].



**Σχήμα 3.2** Σχηματική απεικόνιση της υδατικής ψευδοστοιβάδας που σχηματίζεται στην επιφάνεια μιας πολικής στατικής φάσης [33].

### 3.3 Κινητές φάσεις

Οι κινητές φάσεις στη HILIC αποτελούν, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, δυαδικά ύδατο-οργανικά μείγματα διαλυτών με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή. Οι σχετικές κινητές φάσεις προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό τις κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, με τη διαφορά ότι η εκλουστική ισχύς των διαλυτών είναι ανεστραμμένη και ακολουθεί την εξής σειρά:

**Ακετόνη < Ακετονιτρίλιο < Τετραϋδροφουράνιο < Ισοπροπανόλη < Αιθανόλη < Μεθανόλη < Νερό**

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το νερό αποτελεί τον ισχυρότερο διαλύτη στη HILIC, με την περιεκτικότητά του στην κινητή φάση ( $\phi_{H_2O}$ ) να κυμαίνεται από 5 έως 40%, ενώ σε κάθε περίπτωση συνιστάται η διατήρηση ενός ποσοστού 2-3% με σκοπό την επαρκή ενυδάτωση της στατικής φάσης και τον σχηματισμό μιας υδατικής ψευδοστοιβάδας επαρκούς πάχους για τη συγκράτηση των αναλυτών. Μεταβολές στην τιμή της περιεκτικότητας του  $H_2O$  επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τόσο την εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης, όσο και το πάχος της σχηματιζόμενης υδατικής στοιβάδας, ενώ παράλληλα μπορεί να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές και στον μηχανισμό συγκράτησης των αναλυτών. Σε χαμηλά ποσοστά  $\phi_{H_2O}$  ευνοείται η ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων προσρόφησης, λόγω του μειωμένου πάχους της υδατικής ψευδοστοιβάδας και της εγγύτητας των αναλυτών στη στατική φάση, ενώ για υψηλά ποσοστά  $\phi_{H_2O}$ , η συγκράτηση των αναλυτών πραγματοποιείται κυρίως μέσω της ανάπτυξης αλληλεπιδράσεων κατανομής.

Από το σύνολο των διαθέσιμων διαλυτών, το ακετονιτρίλιο (ACN) αποτελεί τον ευρύτερα χρησιμοποιούμενο οργανικό τροποποιητή στη HILIC καθώς επιδεικνύει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως μειωμένη εκλουστική ισχύ και άριστη διαλυτότητα με το νερό σε οποιαδήποτε αναλογία, ενώ παράλληλα στερείται της δυνατότητας ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου, ευνοώντας κατά συνέπεια την ισχυρή αλληλεπίδραση των μορίων νερού με τη στατική φάση. Η χρήση πρωτικών διαλυτών, όπως είναι οι αλκοόλες, είναι περιορισμένη και συνήθως αποφεύγεται, καθώς η δυνατότητα ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου με τα μόρια  $H_2O$  οδηγεί σε διατάραξη της υδατικής ψευδοστοιβάδας, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγκράτηση των αναλυτών και την αλλοίωση των χαρακτηριστικών συμμετρίας των χρωμογραφικών κορυφών [27]. Η υψηλή περιεκτικότητα των κινητών φάσεων σε οργανικό τροποποιητή προσδίδει στη HILIC αυξημένη συμβατότητα με τη φασματομετρία μαζών και ιδιαίτερα με την τεχνική ESI, καθώς η υψηλή πτητικότητα των σχετικών κινητών φάσεων διευκολύνει τη διαδικασία σχηματισμού των φορτισμένων σταγονιδίων και αυξάνει την απόδοση του ιοντισμού. Παράλληλα, παρατηρούνται σημαντικά χαμηλότερες τιμές πίεσης σε σχέση με τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, λόγω του χαμηλότερου ιξώδους των κινητών φάσεων, επιτρέποντας την εφαρμογή μεγαλύτερου ρυθμού ροής στην κινητή φάση [34].

Η προσθήκη αλάτων στην κινητή φάση είναι επιβεβλημένη στη HILIC και συστήνεται από τους κατασκευαστές στατικών φάσεων, καθώς συμβάλλει στον περιορισμό της έντασης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με σκοπό την αποφυγή φαινομένων ανεπαρκούς συγκράτησης ή καθυστερημένης έκλουσης των αναλυτών και βελτιώνει σημαντικά τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Πέραν από τον περιορισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, η χρήση αλάτων στην κινητή φάση επιφέρει αύξηση του πάχους της υδατικής στοιβάδας, λόγω της ενσωμάτωσης εφυδατομένων ιόντων σε αυτή, επηρεάζοντας θετικά τη συγκράτηση ουδέτερων πολικών αναλυτών. Οι τυπικές συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών διαλυμάτων στην κινητή φάση κυμαίνονται από 5 έως 100 mM και καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες της στατικής φάσης. Το μυρμηκικό αμμώνιο (AMF), το οξικό αμμώνιο (AMA) και το όξινο ανθρακικό αμμώνιο (AMBC) αποτελούν τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα άλατα σε εφαρμογές HILIC, λόγω της επαρκούς διαλυτότητας τους σε κινητές φάσεις με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή και της συμβατότητάς που επιδεικνύουν με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών. Η χρήση φωσφορικών αλάτων συνήθως αποφεύγεται λόγω της μειωμένης διαλυτότητας που παρουσιάζουν στις συνήθεις κινητές φάσεις, ωστόσο χρησιμοποιούνται περιστασιακά σε εφαρμογές HILIC με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) στις οποίες είναι επιθυμητή η ανίχνευση των αναλυτών σε χαμηλές τιμές μήκους κύματος.

### 3.4 Στατικές φάσεις

Τα πρώτα χρόνια από την ανακάλυψη της HILIC ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων στατικών φάσεων ήταν ιδιαίτερα περιορισμένος, με αποτέλεσμα η πλειονότητα των διενεργούμενων διαχωρισμών να πραγματοποιείται σε αναλυτικές στήλες κανονικής φάσης. Ωστόσο, από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα και εξής σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή εξειδικευμένων αναλυτικών στηλών για εφαρμογές HILIC, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην εκθετική αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος γύρω από τη συγκεκριμένη τεχνική και την αναγωγή της σε μέθοδο εκλογής για την ανάλυση πολικών ενώσεων. Ως αποτέλεσμα, σήμερα ένας σημαντικός αριθμός κατάλληλων στατικών φάσεων είναι πλέον διαθέσιμος, καθιστώντας εφικτή την διενέργεια χρωματογραφικών διαχωρισμών υψηλής εκλεκτικότητας. Ανάλογα με το φορτίο των ενσωματωμένων λειτουργικών τους ομάδων, οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία HILIC μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες [35,36]:

1. **Ουδέτερες στατικές φάσεις:** Οι στατικές φάσεις αυτής της κατηγορίας φέρουν λειτουργικές ομάδες, οι οποίες είναι μη-φορτισμένες στο τυπικό εύρος pH 3-8 των χρησιμοποιούμενων κινητών φάσεων. Οι ουδέτερες στατικές φάσεις συνιστούν την μεγαλύτερη οντότητα από το σύνολο των επιμέρους κατηγοριών και εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια ως προς τις ιδιότητες των λειτουργικών τους ομάδων. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται ορισμένες στατικές φάσεις υψηλής δημοτικότητας, όπως οι στατικές φάσεις με ομάδες αμιδίου, οι στατικές φάσεις με ομάδες διόλης και οι στατικές φάσεις με ενσωματωμένες ομάδες κυκλοδεξτρινών, με τις τελευταίες να βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή στον διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων. Η συγκράτηση των αναλυτών πραγματοποιείται κυρίως μέσω της ανάπτυξης φαινομένων κατανομής και δεσμών υδρογόνου, με αποτέλεσμα οι εν λόγω στατικές φάσεις να χαρακτηρίζονται από χαμηλή εκλεκτικότητα.
2. **Φορτισμένες στατικές φάσεις:** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν στατικές φάσεις που φέρουν λειτουργικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να ιοντιστούν σε συγκεκριμένες περιοχές τιμών pH. Ως εκ τούτου, είναι δυνατή η ανάπτυξη ισχυρών κατά περίπτωση ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, που προσδίδουν στις συγκεκριμένες στατικές φάσεις αυξημένη εκλεκτικότητα. Οι στατικές φάσεις αυτής της κατηγορίας διαιρούνται περαιτέρω ανάλογα με το φορτίο τους σε αρνητικά και θετικά φορτισμένες. Η μη τροποποιημένη πηκτή πυριτίας αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της πρώτης κατηγορίας, καθώς οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης (Si-OH) διαθέτουν όξινες ιδιότητες και ιοντίζονται πλήρως σε τιμές  $5 < \text{pH}$ . Αντίθετα οι στατικές φάσεις με ενσωματωμένες ομάδες αμινών (πχ προπυλαμίνης, ιμιδαζολίου, τριαζολίου) αποτελούν τυπικά παραδείγματα θετικά φορτισμένων στατικών φάσεων.

3. **Επαμφοτερίζουσες στατικές φάσεις:** Οι συγκεκριμένες στατικές φάσεις φέρουν ομάδες αμφολυτικών ιόντων στην επιφάνειά τους, στα μόρια των οποίων συνυπάρχει μια ανιοντική και μια κατιοντική λειτουργική ομάδα, οι οποίες είναι φορτισμένες σε όλο το εύρος των τιμών pH. Η στενή γειτνίαση των ετερώνυμα φορτισμένων ομάδων στο μόριο του αμφολύτη περιορίζει σημαντικά την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που μπορεί να αναπτυχθούν, με αποτέλεσμα να καθίστανται σημαντικά ασθενέστερες από αυτές των φορτισμένων στατικών φάσεων. Επιπλέον, ο προσανατολισμός των αμφολυτικών ομάδων στην επιφάνεια των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού καθορίζει την προσβασιμότητα των ιοντικών λειτουργικών ομάδων από τα μόρια των αναλυτών, προσδίδοντας εκλεκτικότητα στις αναπτυσσόμενες αλληλεπιδράσεις. Τέλος, οι επαμφοτερίζουσες στατικές φάσεις προσροφούν ισχυρά τα μόρια νερού στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υδατικών στοιβάδων αυξημένου πάχους. Σε αυτά τα συστήματα η συγκράτηση των αναλυτών πραγματοποιείται κυρίως μέσω φαινομένων κατανομής και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες αν και ασθενείς, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτικότητα που οι εν λόγω στατικές φάσεις επιδεικνύουν.

Ως πληρωτικά υλικά στην πλειονότητα των αναλυτικών στηλών HILIC χρησιμοποιούνται πορώδη και υμενοειδή σωματίδια αποτελούμενα από πηκτή πυριτίας κατάλληλης καθαρότητας, με μειωμένη περιεκτικότητα σε μεταλλικές προσμίξεις. Ακόμα, σε ορισμένες στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται σωματίδια πηκτής πυριτίας υβριδικής τεχνολογίας και πολυμερή σωματίδια με σκοπό τον περιορισμό ή την πλήρη εξάλειψη των δευτερευουσών σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων και τη διασφάλιση υψηλής ανθεκτικότητας σε ακραίες τιμές pH. Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η παραγωγή μονολιθικών στηλών HILIC, οι οποίες δεν αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια, αλλά συνιστούν ένα πολυμερισμένο τεμάχιο πυριτίας, στο οποίο εντοπίζεται ένα εκτεταμένο πορώδες δίκτυο [37].

## Κεφάλαιο 4ο Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments-DOE)

### 4.1 Εισαγωγή

Κατά το στάδιο ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου συνιστάται η διερεύνηση της επίδρασης ενός αριθμού πειραματικών παραμέτρων σε μία ή περισσότερες πειραματικές αποκρίσεις με σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών που θα εξασφαλίσουν την επίτευξη του επιθυμητού στόχου (πχ. αύξηση αναλυτικού σήματος, μεγιστοποίηση διαχωριστικότητας χρωματογραφικών κορυφών, μείωση χρόνου έκλουσης κ.ά.). Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, η πλειονότητα των αναλυτικών μεθόδων αναπτύσσεται ακολουθώντας τη μονοπαραμετρική μέθοδο μεταβολής κατά έναν παράγοντα (OFAT), σύμφωνα με την οποία οι εξεταζόμενες πειραματικές παράμετροι (παράγοντες) βελτιστοποιούνται ξεχωριστά, διατηρώντας παράλληλα σταθερές τις τιμές των υπολοίπων πειραματικών συνθηκών [38,39]. Η παραπάνω προσέγγιση χαρακτηρίζεται από αυξημένη απλότητα ως προς την εφαρμογή της, ωστόσο παρουσιάζει ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα, τα οποία σχετίζονται με την αδυναμία εκτίμησης των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων και την ισχυρή εξάρτηση των τελικών βέλτιστων συνθηκών από τις αρχικές πειραματικές παραμέτρους, οι οποίες επιλέγονται αυθαίρετα από τον ερευνητή. Παράλληλα, ο αριθμός των διενεργούμενων πειραμάτων αυξάνεται σημαντικά καθώς αυξάνονται οι παράγοντες προς βελτιστοποίηση, οδηγώντας σε σημαντική κατανάλωση εργαστηριακών και οικονομικών πόρων [40].

Η επίλυση των προαναφερόμενων προβλημάτων προϋποθέτει την υιοθέτηση μιας ορθολογικής προσέγγισης διεξαγωγής πειραμάτων και ερμηνείας των σχετικών λαμβανόμενων αποτελεσμάτων, προκειμένου να καταστεί εφικτή η διατύπωση έγκυρων και αντικειμενικών συμπερασμάτων αναφορικά με τη συμπεριφορά της εξεταζόμενης πειραματικής διεργασίας. Ως διεργασία νοείται η πορεία μέσω της οποίας τα εισερχόμενα δεδομένα (inputs) ενός συστήματος μετατρέπονται σε εξερχόμενα υπό την επίδραση ενός συνόλου ελεγχόμενων (controllable) και μη-ελεγχόμενων (uncontrollable) παραγόντων (σχήμα 4.1).



**Σχήμα 4.1** Γενικό μοντέλο σχηματικής αναπαράστασης διεργασίας

Ο πειραματικός σχεδιασμός (Design Of Experiments-DOE) αποτελεί μια στρατηγική προσέγγιση διεξαγωγής πειραμάτων, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους επιστημονικούς και βιομηχανικούς τομείς για την υποστήριξη του σχεδιασμού, της ανάπτυξης και της βελτιστοποίησης νέων προϊόντων, μεθόδων και διαδικασιών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αξιοποίησης ενός συνόλου στατιστικών εργαλείων, τα όποια επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση των σχέσεων αιτίου αποτελέσματος ανάμεσα στις ανεξάρτητες μεταβλητές (παράγοντες) και τις εξαρτώμενες πειραματικές αποκρίσεις του εξεταζόμενου συστήματος, μέσω της εδραίωσης κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων [41].

Εν αντιθέσει με τη μονοπαραμετρική προσέγγιση, ο πειραματικός σχεδιασμός επιτρέπει τη συστηματική διερεύνηση και την περιγραφή της συμπεριφοράς των εξεταζόμενων διεργασιών σε μία δεδομένη περιοχή του πειραματικού χώρου (experimental domain), μεταβάλλοντας κατά συστηματικό τρόπο τα επίπεδα των ελεγχόμενων παραγόντων, σύμφωνα με ένα προκαθορισμένο πλάνο πειραμάτων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη διερεύνηση της ύπαρξης πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων, καθώς επίσης τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατεύθυνσης των επιδράσεων τους στις εξεταζόμενες πειραματικές αποκρίσεις. Η αξιοποίηση κατάλληλων στατιστικών εργαλείων για την ανάλυση των λαμβανόμενων πειραματικών δεδομένων επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό του τυπικού σφάλματος εκτίμησης χωρίς να είναι αναγκαία η διενέργεια επαναλαμβανόμενων πειραμάτων σε κάθε σημείο της πειραματικής περιοχής, περιορίζοντας σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο και την κατανάλωση εργαστηριακών πόρων. [42]

Ο σχεδιασμός ενός αποτελεσματικού πειραματικού σχεδιασμού προϋποθέτει την εφαρμογή μιας σειράς διακριτών, αλληλοσυνδεόμενων ενεργειών, οι οποίες συνοψίζονται περιληπτικά στα παρακάτω βήματα [43].

1. Καθορισμός προβλήματος-στόχου
2. Καθορισμός των εξαρτώμενων μεταβλητών -Αποκρίσεων που θα μετρηθούν
3. Καθορισμός του αριθμού και των επιπέδων των εξεταζόμενων παραγόντων
4. Επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την περιγραφή του συστήματος
5. Διενέργεια πειραμάτων
6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

#### 4.2 Παραγοντικοί σχεδιασμοί (factorial designs)

Ως παραγοντικοί νοούνται σχεδιασμοί στους οποίους εξετάζεται ταυτόχρονα η επίδραση περισσοτέρων του ενός παραγόντων (factors), οι οποίοι υπεισέρχονται στο πείραμα σε τουλάχιστον 2 επίπεδα (levels). Εναλλακτικά, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα πειράματα ενός σχεδιασμού επιδεικνύουν παραγοντική δομή (factorial structure), όταν καθένα από αυτά ορίζει έναν μοναδικό συνδυασμό επιπέδων 2 ή περισσοτέρων παραγόντων [44].

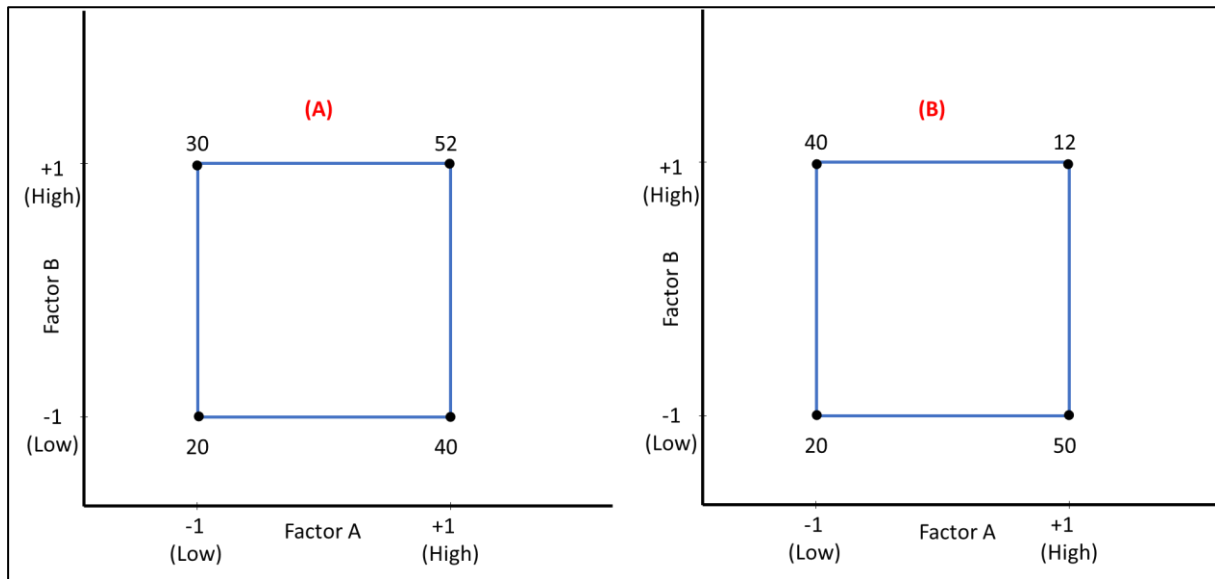
Στην περίπτωση που το πλάνο των πειραμάτων (πειραματική μήτρα) περιλαμβάνει το σύνολο των δυνατών συνδυασμών μεταξύ των επιπέδων των εξεταζόμενων παραγόντων, ο σχεδιασμός χαρακτηρίζεται ως πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (full factorial design). Για τη διενέργεια ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού (**k**) παραγόντων και (**p**) επιπέδων ανά παράγοντα, ο συνολικός αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων (**N**) προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$N = p^k$$

Η μελέτη της επίδρασης 2 παραγόντων, έστω A και B, κατά την οποία κάθε παράγοντας εξετάζεται σε 2 επίπεδα, ένα χαμηλό και ένα υψηλό που κωδικοποιούνται ως -1 και +1 αντίστοιχα, συνιστά την απλούστερη περίπτωση εφαρμογής ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού. Στην περίπτωση αυτή, από τον συνδυασμό μεταξύ των επιπέδων των παραγόντων προκύπτουν 4 πειράματα, τα οποία αντιστοιχούν σε ισάριθμα σημεία στον δισδιάστατο πειραματικό χώρο που ορίζουν τα επίπεδα των παραγόντων και καταλαμβάνουν τις κορυφές ενός τετραγώνου, όπως είναι εμφανές και στο αντίστοιχο διάγραμμα (διάγραμμα A) που παρατίθεται στο σχήμα 4.2. Από τις τιμές της πειραματικής απόκρισης που προκύπτουν ύστερα από τη διεξαγωγή των πειραμάτων μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος της κύριας επίδρασης των εξεταζόμενων παραγόντων A και B επί της εξαρτημένης μεταβλητής. Ως κύρια επίδραση (main effect) νοείται το μέγεθος της μεταβολής στην τιμή της πειραματικής απόκρισης που προκύπτει κατά τη μεταβολή του επιπέδου του εξεταζόμενου παράγοντα. Στην περίπτωση ενός παραγοντικού σχεδιασμού 2 επιπέδων μπορεί να εκτιμηθεί εύκολα μέσω του υπολογισμού της διαφοράς ανάμεσα στη μέση τιμή της απόκρισης που προκύπτει όταν ο εξεταζόμενος παράγοντας τίθεται στο υψηλό του επίπεδο ( επίπεδο +1) και τη μέση τιμή που προκύπτει όταν ο ίδιος παράγοντας βρίσκεται στο χαμηλό του επίπεδο (επίπεδο - 1). Συνεπώς το μέγεθος της επίδρασης του παράγοντα A μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:



$$A = \frac{50 + 42}{2} - \frac{20 + 30}{2} = 21$$

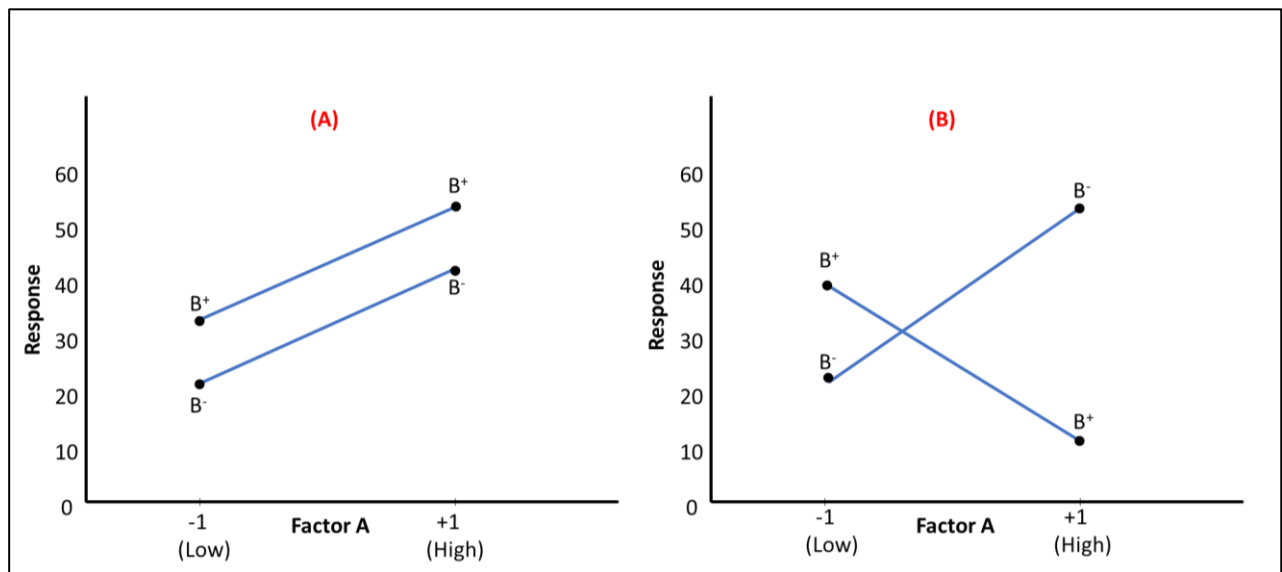


**Σχήμα 4.2** Απεικόνιση των τιμών της πειραματικής απόκρισης και των επιπέδων των παραγόντων ενός υποθετικού πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού 2 παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση (A) και με αλληλεπίδραση (B).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών υπερτερεί έναντι της μονοπαραμετρικής προσέγγισης μεταβολής κατά έναν παράγοντα καθώς επιτρέπει την ανίχνευση φαινομένων αλληλεπίδρασης, τα οποία εφόσον δεν γίνουν αντιληπτά από τον ερευνητή, ενδέχεται να υποβαθμίσουν την εγκυρότητα των εξαγόμενων συμπερασμάτων και να οδηγήσουν σε εσφαλμένες υποθέσεις σχετικά με την σημαντικότητα της επίδρασης των εξεταζόμενων παραγόντων. Το διάγραμμα B (σχήμα 4.2) συνιστά ένα ενδεικτικό παράδειγμα συστήματος δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση των παραγόντων A και B δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από το επίπεδο στο οποίο τίθεται ο άλλος παράγοντας κάθε φορά. Εάν στην προκειμένη περίπτωση υπολογιστεί η κύρια επίδραση του παράγοντα A όπως περιεγράφηκε προηγουμένως προκύπτει ότι:  $A = \frac{50+12}{2} - \frac{20+40}{2} = 1$ , το οποίο υποδηλώνει πως ο παράγοντας A δεν ασκεί πρακτικά καμία επίδραση στην πειραματική απόκριση. Ωστόσο, εάν εκτιμηθεί η επίδραση του παράγοντα A για κάθε επίπεδο του παράγοντα B ξεχωριστά διαπιστώνεται πως το παραπάνω συμπέρασμα δεν ευσταθεί, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι μια σημαντική αλληλεπίδραση είναι πιθανόν να οδηγήσει σε φαινόμενα κάλυψης (masking) της σημαντικότητας των επιδράσεων των εμπλεκόμενων παραγόντων. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η γνώση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των παραγόντων είναι συχνά πιο χρήσιμη από την αποκλειστική γνώση των κύριων επιδράσεων και άρα η εκτίμησή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ουσιαστική κατανόηση και τον έλεγχο των εξεταζόμενων συστημάτων.

Η έννοια της αλληλεπίδρασης μπορεί να αναπαρασταθεί γραφικά μέσω των ενδεικτικών διαγραμμάτων που παρατίθενται στο σχήμα 4.3, τα οποία αναπαριστούν την τιμή της πειραματικής

απόκριση συναρτήσει των επιπέδων του παράγοντα A και για κάθε επίπεδο του παράγοντα B, έτσι ώστε κάθε σημείο του διαγράμματος να περιγράφει έναν από τους 4 προαναφερόμενους συνδυασμούς επιπέδων μεταξύ των παραγόντων A και B. Στην περίπτωση εκείνη που δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων, από την ένωση των σημείων που αντιστοιχούν στα όμοια επίπεδα του παράγοντα B αναμένεται να προκύψουν 2 κατά προσέγγιση παράλληλες ευθείες (διάγραμμα A), ενώ αντιθέτως, όταν οι εξεταζόμενοι παράγοντες αλληλοεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους, οι προκύπτουσες ευθείες B- και B+ αναμένεται να εμφανίζουν σημαντικές αποκλίσεις από την παραλληλία (διάγραμμα B).



**Σχήμα 4.3** Διαγράμματα αλληλεπίδρασης ενός παραγοντικού σχεδιασμού 2 παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση (A) και με αλληλεπίδραση (B).

Τα παραπάνω συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των εξεταζόμενων παραγόντων και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων μπορεί να εξαχθούν εναλλακτικά μέσω της κατασκευής ενός μαθηματικού μοντέλου παλινδρόμησης για την περιγραφή της πειραματικής απόκρισης. Για παράδειγμα το μαθηματικό μοντέλο για έναν πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό της μορφής  $2^2$  μπορεί να γραφτεί ως εξής:

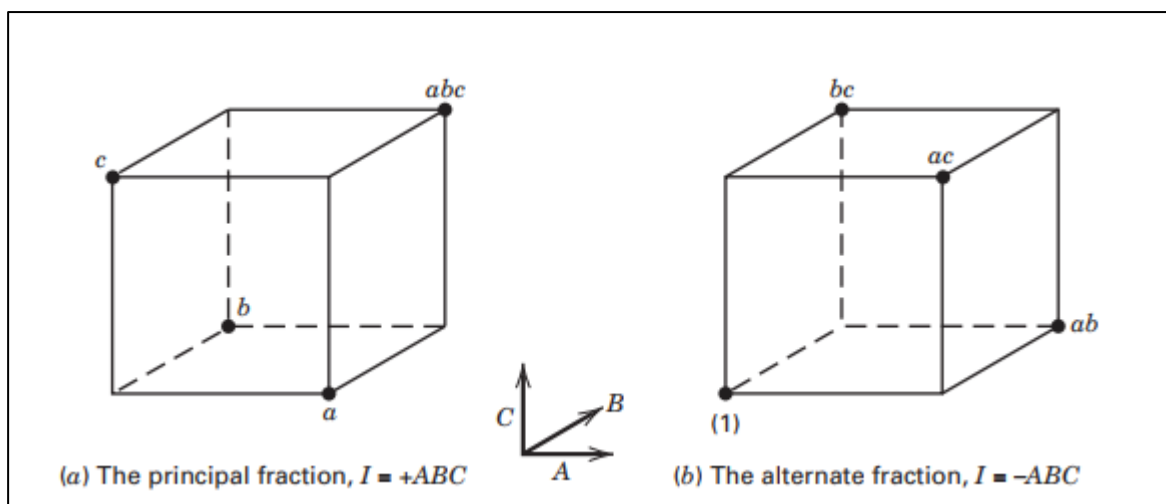
$$Y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_{12}\chi_1\chi_2 + \varepsilon$$

Στην παραπάνω εξίσωση ο όρος Y είναι η πειραματική απόκριση, η μεταβλητή  $\chi_1$  αντιπροσωπεύει τον παράγοντα A και η μεταβλητή  $\chi_2$  τον παράγοντα B αντίστοιχα, ενώ η μεταβλητή  $\chi_1\chi_2$  αναφέρεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων A-B και ο όρος  $\varepsilon$  αντιπροσωπεύει το τυχαίο σφάλμα. Εφόσον οι ανεξάρτητες μεταβλητές του μοντέλου αναφέρονται στις κωδικοποιημένες τιμές των εξεταζόμενων παραγόντων, οι συντελεστές  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_{12}$  θα είναι ενδεικτικοί της συνεισφοράς των αντίστοιχων παραμέτρων στην εξαρτημένη μεταβλητή. Επομένως μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί το μέγεθος και η κατεύθυνση των κύριων επιδράσεων και των

αλληλεπιδράσεων των παραγόντων επί της εξαρτημένης μεταβλητής επιτρέποντας την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για το εξεταζόμενο σύστημα [43–45].

#### 4.3 Κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις κύριες επιδράσεις των εξεταζόμενων παραγόντων και το σύνολο των αλληλεπιδράσεων όλων των τάξεων που περιγράφουν το εξεταζόμενο σύστημα. Ωστόσο, η διεξαγωγή ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού συχνά συνιστά μια μη-βιώσιμη προσέγγιση, καθώς ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων αυξάνεται δραματικά, αυξανόμενου του αριθμού των παραγόντων που εξετάζονται. Για παράδειγμα, η διενέργεια ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού 2 επιπέδων για τη μελέτη 7 παραγόντων θα απαιτούσε την διεξαγωγή συνολικά  $2^7 = 128$  πειραμάτων, οδηγώντας στην κατανάλωση ενός σημαντικού μέρους εργαστηριακών και οικονομικών πόρων. Παράλληλα, η γνώση των κύριων επιδράσεων των παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων δεύτερης τάξης στην πλειονότητα των περιπτώσεων επαρκεί για τον ικανοποιητικό χαρακτηρισμό του εξεταζόμενου συστήματος, δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις υψηλότερης τάξης συνήθως είναι αμελητέες και έτσι μπορούν να παραληφθούν χωρίς σημαντικό σφάλμα [44]. Οι παραπάνω πληροφορίες μπορεί να εξαχθούν μέσω της διεξαγωγής ενός στρατηγικά επιλεγμένου υποσυνόλου (κλάσματος) από την πειραματική μήτρα του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού. Οι εν λόγω σχεδιασμοί καλούνται κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί (fractional factorial design) και διατηρούν ένα ικανό σύνολο πληροφοριών για τον χαρακτηρισμό του εξεταζόμενου συστήματος, περιορίζοντας παράλληλα κατά το ήμισυ, ή και παραπάνω, τον αριθμό των απαιτούμενων πειραμάτων (σχήμα 4.4). Ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός 2 επιπέδων και  $p$  παραγόντων μπορεί να αναγραφεί υπό τη μορφή  $2^{p-k}$ , όπου ο όρος  $k$  αναφέρεται στο κλάσμα του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού που εκτελείται και ισούται με  $1/2^k$ .



**Σχήμα 4.4** Σχηματική αναπαράσταση των δύο κλασμάτων ενός  $2^{3-1}$  κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού.

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί κατηγοριοποιούνται σε ομάδες με βάση το κριτήριο της διακριτικής ικανότητας (Resolution), το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με το εάν λαμβάνουν χώρα φαινόμενα ταύτισης (confounding) των κύριων επιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων χαμηλότερης τάξης από αλληλεπιδράσεις όμοιας ή υψηλότερων τάξεων. Αναλυτικότερα, ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός χαρακτηρίζεται ως διακριτικής ικανότητας R όταν καμία επίδραση  $p$  παραγόντων δεν ταυτίζεται με άλλη επίδραση που περιέχει λιγότερους από  $R-p$  παράγοντες. Η διακριτική ικανότητα του εκάστοτε σχεδιασμού αναγράφεται ως δείκτης χρησιμοποιώντας λατινικούς αριθμούς (πχ  $2_{IV}^{8-2}$ ). Συνολικά, οι σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III, IV και V συνιστούν τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες ομάδες από το σύνολο των κλασματικών παραγοντικών σχεδιασμών και ορίζονται ως ακολούθως:

- **Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III:** Πρόκειται για σχεδιασμούς στους οποίους καμία κύρια επίδραση ( $p=1$ ) δεν αλληλοεπιδρά με άλλη κύρια επίδραση, αλλά οι κύριες επιδράσεις αλληλοεπιδρούν με τις αλληλεπιδράσεις δεύτερης τάξης ( $3-1$ ) και ορισμένες αλληλεπιδράσεις δεύτερης τάξης ενδέχεται να αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους.
- **Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας IV:** Πρόκειται για σχεδιασμούς στους οποίους καμία κύρια επίδραση δεν αλληλοεπιδρά με άλλη κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση δεύτερης τάξης, αλλά οι αλληλεπιδράσεις δεύτερης τάξης αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους.
- **Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας V:** Πρόκειται για σχεδιασμούς στους οποίους καμία κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση δεύτερης τάξης δεν αλληλοεπιδρά με καμία αλληλεπίδραση δεύτερης τάξης, ωστόσο οι τελευταίες αλληλοεπιδρούν με αλληλεπιδράσεις τριών παραγόντων.

## Κεφάλαιο 5ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (Diabetes mellitus type 2-T2DM)

### 5.1 Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης (diabetes mellitus) είναι μια ενδοκρινική πάθηση, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές στον μεταβολισμό και τη φυσιολογική ομοιόσταση των επιπέδων γλυκόζης αίματος, με αποτέλεσμα την προοδευτική εκδήλωση υπεργλυκαιμίας. Πρόκειται για τη συνηθέστερη από τις ενδοκρινικές παθήσεις, καθώς σύμφωνα με εκτιμήσεις προσβάλει περί το 10% των ενηλίκων και συνιστά την έκτη κατά σειρά αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Τα τελευταία χρόνια, η επίπτωση του διαβήτη αυξάνεται με ανησυχητικούς ρυθμούς, τόσο σε ανεπτυγμένες, όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες, με αποτέλεσμα την άσκηση σημαντικών πιέσεων στα εθνικά συστήματα υγείας και τις δομές πρωτοβάθμιας φροντίδας [46].

Ανάλογα με την παθοφυσιολογία της νόσου και τον βαθμό στον οποίον διαταράσσεται η ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας ο σακχαρώδης διαβήτης ταξινομείται σε 2 κύριους τύπους, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1), ο οποίος καλείται και ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), ο οποίος είναι γνωστός και ως μη-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης. Ο ΣΔ1 αποτελεί μια προοδευτικά εξελισσόμενη αυτοάνοση νόσο, η οποία εκδηλώνεται πρωτίστως σε άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στη διαμεσολαβούμενη από τα T-λεμφοκύτταρα καταστροφή των β-κυττάρων των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αδυναμία έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας, καθιστώντας αναγκαία την εξωγενή χορήγηση της ορμόνης για την επιβίωση των ασθενών. Αντιθέτως, ο ΣΔ2 χαρακτηρίζεται από σχεδόν φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης, σε συνδυασμό με μια ποικίλου βαθμού αντίσταση των περιφερικών ιστών στις δράσεις της ορμόνης και εμφανίζεται ως επί το πλείστον σε παχύσαρκους ασθενείς μέσης ηλικίας. Η συντριπτική πλειονότητα των διαβητικών ασθενών πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, με το σχετικό ποσοστό αυτών να ανέρχεται στο 85% επί των συνολικών περιστατικών [47].

### 5.2 Αιτιολογία

Ο ΣΔ2 παρουσιάζει μια πολυπαραγοντική αιτιολογία, η οποία περιλαμβάνει γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες σε συνδυασμό με ένα σύνολο παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τον σύγχρονο τρόπο ζωής και τις συνθήκες διαβίωσης. Από αυτούς, η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου καθώς όπως έχει διαπιστωθεί όλα τα παχύσαρκα άτομα (διαβητικά ή μη) αναμένεται να εμφανίζουν σε κάποιον βαθμό αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και ιδιαίτερα στα κύτταρα του λιπώδους ιστού. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα, ο καθιστικός τρόπος ζωής, η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων, η προχωρημένη ηλικία, το μεταβολικό σύνδρομο, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η παρουσία αθηροσκληρωτικών καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλοι ψυχοκοινωνικοί και οικονομικοί παράγοντες. Ο ΣΔ2 δεν παρουσιάζει μενδελιανό τρόπο

κληρονομικότητας, ωστόσο διαθέτει ισχυρή γενετική βάση, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την υψηλή συχνότητα (~50 %) προσβολής σε μονοζυγωτικά δίδυμα καθώς και από την αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης σε μέλη οικογενειών [46,48,49].

### 5.3 Συμπτώματα

Τα πρώιμα συμπτώματα του ΣΔ2 οφείλονται αρχικά στην προκαλούμενη υπεργλυκαιμία, η οποία επιφέρει κορεσμό στον μηχανισμό επαναπορρόφησης της γλυκόζης από τα νεφρικά σωληνάκια, με αποτέλεσμα την αύξηση της οσμωτικότητας του νεφρικού διηθήματος και την κατακράτηση ύδατος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση των ενδεικτικών συμπτωμάτων της πολυδιψίας και πολουρίας καθώς και την εκδήλωση σημείων αφυδάτωσης στον ασθενή. Η παρατεταμένη έκθεση του οργανισμού σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, ως αποτέλεσμα ανεπιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης ή καθυστερημένης διάγνωσης, οδηγεί προοδευτικά στην εμφάνιση των μακροχρόνιων επιπλοκών της νόσου, οι οποίες οφείλονται σε φαινόμενα αγγειακής βλάβης και συνήθως εκδηλώνονται εντός ενός χρονικού διαστήματος 10-20 χρόνων από την έναρξη του διαβήτη. Σε αυτές περιλαμβάνονται φαινόμενα αθηροσκλήρωσης των μεγάλων αγγείων (μακροαγγειοπάθεια), τα οποία ενισχύουν τον κίνδυνο εκδήλωσης εγκεφαλικών επεισοδίων και αθηροσκληρωτικής στεφανιαίας νόσου, καθώς και φαινόμενα απόφραξης των αγγείων μικρότερης διαμέτρου (μικροαγγειοπάθεια). Η μικροαγγειοπάθεια συνιστά μια μη-αναστρέψιμη παθολογική κατάσταση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αιμάτωσης των περιφερειακών ιστών (δέρμα, νεφροί, αμφιβληστροειδής κοκ) και είναι υπεύθυνη σε μεγάλο βαθμό για την υψηλή νοσηρότητα που χαρακτηρίζει τον ΣΔ2. Στα σημαντικότερα συμπτώματα του ΣΔ2 που σχετίζονται με τη μικροαγγειοπάθεια συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων η διαβητική νεφροπάθεια, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η διαβητική νευροπάθεια, η σεξουαλική δυσλειτουργία καθώς και η ανεπαρκής επούλωση τραυμάτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μη-ιώμενων ελκών, αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης γάγγραινας των άκρων και οστεομυελίτιδας [46,50,51].

### 5.4 Διάγνωση

Η μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος φλεβικού αίματος αποτελεί σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) τη μέθοδο αναφοράς για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης συνιστάται να διενεργείται αμέσως μετά τη συλλογή του δείγματος, ενώ σε περίπτωση που αυτό δεν είναι εφικτό, το δείγμα αίματος θα πρέπει να συλλέγεται σε ειδικά φιαλίδια παρουσία αναστολέων της γλυκόλυσης και να φυγοκεντρείται άμεσα με σκοπό την απομόνωση του πλάσματος, το οποίο καταψύχεται μέχρις ότου αναλυθεί.

Ο έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης συνήθως διενεργείται ύστερα από ολονύκτια νηστεία του ασθενούς, διάρκειας τουλάχιστον 8 ωρών και για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα ως υπεργλυκαιμικό θα πρέπει να εμφανίζει συγκέντρωση γλυκόζης μεγαλύτερη ή ίση των **126 mg/dL** (απουσία

συμπτωμάτων ο έλεγχος θα πρέπει να επαναλαμβάνεται το συντομότερο δυνατόν). Εάν δεν είναι εφικτή η επίτευξη ενός ικανού διαστήματος νηστείας, ο έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί ύστερα από την παρέλευση ενός χρονικού διαστήματος 2 ωρών από την per os χορήγηση προτυποποιημένου διαλύματος γλυκόζης στον ασθενή, κατά αντιστοιχία της δοκιμασίας ανοχής στην γλυκόζη. Στην περίπτωση αυτή ως υπεργλυκαιμικό χαρακτηρίζεται ένα δείγμα με τιμή γλυκόζης μεγαλύτερη ή ίση των **200 mg/dL**. Ωστόσο, εάν η παρουσία συμπτωμάτων της νόσου είναι έκδηλη (πχ. διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια) η διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί και μέσω μιας τυχαίας μέτρησης των επιπέδων γλυκόζης (τιμή ορίου  $\geq 200$  mg/dL).

Ένα άλλο διαγνωστικό κριτήριο, το οποίο προστέθηκε πρόσφατα στις αναθεωρημένες οδηγίες του Π.Ο.Υ. για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη είναι αυτό του ποσοστού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c), το οποίο αναφέρεται στο ποσοστό των μορίων αιμοσφαιρίνης που έχουν υποστεί μη-ειδική προσκόλληση μορίων γλυκόζης στην επιφάνειά τους, ως αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης αίματος. Δεδομένου ότι η μέση διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων κυμαίνεται από 90-120 μέρες, η συγκεκριμένη εξέταση αποτελεί μεταξύ άλλων και ένα χρήσιμο μέσο για την εκτίμηση της 24ωρης έκθεσης του ασθενούς σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας κατά το προαναφερόμενο χρονικό διάστημα. Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης απαιτείται η ανίχνευση τιμών HbA1c  $\geq 6,5\%$  [52,53].

## 5.5 Θεραπεία

Η αποτελεσματική διαχείριση του ΣΔ2 προϋποθέτει την υιοθέτηση μιας ολιστικής προσέγγισης, η οποία περιλαμβάνει διατροφικές παρεμβάσεις, αλλαγές στον τρόπο ζωής καθώς και τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής, με σκοπό την αποτροπή των οξέων επιπλοκών της υπεργλυκαιμίας και την καθυστέρηση της εκδήλωσης των ποικίλων επιπλοκών της μικροαγγειοπάθειας.

Αναμφίβολα, η σωματική άσκηση αποτελεί τη σημαντικότερη από τις μη-φαρμακευτικές παρεμβάσεις για τη θεραπεία του ΣΔ2 καθώς έχει διαπιστωθεί ότι είναι υπεύθυνη για μια σειρά ωφέλιμων βιοχημικών μεταβολών, όπως η επαγωγή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων, η ενίσχυση της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων και η αύξηση του πλήθους των διαμεμβρανικών υποδοχέων της γλυκόζης στους σκελετικούς μύες και τα λιποκύτταρα, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης των περιφερικών ιστών στις δράσεις της ινσουλίνης. Παράλληλα, συνιστάται η διατήρηση ενός υγιούς σωματικού βάρους, η διακοπή του καπνίσματος καθώς και η εφαρμογή μιας σειράς διατροφικών παρεμβάσεων, που εστιάζονται κυρίως στον περιορισμό της κατανάλωσης κορεσμένων λιπαρών και την αύξηση της πρόσληψης φυτικών ινών [48,51,54].

Παρά τα αδιαμφισβήτητα οφέλη των παραπάνω παρεμβάσεων ένα σημαντικό ποσοστό διαβητικών ασθενών δεν καταφέρνει να διατηρήσει αποτελεσματικά και επί μακρόν τα επίπεδα της γλυκόζης εντός φυσιολογικών ορίων, καθιστώντας αναγκαία σε αυτή την περίπτωση τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Τα φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία του ΣΔ2 συνιστούν μια

ευρεία και ετερογενή ομάδα φαρμακευτικών ουσιών και χαρακτηρίζονται ως χορηγούμενοι από του στόματος υπογλυκαιμικοί παράγοντες (oral hypoglycemic agents). Η αντιυπεργλυκαιμική δράση των φαρμάκων αυτών πραγματοποιείται μέσω ενός συνόλου διαφορετικών μηχανισμών δράσης, που περιλαμβάνει την επαγωγή της έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας, τη μείωση της αντίστασης των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης καθώς και την αναστολή της απορρόφησης γλυκόζης από τον αυλό του λεπτού εντέρου. Εν συντομία, οι δραστικές ουσίες των χορηγούμενων από του στόματος υπογλυκαιμικών παραγόντων ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

- Σουλφονουλουρίες
- Διγουανίδια
- Θειαζολιδινεδιόνες
- Μεγλιτινίδια
- Αναστολείς της α-γλυκοζιδάσης
- Αναστολείς της διπεπτιδυλ-πεπτιδάσης 4 (DDP4)
- Αναστολείς του συμεταφορέα γλυκόζης-νατρίου 2 (SGLT2)

Σε περιπτώσεις όπου η χρήση των παραπάνω υπογλυκαιμικών παραγόντων δεν επιφέρει τον επιθυμητό γλυκαιμικό έλεγχο ενδέχεται να είναι απαραίτητη και η συμπληρωματική χορήγηση ινσουλίνης με σκοπό την αποτελεσματικότερη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης αίματος.

## **5.6 Θειαζολιδινεδιόνες (Thiazolidinediones)**

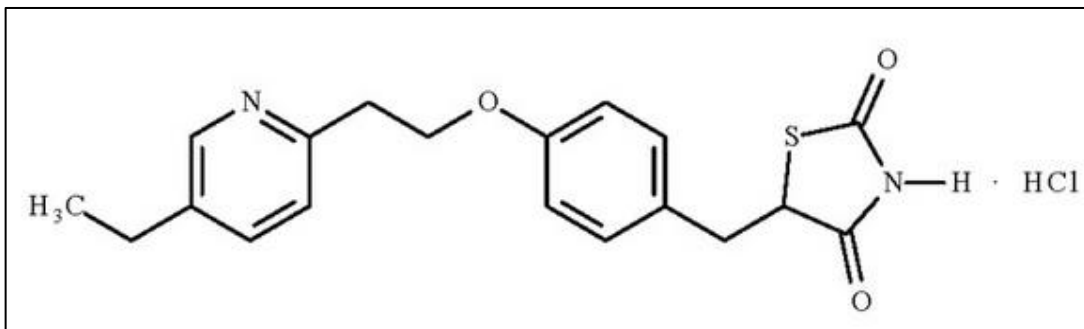
Η θεραπευτική ομάδα των θειαζολιδινεδιονών προέκυψε ύστερα από την τυχαία διαπίστωση της υπογλυκαιμικής δράσης της ουσίας ciglitazone, ενός δομικού αναλόγου της κλοφιμπράτης, το οποίο βρισκόταν υπό μελέτη για την επίδραση του στα λιπίδια. Η παρούσα κατηγορία υπογλυκαιμικών παραγόντων περιλαμβάνει τις δραστικές ουσίες troglitazone, rosiglitazone και pioglitazone. Ωστόσο, η ουσία troglitazone αποσύρθηκε από την κυκλοφορία το 2000 λόγω της συσχητικής της χρήσης της με σοβαρά περιστατικά ηπατοτοξικότητας, ενώ το 2010 ο ευρωπαϊκός οργανισμός φαρμάκων (EMA) ανέστειλε την άδεια κυκλοφορίας της ουσίας rosiglitazone βασιζόμενος σε μια μεγάλη αναδρομική ανάλυση 42 τυχαίοποιημένων κλινικών δοκιμών, η οποία συμπέρανε την ύπαρξη αυξημένου κινδύνου πρόκλησης ισχαιμικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων, όπως στηθάγχης και εμφράγματος του μυοκαρδίου.

### **5.6.1 Pioglitazone**

Η δραστική ουσία pioglitazone αποτελεί επί της ουσίας τον κύριο εκπρόσωπο της ομάδας των θειαζολιδινεδιονών και συνταγογραφείται συστηματικά στην καθημερινή κλινική πράξη για τη διαχείριση του ΣΔ2. Η επίδραση της στα επίπεδα της γλυκόζης αίματος οφείλεται στη μείωση της αντίστασης των περιφερικών ιστών (σκελετικοί μύες, λιπώδης ιστός) και του ήπατος στις δράσεις της ινσουλίνης καθώς και στη μείωση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης. Η ουσία pioglitazone



χρησιμοποιείται υπό τη μορφή του υδροχλωρικού της άλατος (σχήμα 5.1) και διατίθεται εμπορικά με την ονομασία ACTOS (πρωτότυπο σκεύασμα) , ενώ πλέον είναι διαθέσιμος και ένας σημαντικός αριθμός γενοσήμων φαρμάκων και φαρμακοτεχνικών μορφών συνδυασμού με άλλους υπογλυκαιμικούς παράγοντες. Κατά το χρονικό διάστημα 2000-2005 αποτέλεσε ένα από τα ευρύτερα συνταγογραφούμενα φάρμακα για την θεραπεία του ΣΔ2, ωστόσο τα τελευταία χρόνια η χρήση του έχει περιοριστεί αισθητά, λόγω του αυξημένου κινδύνου πρόκλησης σοβαρών περιστατικών συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας. Η αμερικανική διαβητολογική εταιρία (ADA) συστήνει τη χρήση του pioglitazone ως παράγοντα δεύτερης ή τρίτης γραμμής για τη διαχείριση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.



**Σχήμα 5.1** Χημική δομή του υδροχλωρικού άλατος της ουσίας pioglitazone

Το υδροχλωρικό άλας του pioglitazone είναι μια άοσμη λευκή κρυσταλλική σκόνη που σχηματίζει άχρωμα πρίσματα ύστερα από ανακρυστάλλωση με αιθανόλη. Είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, μέτρια διαλυτό στην αιθανόλη και πολύ διαλυτό στο διμεθυλοφορμαμίδιο [55].

### 5.6.2 Μηχανισμός δράσης

Η μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη που παρατηρείται κατά τη θεραπευτική αγωγή με pioglitazone οφείλεται στην αγωνιστική του δράση επί των πυρηνικών υποδοχέων PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferators Activated Receptors), οι οποίοι αποτελούν μέλη της υπερ-οικογένειας των στεροειδικών και θυροειδικών πυρηνικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς PPAR $\gamma$  βρίσκονται σε αφθονία κυρίως στον λιπώδη ιστό, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα μακροφάγα και το ήπαρ ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωσή τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη και στους σκελετικούς μύες των παχύσαρκων διαβητικών ασθενών. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών από τους ενδογενείς προσδέτες τους, στους οποίους συγκαταλέγονται τα λιπαρά οξέα και ορισμένα παράγωγα προσταγλανδινών και λευκοτριενίων είναι γνωστό πως επιφέρει μια σειρά βιοχημικών μεταβολών που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων, όπως η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, η προαγωγή της λιπογένεσης καθώς και αύξηση της πρόσληψης λιπαρών οξέων. Κατά αντίστοιχο τρόπο, η πρόσδεση του φαρμάκου στον υποδοχέα οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής μιας σειράς γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και στις διαδικασίες πρόσληψης γλυκόζης και λιπαρών

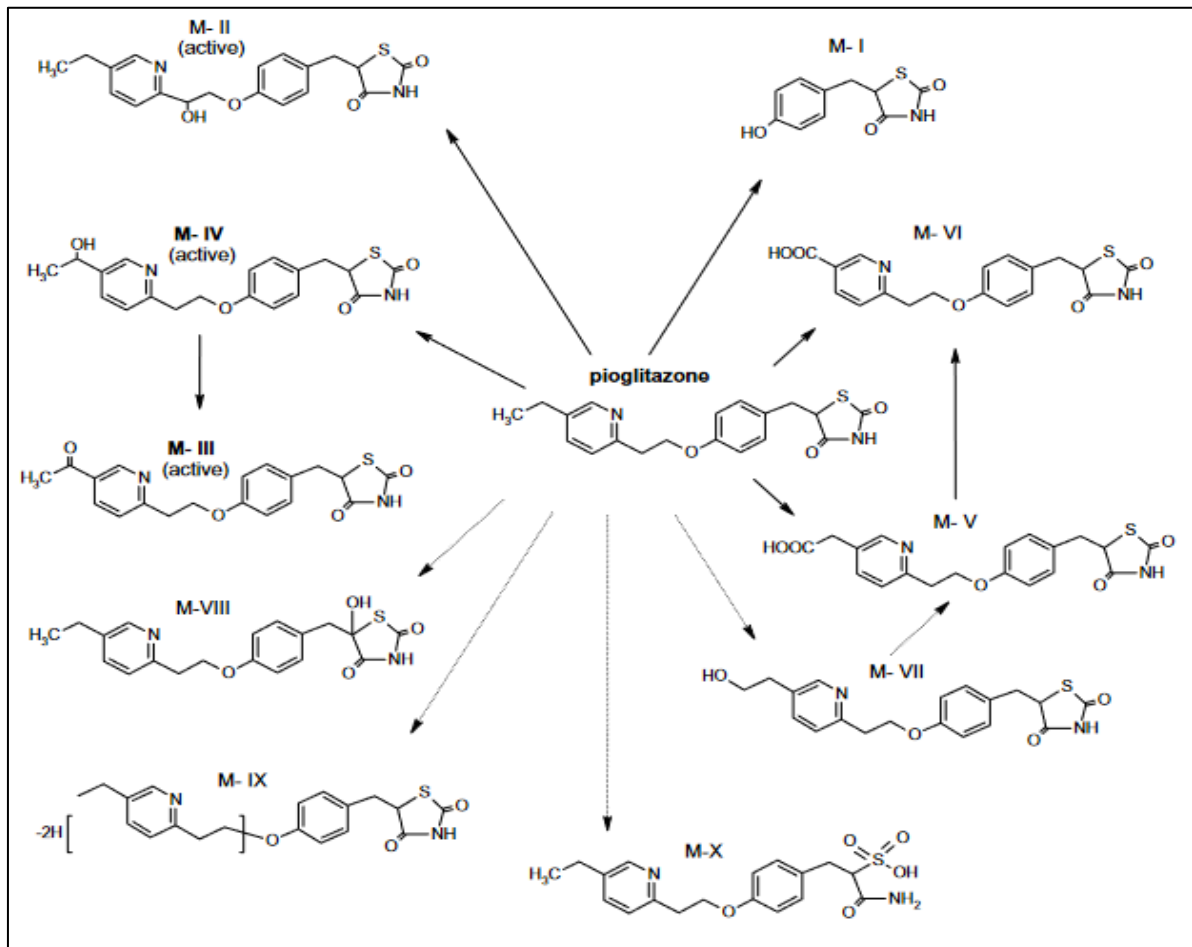
οξέων από τα κύτταρα. Σε αυτές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς της γλυκόζης GLUT-1 και GLUT-4, η λιποπρωτεϊνική λιπάση, η πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων και η φωσφοενολοπυροσταφυλική κινάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της πρόσληψης γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς και τη μείωση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, ως αποτέλεσμα αναστολής της γλυκονεογένεσης. Λόγω της προκαλούμενης ευαισθητοποίησης των ιστών στις δράσεις της ινσουλίνης, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τη μείωση της δοσολογίας της εξωγενώς χορηγούμενης ορμόνης, σε περιπτώσεις συνδυαστικής αγωγής pioglitazone και σκευασμάτων ινσουλίνης. Επιπλέον, πέραν της αγωνιστικής του δράσης επί των υποδοχέων PPAR $\gamma$ , το pioglitazone είναι αγωνιστής των υποδοχέων PPAR $\alpha$ , οι οποίοι εντοπίζονται στον φαιό λιπώδη ιστό, τους σκελετικούς μύες και σε ορισμένα μείζονα όργανα όπως οι νεφροί, το ήπαρ και η καρδιά. Οι υποδοχείς PPAR $\alpha$  εμπλέκονται σε σημαντικά βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την ομοίωση των λιπιδίων, όπως η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών, η πρόσληψη λιπαρών οξέων και η  $\beta$ -οξειδωση των λιπών, γεγονός το οποίο επεξηγεί τις ευεργετικές επιδράσεις του pioglitazone στο λιπιδικό προφίλ των ασθενών, όπως η μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και η αύξηση της χοληστερόλης HDL, χωρίς την ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της λιποπρωτεϊνής χαμηλής πυκνότητας (LDL) [56–58].

### 5.6.3 Απορρόφηση και κατανομή

Η φαρμακοκινητική του pioglitazone δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υγιείς εθελοντές και τους πάσχοντες από ΣΔ2. Αναλυτικότερα, μετά από την per os χορήγηση του φαρμάκου, η δραστική ουσία απορροφάται ταχύτατα και η μέγιστη συγκέντρωση της στο πλάσμα επιτυγχάνεται εντός 2 ωρών, ενώ η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της ανέρχεται στο 83%. Η λήψη τροφής μπορεί να επιβραδύνει ελαφρώς την απορρόφηση του pioglitazone, με αποτέλεσμα τα μέγιστα επίπεδα πλάσματος να επιτυγχάνονται ύστερα από 3-4 ώρες από τη χορήγηση. Ωστόσο, η παράμετρος AUC (Area Under the Curve), η οποία είναι ενδεικτική της συστηματικής έκθεσης δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο καταστάσεων (σίτισης και νηστείας), γεγονός που υποδηλώνει ότι η λήψη τροφής δεν επηρεάζει τη συνολική βιοδιαθεσιμότητα. Για την επίτευξη σταθερών επιπέδων στο πλάσμα απαιτείται η λήψη του φαρμάκου για διάστημα 4-7 ημέρων και η τιμή των επιπέδων της φαρμακοδυναμικής ουσίας καθώς και των προκυπτόντων μεταβολιτών της εξαρτάται άμεσα από τη χορηγούμενη δόση, ενώ σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση του pioglitazone στο πλάσμα δεν φαίνεται να υπερβαίνει τα 2000 ng mL<sup>-1</sup>. Σε μια ελεγχόμενη φαρμακοκινητική μελέτη, κατά την εφάπαξ και επαναλαμβανόμενη χορήγηση σκευάσματος pioglitazone 45 mg σε ασθενείς με ΣΔ2 επιτεύχθηκαν τιμές C<sub>max</sub> 1053 ( $\pm$  357) και 890 ( $\pm$  382) ng mL<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Το pioglitazone επιδεικνύει εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση (97-99%) με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη, γεγονός το οποίο εξηγεί την ιδιαίτερα χαμηλή τιμή του όγκου κατανομής του, η οποία ανέρχεται στα 0,63 L/kg [59,60].

#### 5.6.4 Μεταβολισμός και απέκκριση

Ο μεταβολισμός του pioglitazone λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και περιλαμβάνει φαινόμενα υδροξυλίωσης και οξειδωσης των μεθυλενικών του ομάδων από διάφορα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450, με κυριότερα το CYP2C8, CYP2C9 και CYP3A4, οδηγώντας στο σχηματισμό 5 κύριων μεταβολιτών (M-I, M-II, M-III, M-IV, M-V) εκ των οποίων οι 3 (M-II, M-III, M-IV) είναι φαρμακολογικά δραστικοί. Από αυτούς οι μεταβολίτες M-IV και M-II συνιστούν τα κύρια προϊόντα του μεταβολισμού και τα επίπεδά τους στο πλάσμα είναι συγκρίσιμα ή και μεγαλύτερα από αυτά της μητρικής ουσίας. Πέραν των 5 κύριων μεταβολιτών που εντοπίζονται στον άνθρωπο, ακόμη 4 δευτερεύοντες μεταβολίτες έχουν ταυτοποιηθεί σε *in vitro* πειράματα και σε ζώα (σχήμα 5.2).



**Σχήμα 5.2** Παρουσίαση των κύριων μεταβολιτών του Pioglitazone που προκύπτουν στον άνθρωπο και των δευτερευόντων μεταβολιτών (στικτή γραμμή) που έχουν απομονωθεί *in vitro* [61].

Δεδομένου του αυξημένου ηπατικού μεταβολισμού του pioglitazone είναι πιθανή η εκδήλωση σημαντικών φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων κατά τη συγχορήγηση με άλλες ουσίες που δρουν είτε ως επαγωγείς είτε ως αναστολείς των προαναφερόμενων ισοενζύμων. Κατά τη συγχορήγηση pioglitazone με gemfibrozil (αναστολέας του ισοενζύμου CYP2C8) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της δραστικής ουσίας στο πλάσμα και αύξηση της παραμέτρου AUC κατά 248%. Αντίθετα, η συγχορήγηση pioglitazone με rifampicin (επαγωγέας του CYP2C8) είχε ως αποτέλεσμα

τη μείωση των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα και την ελάττωση της παραμέτρου AUC κατά 54%. Ύστερα από *per os* χορήγηση του φαρμάκου, το 15-30 % της χορηγηθείσας δόσης απομακρύνεται μέσω των ούρων με τη μορφή μεταβολιτών, ενώ η νεφρική απομάκρυνση της μητρικής ουσίας είναι πρακτικά αμελητέα. Το εναπομείναν ποσοστό του φαρμάκου εκκρίνεται στη χολή, είτε ως μητρική ουσία είτε με τη μορφή μεταβολιτών, και απομακρύνεται μέσω των κοπράνων. Ο μέσος χρόνος κάθαρσης του pioglitazone κυμαίνεται από 3 έως 7 ώρες, ενώ οι ενεργοί του μεταβολίτες παρουσιάζουν βραδύτερο ρυθμό απομάκρυνσης. [56,57,62].

#### 5.6.5 Δοσολογία-Ενδείξεις

Η χορήγηση του pioglitazone πραγματοποιείται εφάπαξ ημερησίως σε δόσεις των 15, 30 ή 45 mg, καθώς ο αυξημένος χρόνος ημιζωής των δραστικών μεταβολιτών του φαρμάκου διασφαλίζει παρατεταμένη διάρκεια δράσης. Η λήψη τροφής δεν επηρεάζει τη συνολική βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και συνεπώς είναι δυνατή η λήψη του τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μεταξύ των γευμάτων. Η χορήγηση pioglitazone έχει λάβει έγκριση ως μονοθεραπεία, καθώς και ως διπλή και τριπλή αγωγή, σε συνδυασμό με μετφορμίνη και κάποιον εκπρόσωπο από τη θεραπευτική ομάδα των σουλφονουλουριών. Ακόμα, είναι δυνατή η συγχορήγηση pioglitazone μαζί με ινσουλίνη, σε περιπτώσεις που η μονοθεραπεία με ινσουλίνη δεν επιφέρει τον επιθυμητό γλυκαιμικό έλεγχο και παράλληλα δεν ενδείκνυται η χορήγηση μετφορμίνης, λόγω δυσανεξίας ή άλλων αντενδείξεων [57].

#### 5.6.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η κατακράτηση υγρών αποτελεί μια από τις συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες (3-4%) που σχετίζονται με τη χρήση pioglitazone και συνιστά μια δόσοεξαρτώμενη ανεπιθύμητη ενέργεια που χαρακτηρίζει συνολικά τη θεραπευτική ομάδα των θειαζολιδινεδιονών. Ασθενείς που λαμβάνουν συνδυαστική αγωγή pioglitazone και ινσουλίνης εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης περιφερειακού οιδήματος, καθώς και τα δυο αυτά φάρμακα έχουν συσχετιστεί με σημαντική κατακράτηση υγρών. Επιπλέον, η παραπάνω συνδυαστική αγωγή μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης περιστατικών καρδιακής ανεπάρκειας, ως αποτέλεσμα της προκαλούμενης αύξησης του όγκου πλάσματος και συνεπώς η χορήγηση pioglitazone θα πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς που εμφανίζουν καρδιακή ανεπάρκεια τάξης III και IV. Η αύξηση του σωματικού βάρους κατά τη θεραπευτική αγωγή με pioglitazone και ιδιαίτερα κατά τη συγχορήγηση με ινσουλίνη αποτελεί επίσης μια από τις συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου, η οποία φαίνεται ότι οφείλεται τόσο στην παρατηρούμενη κατακράτηση υγρών, όσο και στην ενίσχυση της εναπόθεσης υποδόριου λίπους. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται συχνά περιλαμβάνουν την μείωση της οστικής πυκνότητας και αύξηση των άτυπων οστικών καταγμάτων των άκρων σε γυναίκες (2,6%) καθώς και την αναιμία, η οποία αποδίδεται στην αύξηση του όγκου πλάσματος και την αραιώση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης. Τέλος, η χρήση pioglitazone έχει συσχετιστεί με μικρή αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ο οποίος είναι ανάλογος της χορηγούμενης δόσης και της διάρκειας της θεραπείας. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται η

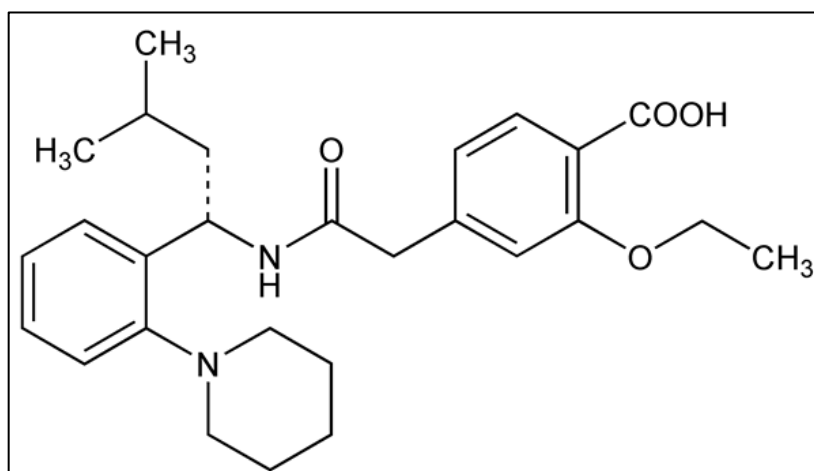
διενέργεια προσεκτικής αξιολόγησης των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου για καρκίνο ουροδόχου κύστης, καθώς και η ενδεδειγμένη διερεύνηση οποιασδήποτε μακροσκοπικής αιματοουρίας πριν από την έναρξη αλλά κατά τη διάρκεια της αγωγής με pioglitazone [56,57,61].

### 5.7 Μεγλιτινίδια (Meglitinides)

Η θεραπευτική ομάδα των μεγλιτινιδίων συγκαταλέγεται στα εκκριταγωγά της ινσουλίνης περιλαμβάνει τις δραστικές ουσίες repaglinide και nateglinide. Οι εν λόγω υπογλυκαιμικοί παράγοντες δρουν κατά τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των σουλφονυλουριών, επάγοντας την έκκριση ινσουλίνης από τα νησιδικά β-κύτταρα του παγκρέατος. Αν και λιγότερο δραστικά από τις σουλφονυλουρίες, τα μεγλιτινίδια παρουσιάζουν ένα σαφώς διαφορετικό προφίλ φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως ταχεία κινητική έναρξης-τερματισμού δράσης και περιορισμένη διάρκεια δράσης, οι οποίες περιορίζουν τον κίνδυνο εκδήλωσης σοβαρής υπογλυκαιμίας και καθιστούν τη χρήση τους ιδιαίτερα ωφέλιμη σε ασθενείς που ακολουθούν έναν ευέλικτο τρόπο ζωής με ακανόνιστο διατροφικό πρόγραμμα [56,63].

#### 5.7.1 Repaglinide

Η δραστική ουσία repaglinide αποτελεί το πρώτο μέλος της θεραπευτικής ομάδας των μεγλιτινιδίων. Διατίθεται εμπορικά με την ονομασία Prandin (πρωτότυπο σκεύασμα), με τη μορφή δισκίων άμεσης αποδέσμευσης των 0,5, 1 και 2 mg, ενώ πλέον είναι διαθέσιμος και ένας σημαντικός αριθμός γενοσήμων φαρμάκων (πχ Nononorm, Theroflan, repaglinide/Actavis κ.ά.). Το repaglinide αποτελεί ένα χειρόμορφο παράγωγο βενζοϊκού οξέος (σχήμα 5.3) και χρησιμοποιείται υπό τη μορφή του (S) στερεοϊσομερούς, καθώς σύμφωνα με *in vitro* πειράματα φαίνεται να παρουσιάζει 100 φορές υψηλότερη δραστηριότητα από το αντίστοιχα (R) στερεοϊσομερές του, το οποίο συνυπάρχει ως πρόσμιξη στη φαρμακοτεχνική μορφή. Η στερεή δραστική ουσία είναι υπόλευκη προς λευκή σκόνη, πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, αλλά εύκολα διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη και μεθυλενοχλωρίδιο [57,64].



Σχήμα 5.3 Χημική δομή του (S)-repaglinide

### 5.7.2 Μηχανισμός δράσης

Η εκκριταγωγός δράση του repaglinide οφείλεται στη διέγερση των νησιδικών β-κυττάρων του παγκρέατος προς απελευθέρωση ινσουλίνης. Η δράση αυτή πραγματοποιείται μέσω του αποκλεισμού των εξαρτώμενων από την τριφωσφορική αδενοσίνη διαύλων καλίου ( $K_{ATP}$ ), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης των β-κυττάρων. Ο αποκλεισμός των διαύλων  $K_{ATP}$  οδηγεί στην εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την εισροή ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, λόγω ενεργοποίησης των τασεο-ελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου. Η επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου διεγείρει την απελευθέρωση ινσουλίνης στη συστηματική κυκλοφορία [65].

Το repaglinide εμφανίζει μερική αλληλοεπικάλυψη ως προς τις μοριακές θέσεις πρόσδεσης με τις σουλφονουλουρίες, καθώς διαθέτει μια κοινή θέση πρόσδεσης με αυτές, η οποία είναι γνωστή ως υποδοχέας των σουλφονουλουριών (SUR1), ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί σε *in vitro* πειράματα ότι συνδέεται και σε μία μοναδική θέση πρόσδεσης. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις σουλφονουλουρίες, το repaglinide δε διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης απουσία γλυκόζης, ούτε αναστέλλει την επαγόμενη από τη γλυκόζη βιοσύνθεση της προϊνσουλίνης [66].

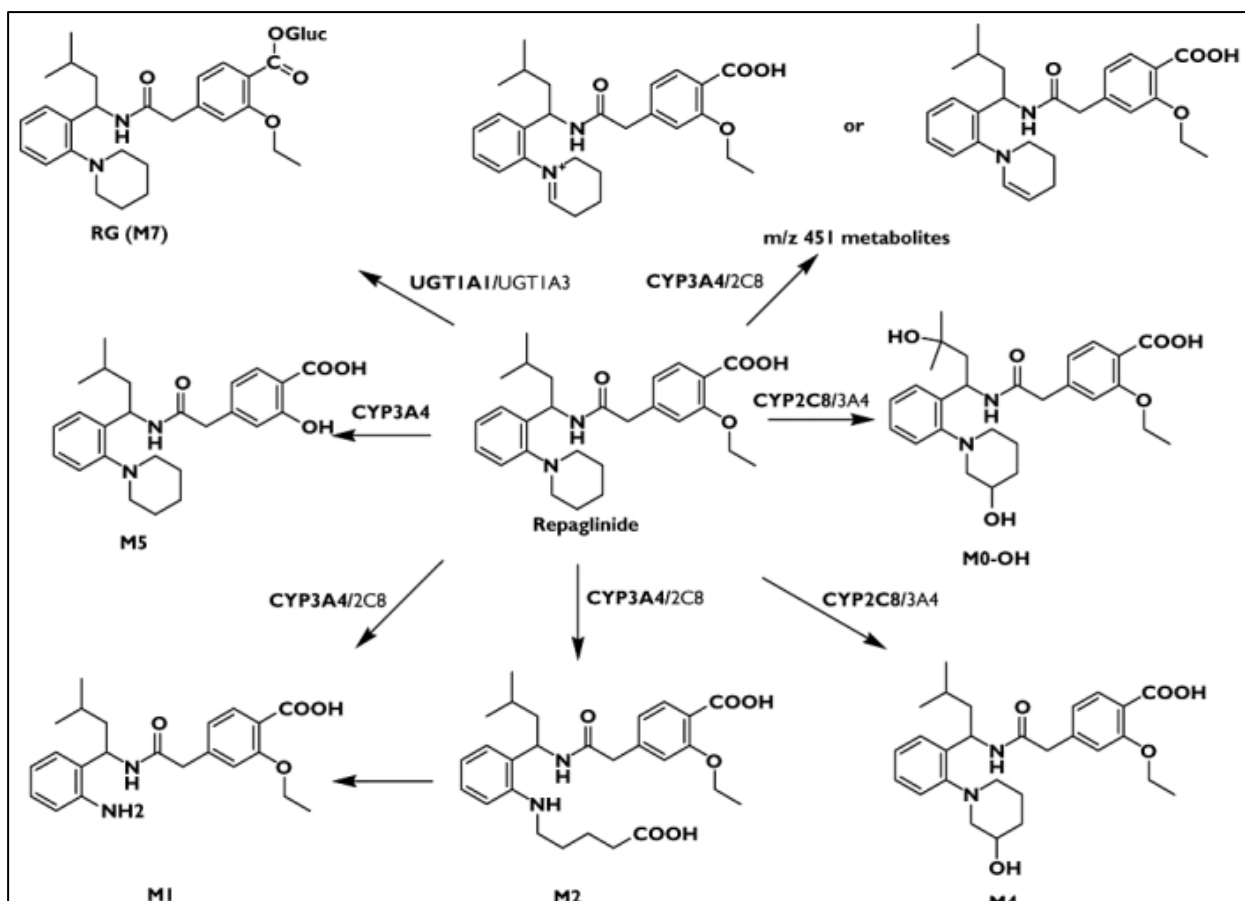
### 5.7.3 Απορρόφηση και κατανομή

Η φαρμακοκινητική του repaglinide έχει μελετηθεί εκτενώς σε ενήλικες νεαρής ηλικίας αλλά και ηλικιωμένους ασθενείς, στα πλαίσια κλινικών μελετών επαναλαμβανόμενης και εφάπαξ χορήγησης του φαρμάκου. Συνολικά, οι επιμέρους φαρμακοκινητικές συνιστώσες της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης δεν παρουσιάζουν κλινικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υγιείς συμμετέχοντες και τους διαβητικούς ασθενείς. Αναλυτικότερα, ύστερα από *per os* χορήγηση του φαρμάκου, η δραστική ουσία απορροφάται ταχύτατα, με τα μέγιστα επίπεδα της στο πλάσμα να εμφανίζονται σε χρονικό διάστημα μικρότερο της μιας ώρας ( $t_{max} = 0,8h$ ) και την απόλυτη βιοδιαθεσιμότητά της να ανέρχεται στο 63%. Η φαρμακοκινητική του repaglinide χαρακτηρίζεται από μικρό όγκο κατανομής (~ 30 L) και εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (98,5 %), με σημαντικότερη εξ αυτών την αλβουμίνη. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης στο πλάσμα εξαρτάται από την χορηγούμενη δόση και παρουσιάζει γραμμικότητα τόσο κατά την επαναλαμβανόμενη, όσο και κατά την εφάπαξ χορήγηση. Ενδεικτικά αναφέρεται πως σε μια ελεγχόμενη φαρμακοκινητική μελέτη, ύστερα από την εφάπαξ και επαναλαμβανόμενη χορήγηση σκευάσματος repaglinide 2 mg σε ηλικιωμένους ασθενείς με ΣΔ2 επιτεύχθηκαν τιμές  $C_{max}$  56,5 και 69 ng mL<sup>-1</sup> αντίστοιχα, ενώ ο χρόνος επίτευξης των μέγιστων επιπέδων ήταν ο ίδιος και στις δύο περιπτώσεις ( $t_{max} = 1h$ ). Επιπλέον, η χορήγηση του φαρμάκου παρουσία τροφής φαίνεται πως ασκεί μια πολύ μικρή επίδραση στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, σε μία σχετική κλινική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης της τροφής στη φαρμακοκινητική του repaglinide διαπιστώθηκε πως σε σύγκριση με τη λήψη του φαρμάκου σε

κατάσταση νηστείας, η χορήγησή ενός δισκίου repaglinide 2 mg σε συνδυασμό με γεύμα πλούσιο σε λιπαρά οδήγησε σε μία μικρή ελάττωση της μέγιστης συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα ( $67,5 \text{ ng mL}^{-1}$  έναντι  $84,3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) ενώ η παράμετρος  $t_{\max}$  παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητη και ο μέσος χρόνος παραμονής της δραστικής ουσίας σημείωσε μικρή αύξηση. Επομένως, είναι δυνατή η προγευματική χορήγηση του φαρμάκου, χωρίς να αναμένονται σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό απορρόφησης [67,68].

#### 5.7.4 Μεταβολισμός και απέκκριση

Το repaglinide υποβάλλεται σε εκτεταμένο ηπατικό μεταβολισμό από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450, οδηγώντας στον σχηματισμό μιας σειράς μεταβολιτών, οι οποίοι δεν εμφανίζουν κλινικά σημαντική υπογλυκαιμική δράση. Από αυτούς, οι μεταβολίτες M2, M1 και M4 (σχήμα 5.4) αποτελούν τα κύρια προϊόντα βιομετατροπής της φαρμακοδυναμικής ουσίας και προκύπτουν από τη δράση των ισοενζύμων CYP3A4 και CYP2C8, ενώ ένα μικρό ποσοστό της μητρικής ουσίας απομακρύνεται ως γλυκουρονίδιο χωρίς να υποστεί οξειδωτική βιομετατροπή από τα ηπατικά ένζυμα. Συνεπώς, η συγχορήγηση του repaglinide με ουσίες που δρουν ως αναστολείς ή επαγωγείς των παραπάνω ισοενζύμων ενδέχεται να οδηγήσει σε σημαντικές μεταβολές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων του φαρμάκου. Κατά τη συγχορήγηση του repaglinide με τις δραστικές ουσίες gemfibrozil και itraconazole σε υγιείς εθελοντές παρατηρήθηκε αύξηση των παραμέτρων  $C_{\max}$  και AUC κατά 19 και 67 φορές αντίστοιχα, οδηγώντας σε μια σημαντικότερη ενίσχυση των υπογλυκαιμικών δράσεων του φαρμάκου. Έχει διαπιστωθεί ότι άτομα με ηπατική ανεπάρκεια αναμένεται να εμφανίσουν σημαντικά αυξημένη συστηματική έκθεση στη δραστική ουσία και για τον λόγο αυτό συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή στον καθορισμό της χορηγούμενης δόσης σε αυτή την κατηγορία ασθενών [67,69].



**Σχήμα 5.4** Προτεινόμενες οδοί βιομετατροπής του repaglinide από τα ηπατικά ένζυμα, όπως προέκυψαν σε *in vitro* πειράματα [69].

Η απομάκρυνση του repaglinide από αίμα είναι ταχύτατη και πραγματοποιείται εντός 4-6 ωρών (χρόνος ημιζωής: 1h), με το μεγαλύτερο ποσοστό του να εκκρίνεται στη χολή και να αποβάλλεται μέσω των κοπράνων. Συγκεκριμένα, ύστερα από *per os* χορήγηση του φαρμάκου, το 92% της χορηγηθείσας δόσης ανακτάται μέσω των κοπράνων με τη μορφή αδρανών μεταβολιτών, με κυριότερο εξ αυτών τον μεταβολίτη M2 (66%), ενώ το εναπομείναν ποσοστό εκκρίνεται υπό τη μορφή μεταβολιτών μέσω των ούρων [70].

#### 5.7.5 Δοσολογία- Ενδείξεις

Το repaglinide έχει εγκριθεί ως μονοθεραπεία σε ενήλικες ασθενείς με ΣΔ2, στους οποίους η υπεργλυκαιμία δεν ελέγχεται πλέον ικανοποιητικά από την υιοθέτηση των προβλεπόμενων υγιεινοδιαιτητικών παρεμβάσεων, καθώς και ως συνδυαστική αγωγή με metformin, σε περιπτώσεις ανεπαρκούς γλυκαιμικού ελέγχου από τη μονοθεραπεία με metformin. Δεδομένης της απουσίας θείου στη δομή της δραστικής ουσίας, η χορήγηση repaglinide αποτελεί αποτελεσματική εναλλακτική λύση σε περιπτώσεις ασθενών με αλλεργία στο θείο ή τις σουλφονουλουρίες, αλλά και σε περιπτώσεις ασθενών που ακολουθούν ένα πιο ευέλικτο διατροφικό πρόγραμμα ή εμφανίζουν παρατεταμένης διάρκειας υπογλυκαιμία κατά τη χρήση σουλφονουλουριών. Το repaglinide χορηγείται προγευματικά και τιτλοποιείται εξατομικευμένα, ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς.



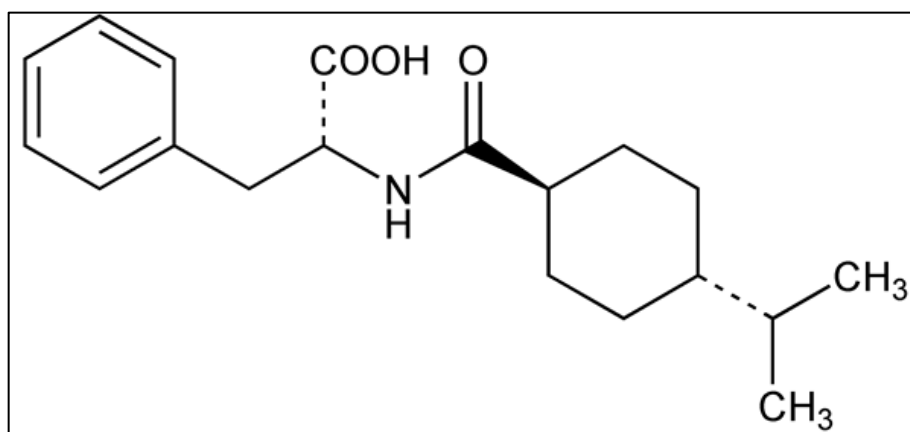
Η αρχική δόση εκκίνησης είναι 0,5 mg, ενώ η συνολική ημερήσια δόση δε θα πρέπει να ξεπερνά τα 16 mg. Η μέγιστη εφάπαξ δόση είναι 4mg [57,71].

#### 5.7.6 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η υπογλυκαιμία αποτελεί τη συνηθέστερη ανεπιθύμητη ενέργεια (1-10%) κατά τη θεραπευτική αγωγή με repaglinide και ενδέχεται να συμβεί εάν το γεύμα παραληφθεί, καθυστερήσει ή περιέχει ανεπαρκή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Άλλες συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές, όπως στομαχικός πόνος και διάρροια, καθώς και η αύξηση βάρους, η οποία ωστόσο είναι μικρότερη από αυτή που παρατηρείται σε περιπτώσεις αγωγής με σουλφονουλουρίες. Στις μη-συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες (1%<) περιλαμβάνονται η αύξηση των ηπατικών ενζύμων, η θρομβοκυτταροπενία, η λευκοπενία και οι αναφυλακτική αντίδραση. Άλλες σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες του repaglinide περιλαμβάνουν την αλωπεκία, το σύνδρομο Stevens–Johnson και τη σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία [72].

#### 5.8 Nateglinide

Η δραστική ουσία nateglinide είναι ένα ταχείας δράσης εκκριταγωγό της ινσουλίνης και συνιστά τον νεότερο εκπρόσωπο της θεραπευτικής ομάδας των μεγλιτινιδίων. Το nateglinide αποτελεί παράγωγο του αμινοξέος φαινυλαλανίνη (σχήμα 5.5) και μορφοποιείται υπό τη μορφή του (R) στερεοϊσομερούς. Η στερεή δραστική ουσία είναι λευκή σκόνη, η οποία είναι εύκολα διαλυτή στη μεθανόλη, την αιθανόλη και το χλωροφόρμιο, διαλυτή στον αιθέρα, λίγο διαλυτή στο ακετονιτρίλιο και την οκτανόλη και πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Διατίθεται εμπορικά με την ονομασία Starlix (πρωτότυπο σκεύασμα), ως επικαλυμμένα δισκία των 60, 120 και 180 mg και έλαβε έγκριση κυκλοφορίας από τον ευρωπαϊκό οργανισμό φαρμάκων (EMA) στις 03-04-2001.



Σχήμα 5.5 Χημική δομή της της δραστικής ουσίας (R)-nateglinide.

Ωστόσο στις 29-04-2022 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission) απέσυρε την άδεια κυκλοφορίας του στην Ευρώπη, ύστερα από αίτημα της εταιρίας παραγωγής. Ως εκ τούτου, η δραστική ουσία repaglinide αποτελεί πλέον τον κύριο εκπρόσωπο της εν λόγω θεραπευτικής κατηγορίας στην ευρωπαϊκή αγορά [73,74].

### 5.8.1 Μηχανισμός δράσης

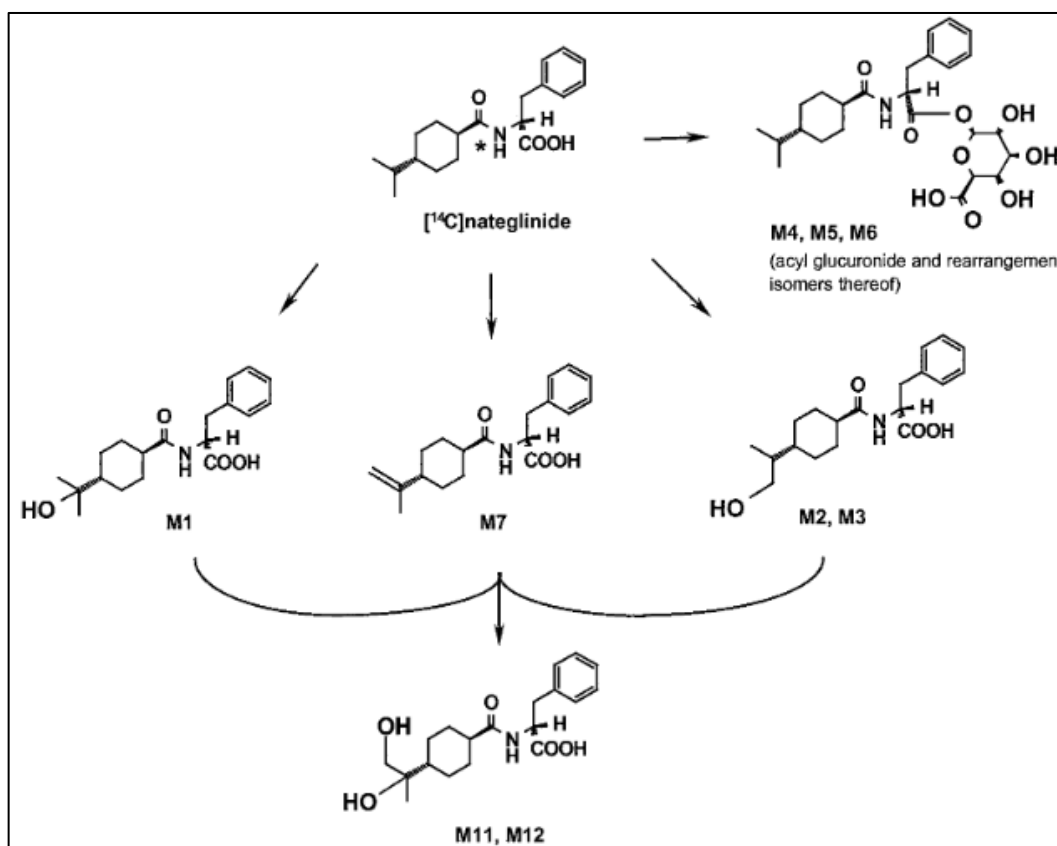
Ο μηχανισμός δράσης του nateglinide είναι παρόμοιος με αυτόν του repaglinide και περιλαμβάνει τη διέγερση των β-κυττάρων του παγκρέατος προς απελευθέρωση ινσουλίνης, μέσω του αποκλεισμού των διαύλων  $K_{ATP}$ . Ωστόσο, σε αντίθεση με το repaglinide, το nateglinide δεν εμφανίζει κάποια ξεχωριστή θέση πρόσδεσης, αλλά συνδέεται με υψηλή εκλεκτικότητα στη μοριακή θέση πρόσδεσης των σουλφονουλουριών SUR1. Επιπλέον, σύμφωνα με προ-κλινικά *in vitro* δεδομένα, φαίνεται ότι συγκριτικά με το repaglinide, το nateglinide εμφανίζει ταχύτερη κινητική πρόσδεσης και αποδέσμευσης από τον υποδοχέα καθώς και σημαντικά μικρότερο διάστημα αποκλεισμού των ιοντικών διαύλων  $K_{ATP}$ , γεγονός το οποίο μεταφράζεται σε μια άμεση και περιορισμένης διάρκειας απελευθέρωση ινσουλίνης. Το nateglinide εμφανίζει περίπου 1000 φορές υψηλότερη εκλεκτικότητα για τον υποτύπο  $K_{ATP}$  των νησιδικών β-κυττάρων έναντι του υποτύπου  $K_{ATP}$  των μυοκαρδιακών κυττάρων, σε αντίθεση με το repaglinide, το οποίο αποτελεί μη-εκλεκτικό προσδέτη [75].

### 5.8.2 Φαρμακοκινητικά δεδομένα

Η φαρμακοκινητική του nateglinide προσομοιάζει σε αρκετά σημεία τη φαρμακοκινητική του repaglinide και χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα όταν χορηγείται σε δοσολογικό εύρος από 60-240 mg και συχνότητα 3 φορές ημερησίως. Αναλυτικότερα, ύστερα από *per os* χορήγηση του απορροφάται ταχέως και τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα επιτυγχάνονται εντός μίας ώρας, ενώ η απόλυτη από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα ανέρχεται στο 72%. Το nateglinide χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές όγκου κατανομής (10 L) και εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (98%), με κυριότερη αυτών την αλβουμίνη. Τα μέγιστα επίπεδα του στο πλάσμα εξαρτώνται πρωτίστως από τη χορηγούμενη δόση και δευτερευόντως από την κατάσταση της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας των ασθενών. Κατά την εφάπαξ και προγευματική χορήγηση ενός δισκίου nateglinide 120 mg σε υγιείς εθελοντές μέσης ηλικίας επιτεύχθηκαν τιμές  $C_{max}$   $5,62 \pm 1,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ακόμα, έχει διαπιστωθεί ότι η κινητική της απορρόφησης επηρεάζεται ως έναν βαθμό από την πρόσληψη τροφής και για τον λόγο αυτό συνιστάται η χορήγηση του φαρμάκου τουλάχιστον 1-30 λεπτά πριν το γεύμα, καθώς η προγευματική χορήγηση του nateglinide έχει συσχετιστεί με ταχύτερη απορρόφηση και υψηλότερες τιμές  $C_{max}$  σε σχέση με τη μεταγευματική χορήγηση ή τη χορήγηση σε κατάσταση νηστείας.

Το nateglinide μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών ποικίλου βαθμού δραστικότητας. Η κύρια οδός μεταβολισμού περιλαμβάνει την οξειδωτική βιομετατροπή του φαρμάκου επί της πλευρικής ισοπροπυλικής ομάδας προς μονο-υδροξυλιωμένα προϊόντα και πραγματοποιείται πρωτίστως από το ισοένζυμο CYP2C9 (~70%) και δευτερευόντως από το CYP3A4 (~30%). Ακόμα, έχει τεκμηριωθεί ο σχηματισμός προϊόντων σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό ο σχηματισμός δι-υδροξυλιωμένων μεταβολιτών και ακόρεστων παραγώγων που προκύπτουν από την αφυδρογόνωση της μητρικής

ουσίας. Συνολικά, οι παραγόμενοι μεταβολίτες εμφανίζουν περίπου 3-6 φορές ασθενέστερη υπογλυκαιμική δράση σε σχέση με το nateglinide, με εξαίρεση τον ήσσονος σημασίας ισοπρενικό μεταβολίτη M7 (σχήμα 5.6), ο οποίος εμφανίζει ανάλογη δραστηριότητα με την μητρική ουσία. Δεδομένου ότι το nateglinide δεν επάγει ούτε αναστέλλει τα προαναφερόμενα ισοένζυμα, η συγχορήγηση του με άλλες φαρμακοδυναμικές ουσίες δεν αναμένεται να επηρεάσει τα επίπεδα αυτών στο πλάσμα. Ωστόσο, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε περιπτώσεις συγχορήγησης με ουσίες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση επί του ισοενζύμου CYP2C9 (πχ. fluconazole, gemfibrozil), καθώς είναι πιθανή η σημαντική αύξηση των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα και κατ' επέκταση η αύξηση του κινδύνου πρόκλησης υπογλυκαιμικών επεισοδίων [65].



Σχήμα 5.6 Κύριες μεταβολικές οδοί του nateglinide στον άνθρωπο[76]

Η απομάκρυνση του nateglinide ύστερα από μία ενδοφλέβια ή από του στόματος χορήγηση είναι ταχεία και χαρακτηρίζεται από τιμές χρόνου ημιζωής απομάκρυνσης  $t_{1/2el} = 1,5-1,7$  h. Το μεγαλύτερο μέρος της χορηγηθείσας δόσης (84-87%) αποβάλλεται μέσω των ούρων και ένα πρόσθετο 10% ανιχνεύεται στα κόπρανα. Περίπου 15% της αποβαλλόμενης μέσω των ούρων ποσότητας του φαρμάκου αντιστοιχεί στη μητρική ουσία.

### 5.8.3 Δοσολογία-ενδείξεις

Το nateglinide έχει λάβει έγκριση ως συνδυαστική αγωγή με metformin για τη διαχείριση του ΣΔ2 σε περιπτώσεις ασθενών κατά τις οποίες δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός γλυκαιμικός έλεγχος παρά

τη χορήγηση της μέγιστης προβλεπόμενης δόσης metformin. Η συνιστώμενη δόση εκκίνησης είναι 60 mg χορηγούμενα 3 φορές ημερησίως πριν από τα γεύματα και αναλόγως τις ανάγκες του ασθενούς μπορεί να αυξηθεί στα 120 διατηρώντας σταθερή τη συχνότητα χορήγησης. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση ανέρχεται στα 180 mg, 3 φορές ημερησίως.

#### 5.8.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η υπογλυκαιμία και η αύξηση του σωματικού βάρους συνιστούν τις συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη θεραπευτική αγωγή με nateglinide (συχνότητα 1-10 %). Άλλες συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τις γαστρεντερικές διαταραχές, στις οποίες συγκαταλέγεται το κοιλιακό άλγος, η δυσπεψία, η ναυτία και η διάρροια. Στις σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες (συχνότητα <0,01 %) περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας καθώς και ορισμένες ήπιες ηπατοχολικές διαταραχές, όπως η αύξηση των ηπατικών ενζύμων και ο ίκτερος [74].

## **Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με χρήση πειραματικού σχεδιασμού για τον ποσοτικό προσδιορισμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων σε ανθρώπινο πλάσμα**

### **6.1 Εισαγωγή**

Οι φαρμακευτικές ουσίες pioglitazone, repaglinide και nateglinide ανήκουν στους χορηγούμενους από του στόματος υπογλυκαιμικούς παράγοντες και χρησιμοποιούνται συστηματικά στην καθημερινή κλινική πράξη για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα τελευταία χρόνια, αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία ότι η εκδήλωση φαινομένων πολυφαρμακίας στους διαβητικούς ασθενείς αποτελεί ένα μείζον υγειονομικό ζήτημα, το οποίο εγείρει σημαντικές ανησυχίες, καθώς η συγχορήγηση πολλαπλών φαρμακευτικών αγωγών για την αντιμετώπιση των συνυπαρχουσών συνοσηροτήτων αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης σοβαρών φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων [77,78]. Υπό αυτό το πλαίσιο, η ανάπτυξη κατάλληλων βιοαναλυτικών μεθόδων για την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των υπογλυκαιμικών παραγόντων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να διασφαλίσει την ασφάλεια των ασθενών και τη μεγιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος, μέσω της διενέργειας εξατομικευμένων τροποποιήσεων στη δοσολογία.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας βιοαναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των παραπάνω αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών, με σκοπό την επίτευξη των απαιτούμενων ορίων ποσοτικοποίησης. Για την προκατεργασία του βιολογικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE), η οποία συνιστά μια ευέλικτη και περιβαλλοντικά βιώσιμη τεχνική μικροεκχύλισης. Κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας έγινε χρήση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού, όπως κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού, με σκοπό την συστηματική μελέτη της επίδρασης μιας σειράς πειραματικών παραμέτρων στην απόδοση της εκχύλισης και τη βελτιστοποίηση της ανάκτησης των αναλυτών. Η προτεινόμενη μέθοδος μελετήθηκε και επικυρώθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πρακτική με σκοπό την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των σχετικών υπογλυκαιμικών παραγόντων.

## 6.2 Οργανολογία συστήματος LC-MS

Η παροχή κινητής φάσης στο χρωματογραφικό σύστημα πραγματοποιείται με χρήση της αντλίας ισοκρατικής έκλουσης διπλού εμβόλου Spectra series P100, της εταιρίας ThermoSeparationProducts (TSP, UK). Για την εισαγωγή δείγματος κατά επαναλήψιμο τρόπο χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έγχυσης Rheodyne® 7725i, το οποίο διαθέτει βρόχο εισαγωγής δείγματος σταθερού όγκου 20 µL. Ο Χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την αναλυτική στήλη SeQuant® ZIC®-cHILIC (150x2.1 mm, 3.0 µm particle size) από την εταιρία Merck. Της αναλυτικής στήλης προηγείται μια προστήλη αντίστοιχης στατικής φάσης με σκοπό την προστασία της και την παράταση της διάρκειάς ζωής της.

Ως ανιχνευτής στο τρέχον σύστημα LC-MS χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μαζών Finnigan AQA της εταιρίας ThermoQuest (Manchester, UK), το οποίο είναι εξοπλισμένο με σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI interface), απλό τετραπολικό αναλυτή μαζών και φωτοπολλαπλασιαστή για την ανίχνευση των ιόντων. Η παροχή αζώτου απαιτούμενης καθαρότητας για την λειτουργία του συστήματος ESI έγινε με την χρήση της γεννήτριας αζώτου Nitrox-N<sub>2</sub>, μοντέλο UHPLC-MS12E της εταιρίας Domnick Hunter (Gateshead, England). Η ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών, όπως επίσης η καταγραφή και επεξεργασία των λαμβανόμενων αναλυτικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Xcalibur ver 1.2 της εταιρίας ThermoQuest (Manchester, UK).

## 6.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες- Εξοπλισμός

Στην συνέχεια της παρούσας ενότητας παρατίθενται οι διαλύτες, τα αντιδραστήρια και ο σχετικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια ανάπτυξης της βιοαναλυτικής μεθόδου.

### 6.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός - αναλώσιμα

- Συσκευή απαέρωσης κινητής φάσης Millipore της εταιρίας Waters
- Φίλτρα νάιλον για την υπό κενό διήθηση της κινητής φάσης, διαμέτρου 0,45 µm (Gelman Sciences Ltd)
- Φίλτρα σύριγγας Millipore Hydrophilic PTFE 0,45 µm από την εταιρία RephiLe Bioscience ltd Europe, Novolab representative (Athens, Greece)
- Λουτρό υπερήχων Transonic 460 της εταιρίας ELMA
- Μαγνητικός αναδευτήρας με δυνατότητα ήπιας θέρμανσης της εταιρίας Hettich μοντέλο Universal 32R
- Μικροπιπέτες Gilson των 50, 200 και 1000 µL

### 6.3.2 Αντιδραστήρια – διαλύτες

- Μυρμηκικό αμμώνιο ( $\text{HCOONH}_4$ , AMF) καθαρότητας αναλυτικού βαθμού 97% από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany)
- Οξικό αμμώνιο ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -AMA) καθαρότητας αναλυτικού βαθμού 98% από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany)
- Μυρμηκικό οξύ ( $\text{HCOOH}$ , formic acid) καθαρότητας αναλυτικού βαθμού από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany)
- Ακετονιτρίλιο ( $\text{MeCN}$ , ACN) καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (99,8 %) της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany)
- Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , MeOH) καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (99,8 %) της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany)
- Υπερκάθαρο νερό (τύπου 1) παραγόμενο από σύστημα αντίστροφης ώσμωσης και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή Synergy UV

### 6.3.3 Φαρμακευτικές ουσίες

- Pioglitazone hydrochloride φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας (98,9%) από την εταιρία Sigma-Aldrich
- Repaglinide φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας (99,7%) από την εταιρία Sigma-Aldrich
- Nateglinide φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας (99,5%) από την εταιρία Lakshita Ltd. (Mumbai, India)
- N-despropyl ropinirole (98,6%) από την εταιρία Vitalife Chemipharma Pvt. Ltd. (Mumbai, India)

## 6.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

### 6.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των υπογλυκαιμικών ουσιών συγκέντρωσης  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , μέσω ζύγισης της απαιτούμενης ποσότητας στερεής ουσίας σε αναλυτικό ζυγό 5 δεκαδικών ψηφίων (ακρίβεια  $\pm 0,01 \text{ mg}$ ). Η ζυγισθείσα ποσότητα μεταφέρεται σε λουτρό υπερήχων για χρονικό διάστημα 1-2 λεπτών, ώστε να διαλυθεί πλήρως και ακολούθως πραγματοποιείται αραιώση με κατάλληλο διαλύτη.

**Διάλυμα παρακαταθήκης A:** Ζυγίστηκε με ακρίβεια ποσότητα ουσίας nateglinide (NTG) 0,0050 g και πραγματοποιήθηκε αραιώση με MeOH σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.

**Διάλυμα παρακαταθήκης B:** Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,0054 g του υδροχλωρικού άλατος της ουσίας pioglitazone (PGL), τα οποία αντιστοιχούν σε 0,0050 g pioglitazone και πραγματοποιήθηκε αραιώση με MeOH σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.

**Διάλυμα παρακαταθήκης C:** Ζυγίστηκε με ακρίβεια ποσότητα ουσίας repaglinide (RPG) 0,0050 g και πραγματοποιήθηκε αραίωση με MeOH σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης M1 και M2, από τα οποία παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας των προσδιοριζόμενων ουσιών.

**Διάλυμα παρακαταθήκης M1:** Μεταφέρθηκαν με χρήση πιπέτας όγκοι 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  και 50  $\mu\text{L}$  των διαλυμάτων παρακαταθήκης A, B και C σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και πραγματοποιήθηκε αραίωση με  $\text{H}_2\text{O}$ , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  και 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για τις ουσίες nateglinide, pioglitazone και repaglinide αντίστοιχα.

**Διάλυμα παρακαταθήκης M2:** Μεταφέρθηκαν 1000  $\mu\text{L}$  διαλύματος παρακαταθήκης M1 σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και πραγματοποιήθηκε αραίωση με  $\text{H}_2\text{O}$ , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  και 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για τις ουσίες nateglinide, pioglitazone και repaglinide αντίστοιχα.

Τέλος παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης IS1 και IS2 της ουσίας N-desmethyl roprinole (εσωτερικό πρότυπο), όπως περιγράφεται παρακάτω.

**Διάλυμα IS1:** Ζυγίστηκαν 0,0020 g στερεής ουσίας N-desmethyl roprinole και πραγματοποιήθηκε αραίωση σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με MeOH, ώστε να προκύψει διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Διάλυμα IS2:** : Μεταφέρθηκαν 1000  $\mu\text{L}$  διαλύματος παρακαταθήκης IS1 σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL και πραγματοποιήθηκε αραίωση με MeOH, ώστε να προκύψει το τελικό διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου, συγκέντρωσης 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται σε τυπικές συνθήκες συντήρησης (4 °C) προστατευμένα από το φως. Υπό αυτές τις συνθήκες διατηρούνται σταθερά για αρκετές εβδομάδες,

**Πίνακας 1** Σύνοψη των αραιώσεων που πραγματοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεικτών διαλυμάτων παρακαταθήκης των υπογλυκαιμικών ουσιών

Αρχικό Διάλυμα		Αραίωση			Τελικό διάλυμα			
ονομασία	όγκος ( $\mu\text{L}$ )	διαλύτης	τελικός όγκος (mL)	Συντελεστής αραιώσης	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Ονομασία
					NTG	PGL	RPG	
A	1000			1:5				
B	200	$\text{H}_2\text{O}$	5	1:25	100	20	5	M1
C	50			1:100				
M1	1000	$\text{H}_2\text{O}$	10	1:10	10	2	0,5	M2



#### 6.4.2 Διαλύματα εργασίας

Πραγματοποιώντας κατάλληλες αραιώσεις των μεικτών διαλυμάτων παρακαταθήκης M1 και M2 σε H<sub>2</sub>O παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα εργασίας σε 8 επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία καλύπτουν ένα εύρος συγκεντρώσεων από 50-2000 ng mL<sup>-1</sup> για το pioglitazone, 6,25-500 ng mL<sup>-1</sup> για τον αναλύτη repaglinide, και 125-10000 ng mL<sup>-1</sup> για το nateglinide. Το πρότυπο διάλυμα εργασίας του εσωτερικού προτύπου (IS3) συγκέντρωσης 240 ng mL<sup>-1</sup> παρασκευάστηκε μέσω μεταφοράς όγκου 60 μL σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώσης με H<sub>2</sub>O. Τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονται σε ψυγείο κατά αντίστοιχο τρόπο με τα διαλύματα παρακαταθήκης και διατηρούνται για χρονικό διάστημα 1-2 εβδομάδων.

**Πίνακας 2** Σύνοψη των αραιώσεων που πραγματοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεικτών διαλυμάτων εργασίας των υπογλυκαιμικών ουσιών

Αρχικό Διάλυμα		Αραιώση			Τελικό διάλυμα			
ονομασία	όγκος (μL)	διαλύτης	τελικός όγκος (mL)	Συντελεστής αραιώσης	Συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )			Ονομασία
					NTG	PGL	RPG	
M2	125	H <sub>2</sub> O	10	1:80	125	25	6,25	W1
M2	200	H <sub>2</sub> O	10	1:50	200	40	10	W2
M2	250	H <sub>2</sub> O	10	1:40	250	50	12.5	W3
M2	500	H <sub>2</sub> O	10	1:20	500	100	25	W4
M2	1000	H <sub>2</sub> O	10	1:10	1000	200	50	W5
M1	250	H <sub>2</sub> O	10	1:40	2500	500	125	W6
M1	500	H <sub>2</sub> O	10	1:20	5000	1000	250	W7
M1	1000	H <sub>2</sub> O	10	1:10	10000	2000	500	W8

#### 6.4.3 Εμβολιασμένα δείγματα σε βιολογικό υλικό (spiked samples)

Η παρασκευή των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος έγινε σε αντίστοιχα εύρη συγκεντρώσεων με τα πρότυπα διαλύματα εργασίας, κατά τέτοιαν τρόπο ώστε να περιέχεται ίδια ποσότητα διαλυτή εργασίας σε όλα τα δείγματα. Αναλυτικότερα, ο εμβολιασμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεταφοράς κατάλληλης ποσότητας διαλύματος εργασίας σε 100 μL ανθρώπινου πλάσματος εντός περιέκτη Eppendorf 2 mL.

#### 6.4.4 Δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC samples)

Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάζονται κατά τρόπο παρόμοιο με τα εμβολιασμένα δείγματα βαθμονόμησης, χρησιμοποιώντας διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης. Συνολικά, παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3)

**Πίνακας 3** Συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ελέγχου ποιότητας που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της βιοαναλυτικής μεθόδου

Όνομασία	Συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )		
	NTG	PGL	RPG
QC <sub>LLoQ</sub>	125	25	6.25
QC1	500	100	25
QC2	2500	500	125
QC3	10000	2000	500

#### 6.5 Ανάπτυξη βιοαναλυτικής μεθόδου

Η ανάπτυξη μιας βιοαναλυτικής μεθόδου διακρίνεται σε 2 κύρια στάδια. Το πρώτο, αφορά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων συστατικών, ενώ το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας κατάλληλης μεθόδου κατεργασίας δείγματος, με σκοπό την ανάκτηση των αναλυτών από το βιολογικό υλικό. Συνήθως, αρχικά πραγματοποιείται η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα εργασίας και αφού αποδειχθεί η καταλληλότητά της για την σκοπούμενη εφαρμογή στη συνέχεια αναπτύσσεται η μέθοδος κατεργασίας χρησιμοποιώντας δείγματα εμβολιασμένα σε βιολογικό υλικό [79].

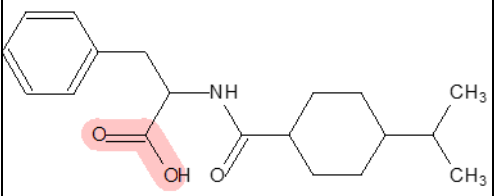
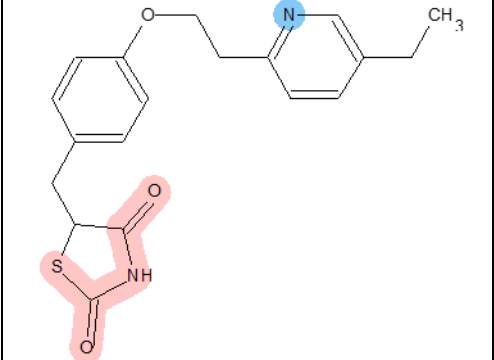
Παράλληλα, πριν από την έναρξη οποιασδήποτε εργαστηριακής εργασίας είναι σημαντική η διενέργεια μιας ενδελεχούς μελέτης ανασκόπησης της βιβλιογραφίας με σκοπό τη συγκέντρωση χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με τις ουσίες που πρόκειται να αναλυθούν. Σε αυτές περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή των αναλυτών, τη διαλυτότητα τους, την κατάσταση ιοντισμού, την πολικότητα και τη χημική τους σταθερότητα προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη τεχνική ανάλυσης, το είδος των διαλυτών εργασίας και οι συνθήκες φύλαξης των προτύπων διαλυμάτων. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η εύρεση πληροφοριών σχετικά με το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτών στο δεδομένο βιολογικό υλικό, ώστε να καθοριστούν οι απαιτήσεις ευαισθησίας και το εύρος της καμπύλης αναφοράς. Τέλος, απαιτείται η συγκέντρωση δεδομένων σχετικά με τις ιδιότητες του προς ανάλυση βιολογικού υλικού (πχ. pH,

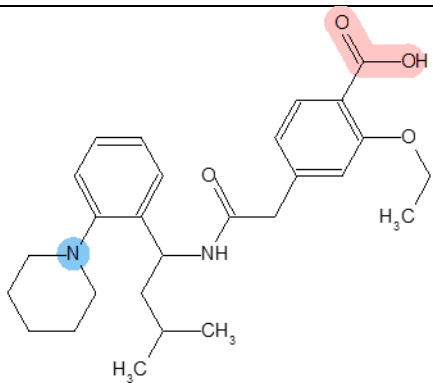
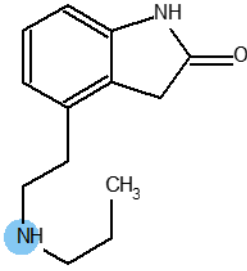
περιεκτικότητα σε δευτερογενή συστατικά), με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προκατεργασίας.

#### 6.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά προσδιοριζόμενων ουσιών

Αρχικά, χρησιμοποιώντας το λογισμικό ADME BOXES ver. 3.0 συλλέχθηκαν ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για τις υπογλυκαιμικές ουσίες που πρόκειται να αναλυθούν και για το εσωτερικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν δεδομένα σχετικά με την πολικότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών, την ύπαρξη όξινων ή βασικών λειτουργικών ομάδων, καθώς και πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4).

**Πίνακας 4** Σύνοψη ορισμένων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των προσδιοριζόμενων υπογλυκαιμικών ουσιών και του εσωτερικού προτύπου

<b>Nateglinide</b>	
 <p>The chemical structure of Nateglinide is shown. It features a benzene ring connected to a propyl chain. The second carbon of the propyl chain is attached to an amide group (-NH-C(=O)-). This amide group is further connected to a cyclohexane ring, which is substituted with an isopropyl group (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). The carboxylic acid group (-COOH) is highlighted in red.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Μοριακό βάρος: 317.42</li><li>• pKa (οξύ): 3,0 ± 0,50</li><li>• LogD<sub>pH=6,5</sub> = -0,60</li><li>• Αριθμός ιοντιζόμενων ομάδων: 1</li><li>• Ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου: 2</li><li>• Ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου: 4</li></ul>
<b>Pioglitazone</b>	
 <p>The chemical structure of Pioglitazone is shown. It consists of a thiazolidine ring system with a sulfur atom and an NH group. This ring is connected via a propyl chain to a benzene ring. The benzene ring is further connected via another propyl chain to a pyridine ring, which is substituted with a methyl group (-CH<sub>3</sub>). The thiazolidine ring system is highlighted in red.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Μοριακό βάρος: 356,44</li><li>• pKa (οξύ): 6,50 ± 0,50</li><li>• pKa (βάση): 5,40 ± 0,50</li><li>• LogD<sub>pH=6,5</sub> = 2,50</li><li>• Αριθμός ιοντιζόμενων ομάδων: 2</li><li>• Ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου: 1</li><li>• Ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου: 5</li></ul>

<b>Repaglinide</b>	
 <p>The structure shows a piperidine ring attached to a benzene ring, which is further connected to a chain containing a methyl group, an amide group, and another benzene ring. This second benzene ring has a methoxy group and a carboxylic acid group highlighted in red.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μοριακό βάρος: 452,58</li> <li>• pKa (οξύ): 3,80 ± 0,50</li> <li>• pKa (βάση): 6,40 ± 0,50</li> <li>• LogD<sub>pH=6,5</sub> = 2,40</li> <li>• Αριθμός ιοντιζόμενων ομάδων: 2</li> <li>• Ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου: 2</li> <li>• Ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου: 6</li> </ul>
<b>N-despropyl ropinirole (εσωτερικό πρότυπο)</b>	
 <p>The structure shows a benzimidazole ring system with a propyl chain attached to the nitrogen atom, which is highlighted in blue.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μοριακό βάρος: 218,29</li> <li>• pKa (βάση): 8,80 ± 0,50</li> <li>• LogD<sub>pH=6,5</sub> = - 0,50</li> <li>• Αριθμός ιοντιζόμενων ομάδων: 1</li> <li>• Ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου: 2</li> <li>• Ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου: 3</li> </ul>

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4, στη χρωματογραφία HILIC επικρατεί ένας σύνθετος μηχανισμός συγκράτησης, ο οποίος περιλαμβάνει μεταξύ άλλων φαινόμενα κατανομής, προσρόφησης και ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Παράλληλα, η συνεισφορά των επιμέρους συνιστωσών αλληλεπιδράσεων δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες της στατικής φάσης, την σύσταση της κινητής φάσης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών. Συνεπώς, η συνεκτίμηση των παραπάνω δεδομένων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μπορεί να συμβάλλει στην επιλογή της βέλτιστης στατικής φάσης για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών.

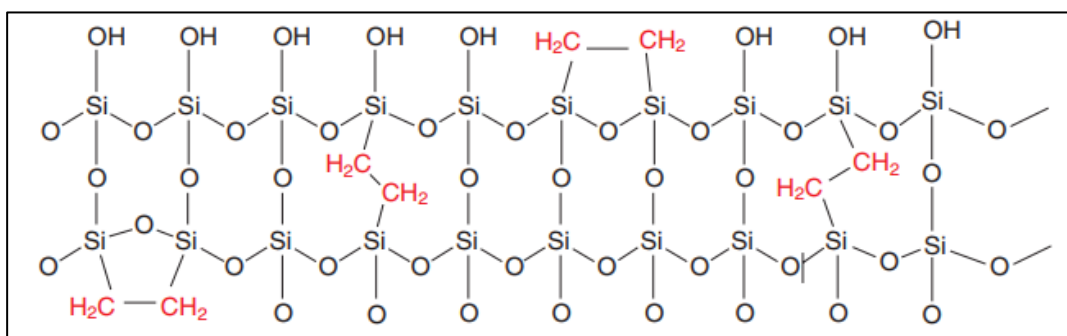
### 6.5.2 Επιλογή στατικής φάσης

Η επιλογή της βέλτιστης στατικής φάσης αποτελεί το πρώτο βήμα κατά την ανάπτυξη μια αναλυτικής μεθόδου. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως σε αντίθεση με την RP-HPLC στη HILIC δεν παρατηρείται η ύπαρξη μιας καθολικά χρησιμοποιούμενης στατικής φάσης αντίστοιχης δημοτικότητας με τη C18, ενώ παράλληλα οι αναλυτές καλούνται να επιλέξουν μέσα από έναν μεγάλο αριθμό εμπορικά διαθέσιμων στατικών φάσεων, οι οποίες επιδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς την εκλεκτικότητα και την χημική τους δομή [36].

Στα πλαίσια, των προκαταρκτικών πειραμάτων ανάπτυξης της χρωματογραφικής μεθόδου εξετάστηκαν 2 αναλυτικές στήλες HILIC, οι οποίες διαφέρουν ουσιωδώς μεταξύ τους ως προς την εκλεκτικότητα και τον μηχανισμό μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η συγκράτηση των αναλυτών. Για

την επιλογή της βέλτιστης στατικής φάσης αξιολογούνται τόσο τα χαρακτηριστικά συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών, όσο και η ικανότητα επαρκούς συγκράτησης των αναλυτών, η οποία εκφράζεται μέσω του παράγοντα χωρητικότητας ( $k'$ ) και του χρόνου ανάσχεσης ( $t_r$ ).

**XBridge®HILIC-BEH:** Αρχικά, διερευνήθηκε η δυνατότητα συγκράτησης των αναλυτών στη χρωματογραφική στήλη XBridge®HILIC-BEH (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m) της εταιρίας Waters. Ως πληρωτικό υλικό στη συγκεκριμένη στήλη χρησιμοποιούνται πορώδη σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας αποτελούμενα από ομάδες bis-triethoxysilyl-ethane (BEH), στα οποία μέρος των ομάδων σιλοξανιού και των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης έχουν αντικατασταθεί από γέφυρες αιθυλενίου (σχήμα 6.1). Το γεγονός αυτό προδίδει στα υβριδικά σωματίδια BEH αυξημένη χημική σταθερότητα σε χαμηλές τιμές pH, ενώ παράλληλα περιορίζεται η έκταση των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, βελτιώνοντας τον χρωματογραφικό διαχωρισμό βασικών ενώσεων[80]. Όπως έχει αναδειχθεί σε σχετικές μελέτες διερεύνησης του μηχανισμού συγκράτησης στην χρωματογραφία HILIC, οι υβριδικές στατικές φάσεις μη παραγωγισμένης πυριτίας συγκρατούν σημαντικά μικρότερες ποσότητες νερού στην επιφάνειά τους συγκριτικά με τις επαμφοτερίζουσες στατικές φάσεις και τις ουδέτερες στατικές φάσεις με λειτουργικές ομάδες αμιδίου, οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν μέχρι και 15 φορές υψηλότερη ποσότητα νερού, οδηγώντας στην ανάπτυξη υδατικών στοιβάδων μειωμένου πάχους. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων προσρόφησης φαίνεται να διαδραματίζει ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό συγκράτησης των αναλυτών και εξηγεί σε μεγάλο βαθμό τις διαφορές στην εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν [81].

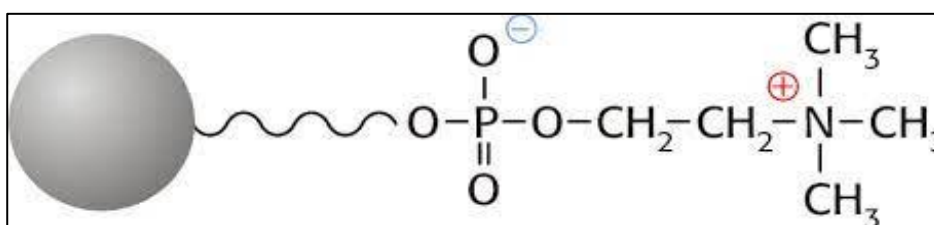


**Σχήμα 6.1** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των υβριδικών σωματιδίων στην στήλη XBridge®HILIC-BEH.

Κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των υπογλυκαιμικών ουσιών με τη συγκεκριμένη στήλη παρατηρήθηκαν φαινόμενα ανεπαρκούς συγκράτησης των αναλυτών από τη στατική φάση, με τα rioglitazone και repaglinide να εκλούνται κοντά στον νεκρό όγκο, ακόμα και σε κινητές φάσεις μειωμένης εκλουστικής ισχύος (πχ κινητές φάσεις με αναλογία διαλυτών ACN/H<sub>2</sub>O 95:5 v/v).

**SeQuant® ZIC®-cHILIC:** Στη συνέχεια, εξετάστηκε η αναλυτική στήλη SeQuant® ZIC®-cHILIC (150 x 2.1 mm, 3,0  $\mu$ m) της εταιρίας Merck. Το πληρωτικό υλικό της συγκεκριμένης στήλης αποτελείται από πορώδη σωματίδια πυριτίας, τα οποία έχουν επικαλυφθεί μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης με φωσφατιδυλοχολίνη. Η λειτουργική ομάδα της φωσφατιδυλοχολίνης αποτελείται από

μια κατιοντική ομάδα τεταρτοταγούς αζώτου, η οποία συνδέεται μέσω μιας γέφυρας αιθυλενίου με μια αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα και είναι προσανατολισμένη κατά τέτοιον τρόπο ώστε το κατιοντικό τμήμα του μορίου να προβάλλει προς τον κύριο όγκο της κινητής φάσης (σχήμα 6.2). Η στενή γεινίαση των ετερώνυμα φορτισμένων ομάδων στο μόριο του αμφολύτη περιορίζει σημαντικά την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενώ η χωρική διεύθετηση των λειτουργικών ομάδων στα σωματίδια του πληρωτικού υλικού εξηγεί την εκλεκτικότητα που επιδεικνύει η συγκεκριμένη στήλη στον προσδιορισμό αρνητικά φορτισμένων ενώσεων, όπως οργανικά οξέα. Ακόμα, είναι γνωστό ότι οι επαμφοτερίζουσες στατικές φάσεις δεσμεύουν ισχυρά τα μόρια H<sub>2</sub>O στην επιφάνειά τους, οδηγώντας στην ανάπτυξη υδατικών ψευδοστοιβάδων αυξημένου πάχους. Σε αυτά τα συστήματα η συγκράτηση των αναλυτών πραγματοποιείται κυρίως μέσω φαινομένων κατανομής και δευτερευόντως μέσω των ασθενών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που διασφαλίζει η παρουσία των μορίων του αμφολύτη [82,83].



**Σχήμα 6.2** Σχηματική απεικόνιση της δομής των λειτουργικών ομάδων φωσφατίδουλοχολίνης που εντοπίζονται στις στήλες ZIC®-cHILIC

Κατά τη διάρκεια των διερευνητικών πειραμάτων διαπιστώθηκε μια σαφώς βελτιωμένη εικόνα ως προς τη συγκράτηση των αναλυτών σε σχέση με τη στατική φάση XBridge®HILIC-BEH, ενώ παράλληλα λήφθηκαν βελτιωμένες χρωματογραφικές κορυφές με ικανοποιητικά χαρακτηριστικά συμμετρίας. Συνεπώς, αποφασίστηκε η χρήση της στήλης ZIC®-cHILIC στα πλαίσια ανάπτυξης της χρωματογραφικής μεθόδου.

### 6.5.3 Βελτιστοποίηση κινητής φάσης

Αφού επιλέχθηκε η βέλτιστη στατική φάση για τη συγκράτηση των αναλυτών, στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση μιας σειράς πειραματικών παραμέτρων στην απόδοση της χρωματογραφικής μεθόδου, αναλύοντας πρότυπα διαλύματα εργασίας. Εν συντομία, οι παράγοντες που εξετάστηκαν κατά το στάδιο ανάπτυξης της χρωματογραφικής μεθόδου συνοψίζονται στα παρακάτω σημεία:

- Περικεκτικότητα κινητής φάσης σε νερό (φH<sub>2</sub>O).
- Συγκέντρωση άλατος
- Τύπος άλατος

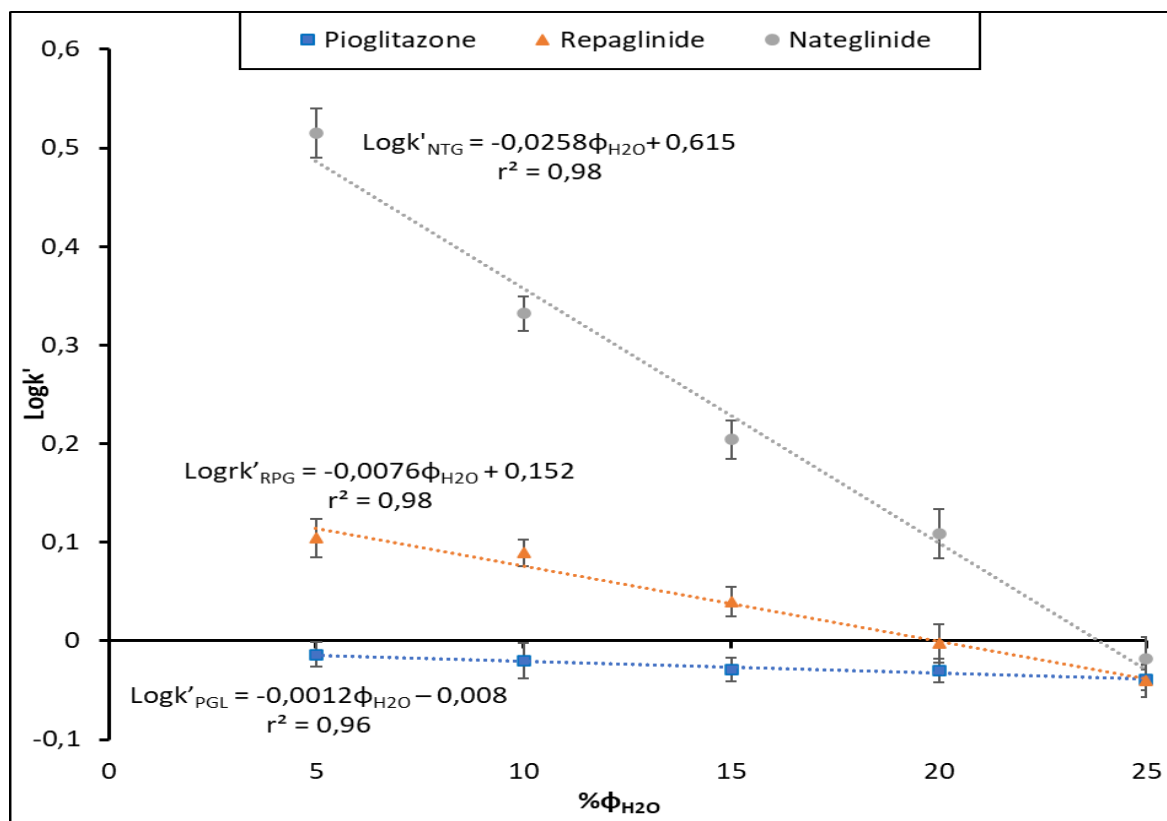
Για τη βελτιστοποίηση της κινητής φάσης εφαρμόστηκε η μέθοδος μεταβολής κατά έναν παράγοντα (One Variable at A Time), σύμφωνα με την οποία κάθε παράγοντας βελτιστοποιείται

ξεχωριστά, διατηρώντας παράλληλα σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους. Η αξιολόγηση των σχετικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέσω της συνεκτίμησης της συγκράτησης των αναλυτών, η οποία εκφράζεται μέσω του παράγοντα χωρητικότητας ( $k'$ ), της συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών και της έντασης του λαμβανόμενου αναλυτικού σήματος.

#### 6.5.3.1 Μελέτη επίδρασης Περιεκτικότητα κινητής φάσης σε νερό (%φH<sub>2</sub>O)

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.3 το H<sub>2</sub>O αποτελεί τον ισχυρό διαλύτη έκλουσης στην χρωματογραφία HILIC και συνεπώς η περιεκτικότητά του στην κινητή φάση συνιστά έναν από τους κυριότερους παράγοντες προς βελτιστοποίηση κατά την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου. Μεταβολές στην τιμή του ποσοστού νερού (φH<sub>2</sub>O) αναμένεται να επηρεάσουν τόσο την εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης, όσο και το πάχος της ημι-ακίνητοποιημένης υδατικής ψευδοστοιβάδας, η οποία δρα ως αναπόσπαστο κομμάτι της στατικής φάσης στην χρωματογραφία HILIC. Παράλληλα, η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε νερό επηρεάζει άμεσα ορισμένα σημαντικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της, όπως η τάση ατμών και το ιξώδες, τα οποία σχετίζονται με την απόδοση του ιοντισμού στην περίπτωση της τεχνικής ESI και κατ' επέκταση με την ένταση του λαμβανόμενου αναλυτικού σήματος.

Το τυπικό εύρος τιμών της περιεκτικότητας νερού στην κινητή φάση σε συνθήκες HILIC κυμαίνεται από 5 έως 40 %, ενώ σε κάθε περίπτωση συνιστάται η διατήρηση ενός ελάχιστου ποσοστού της τάξης του 2-3 %. Στην παρούσα εργασία, η διερεύνηση των επιδράσεων της μεταβολής του ποσοστού του νερού στην απόδοση της χρωματογραφικής μεθόδου διενεργήθηκε σε ένα εύρος τιμών από 5 έως 25%, διατηρώντας παράλληλα σταθερή την ποσότητα του μυρμηκικού αμμωνίου στα 0,1 mmol. Για την καλύτερη επισκόπηση και ερμηνεία των σχετικών αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν τα σχετικά διαγράμματα του λογαρίθμου της τιμής του παράγοντα χωρητικότητας ( $\log k'$ ) συναρτήσει του ποσοστού του νερού στην κινητή φάση (σχήμα 6.3).



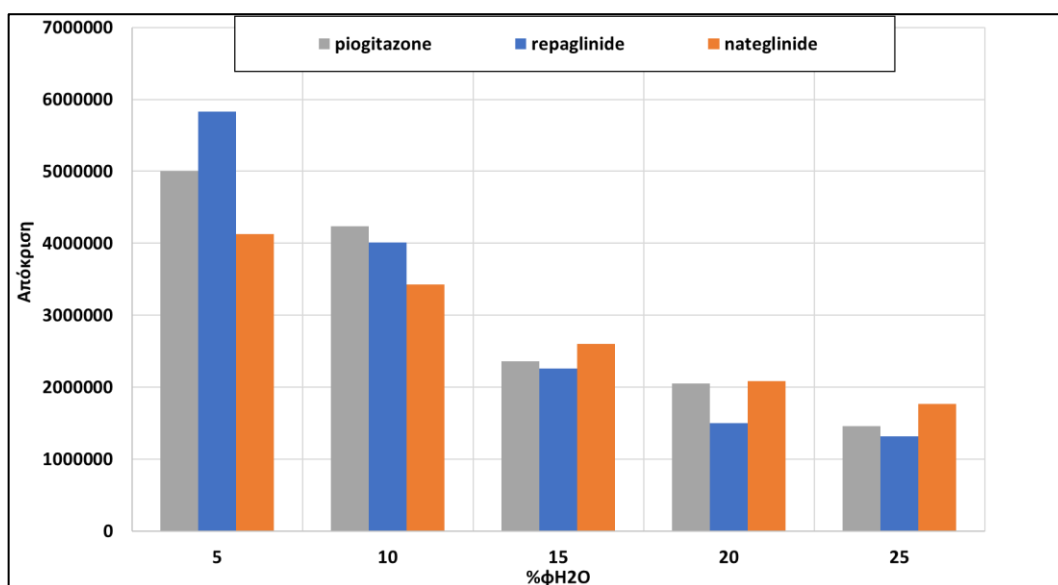
**Σχήμα 6.3** Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης του ποσοστού νερού (%φH<sub>2</sub>O) της κινητής φάσης στην τιμή του παράγοντα χωρητικότητας logk' των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Από την εξέταση του παραπάνω διαγράμματος συμπεραίνεται ότι η αύξηση του ποσοστού νερού της κινητής φάσης επιφέρει μείωση του χρόνου ανάσχεσης των αναλυτών, οι οποίοι εκκλύονται, όπως είναι αναμενόμενο, κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας. Παράλληλα, η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης ανάμεσα στην τιμή της περιεκτικότητας νερού και τον λογάριθμο του παράγοντα χωρητικότητας υποδηλώνει ότι η συγκράτηση των αναλυτών στο παρόν σύστημα πραγματοποιείται κυρίως μέσω φαινομένων κατανομής, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και η ανάπτυξη ασθενών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα ιοντικές λειτουργικές ομάδες των ουσιών και τα μόρια του αμφολύτη της στατικής φάσης. Τέλος, είναι εμφανές ότι το μέγεθος της επίδρασης των μεταβολών του ποσοστού νερού της κινητής φάσης στον χρόνο έκλυσης των αναλυτών είναι ανάλογο της πολικότητάς τους.

Ως γνωστόν, η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε νερό καθορίζει ορισμένες σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητές της, όπως είναι η τάση ατμών και η επιφανειακή τάση. Η παράμετρος της τάσης ατμών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον ρυθμό συρρίκνωσης των φορτισμένων νανοσταγονιδίων στην τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI), ενώ η παράμετρος της επιφανειακής τάσης συνδέεται κατά τρόπο ανάλογο με την τιμή του ορίου Rayleigh, το οποίο αποτελεί το ενεργειακό όριο σχάσης των φορτισμένων σταγονιδίων [34]. Συνεπώς η αύξηση του ποσοστού της κινητής φάσης σε νερό ενδέχεται να οδηγήσει σε ελάττωση της απόδοσης του



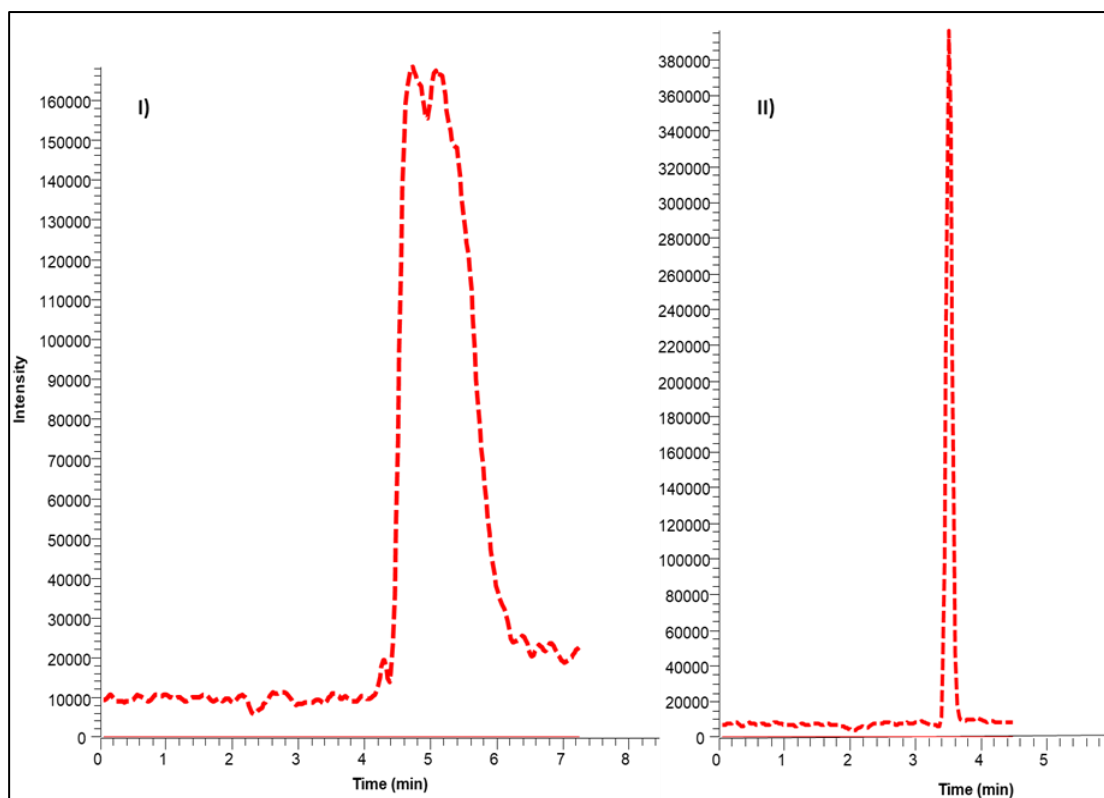
ιοντισμού, γεγονός το οποίο ερμηνεύει την μείωση του αναλυτικού σήματος που παρατηρήθηκε στην παρούσα περίπτωση κατά την χρήση κινητών φάσεων υψηλής περιεκτικότητας σε νερό (σχήμα 6.4).



**Σχήμα 6.4** Γραφική παράσταση της έντασης του αναλυτικού σήματος συναρτήσει της περιεκτικότητας της κινητής φάσης σε H<sub>2</sub>O.

Όπως προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα, η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στην κινητή φάση προκαλεί προοδευτική καταστολή της έντασης του αναλυτικού σήματος για το σύνολο των αναλυτών, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τιμές νερού άνω του 10%. Παράλληλα, όταν το νερό αποτελεί το 5% σε αναλογία στην κινητή φάση το αναλυτικό σήμα λαμβάνει την μέγιστη τιμή του και για τους τρεις αναλύτες. Ωστόσο, πέρα από την ένταση του αναλυτικού σήματος, για την επιλογή της βέλτιστης αναλογίας νερού στην κινητή φάση θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η επίδραση των παραπάνω μεταβολών στα χαρακτηριστικά συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών.

Αναλυτικότερα, η μεταβολή της περιεκτικότητας του νερού στην κινητή φάση φάνηκε να ασκεί αμελητέα επίδραση στις χρωματογραφικές κορυφές των pioglitazone και repaglinide, οι οποίες επέδειξαν ικανοποιητική συμμετρία στο εξεταζόμενο εύρος τιμών. Ωστόσο, στην περίπτωση του nateglinide, κατά τη χρήση κινητών φάσεων περιεκτικότητας 5% σε νερό παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διεύρυνση και σημαντική διατάραξη των χαρακτηριστικών συμμετρίας της σχετικής χρωματογραφικής κορυφής, καθιστώντας αδύνατη την ολοκλήρωσή της κατά επαναλήψιμο τρόπο (σχήμα 6.5). Συνεπώς, η αναλογία ακετονιτρίλιο/νερό 90:10 v/v επιλέχθηκε ως βέλτιστη και χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια των πειραμάτων βελτιστοποίησης καθώς σε αυτές τις συνθήκες επιτεύχθηκε η λήψη χρωματογραφικών κορυφών εξαιρετικής συμμετρίας και αποδεκτών τιμών αναλυτικού σήματος για το σύνολο των προσδιοριζόμενων ουσιών.



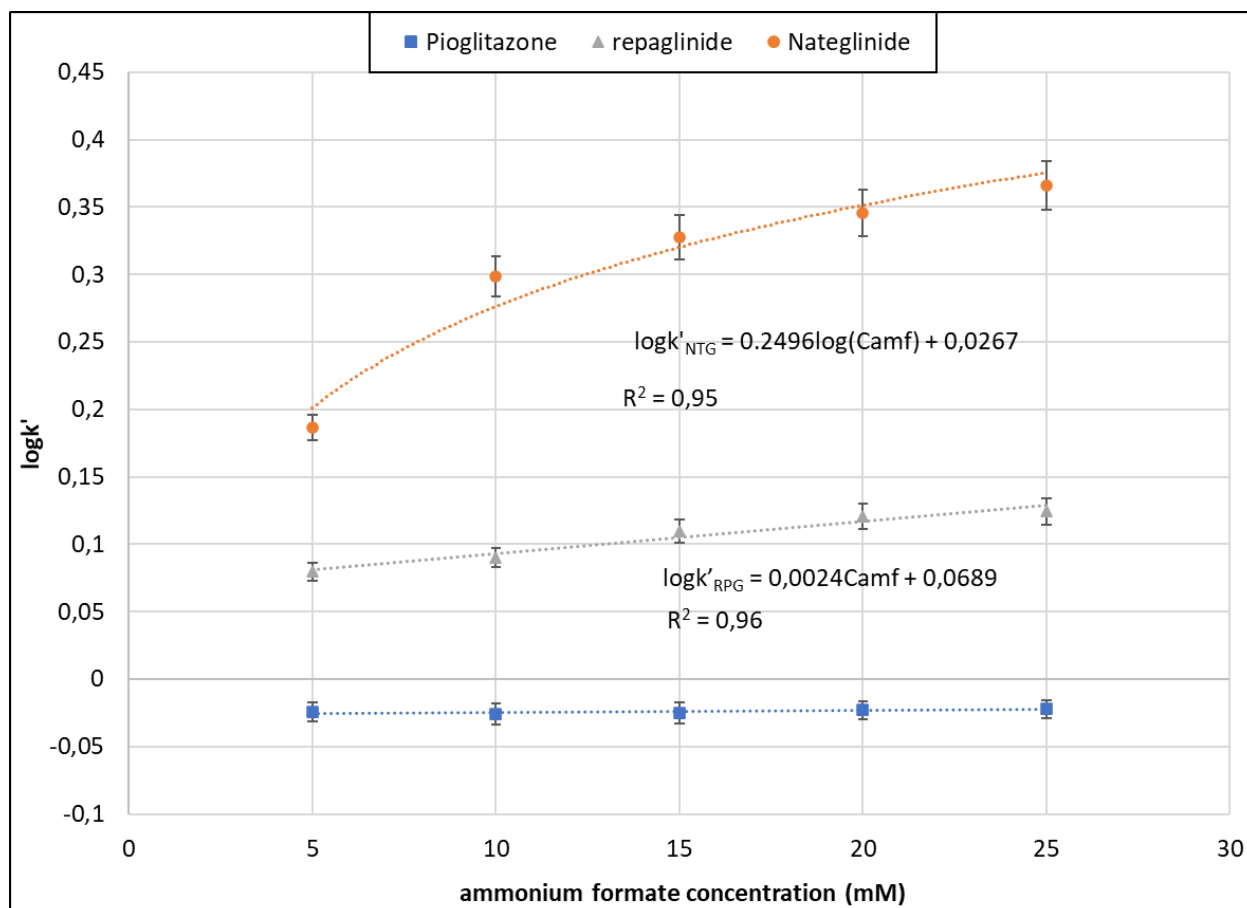
**Σχήμα 6.5** τυπικά ιοντικά χρωματογραφήματα που προέκυψαν κατά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων της ουσίας pateglinide σε τιμές περιεκτικότητας νερού I) 5% και II) 10% στην κινητή φάση, υπό σταθερή ποσότητα μυρμηκικού αμμωνίου.

### 6.5.3.2 Συγκέντρωση άλατος

Η προσθήκη αλάτων στις ύδατο-οργανικές κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία HILIC είναι ιδιαίτερα σημαντική και συστήνεται από τους κατασκευαστές στατικών φάσεων με σκοπό τον έλεγχο της ισχύος των αναπτυσσόμενων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις ιοντίσιμες λειτουργικές ομάδες της στατικής φάσης και τα μόρια των αναλυτών. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος των κινητών φάσεων έχει αποδειχθεί πως βελτιώνει σημαντικά τα χαρακτηριστικά συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών, ενώ παράλληλα περιορίζει αισθητά την εκδήλωση φαινομένων ανεπαρκούς συγκράτησης ή καθυστερημένης έκλουσης, τα οποία ενδέχεται να προκύψουν σε περίπτωση ανάπτυξης ισχυρών απωστικών ή ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ακόμη, η προσθήκη αλάτων στην κινητή φάση μπορεί να βελτιώσει και την συγκράτηση ουδέτερων πολικών μορίων, γεγονός οφειλόμενο στην αύξηση του πάχους της υδατικής ψευδοστοιβάδας και την ανάπτυξη φαινομένων εξαλάτωσης, τα οποία λαμβάνουν χώρα σε υψηλές τιμές συγκέντρωσης άλατος.

Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η σύζευξη της χρωματογραφίας HILIC με την φασματομετρία μαζών, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην προσεκτική ρύθμιση των επιπέδων άλατος στην κινητή φάση, καθώς σε αντίθετη περίπτωση είναι δυνατή η ανάπτυξη ισχυρών φαινομένων ιοντικής καταστολής, τα οποία ενδέχεται να περιορίσουν αισθητά την ένταση του αναλυτικού σήματος. Ως εκ τούτου, κατά το στάδιο βελτιστοποίησης της κινητής φάσης εξετάστηκε επίδραση

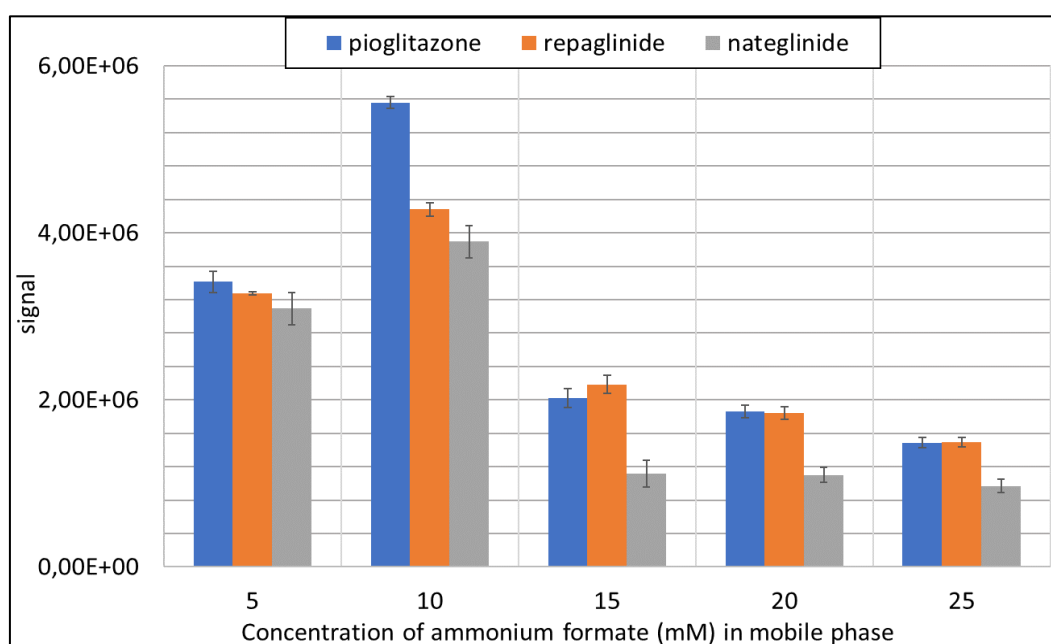
της συγκέντρωσης άλατος σε ένα εύρος τιμών από 5 έως 25 mM, διατηρώντας παράλληλα σταθερό το ποσοστό του νερού της κινητής φάσης σε τιμή 10%. Το μυρμηκικό αμμώνιο αποτέλεσε το άλας εκλογής για την παρασκευή των σχετικών κινητών φάσεων, καθώς παρουσιάζει επαρκή διαλυτότητα σε κινητές φάσεις με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή και αυξημένη πτητικότητα, η οποία διασφαλίζει άριστη συμβατότητα με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών.



**Σχήμα 6.6** Γραφική αναπαράσταση της τιμής του λογαρίθμου του παράγοντα χωρητικότητας  $\log k'$  συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου.

Από την εξέταση του σχετικού διαγράμματος επίδρασης της ποσότητας άλατος στον λογάριθμο της τιμής του παράγοντα χωρητικότητας (σχήμα 6.6) είναι εμφανές πως η συγκράτηση του αναλύτη pioglitazone δεν επηρεάζεται από την ιονική ισχύ της κινητής φάσης, γεγονός που υποδηλώνει την αμελητέα επίδραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην προκειμένη περίπτωση. Η συγκράτηση των repaglinide και nateglinide, ωστόσο, φαίνεται να αυξάνεται κατά γραμμικό και λογαριθμικό τρόπο αντίστοιχα με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος στην κινητή φάση, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην συνδυαστική μείωση της ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την αύξηση του πάχους της υδατικής ψευδοστοιβάδας, λόγω της συσσώρευσης εφυδατομένων ιόντων σε αυτή. Επιπλέον, είναι εμφανές πως το μέγεθος της μεταβολής της συγκράτησης των αναλυτών αυξάνεται κατά αντιστοιχία με την πολικότητα των εξεταζόμενων ουσιών, ωστόσο σε κάθε περίπτωση το μέτρο της τιμής του λογαρίθμου του

παράγοντα χωρητικότητας ( $\log k'$ ) δεν εμφανίζει αξιοσημείωτες μεταβολές, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει πως στις επαμφοτερίζουσες στατικές φάσεις οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μετέχουν σε μικρότερο βαθμό στην συγκράτηση των αναλυτών, σε σχέση με της φορτισμένες στατικές φάσεις. Συνεπώς, η εξέταση της επίδρασης των μεταβολών της ιονικής ισχύος στο μέγεθος του αναλυτικού σήματος αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης άλατος, δεδομένου ότι οι χρωματογραφικές κορυφές των αναλυτών επέδειξαν ικανοποιητική συμμετρία σε όλες τις τιμές του προαναφερόμενου εύρους συγκεντρώσεων.



Σχήμα 6.7 Γραφική παράσταση της έντασης του αναλυτικού σήματος συναρτήσει της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου.

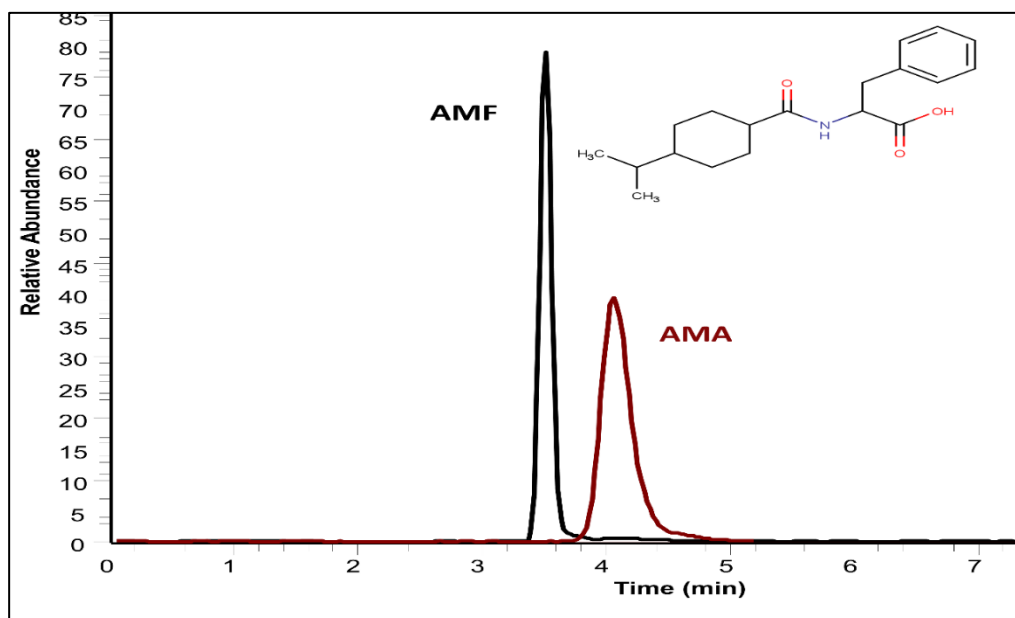
Όπως προκύπτει από το σχετικό διάγραμμα (σχήμα 6.7), η ένταση του αναλυτικού σήματος φαίνεται να λαμβάνει την μέγιστη τιμή της κατά την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10mM, ενώ η περεταίρω αύξηση της ιονικής ισχύος της κινητής φάσης επιφέρει σημαντική υποβάθμιση στην απόκριση του οργάνου, η οποία μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενα ιοντικής καταστολής.

### 6.5.3.3 Επίδραση τύπου άλατος

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.3, το μυρμηκικό αμμώνιο (ammonium formate) και το οξικό αμμώνιο (ammonium acetate) αποτελούν τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα άλατα στη HILIC, λόγω της υψηλής διαλυτότητας που επιδεικνύουν σε κινητές φάσεις πλούσιες σε οργανικό τροποποιητή και της συμβατότητάς τους με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών. Γενικώς, τα συγκεκριμένα άλατα φαίνεται να ασκούν παρόμοιες επιδράσεις στην εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις η επιλογή του ενός άλατος έναντι του άλλου ενδέχεται να προκαλέσει αλλαγές στον χρόνο έκλυσης των αναλυτών, το μέγεθος των οποίων καθορίζεται σε μεγάλο

βαθμό από τις χημικές ιδιότητες της στατικής φάσης [36]. Συγκεκριμένα, η επίδραση του τύπου άλατος αναμένεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική σε στατικές φάσεις στις οποίες οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στην συγκράτηση των αναλυτών, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των στατικών φάσεων μη τροποποιημένης πηκτής πυριτίας και των στατικών φάσεων τροποποιημένης πυριτίας με λειτουργικές ομάδες αμινών. Αντιθέτως, στην περίπτωση των επαμφοτερίζουσών στατικών φάσεων αναμένονται μικρότερες αποκλίσεις ως προς τον χρόνο έκλουσης των αναλυτών, ωστόσο είναι δυνατή η εκδήλωση σημαντικών διαφορών στα χαρακτηριστικά συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών [84].

Συνεπώς, στα πλαίσια βελτιστοποίησης της κινητής φάσης κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της επίδρασης του τύπου άλατος στην απόδοση της χρωματογραφικής μεθόδου. Αναλυτικότερα, εξετάστηκε η αντικατάσταση άλατος του μυρμηκικού αμμωνίου (pH=6,4) από άλας οξικού αμμωνίου (pH=6,9), διατηρώντας σταθερό το ποσοστό νερού της κινητής φάσης στο 10% και την συγκέντρωση άλατος σε τιμή 10mM. Όπως διαπιστώθηκε, τα pioglitazone και repaglinide δεν επέδειξαν αξιόλογες μεταβολές ως προς τον χρόνο έκλουσης και τα χαρακτηριστικά των κορυφών τους, ωστόσο, στην περίπτωση του nateglinide παρατηρήθηκε αισθητή διεύρυνση της χρωματογραφικής κορυφής κατά την αντικατάσταση του μυρμηκικού αμμωνίου από το αντίστοιχο οξικό άλας (σχήμα 6.8). Συνεπώς, το μυρμηκικό αμμώνιο διατηρήθηκε ως άλας εκλογής για την προετοιμασία της κινητής φάσης.

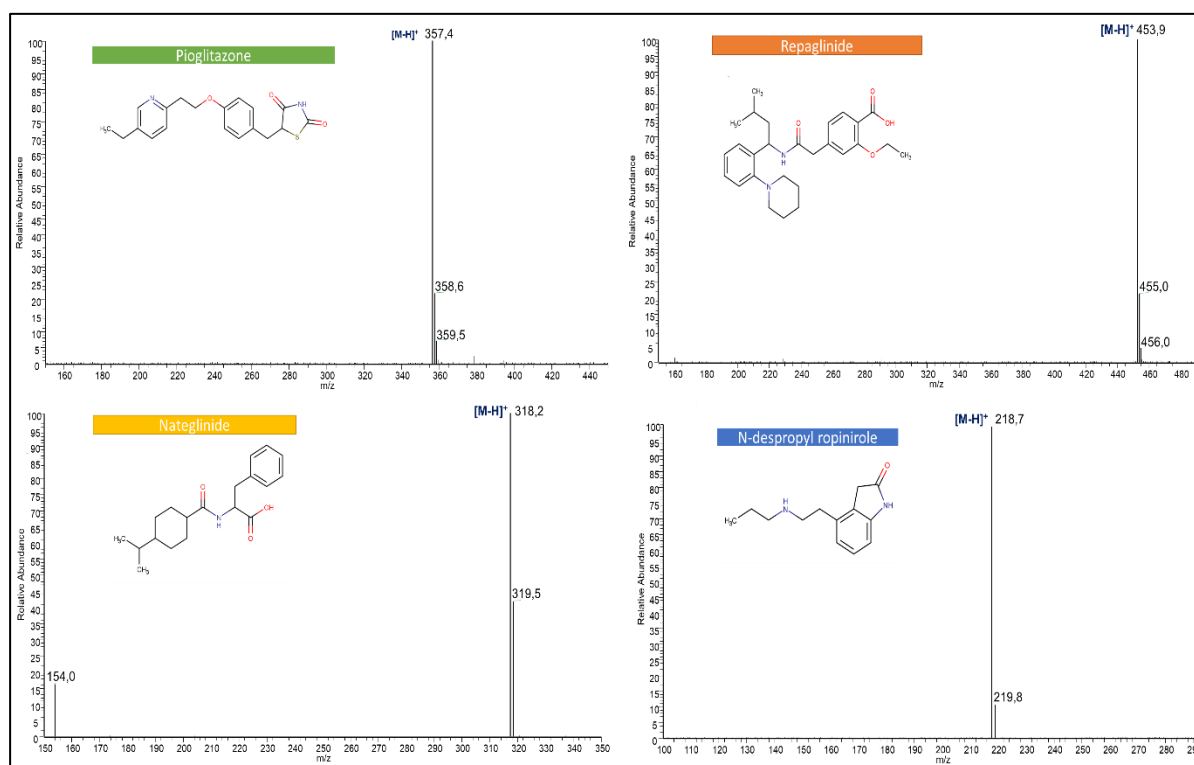


**Σχήμα 6.8** Επίδραση του τύπου άλατος στην χρωματογραφική κορυφή του αναλύτη nateglinide.

#### 6.5.4 Βελτιστοποίηση φασματόμετρου μαζών

Κατά το στάδιο ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών και της πηγής ιοντισμού με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας του συστήματος ανίχνευσης. Η ρύθμιση των σχετικών παραμέτρων

(tuning) πραγματοποιήθηκε μέσω της άμεσης έγχυσης (direct infusion) στο φασματόμετρο μαζών προτύπων διαλυμάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών και του εσωτερικού προτύπου σε επίπεδο συγκέντρωσης  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ως διαλύτης εργασίας χρησιμοποιήθηκε η τελική κινητή φάση και η ταχύτητα ροής τέθηκε στα  $0,2 \text{ mL/min}$ . Οι παράμετροι της θερμοκρασίας της πηγής, του δυναμικού (AQAmx) και του δυναμικού του τριχοειδούς τέθηκαν σε τιμές  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ V}$  και  $4,0 \text{ kV}$  αντίστοιχα, οδηγώντας σε αύξηση της σχετικής αφθονίας των μοριακών ιόντων και μειωμένη θραυσματοποίηση. Ο ιοντισμός των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου πραγματοποιήθηκε με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό σε λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI(+)). Στο σχήμα 6.9 παρατίθενται τα αντιπροσωπευτικά φάσματα μαζών των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου, τα οποία λήφθηκαν υπό βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS.



**Σχήμα 6.9** Αντιπροσωπευτικά φάσματα μαζών των αναλυτών pioglitazone, repaglinide, nateglinide και του εσωτερικού προτύπου N-despropyl roprinole σε συνθήκες ESI(+)

Για την καταγραφή των σχετικών αναλυτικών δεδομένων επιλέχθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM mode), η οποία ενδείκνυται για ποσοτικούς προσδιορισμούς καθώς προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε σχέση με την τεχνική σάρωσης ιόντων. Η ανίχνευση των pioglitazone, repaglinide, nateglinide και του εσωτερικού προτύπου N-despropyl roprinole πραγματοποιείται μέσω της παρακολούθησης των αντίστοιχων πρωτονιομένων μοριακών ιόντων  $[M-H]^+$  σε ξεχωριστά παράθυρα με τιμές  $m/z$  357,4, 453,9, 318,2, και 218,7 αντίστοιχα. Στον πίνακα 5 συνοψίζονται οι κύριες παράμετροι της μεθόδου

SIM που αναπτύχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.

**Πίνακας 5** Μέθοδος παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (SIM) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών pioglitazone, repaglinide, nateglinide και του εσωτερικού προτύπου N-despropyl roprinole

Χρονικό παράθυρο (min)	ουσία	Πολικότητα	Τάση πηγής (V)	Τάση τριχοειδούς (kV)	Επιλεγμένα ιόντα (m/z)	Mass span
0-15	Pioglitazone	+ve	20	4,0	[M-H <sup>+</sup> ]: 357,4	0,1
0-15	Repaglinide	+ve	20	4,0	[M-H <sup>+</sup> ]: 453,9	0,1
0-15	Nateglinide	+ve	20	4,0	[M-H <sup>+</sup> ]: 318,2	0,1
0-15	N-despropyl roprinole	+ve	20	4,0	[M-H <sup>+</sup> ]: 218,7	0,1

#### 5.5.4 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC-MS

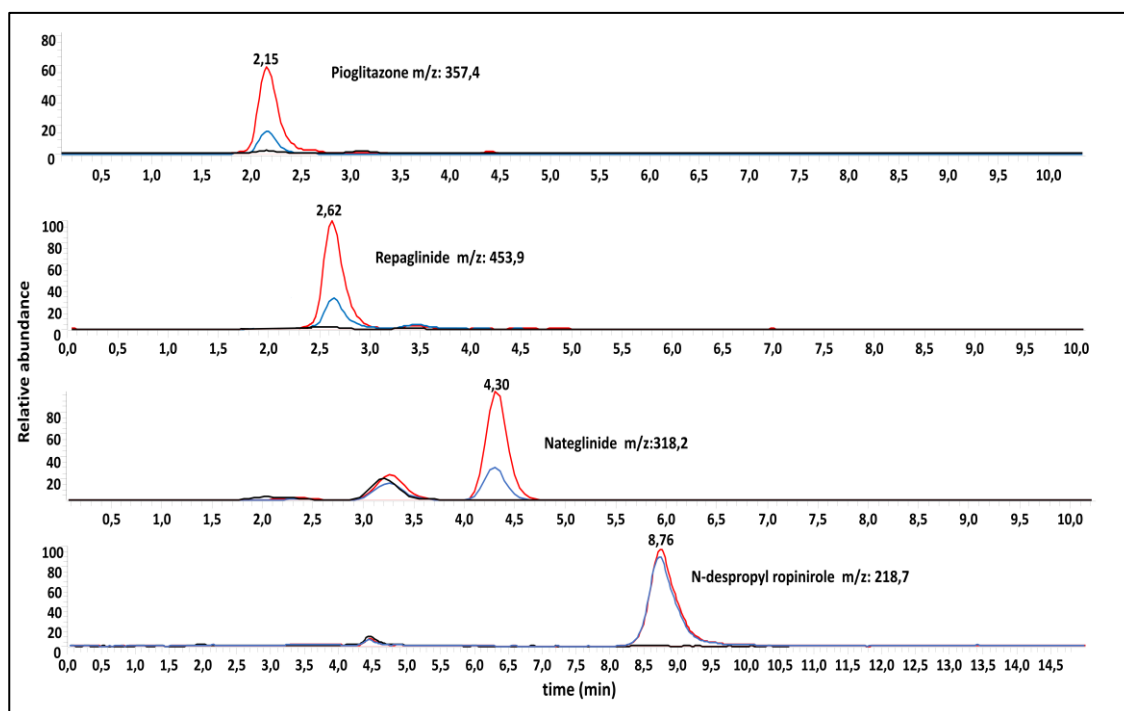
Ανακεφαλαιώνοντας, οι τελικές συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS, όπως προέκυψαν από την μελέτη βελτιστοποίησης της χρωματογραφικής μεθόδου συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 6).

**Πίνακας 6** Σύνοψη των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας του συστήματος LC-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπογλυκαιμικών ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide

<b>Υγροχρωματογραφικό σύστημα</b>	
Στατική φάση	Αναλυτική στήλη ZIC®-cHILIC (150 x 2.1 mm, 3 μm)
Κινητή φάση	10% v/v διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 10 mM (pH=6,4) σε ακετονιτρίλιο
Ταχύτητα ροής	0,2 mL/min
<b>Φασματοόμετρο μαζών</b>	
Τεχνική ιοντισμού	Ηλεκτροψεκασμός- λειτουργία θετικού ιοντισμού (ESI(+))
Θερμοκρασία πηγής	250 °C
Τάση πηγής	20 V
Δυναμικό τριχοειδούς	4,0 kV
Σάρωση ιόντων	Τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (SIM)

Στο σχήμα 6.10 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος ανθρώπινου πλάσματος, το οποίο επικαλύπτεται από τα ιοντικά χρωματογραφήματα

εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων. Όπως είναι εμφανές, ο συνολικός χρόνος ανάλυσης δεν υπερβαίνει τα 10 λεπτά και οι χρωματογραφικές κορυφές των αναλυτών pioglitazone, repaglinide, nateglinide και του εσωτερικού προτύπου εκκλούνται στα 2,15, 2,62, 4,30 και 8,76 λεπτά αντίστοιχα. Παράλληλα, οι σχετικές κορυφές επιδεικνύουν ικανοποιητική συμμετρία και επαρκή διαχωριστικότητα από τις παρεμποδίζουσες κορυφές του βιολογικού υλικού.



**Σχήμα 6.10** Ιοντικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος ανθρώπινου πλάσματος (μαύρη γραμμή), επικαλυπτόμενο από τα ιοντικά χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (μπλε γραμμή-μεσαίο, κόκκινη γραμμή-υψηλό): pioglitazone 500 και 2000 ng/mL, repaglinide 125 και 500 ng/mL, nateglinide 2500 και 10000 ng/mL, εσωτερικό πρότυπο 240 ng/mL. Στατική φάση: Αναλυτική στήλη ZIC®-cHILIC. Κινητή φάση: 10% v/v διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 10 mM (pH=6,4) σε ακετονιτρίλιο. Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,2 mL/min. Καταγραφή φάσματος σε λειτουργία παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (SIM mode).



## **6.6 Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) για την ανάκτηση των υπογλυκαιμικών ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.**

### 6.6.1 Ανθρώπινο πλάσμα

Το ανθρώπινο πλάσμα αποτελεί ένα διαυγές υποκίτρινο υγρό υψηλού ιξώδους και συνιστά το υγρό τμήμα του ολικού αίματος, εντός του οποίου βρίσκονται διεσπαρμένα τα έμμορφα συστατικά του, στα οποία συγκαταλέγονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Αποτελεί το 20% του εξωκυττάριου υγρού και καταλαμβάνει κατά προσέγγιση το 55% του συνολικού όγκου αίματος. Η απομόνωσή του πλάσματος πραγματοποιείται μέσω φυγοκέντρησης του ολικού αίματος, με σκοπό τον διαχωρισμό των κυτταρικών στοιχείων του, παρουσία κατάλληλου αντιπηκτικού παράγοντα, όπως EDTA, ηπαρίνης ή κιτρικών ιόντων[85].

Το νερό αποτελεί το κύριο συστατικό του πλάσματος και είναι υπεύθυνο για το 91% του συνολικού του βάρους. Το εναπομείναν ποσοστό συμπληρώνεται από διαλυτές οργανικές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες (πχ. αλβουμίνη, σφαιρίνες, ινωδογόνο), οι οποίες αποτελούν το 7% του συνολικού βάρους, θρεπτικές ουσίες, όπως γλυκόζη, αμινοξέα και λιπίδια, μεταβολικά παραπροϊόντα καθώς και από έναν μεγάλο αριθμό ανόργανων ιόντων. Τα τελευταία, αν και αποτελούν μόλις το 1% του συνολικού βάρους ευρίσκονται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις είναι υπεύθυνα για ορισμένες κρίσιμες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η διατήρηση της οσμωτικότητας του αίματος, η ρύθμιση του pH και ο έλεγχος της διεγερσιμότητας των κυτταρικών μεμβρανών[47].

Το λιπιδικό κλάσμα του πλάσματος αποτελείται κυρίως από ελεύθερα λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και χοληστερόλη. Οι συγκεντρώσεις των προαναφερόμενων συστατικών εμφανίζουν σημαντική διατομική μεταβλητότητα, η οποία σχετίζεται τόσο με γενετικούς όσο και διατροφικούς παράγοντες και η παρουσία τους ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση της βιοαναλυτικής μεθόδου [86,87]. Συνεπώς είναι σημαντική η απομάκρυνσή τους, μέσω της εφαρμογής κατάλληλων μεθόδων προκατεργασίας, με σκοπό τον κατά δύναμιν περιορισμό της παρεμποδιστικής τους δράσης, η οποία ενδέχεται είναι ιδιαίτερα έντονη στην τεχνική της φασματομετρίας μαζών.

### 6.6.2 Καταλληλόλητα εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο

Λαμβάνοντας υπόψιν την πολυπλοκότητα που παρουσιάζει η σύσταση του ανθρώπινου πλάσματος και την υψηλή περιεκτικότητα σε παρεμποδίζουσες ουσίες, είναι προφανές πως απαραίτητη προϋπόθεση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εξεταζόμενων υπογλυκαιμικών ουσιών αποτελεί η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής μεθόδου προκατεργασίας, με σκοπό την εκλεκτική ανάκτηση των αναλυτών από το υλικό μήτρας. Στην παρούσα εργασία αποφασίστηκε η αξιοποίηση της τεχνικής εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE), η οποία συνιστά μια τεχνική μικροεκχύλισης που συμμορφώνεται σε μεγάλο βαθμό με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας και συγκεντρώνει αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια.

Όπως αναφέρθηκε και στην σχετική ενότητα 2.2 , τα προσροφητικά μέσα που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη τεχνική προκατεργασίας αποτελούνται από ένα υφασμάτινο υπόστρωμα κυτταρίνης, ή ενός κατάλληλου συνθετικού υλικού, το οποίο επικαλύπτεται μέσω της τεχνολογίας sol-gel με ένα υβριδικό οργανικο-ανόργανο προσροφητικό πολυμερές υπό τη μορφή λεπτής επίστρωσης. Η αξιοποίηση της τεχνολογίας sol-gel προσδίδει υψηλή μηχανική και χημική σταθερότητα στις σχετικές επιστρώσεις, διευκολύνοντας σημαντικά την πορεία κατεργασίας των αναλυόμενων δειγμάτων, η οποία πραγματοποιείται μέσω της άμεσης εισαγωγής των προσροφητικών μέσων σε αυτά. Παράλληλα, είναι εφικτή η επαναχρησιμοποίηση των συσκευών FPSE για έναν σημαντικό αριθμό αναλύσεων, περί τις 20 με 25, γεγονός το οποίο ενισχύει σημαντικά την περιβαλλοντική βιωσιμότητα της τεχνικής και μειώνει τα λειτουργικά έξοδα σε μεγάλο βαθμό[88].

Κατά την ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας εντοπίστηκαν αρκετές εφαρμογές της FPSE σχετικά με τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων φαρμακολογικού και τοξικολογικού ενδιαφέροντος σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως δείγματα πλάσματος, ολικού αίματος, μητρικού γάλακτος και ούρων, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα της τεχνικής στο πεδίο της βιοαναλυτικής χημείας. [89–92]. Δεδομένου ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της τεχνικής FPSE για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών υπογλυκαιμικών παραγόντων, κρίθηκε σκόπιμη η ενσωμάτωση τεχνικών πειραματικού σχεδιασμού κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας με σκοπό την βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού που διέπει την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών, την ανίχνευση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων καθώς και την βελτιστοποίηση των σχετικών πειραματικών παραμέτρων, με σκοπό την μεγιστοποίηση της ανάκτησης και την ενίσχυση της ευαισθησίας της μεθόδου.

### 6.6.3 επιλογή προσροφητικού μέσου FPSE

Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού μέσου αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιτυχή ανάπτυξη μιας μεθόδου FPSE. Πέρα από τα χαρακτηριστικά της sol-gel επίστρωσης ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί κατά το στάδιο αυτό και στις ιδιότητες του υφασμάτινου υποστρώματος, καθώς σε αντίθεση με τις υπόλοιπες τεχνικές μικροεκχύλισης, τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στην τεχνική FPSE μετέχουν ενεργά στην συγκράτηση των αναλυτών, συμβάλλοντας στην εκλεκτικότητα της εκχύλισης [93]. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προσδιοριζόμενων ουσιών και τις ιδιότητες των λειτουργικών τους ομάδων, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά πολικά υποστρώματα κυτταρίνης, τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων προσρόφησης με τους αναλύτες, όπως αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και δεσμών υδρογόνου. Κατά την διάρκεια των διερευνητικών πειραμάτων εξετάστηκαν 4 προσροφητικά μέσα FPSE με sol-gel επιστρώσεις διαφορετικής πολικότητας, οι οποίες περιγράφονται στα παρακάτω σημεία:

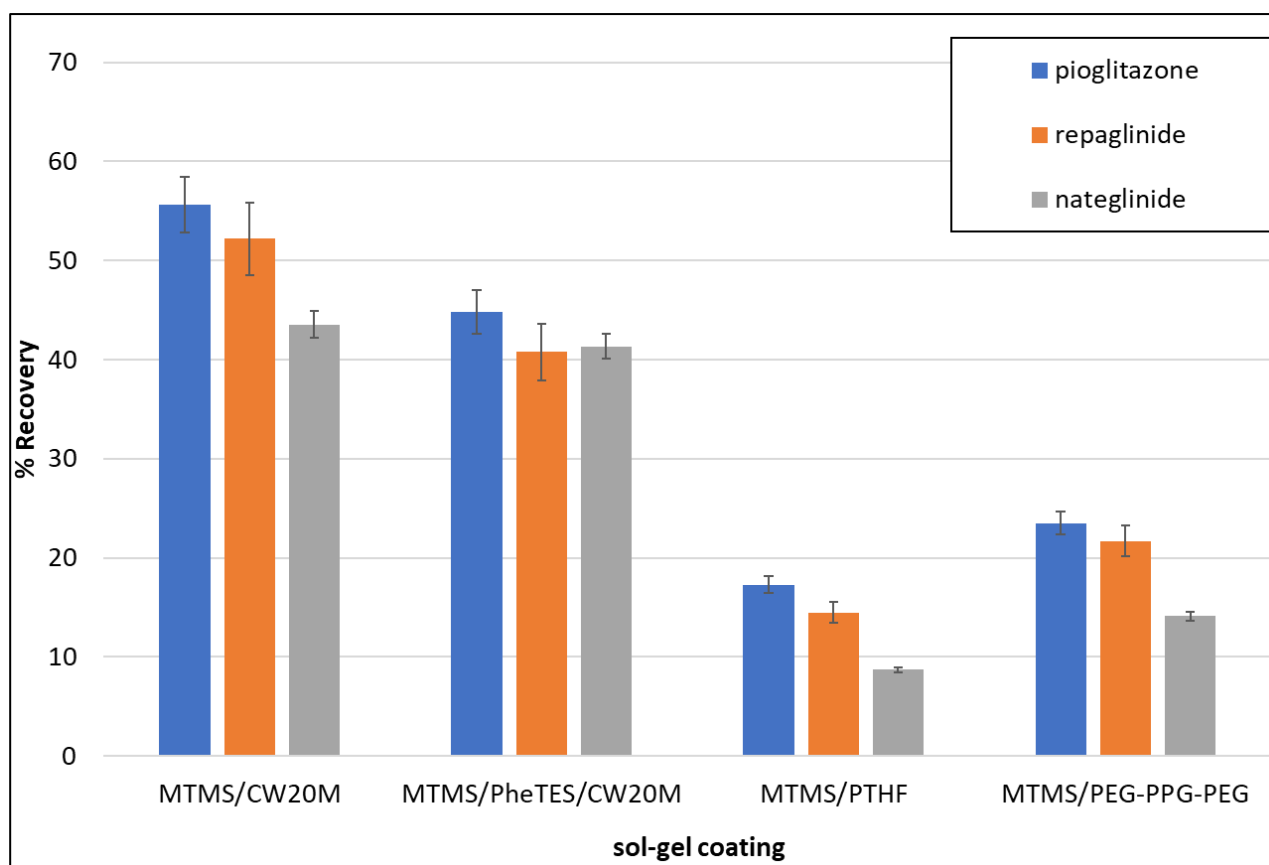
1. Sol-gel MTMS (methyl-trimethoxy silane)/Carbowax 20M
2. Sol-gel MTMS/ polytetrahydrofuran (PTHF)
3. Sol-gel MTMS/ poly (ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol)glycol (PEG-PPG-PEG)
4. Sol-gel MTMS/PheTES (phenyl-triethoxy silane)/ Carbowax 20M

Οι επιστρώσεις 1 και 4 διαθέτουν όμοια οργανικά πολυμερή, άλλα διαφέρουν ως προς το είδος των χρησιμοποιούμενων οργανοπυριτικών ενώσεων που δομούν το ανόργανο πολυμερές δίκτυο. Συνεπώς ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορές ως προς την εκλεκτικότητά τους, καθώς ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων στο μόριο του μονομερούς φαινυλο-τριαθοξυ-πυριτίου (PheTES) επιτρέπει θεωρητικά την ανάπτυξη επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων (πχ. π-π αλληλεπιδράσεις) με τις αρωματικές λειτουργικές ομάδες των αναλυτών. Στον πίνακα 7 συνοψίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά των προσροφητικών μέσων FPSE που μελετήθηκαν.

**Πίνακας 7** Σύνοψη ορισμένων βασικών χαρακτηριστικών των προσροφητικών μέσων FPSE που μελετήθηκαν κατά την φάση ανάπτυξης της μεθόδου κατεργασίας.

Προσροφητικό μέσο FPSE	Οργανικό πολυμερές	πολικότητα επίστρωσης	Χωρητικότητα επίστρωσης
Sol-gel CW20M (Cellulose)	polyethylene glycol	Υψηλή	8,63 mg/cm <sup>2</sup>
Sol-gel PTHF (Cellulose)	polytetrahydrofuran	Μέτρια	3,96 mg/cm <sup>2</sup>
Sol-gel PEG-PPG-PEG (cellulose)	poly (ethylene glycol)- <i>block</i> -poly(propylene glycol)- <i>block</i> -poly(ethylene glycol)	Μέτρια	5,68 mg/cm <sup>2</sup>
Sol-gel/PheTES CW20M (Cellulose)	polyethylene glycol	Υψηλή	8,63 mg/cm <sup>2</sup>

Η διεξαγωγή των διερευνητικών πειραμάτων για την επιλογή του βέλτιστου προσροφητικού μέσου πραγματοποιήθηκε αναλύοντας ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας σε νερό, συγκέντρωσης 2000 ng mL<sup>-1</sup> για όλους τους αναλύτες, διατηρώντας παράλληλα σταθερές τις σχετικές πειραματικές παραμέτρους των σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης (πίνακας 8). Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εξεταζόμενων μέσων, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική ανάκτηση των αναλυτών και τα σχετικά αποτελέσματα συνοψίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (σχήμα 6.11).



**Σχήμα 6.11** Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της επί τοις εκατό ανάκτησης των αναλυτών, μεταξύ των προσροφητικών μέσων FPSE που μελετήθηκαν κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας.

**Πίνακας 8** Πειραματικές συνθήκες σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης των προκαταρκτικών πειραμάτων για την επιλογή του βέλτιστου προσροφητικού μέσου FPSE.

<b>Εκχύλιση (extraction)</b>	
<b>Πειραματικές παράμετροι</b>	<b>Συνθήκες</b>
Όγκος εκχύλισης	1 mL
Χρόνος εκχύλισης	25 min
Μαγνητική ανάδευση	600 rpm
Θερμοκρασία εκχύλισης	35 °C
Συγκέντρωση άλατος AMF	12 mM
%v/v HCOOH	0,05 %
<b>Εκρόφηση (desorption)</b>	
<b>Πειραματικές παράμετροι</b>	<b>Συνθήκες</b>
Διαλύτης εκρόφησης	ACN
Χρόνος εκρόφησης	20 min
Όγκος εκρόφησης	0,5 mL
Θερμοκρασία εκρόφησης	25 °C

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, η πολικότητα του οργανικού πολυμερούς στην sol-gel επίστρωση φαίνεται να αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα για τον καθορισμό της ανάκτησης των αναλυτών, καθώς σημειώνονται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επιστρώσεις μέτριας και υψηλής πολικότητας, με τις τελευταίες να επιδεικνύουν τη βέλτιστη ανάκτηση για το σύνολο των αναλυτών. Μεταξύ των επιστρώσεων Carbowax20M παρατηρήθηκαν ορισμένες μικρές διαφορές ως προς την απόδοση και την εκλεκτικότητα τις εκχύλισης, οι οποίες υποδηλώνουν την έως έναν βαθμό συμμετοχή των οργανοπυριτικών μονομερών στον μηχανισμό προσρόφησης των αναλυτών. Συνολικά, η sol-gel επίστρωση MTMS/Carbowax 20M παρουσίασε την μέγιστη ανάκτηση για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις και ως εκ τούτου το εν λόγω προσροφητικό μέσο χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα στάδια ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας.

#### 6.6.4 Διαστάσεις προσροφητικού μέσου

Η δυνατότητα τροποποίησης των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των προσροφητικών μέσων αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής FPSE, καθώς επιτρέπει την εύκολη παραμετροποίηση της επιφάνειας επαφής ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε μεθόδου. Στην παρούσα εφαρμογή, οι διαστάσεις των μεμβρανών FPSE τροποποιήθηκαν καταλλήλως, προκειμένου να αποκτηθούν κυκλικοί δίσκοι εσωτερικής διαμέτρου 0,75 cm και επιφάνειας 1,76 cm<sup>2</sup> ανά πλευρά, κατά επαναλήψιμο τρόπο (εικόνα 6.1).



**Εικόνα 6.1** Κυκλικός δίσκος διαμέτρου 1,5 cm προσροφητικού μέσου FPSE με επίστρωση sol-gel MTMS/CW20M που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μέθοδο προκατεργασίας.

### **6.7 Εφαρμογή κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού στην ανάπτυξη της μεθόδου FPSE**

Η κατεργασία του βιολογικού υλικού με την τεχνική FPSE έγινε σύμφωνα με την πειραματική πορεία τεσσάρων σταδίων, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.3. Εν συντομία, κατά το 1<sup>ο</sup> και 2<sup>ο</sup> στάδιο το προσροφητικό μέσο εκπλένεται αρχικά με σύστημα οργανικών διαλυτών ACN/MeOH σε αναλογία 50:50 v/v και εν συνεχεία με υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O με σκοπό τον καθαρισμό και την εμβροχή της sol-gel επίστρωσης. Ακολούθως, το μέσο FPSE εισάγεται στον περιέκτη που φέρει το προς κατεργασία δείγμα, όπου λαμβάνει χώρα η προσρόφηση των αναλυτών και μετά την πάροδο ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος μεταφέρεται στον τελικό περιέκτη, όπου πραγματοποιείται η εκρόφηση των ουσιών. Στην παρούσα μελέτη ως διαλύτης ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο (ACN), το οποίο συνιστά και τον διαλύτη εργασίας της χρωματογραφικής μεθόδου. Συνεπώς, είναι δυνατή η άμεση ένεση του προκύπτοντος διαλύματος στο χρωματογραφικό σύστημα, ύστερα από διήθηση με κατάλληλο μικροφίλτρο σύριγγας (PTFE, 13 mm, pore size 0.45 μm), χωρίς να είναι απαραίτητη η διενέργεια επιπρόσθετων βημάτων συμπύκνωσης και ανασύστασης. Μετά την ολοκλήρωση του 4<sup>ου</sup> σταδίου το προσροφητικό μέσο πλένεται με το σύστημα οργανικών διαλυτών ACN/MeOH 50:50 v/v και αφήνεται να στεγνώσει πλήρως προτού αποθηκευτεί σε κατάλληλο σφραγιαζόμενο περιέκτη μέχρι την επόμενη χρήση του. Συνολικά, κάθε προσροφητικό μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για έναν αριθμό 20 αναλύσεων χωρίς την εκδήλωση σημαντικής έκπτωσης στην απόδοση της εκχύλισης.

Κατά το στάδιο ανάκτησης της μεθόδου προκατεργασίας έγινε εφαρμογή κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού, με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης μιας σειράς πειραματικών παραμέτρων στην απόδοση της εκχύλισης και τη βελτίωση της ανάκτησης των αναλυτών. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν συνολικά 8 παράγοντες, σε δύο επίπεδα ο καθένας, και το πειραματικό πλάνο των πειραμάτων (πειραματική μήτρα) περιελάμβανε το  $\frac{1}{4}$  του συνόλου των δυνατών συνδυασμών μεταξύ των επιπέδων των παραγόντων. Για τη διεξαγωγή των προκαθορισμένων πειραμάτων του προκύπτοντος  $2^{8-2}$  κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα εργασίας, συγκέντρωσης 100, 25 και 500 ng mL<sup>-1</sup> για τους αναλύτες pioglitazone, repaglinide και nateglinide αντίστοιχα.

Η επιλογή των εξεταζόμενων παραγόντων βασίστηκε στη διενέργεια προκαταρκτικών διερευνητικών πειραμάτων, κατά τα οποία εξετάστηκε η επίδραση της μεταβολής αρκετών πειραματικών παραμέτρων των σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης στην ανάκτηση των αναλυτών. Στους παράγοντες του σταδίου εκχύλισης που συμπεριλήφθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό περιλαμβάνεται η μαγνητική ανάδευση, η εφαρμογή θέρμανσης κατά την εκχύλιση, ο όγκος εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης, καθώς και η χρήση του μυρμηκικού οξέος, το οποίο προστίθεται στο χρησιμοποιούμενο διάλυμα άλατος AMF 25 mM, με σκοπό τη ρύθμιση του pH σε τιμή ίση με 4. Οι παράγοντες του σταδίου εκρόφησης που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν την εφαρμογή θέρμανσης, τον όγκο εκρόφησης και τον χρόνο εκρόφησης. Ως εξαρτημένες μεταβλητές (πειραματικές αποκρίσεις) ορίστηκαν οι επί τοις εκατό σχετικές ανακτήσεις των pioglitazone, repaglinide και nateglinide, οι οποίες κωδικοποιούνται ως Y<sub>PGL</sub>, Y<sub>RPG</sub> και Y<sub>NTG</sub> αντίστοιχα. Οι κωδικοποιήσεις των παραπάνω παραγόντων και τα σχετικά επίπεδα στα οποία μελετήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 9).

**Πίνακας 9** Σύνοψη επιπέδων, παραγόντων και πειραματικών αποκρίσεων για τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό  $2^{8-2}$ .

		Παράγοντες	
κωδικοποίηση	περιγραφή	Επίπεδα	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό (+1)
A	Όγκος εκχύλισης (mL)	1	2
B	Περιεκτικότητα HCOOH (% v/v)	0	0,07
C	Χρόνος εκχύλισης (min)	10	50
D	Μαγνητική ανάδευση (rpm)	0	650
E	Θέρμανση-εκχύλιση (°C)	25	35
F	Όγκος εκρόφησης (mL)	0,5	1
G	Χρόνος εκρόφησης (min)	5	30
H	Θέρμανση-εκρόφηση (°C)	25	35

Αποκρίσεις	
κωδικοποίηση	περιγραφή
$Y_{PGL}$	% Σχετική ανάκτηση pioglitazone
$Y_{RPG}$	% Σχετική ανάκτηση repaglinide
$Y_{NTG}$	% Σχετική ανάκτηση nateglinide

Αφού εκτελέστηκαν τα προβλεπόμενα από τον πειραματικό σχεδιασμό πειράματα (παράρτημα Α), στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των σχετικών δεδομένων με χρήση του λογισμικού Design Expert (v. 13, Stat-Ease, USA). Η αξιολόγηση των σχετικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της εξέτασης των διαγραμμάτων ημικανονικής πιθανότητας, των διαγραμμάτων Pareto και τη στατιστική δοκιμασία ανάλυσης διακύμανσης (Analysis of Variance-ANOVA). Μέσω της δοκιμασίας ANOVA παρέχονται σημαντικές πληροφορίες για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των εξισώσεων πολλαπλής παλινδρόμησης που εξάγονται με σκοπό μαθηματική περιγραφή των πειραματικών αποκρίσεων και των επιμέρους αυτών όρων, που σχετίζονται με τις κύριες επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται στην στατιστική δοκιμασία F-test (ενός άκρου) κατά την οποία οι



πειραματικές τιμές F συγκρίνονται με τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές, που αναφέρονται σε συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας στάθμη εμπιστοσύνης, προκειμένου να διερευνηθεί εάν είναι δυνατή η απόρριψη της μηδενικής υποθέσεως (null Hypothesis- $H_0$ ), η οποία αποδίδει τις παρατηρούμενες μεταβολές των αποκρίσεων και τις επιδράσεις των παραγόντων σε φαινόμενα τυχαίας διακύμανσης (θόρυβο) [94]. Τα χρησιμοποιούμενα λογισμικά επιτρέπουν την εξαγωγή των αντίστοιχων συμπερασμάτων μέσω της εκτίμησης της τιμής p-value, η οποία σχετίζεται με την ισχύ της μηδενικής υποθέσεως και επιτρέπει την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας σε οποιαδήποτε στάθμη εμπιστοσύνης. Στην παρούσα εργασία η ερμηνεία των σχετικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%, δηλαδή για την απόρριψη της  $H_0$  απαιτείται τιμή  $p < 0,05$  [95].

Επιπλέον, για την αξιολόγηση της καταλληλότητας των μαθηματικών μοντέλων συνεκτιμώνται μεταξύ άλλων οι στατιστικοί δείκτες πολλαπλού προσδιορισμού  $R^2$ , adjusted  $R^2$  και predicted  $R^2$ , καθώς και ο δείκτης Adequate precision. Ο συντελεστής πολλαπλού προσδιορισμού  $R^2$  εκφράζει το ποσοστό της μεταβλητότητας της εξαρτημένης μεταβλητής που μπορεί να εξηγηθεί από το μαθηματικό μοντέλο και αποτελεί το μέτρο της προσαρμογής του στα πειραματικά δεδομένα [96]. Δεδομένου ότι ο συντελεστής  $R^2$  τείνει να αυξάνεται καθώς προστίθενται ανεξάρτητες μεταβλητές στην εξίσωση παλινδρόμησης, ανεξαρτήτως της στατιστικής τους σημαντικότητας, συχνά συστήνεται η αξιολόγηση του προσαρμοσμένου συντελεστή προσδιορισμού adjusted  $R^2$ , ο οποίος λαμβάνει υπόψη την επίδραση του πλήθους των μεταβλητών σε σχέση με το μέγεθος του δείγματος και ως εκ τούτου συνιστά ένα πιο αξιόπιστο μέτρο για την εκτίμηση της ερμηνευτικής ικανότητας μοντέλων με διαφορετικό αριθμό ανεξάρτητων μεταβλητών. Ως εκ τούτου, εάν ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών είναι υψηλός συγκριτικά με το μέγεθος του δείγματος οι παραπάνω συντελεστές αναμένεται να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και ειδικότερα, στην περίπτωση ύπαρξης πολλών στατιστικά μη-σημαντικών μεταβλητών στο προτεινόμενο μοντέλο, ο συντελεστής adj.  $R^2$  αναμένεται να είναι σημαντικά μικρότερος από την τιμή του συντελεστή  $R^2$  [45,97]. Ο συντελεστής predicted  $R^2$  σχετίζεται με την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, αναφέρεται δηλαδή στο ποσοστό της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγηθεί από αυτό και αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη για την ανίχνευση φαινομένων υπερπροσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα [98]. Συνήθως επιδιώκεται μια διαφορά μικρότερη των 0,2 μονάδων από τον συντελεστή adj.  $R^2$ , χωρίς ωστόσο αυτό να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου. Τέλος, ο δείκτης Adeq precision ορίζεται ως ο λόγος του εύρους των προβλεπόμενων τιμών απόκρισης στα επιμέρους σημεία της πειραματικής περιοχής προς το μέσο σφάλμα πρόβλεψης και αποτελεί ένα μέτρο εκτίμησης του λόγου σήματος προς θόρυβο. Η επίτευξη τιμών Adeq precision  $> 4$  υποδηλώνει την επάρκεια του μοντέλου και την καταλληλότητά του για την πλοήγηση στον πειραματικό χώρο, που όριζον τα επίπεδα των εξεταζόμενων παραγόντων [99].

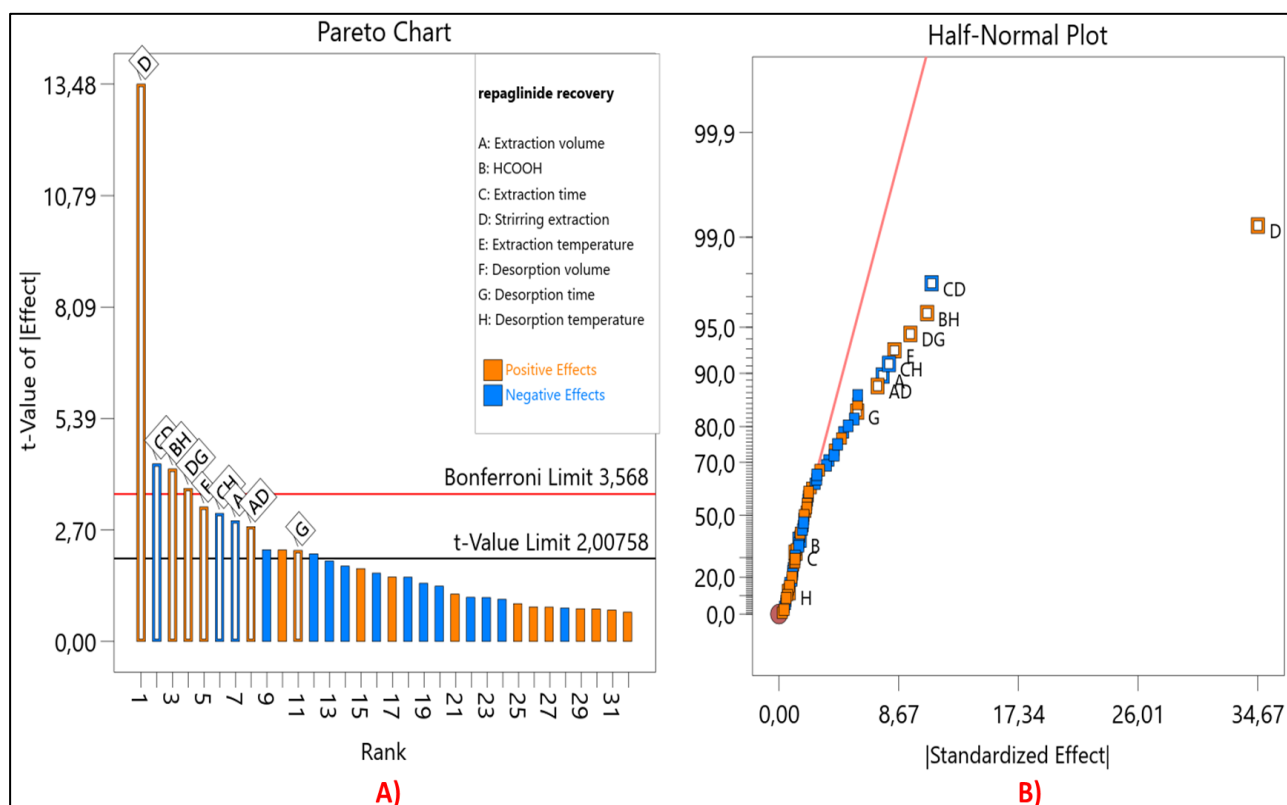
### 6.7.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{RPG}$

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 10) παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης για την εξαρτημένη μεταβλητή της % σχετικής ανάκτησης του repaglinide ( $Y_{RPG}$ ) και επισημαίνονται με αστερίσκο (\*) όσοι όροι είναι στατιστικά σημαντικοί σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ). Όπως προκύπτει από την εξέταση των σχετικών αποτελεσμάτων, το μαθηματικό μοντέλο εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντικό, καθώς η προκύπτουσα τιμή  $p$  ( $< 0,0001$ ) επιτρέπει απόρριψη της μηδενικής υποθέσεως στην δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης και υποδηλώνει την ύπαρξη ενός τουλάχιστον παράγοντα που ασκεί στατιστικά σημαντική επίδραση στην εξαρτημένη μεταβλητή.

**Πίνακας 10** Αποτελέσματα ANOVA για την απόκριση της % ανάκτησης του αναλύτη repaglinide

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	28907,49	12	2408,96	22,76	< 0.0001	significant
A-Extraction volume	900,68	1	900,68	8,51	0,0052	*
B-Conc. HCOOH	35,51	1	35,51	0,3355	0,5650	
C-Extraction time	22,57	1	22,57	0,2133	0,6462	
D-Stirring rate	19236,65	1	19236,65	181,75	< 0.0001	*
E-Extraction temperature	1117,82	1	1117,82	10,56	0,0020	*
G-Desorption time	513,08	1	513,08	4,85	0,0322	*
H-Desorption temperature	7,88	1	7,88	0,0744	0,7861	
AD	814,89	1	814,89	7,70	0,0077	*
BH	1840,73	1	1840,73	17,39	0,0001	*
CD	1951,54	1	1951,54	18,44	< 0.0001	*
CH	1015,78	1	1015,78	9,60	0,0032	*
DG	1450,37	1	1450,37	13,70	0,0005	*
<b>Residual</b>	5397,88	51	105,84			
<b>Cor Total</b>	34305,36	63				

Συγκεκριμένα, οι παράγοντες A (όγκος εκχύλισης), D (μαγνητική ανάδευση), E (θερμοκρασία εκχύλισης), G (χρόνος εκρόφησης), καθώς και οι αλληλεπιδράσεις δεύτερης τάξεως AD (όγκος εκχύλισης x μαγνητική ανάδευση), BH (συγκέντρωση HCOOH x θερμοκρασία εκρόφησης), CD (χρόνος εκχύλισης x μαγνητική ανάδευση), CH (χρόνος εκχύλισης x θερμοκρασία εκρόφησης) και DG (μαγνητική ανάδευση x χρόνος εκρόφησης) επιδεικνύουν στατιστική σημαντικότητα στην δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από το διάγραμμα Pareto, στο οποίο οι επιμέρους όροι διευθετούνται κατά σειρά μειούμενης στατιστικής σημαντικότητας και ως σημαντικοί χαρακτηρίζονται εκείνοι των οποίων το σχετικό μέγεθος της επίδρασής τους υπερβαίνει τη γραμμή του ορίου t-value. Αντίστοιχες πληροφορίες λαμβάνονται και από το διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας, στο οποίο είναι εμφανής και η παρουσία ορισμένων μη σημαντικών όρων, επί της κόκκινης γραμμής, οι οποίοι περιλαμβάνονται στο μοντέλο με σκοπό την διατήρηση της ιεραρχίας του (σχήμα 6.12).



**Σχήμα 6.12** Διάγραμμα Pareto (A) και διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας (B) για την πειραματική απόκριση YRPG

Ακολούθως παρατίθεται η σχετική εξίσωση του μοντέλου υπό μορφή κωδικοποιημένων παραγόντων, η οποία επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της συνεισφοράς των επιμέρους όρων στην εξαρτημένη μεταβλητή και την διενέργεια προβλέψεων σχετικά με την ανάκτηση του αναλύτη σε διάφορα σημεία του πειραματικού χώρου (πίνακας 11). Επιπλέον παρουσιάζονται οι προαναφερόμενοι συντελεστές πολλαπλού προσδιορισμού και ο δείκτης Adequate precision, οι οποίοι συναξιολογούνται για την εκτίμηση της καταλληλότητας του μοντέλου. Αναλυτικότερα, οι συντελεστές adjusted  $R^2$  και predicted  $R^2$  εμφανίζουν διαφορά μικρότερη των 0,2 μονάδων και οι

τιμές τους υποδηλώνουν μια αποδεκτή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Τέλος, η υψηλή τιμή του συντελεστή Adeq Precision τεκμηριώνει την επάρκεια του σήματος για την εξεταζόμενη απόκριση και συνεπώς το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλοήγηση στον πειραματικό χώρο.

**Πίνακας 11** Εξίσωση κωδικοποιημένων παραγόντων για την πειραματική απόκριση  $Y_{RPG}$

<b>Model equation – repaglinide recovery</b>	
$Y_{RPG} = +49,14 -3,75 A -0,7448 B +0,5939 C +17,34 D +4,18 E +2,83 G +0,3508 H +3,57 AD$ $+5,36BH -5,52 CD -3,98 CH +4,76 DG$	
<b>R<sup>2</sup></b>	0,8427
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,8056
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,7522
<b>Adeq Precision</b>	19,5173

### **Ανάλυση υπολοίπων**

Ο έλεγχος της ορθότητας του προτεινόμενου μαθηματικού μοντέλου προϋποθέτει την απόδειξη της ικανοποίησης ορισμένων υποθέσεων σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των σφαλμάτων, οι οποίες αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης και την τεκμηρίωση της εγκυρότητας των εξαγόμενων συμπερασμάτων. Τα σφάλματα ( $\epsilon_i$ ), σχετίζονται με το ποσοστό της μεταβλητότητας που δεν μπορεί να ερμηνευτεί από το μοντέλο, είναι υπεύθυνα για την διαφορά των αποτελεσμάτων που εμφανίζει η εξαρτημένη μεταβλητή κατά την διενέργεια επαναλαμβανόμενων πειραμάτων υπό τις ίδιες συνθήκες και ορίζονται ως η διαφορά ανάμεσα στις παρατηρήσιμες-πειραματικές τιμές της απόκρισης και τις αντίστοιχες αληθείς τιμές της. Οι κύριες υποθέσεις σχετικά με τα χαρακτηριστικά των σφαλμάτων συνοψίζονται στα παρακάτω σημεία:[100]

- Τα σφάλματα αποτελούν ασυσχέτιστες τυχαίες μεταβλητές.
- Εμφανίζουν μέση τιμή 0 και σταθερή διασπορά ( $\sigma^2$ )
- Ακολουθούν κανονική κατανομή  $N(0, \sigma^2)$

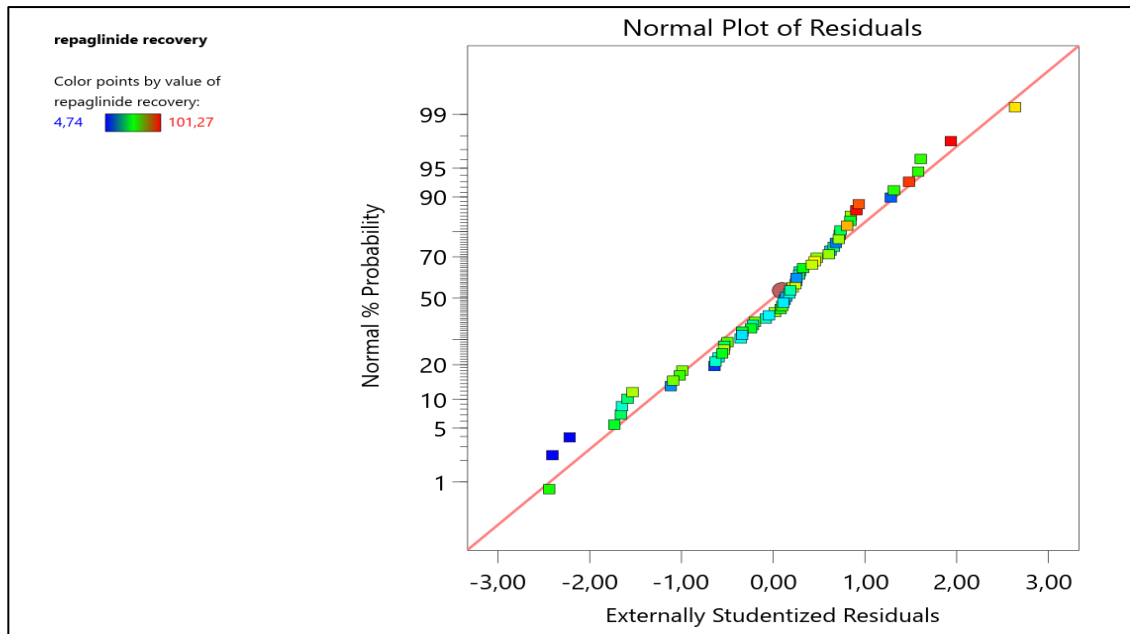
Δεδομένου ότι τα σφάλματα αποτελούν μη-παρατηρήσιμες μεταβλητές, ο έλεγχος της ύπαρξης αποκλίσεων από τις προαναφερόμενες υποθέσεις μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ανάλυσης των υπολοίπων, τα οποία συνιστούν γραμμικούς συνδιασμούς των σφαλμάτων και ως τέτοιοι αναμένεται να αντανakλούν ορισμένες από τις ιδιότητές τους. Τα υπόλοιπα ( $\hat{\epsilon}$ ) ορίζονται ως η διαφορά ανάμεσα στην πειραματική τιμή της απόκρισης ( $y_i$ ) και την προβλεπόμενη τιμή ( $\hat{y}$ ) από την εξίσωση του μοντέλου και μπορούν να υπολογιστούν πολύ εύκολα μέσω της σχέσης.

$$\hat{\varepsilon}_i = y_i - \hat{y}_i \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Συνολικά, η ανάλυση των υπολοίπων μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με τη χρήση στατιστικών δοκιμασιών, όσο και γραφικά, μέσω της εξέτασης των διαγνωστικών διαγραμμάτων των υπολοίπων. Εντούτοις, στα περισσότερα εγχειρίδια πειραματικού σχεδιασμού η χρήση της πρώτης προσέγγισης συχνά αντενδίδνεται καθώς η χρησιμότητα των πληροφοριών που παρέχουν οι στατιστικές δοκιμασίες είναι περιορισμένη και στην πλειονότητα των περιπτώσεων απλώς αποδεικνύουν ότι η απόλυτη ικανοποίηση των παραπάνω υποθέσεων είναι πρακτικά ανέφικτη κατά την ανάλυση πραγματικών δεδομένων. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη ότι η εγκυρότητα των ισχυρισμών επιδεικνύει ανθεκτικότητα σε μικρές αποκλίσεις από την κανονικότητα (robustness of validity), είναι εμφανές πως η γραφική ανάλυση συνιστά μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση, αφού επιτρέπει την εκτίμηση της φύσης και του βαθμού των όποιων αποκλίσεων και υποδεικνύει την αναγκαιότητα λήψης διορθωτικών ενεργειών, για τη διασφάλιση της εγκυρότητας του μαθηματικού μοντέλου. Παρακάτω παρατίθενται τα σχετικά διαγράμματα των υπολοίπων (σχήματα 6.13-6.15), τα οποία αξιολογούνται για τον έλεγχο της κανονικότητας, της σταθερότητας της διασποράς και της ανεξαρτησίας των σφαλμάτων [44,101].

### **Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας**

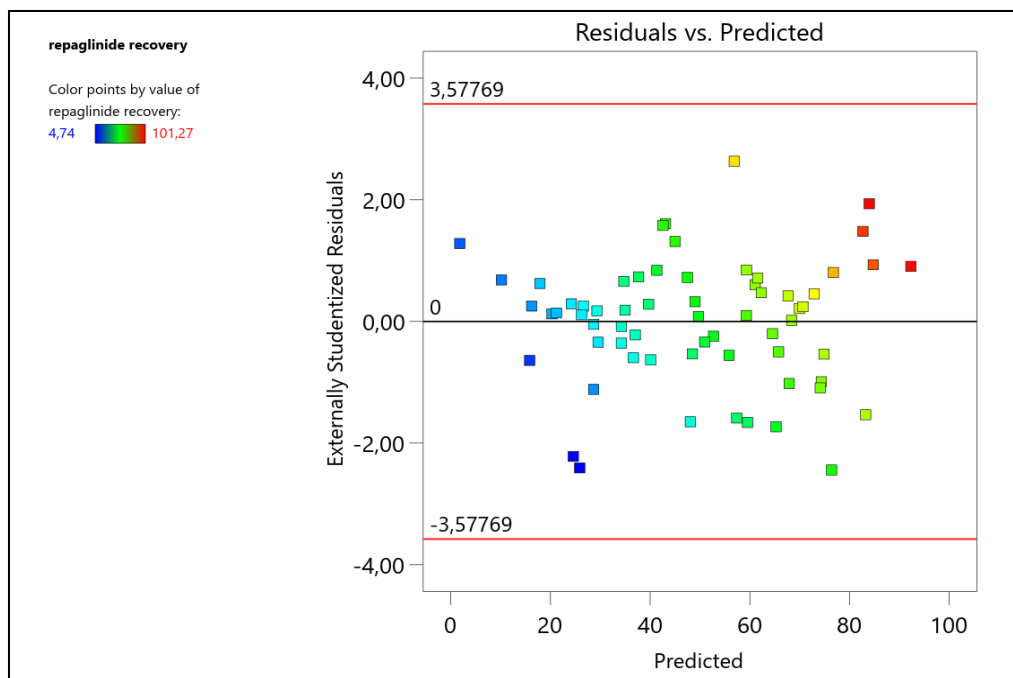
Ο έλεγχος της υποθέσεως της κανονικότητας των σφαλμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της εξέτασης του διαγράμματος κανονικής πιθανότητας των υπολοίπων (σχήμα 6.13). Αναλυτικότερα, στην περίπτωση που τα σημεία του διαγράμματος κατανέμονται πάνω σε μια ευθεία γραμμή μπορούμε να αποδεχθούμε πως η υπόθεση της κανονικότητας δεν παραβιάζεται. Ορισμένες ήπιες αποκλίσεις από την ευθεία είναι γενικά αποδεκτές και συνήθως δεν χρήζουν περεταίρω διερεύνησης καθώς δεν αναμένεται να επηρεάσουν σημαντικά την εγκυρότητα της ανάλυσης διακύμανσης [44]. Συνεπώς, από την εξέταση του σχετικού διαγράμματος είναι εμφανές πως ικανοποιείται η υπόθεση της κανονικότητας στην περίπτωση της πειραματικής απόκρισης  $Y_{RPG}$ .



**Σχήμα 6.13** Διάγραμμα κανονικής κατανομής των υπολοίπων για την απόκριση  $Y_{RPG}$  του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού  $2^{8-2}$ .

### Διάγραμμα υπολοίπων έναντι προβλεπόμενων τιμών

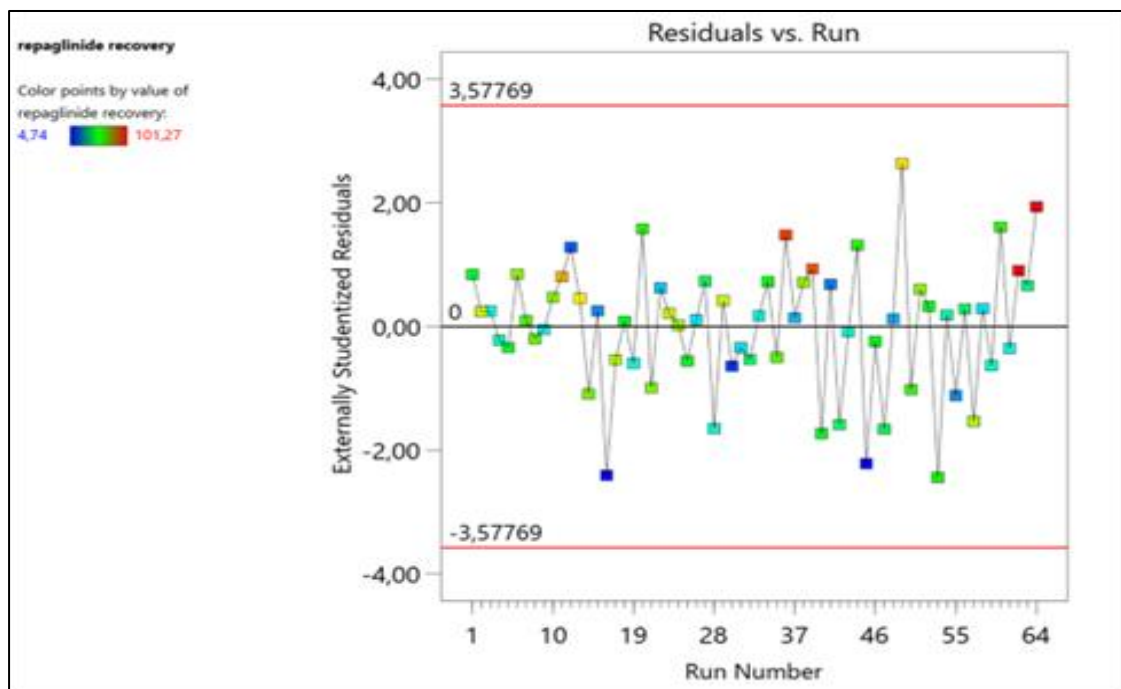
Το διάγραμμα των υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων τιμών αποτελεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ορθότητας του μαθηματικού μοντέλου και την έλεγχο της υποθέσεως σχετικά με τη διασπορά των σφαλμάτων. Εάν το προτεινόμενο μοντέλο είναι ορθό, τα υπόλοιπα αναμένεται να κατανέμονται κατά τυχαίο τρόπο εκατέρωθεν του άξονα  $\chi=0$  με ομοιογενή διασπορά σε όλο το εύρος των προβλεπόμενων τιμών της εξαρτημένης μεταβλητής (ομοσκεδαστικότητα). Αντίθετα, η εξάρτηση του εύρους της διασποράς των υπολοίπων από την τιμή της πειραματικής απόκρισης (ετεροσκεδαστικότητα) και η παρατήρηση συγκεκριμένων μοτίβων στο διάγραμμα των υπολοίπων υποδηλώνουν πως το μαθηματικό μοντέλο δεν περιγράφει ορθά την εξαρτημένη μεταβλητή. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί διερεύνηση των αιτιών και πιθανώς κατάλληλοι μαθηματικοί μετασχηματισμοί της εξαρτημένης μεταβλητής, (πχ. αλλαγή σε λογαριθμική κλίμακα), ώστε να διασφαλιστεί πως τα υπόλοιπα δεν θα παρουσιάζουν καμία προβλεπτική δύναμη.[45]. Στο σχήμα 6.14 παρουσιάζεται το σχετικό διάγραμμα υπολοίπων για την πειραματική απόκριση  $Y_{RPG}$ , όπου είναι εμφανές πως τα υπόλοιπα επιδεικνύουν ομοσκεδαστικότητα σε όλο το εύρος των προβλεπόμενων τιμών.



**σχήμα 6.14** Διάγραμμα υπολοίπων έναντι προβλεπόμενων τιμών για την απόκριση  $Y_{RPG}$  του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού  $2^{8-2}$ .

### Διάγραμμα υπολοίπων έναντι σειρά εκτέλεσης πειραμάτων

Το διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων χρησιμοποιείται συχνά για τον έλεγχο ικανοποίησης της υποθέσεως σχετικά με την ανεξαρτησία των σφαλμάτων, η οποία συνιστά μια από τις βασικές προϋποθέσεις για την τεκμηρίωση της εγκυρότητας της στατιστικής δοκιμασίας ANOVA. Ιδανικά, τα σημεία του διαγράμματος θα πρέπει να μην ομαδοποιούνται και να κατανέμονται κατά τυχαίο τρόπο εκατέρωθεν του άξονα  $\chi = 0$  με ομοιογενή διασπορά. Η παρουσία συσχετίσεων μεταξύ των υπολοίπων μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως φαινόμενα ολίσθησης της μετρητικής διάταξης, μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών ή της τεχνικής επάρκειας του πειραματιστή και μπορεί να υποβαθμίσει σημαντικά την αξιοπιστία των συμπερασμάτων που θα προκύψουν από την ανάλυση των δεδομένων [44,95]. Συνεπώς, συνιστάται η λήψη προληπτικών ενεργειών, όπως η ορθή τυχαιοποίηση των πειραμάτων κατά το στάδιο του οργάνωσης του πειραματικού πλάνου, με σκοπό την διασφάλιση της ανεξαρτησίας των αποτελεσμάτων.



**Σχήμα 6.15** Διάγραμμα υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων για την απόκριση  $Y_{RPG}$  του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού  $2^{8-2}$ .

Στο σχήμα 6.15 παρατίθεται το σχετικό διάγραμμα των υπολοίπων, από το οποίο διαπιστώνεται πως τα υπόλοιπα κατανέμονται κατά τυχαίο τρόπο και δεν εντοπίζονται τάσεις αύξησης ή μείωσης της διασποράς τους, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει πως η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων δεν επηρεάζει την εξεταζόμενη πειραματική απόκριση.



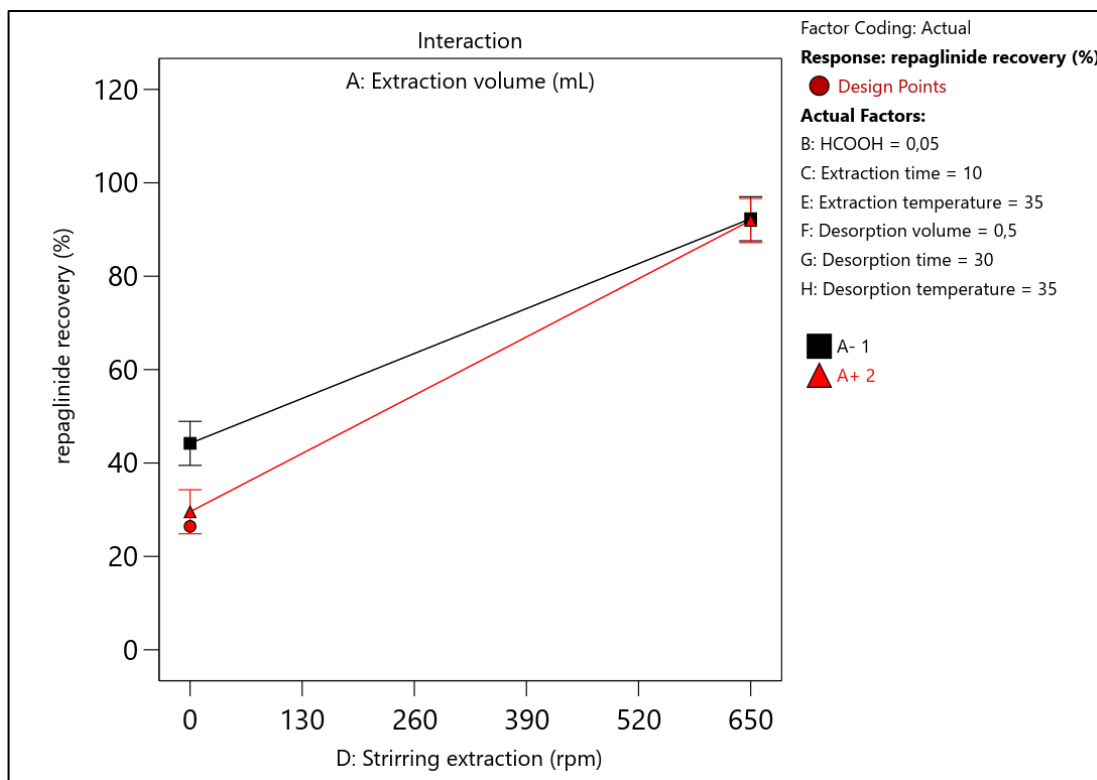
## Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Εφόσον αποδειχθεί μέσω της εξέτασης των διαγνωστικών διαγραμμάτων των υπολοίπων η ικανοποίηση των βασικών προϋποθέσεων για την διεξαγωγή της δοκιμασίας ANOVA και αξιολογηθεί η επάρκεια εξίσωσης παλινδρόμησης, το προκύπτον μαθηματικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ανάκτησης του αναλύτη στον δεδομένο πειραματικό χώρο και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση των εξεταζόμενων παραγόντων στην εξαρτημένη μεταβλητή.

Όπως προκύπτει από την ανασκόπηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, ο παράγοντας της μαγνητικής ανάδευσης φαίνεται πως ασκεί θετική επίδραση στην πειραματική απόκριση και συνιστά τον σημαντικότερο παράγοντα του μαθηματικού μοντέλου. Η αυξημένη συνεισφορά του εν λόγω παράγοντα στην ανάκτηση του αναλύτη είναι ως έναν βαθμό αναμενόμενη και μπορεί να αποδοθεί αφενός στην αύξηση μοριακής κινητικότητας που διασφαλίζει η μαγνητική ανάδευση και αφετέρου στην ιδιαίτερη αρχιτεκτονική των προσροφητικών μεμβρανών FPSE. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.1, τα υφασμάτινα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα τεχνική επιδεικνύουν ένα εκτεταμένο πορώδες δίκτυο, το οποίο διατρέχει όλη την έκταση τους και διαφοροποιεί τα σχετικά προσροφητικά μέσα από τις συνήθεις συσκευές μικροεκχύλισης, στις οποίες γίνεται χρήση αδρανών, μη-διαπερατών υποστρωμάτων. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει την ανεμπόδιστη κίνηση των αναλυτών διαμέσου του προσροφητικού μέσου κατά την εφαρμογή ανάδευσης στο αναλυόμενο δείγμα, αυξάνοντας σημαντικά την αλληλεπίδραση των αναλυτών με το προσροφητικό πολυμερές, ως αποτέλεσμα της αύξησης του ρυθμού μεταφοράς μαζών από τον κύριο όγκο του δείγματος στην sol-gel επίστρωση [23].

Ένας άλλος παράγοντας που εμφανίζεται να ασκεί στατιστικά σημαντική επίδραση στην ανάκτηση του repaglinide είναι αυτός του όγκου εκχύλισης (A), ο οποίος αναφέρεται στον τελικό όγκο του εκχυλιζόμενου διαλύματος που προκύπτει ύστερα από την αραιώση του δείγματος με διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 25 mM και υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O σε αναλογία όγκων 60/40 v/v. Ως γνωστόν, η συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα εκχύλισης συνδέεται κατά αναλογικό τρόπο με τον ρυθμό εκχύλισης (dn/dt) και την ποσότητα της ουσίας που μπορεί να ανακτηθεί [93] και συνεπώς η αύξηση του βαθμού αραιώσης αναμένεται να επιδρά αρνητικά στην ανάκτηση του αναλύτη, όπως άλλωστε είναι εμφανές και από το αρνητικό πρόσημο της σχετικής επίδρασης στο μαθηματικό μοντέλο. Επιπλέον, ο παράγοντας του όγκου εκχύλισης (A) φαίνεται πως αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα του ρυθμού ανάδευσης (D), δηλαδή η επίδραση του ενός παράγοντα στην πειραματική απόκριση αναμένεται να διαφοροποιείται αναλόγως με το επίπεδο στο οποίο τίθεται ο έτερος παράγοντας. Αυτό γίνεται αντιληπτό και από την εξέταση του σχετικού διαγράμματος αλληλεπίδρασης (σχήμα 6.16), όπου είναι εμφανές πως απουσία μαγνητικής ανάδευσης η μεταβολή του όγκου εκχύλισης επιφέρει μια στατιστικά σημαντική μεταβολή στην πειραματική

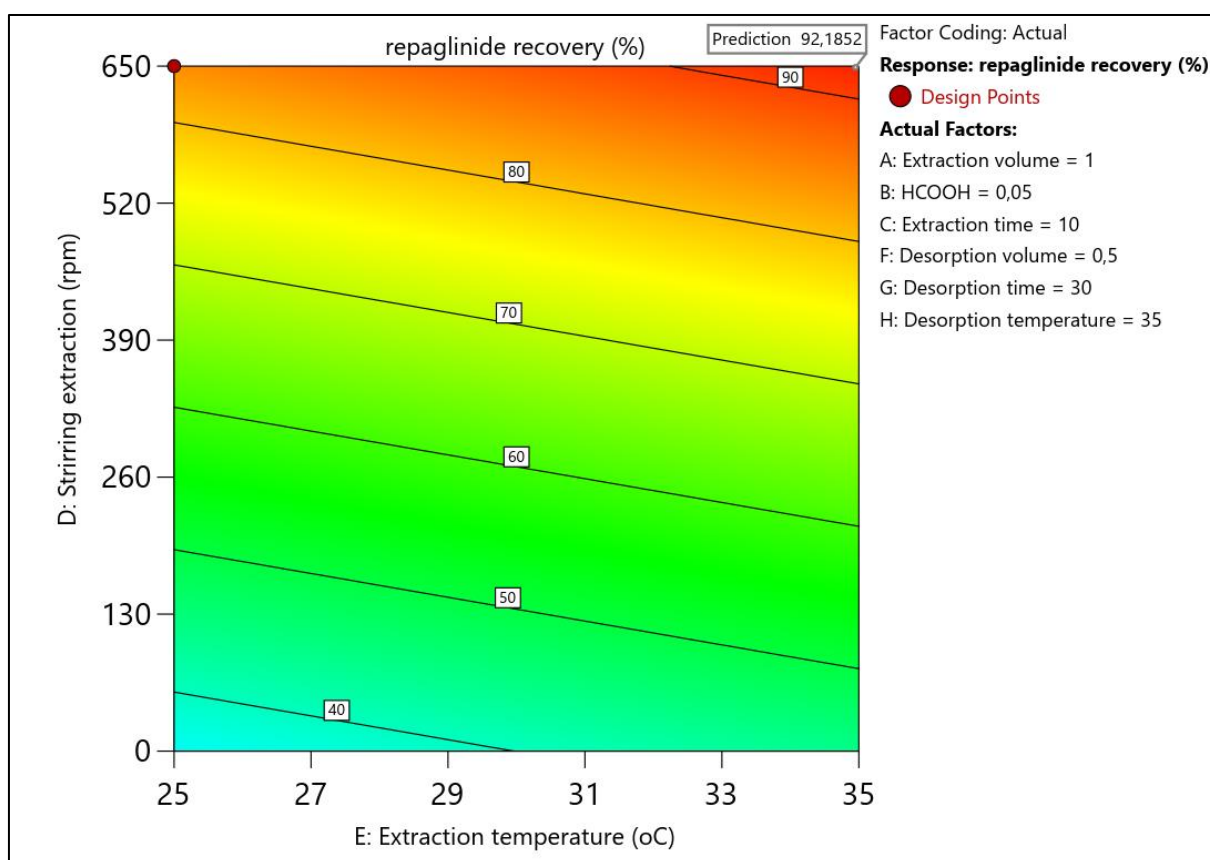
απόκριση  $Y_{RPG}$ , ενώ όταν το δείγμα αναδεύεται δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στην ανάκτηση του αναλύτη μεταξύ των 2 επιπέδων του παράγοντα A, γεγονός πιθανώς οφειλόμενο στην σημαντική ενίσχυση της κινητικής της εκχύλισης που διασφαλίζει η μαγνητική ανάδευση.



**Σχήμα 6.16** Διάγραμμα αλληλεπίδρασης των παραγόντων A (όγκος εκχύλισης) και D (μαγνητική ανάδευση), όπως προέκυψε από τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό για την απόκριση  $Y_{RPG}$

Η μεταβολή της θερμοκρασίας των σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση μιας μεθόδου μικροεκχύλισης με διάφορους τρόπους, δεδομένου ότι η παράμετρος της θερμοκρασίας σχετίζεται τόσο με την σταθερά κατανομής, όσο και με τον συντελεστή διάχυσης των ουσιών, ως αποτέλεσμα της αύξησης της μοριακής κινητικότητας [102,103]. Όπως προέκυψε από την εξέταση των σχετικών αποτελεσμάτων, η εφαρμογή ήπιας θέρμανσης κατά το στάδιο της εκχύλισης φαίνεται να ασκεί μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην ανάκτηση του αναλύτη, ενώ ο παράγοντας της θέρμανσης κατά την εκρόφηση δεν επιφέρει αντίστοιχα αποτελέσματα στην δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Τέλος, ο παράγοντας του χρόνου εκρόφησης επιδεικνύει στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0,05$ ) σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% και ασκεί θετική επίδραση στην πειραματική απόκριση, γεγονός που υποδηλώνει πως ο ρυθμός μεταφοράς μαζών είναι σαφώς βραδύτερος όταν το δείγμα δεν βρίσκεται υπό ανάδευση και συνεπώς θα πρέπει να προβλεφθεί ένα ικανό χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση της εκρόφησης και την ανάκτηση του αναλύτη.

## Εκτίμηση ανάκτησης repaglinide



Σχήμα 6.17 Διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών για την πειραματική απόκριση Y<sub>RPG</sub>

Στο σχήμα 6.17 παρατίθεται το ενδεικτικό διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών (contour plot), στο οποίο απεικονίζονται οι γραμμές ισαπόκρισης της πειραματικής απόκρισης συναρτήσεως των στατιστικά σημαντικών παραγόντων D (μαγνητική ανάδευση) και E (θερμοκρασία εκχύλισης), ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες διατηρούνται σταθεροί σε τιμές που αντιστοιχούν στα ακραία τους επίπεδα και αναγράφονται στο σχετικό υπόμνημα. Όπως είναι εμφανές, όταν όλοι οι παράγοντες, εξαιρουμένων των A (όγκος εκχύλισης) και C (χρόνος εκχύλισης), τίθενται σε τιμές που αντιστοιχούν στο υψηλό τους επίπεδο η ανάκτηση του αναλύτη λαμβάνει την μέγιστη τιμή της, όπως υπολογίζεται από το σχετικό μαθηματικό μοντέλο, η οποία ανέρχεται σε 92%. Δεδομένου ότι τα θεραπευτικά επίπεδα της φαρμακευτικής ουσίας repaglinide είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των ουσιών pioglitazone και nateglinide, η επίτευξη υψηλών τιμών ανάκτησης για τον δεδομένο αναλύτη είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η παράμετρος της ανάκτησης σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ευαισθησία της βιοαναλυτικής μεθόδου. Ωστόσο, για την επιλογή των τελικών συνθηκών θα πρέπει να συνεκτιμηθούν και τα σχετικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού σχετικά με την ανάκτηση των υπολοίπων υπογλυκαιμικών παραγόντων.

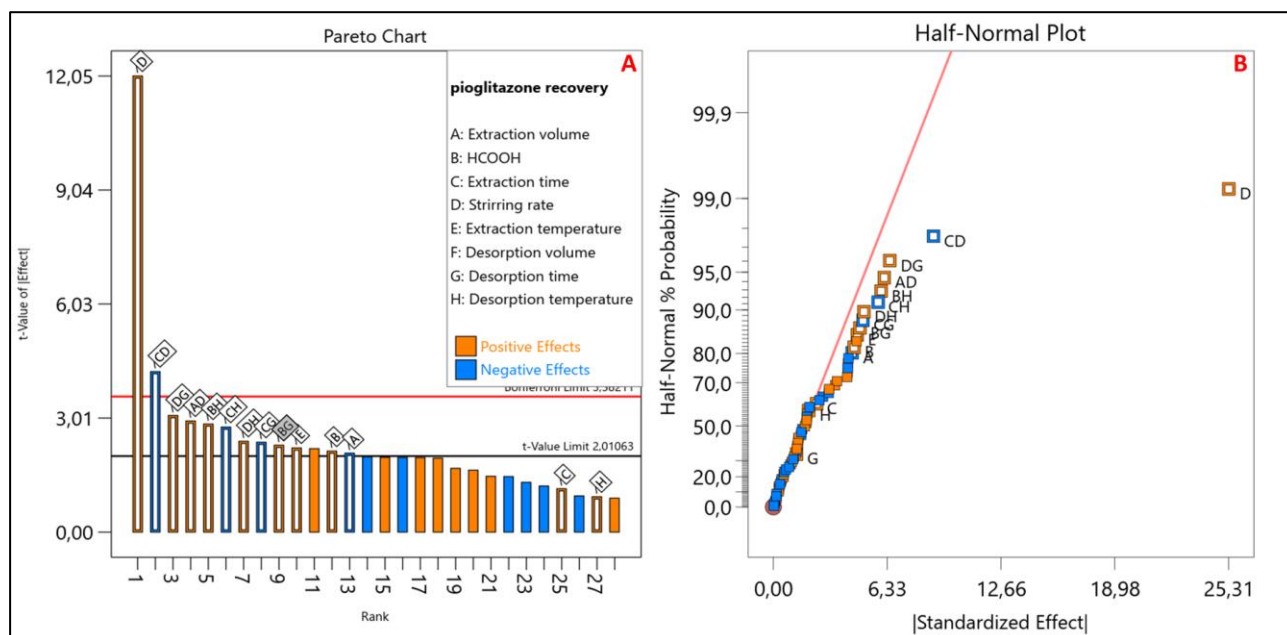
### 6.7.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{PGL}$

Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ANOVA για την πειραματική απόκριση της % σχετικής ανάκτησης του αναλύτη pioglitazone ( $Y_{PGL}$ ) και επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικοί όροι σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Όπως είναι εμφανές, το μαθηματικό μοντέλο επιδεικνύει στατιστική σημαντικότητα στη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη τουλάχιστον ενός παράγοντα που θα ασκεί στατιστικά σημαντική επίδραση στην πειραματική απόκριση.

**Πίνακας 12** Αποτελέσματα ANOVA για την απόκριση της % ανάκτησης του αναλύτη pioglitazone ( $Y_{PGL}$ )

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	16252,97	15	1083,53	15,35	< 0.0001	significant
A-Extraction volume	307,04	1	307,04	4,35	0,0424	*
B-HCOOH	323,37	1	323,37	4,58	0,0374	*
C-Extraction time	92,83	1	92,83	1,32	0,2571	
D-Strirring rate	10251,06	1	10251,06	145,23	< 0.0001	*
E-Extraction temperature	348,66	1	348,66	4,94	0,0310	*
G-Desorption time	26,65	1	26,65	0,3776	0,5418	
H-Desorption temperature	61,50	1	61,50	0,8714	0,3553	
AD	608,36	1	608,36	8,62	0,0051	
BG	371,72	1	371,72	5,27	0,0262	*
BH	575,76	1	575,76	8,16	0,0063	*
CD	1268,96	1	1268,96	17,98	0,0001	*
CG	398,10	1	398,10	5,64	0,0216	*
CH	543,01	1	543,01	7,69	0,0079	*
DG	669,52	1	669,52	9,49	0,0034	*
<b>Residual</b>	3388,07	48	70,58			
<b>Cor Total</b>	19641,04	63				

Αναλυτικότερα, ως στατιστικά σημαντικοί εμφανίζονται οι παράγοντες A (όγκος εκχύλισης), B (περιεκτικότητα % v/v HCOOH), D (μαγνητική ανάδευση) και E (θερμοκρασία εκχύλισης). Επιπλέον στατιστικά σημαντική μεταβολή της εξαρτημένης μεταβλητής πετυχαίνει ο συνδυασμός των παραγόντων AD (όγκος εκχύλισης x μαγνητική ανάδευση), BG (περιεκτικότητα % w/v HCOOH x χρόνο εκρόφησης), BH (περιεκτικότητα % v/v HCOOH x θερμοκρασία εκρόφησης), CD (χρόνος εκχύλισης x μαγνητική ανάδευση), CG (χρόνος εκχύλισης x χρόνος εκρόφησης), CH (χρόνος εκχύλισης x θερμοκρασία εκρόφησης) και DG (μαγνητική ανάδευση x χρόνο εκρόφησης). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τα διαγράμματα pareto και το διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας (σχήμα 6.18)



**Σχήμα 6.18** Διάγραμμα pareto (A) και διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας (B) για την πειραματική απόκριση  $Y_{PG}$ .

Στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 13) παρατίθεται η μαθηματική εξίσωση για την περιγραφή της πειραματικής απόκρισης υπό μορφή κωδικοποιημένων παραγόντων, καθώς και οι σχετικοί στατιστικοί δείκτες που συνεκτιμώνται για την αξιολόγηση του μοντέλου. Τα παρακάτω αποτελέσματα υποδηλώνουν μια αποδεκτή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, καθώς και την απουσία φαινομένων υπερ-προσαρμογής, δεδομένου ότι οι συντελεστές adjusted- $R^2$  και predicted- $R^2$  βρίσκονται σε λογική συμφωνία μεταξύ τους.

**Πίνακας 13** Εξίσωση κωδικοποιημένων παραγόντων για την πειραματική απόκριση  $Y_{RPG}$

### Model equation – pioglitazone recovery

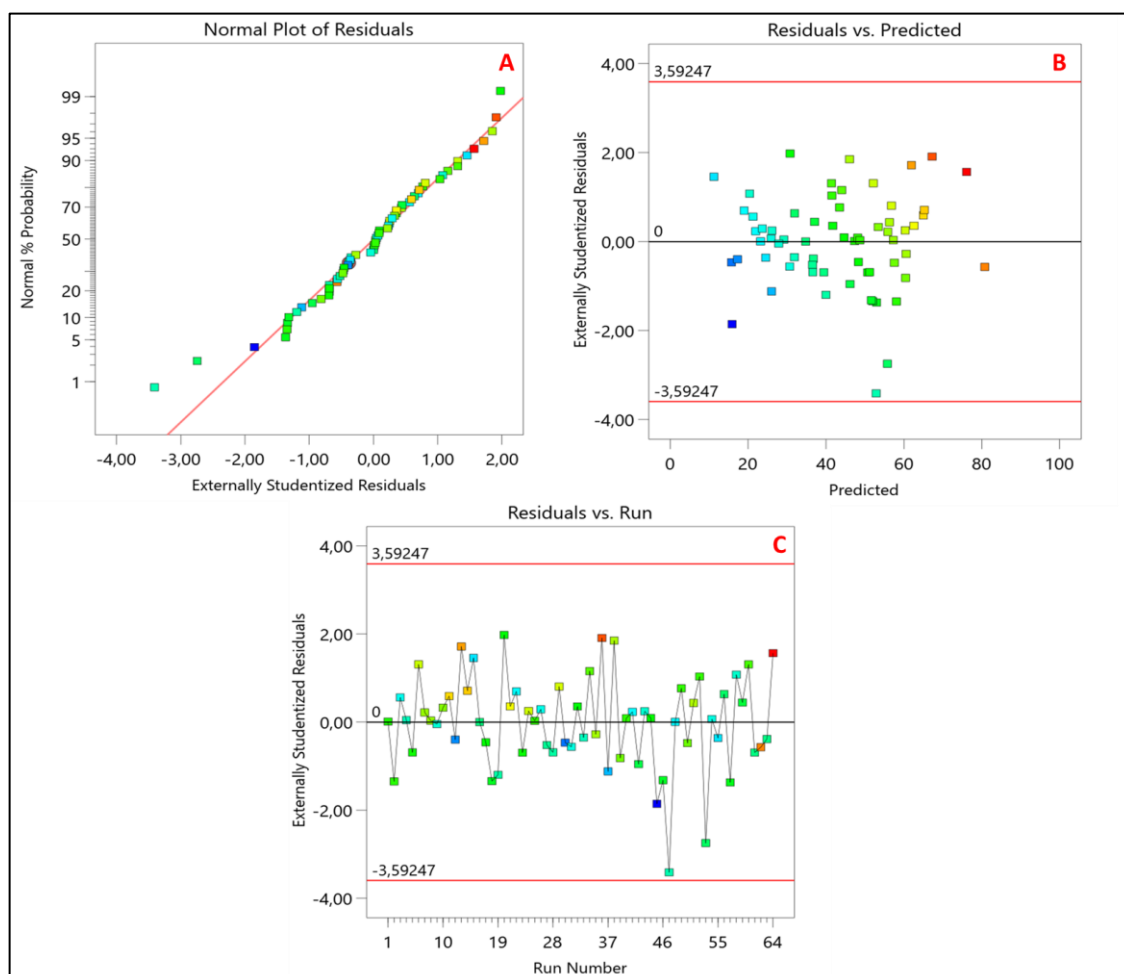
$$\text{pioglitazone recovery} = +42,99 - 2,19 A + 2,25 B + 1,20 C + 12,66 D + 2,33 E + 0,6453 G + 0,9803 H$$

+3,08 AD +2,41 BG +3,00 BH -4,45 CD -2,49 CG -2,91 CH +3,23 DG +2,52 DH

<b>R<sup>2</sup></b>	0,8275
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,7736
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,6933
<b>Adeq Precision</b>	16,5658

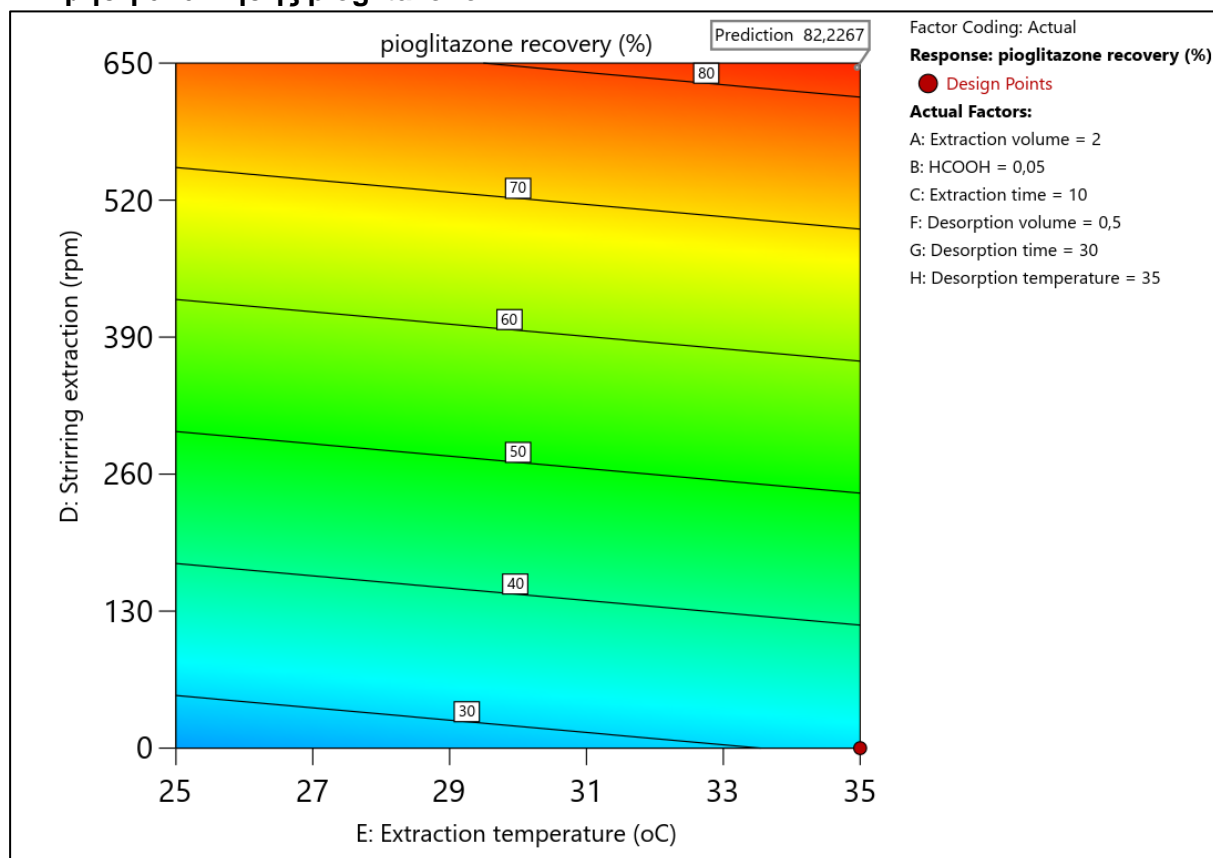
### Διαγνωστικά διαγράμματα υπολοίπων

Ακολουθώς, παρουσιάζονται τα ενδεικτικά διαγνωστικά διαγράμματα των υπολοίπων (σχήμα 6.19), τα οποία αξιολογούνται με σκοπό την τεκμηρίωση της ικανοποίησης των προϋποθέσεων για την διεξαγωγή της δοκιμασίας ANOVA και την τεκμηρίωση της ορθότητας του μαθηματικού μοντέλου. Από την εξέταση των σχετικών διαγραμμάτων δεν προκύπτει κάποια σημαντική παραβίαση των βασικών υποθέσεων σχετικά με την φύση και τα χαρακτηριστικά των σφαλμάτων, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται πως το τρέχον μαθηματικό μοντέλο περιγράφει ορθά την πειραματική απόκριση και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διενέργεια προβλέψεων σχετικά με την ανάκτηση του αναλύτη εντός του πειραματικού χώρου που ορίζουν τα επίπεδα των εξεταζόμενων παραγόντων.



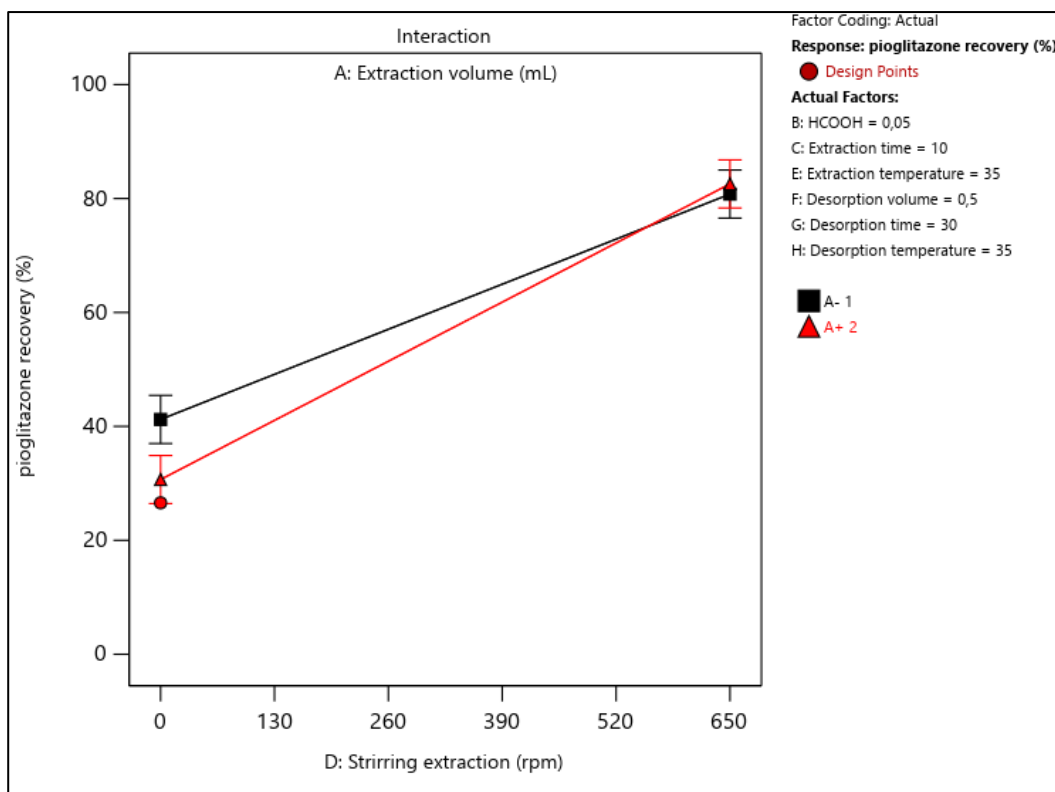
**Σχήμα 6.19** Διαγνωστικά διαγράμματα υπολοίπων για την πειραματική απόκριση  $Y_{PGL}$  A) διάγραμμα κανονικής πιθανότητας B) διάγραμμα υπολοίπων έναντι προβλεπόμενων τιμών C) διάγραμμα υπολοίπων έναντι σειράς εκτέλεσης πειραμάτων.

### Εκτίμηση ανάκτησης pioglitazone



**Σχήμα 6.20** Διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών για την πειραματική απόκριση  $Y_{PGL}$

Στο σχήμα 6.20 παρουσιάζεται το ενδεικτικό διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών για την πειραματική απόκριση  $Y_{PGL}$ , από την εξέταση του οποίου είναι εμφανές πως όταν πως όταν όλοι οι εξεταζόμενοι παράγοντες, εξαιρουμένου του παράγοντα C (χρόνος εκχύλισης), τίθενται στο υψηλό τους επίπεδο (επίπεδο +1) τότε η ανάκτηση του αναλύτη λαμβάνει την μέγιστη τιμή της, η οποία ανέρχεται σε 82,3%. Επιπλέον, παρατηρείται πως σε αντίθεση με τον αναλύτη repaglinide η μέγιστη ανάκτηση του pioglitazone επιτυγχάνεται όταν ο παράγοντας A (όγκος εκχύλισης) τίθεται στο υψηλό του επίπεδο, δηλαδή για τιμή 2 mL. Ωστόσο, η επίδραση του όγκου εκχύλισης στην εξαρτημένη μεταβλητή είναι πρακτικά αμελητέα όταν το δείγμα βρίσκεται υπό ανάδευση, γεγονός οφειλόμενο στην σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων AD (σχήμα 6.21). Ως εκ τούτου, η ουσία pioglitazone μπορεί να ανακτηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό υπό συνθήκες όμοιες με αυτές τις ουσίας repaglinide.



**Σχήμα 6.21** Διάγραμμα αλληλεπίδρασης των παραγόντων A (όγκος εκχύλισης) και D (μαγνητική ανάδευση), για την πειραματική απόκριση  $Y_{PGL}$ .

### 6.7.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού για την απόκριση $Y_{NTG}$

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 14) συνοψίζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας ANOVA για την πειραματική απόκριση της % σχετικής ανάκτησης του αναλύτη nateglinide ( $Y_{NTG}$ ). Από την εξέταση των παρακάτω δεδομένων είναι εμφανές πως το μαθηματικό μοντέλο επιδεικνύει στατιστική σημαντικότητα σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%, καθώς η τιμή p-value είναι σημαντική μικρότερη της τιμής 0,05.

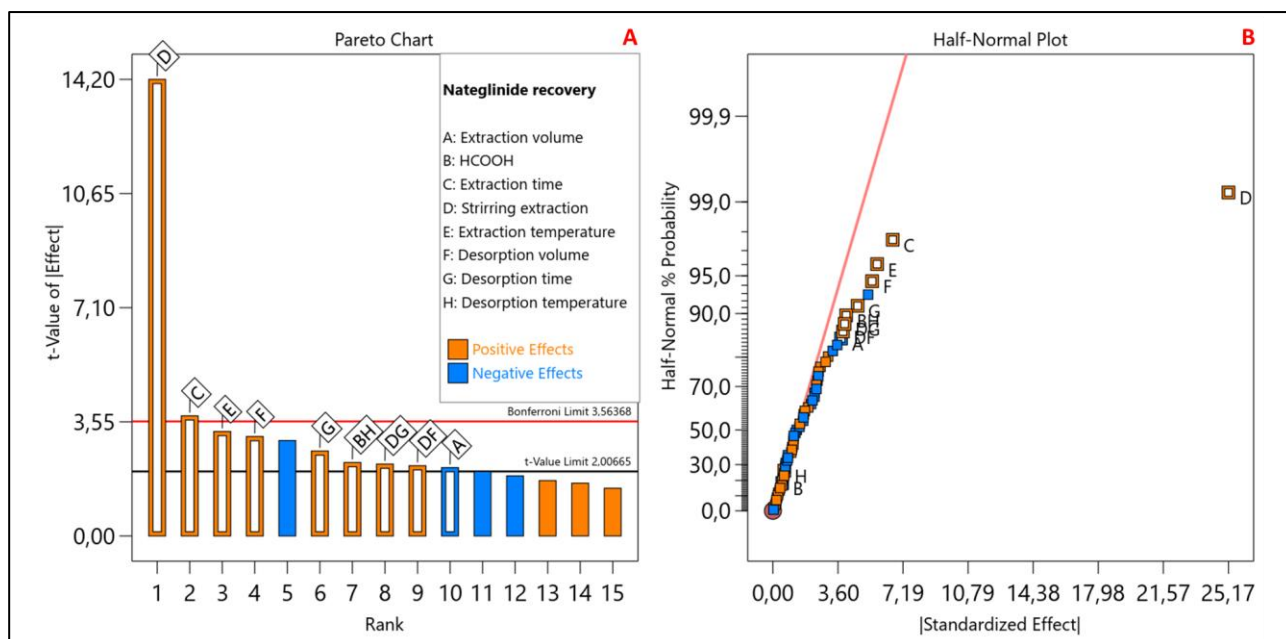
**Πίνακας 14** Αποτελέσματα ANOVA για την απόκριση της % ανάκτησης του αναλύτη nateglinide ( $Y_{NTG}$ )

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	12915,10	8	1614,39	30,75	< 0.0001	significant
A- Extraction volume	226,77	1	226,77	4,51	0,0385	*
B-HCOOH	4,26	1	4,26	0,0847	0,7722	
C- Extraction time	701,26	1	701,26	13,95	0,0005	*



D-Strirring extraction	10133,19	1	10133,19	201,53	< 0.0001	*
E-Extraction temperature	530,55	1	530,55	10,55	0,0020	*
F-Desorption volume	480,65	1	480,65	9,56	0,0032	*
G-Desorption time	351,05	1	351,05	6,98	0,0109	*
H-Desorption temperature	6,39	1	6,39	0,1272	0,7228	
BH	262,16	1	262,16	5,21	0,0265	*
DF	240,21	1	240,21	4,78	0,0334	*
DG	251,42	1	251,42	5,00	0,0297	*
<b>Residual</b>	2614,67	52	50,28			
<b>Cor Total</b>	15802,58	63				

Ως στατιστικά σημαντικοί ( $p < 0,05$ ) εμφανίζονται οι παράγοντες A (όγκος εκχύλισης), C (χρόνος εκχύλισης), D (μαγνητική ανάδευση), E (θερμοκρασία εκχύλισης), F (όγκος εκρόφησης), G (χρόνος εκρόφησης) καθώς και οι αλληλεπιδράσεις δευτέρας τάξεως BH (περιεκτικότητα % v/v HCOOH x θερμοκρασία εκρόφησης), DF (μαγνητική ανάδευση x όγκος εκρόφησης) και DG (μαγνητική ανάδευση x χρόνος εκρόφησης). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και μέσω της εξέτασης του διαγράμματος ημικανονικής πιθανότητας και του διαγράμματος Pareto τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω (σχήμα 6.22).



**Σχήμα 6.22** Διάγραμμα ημικανονικής πιθανότητας (A) και διάγραμμα Pareto (B) για την πειραματική απόκριση  $Y_{NTG}$ .

Ακολουθώς παρατίθεται η μαθηματική εξίσωση για την περιγραφή της πειραματικής απόκρισης  $Y_{NTG}$  υπό μορφή κωδικοποιημένων παραγόντων, καθώς και οι σχετικοί στατιστικοί δείκτες πολλαπλού προσδιορισμού, οι οποίοι φανερώνουν μια αποδεκτή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, καθώς και την απουσία φαινομένων υπερπροσαρμογής σε αυτά. Παράλληλα, η υψηλή τιμή του δείκτη Adeq precision ( $4 <$ ) υποδηλώνει πως το τρέχον μαθηματικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς πρόβλημα για την εξερεύνηση του πειραματικού χώρου που ορίζουν τα επίπεδα των εξεταζόμενων παραγόντων.

**Πίνακας 15** Εξίσωση κωδικοποιημένων παραγόντων για την πειραματική απόκριση  $Y_{NTG}$ .

### Model equation – nateglinide recovery

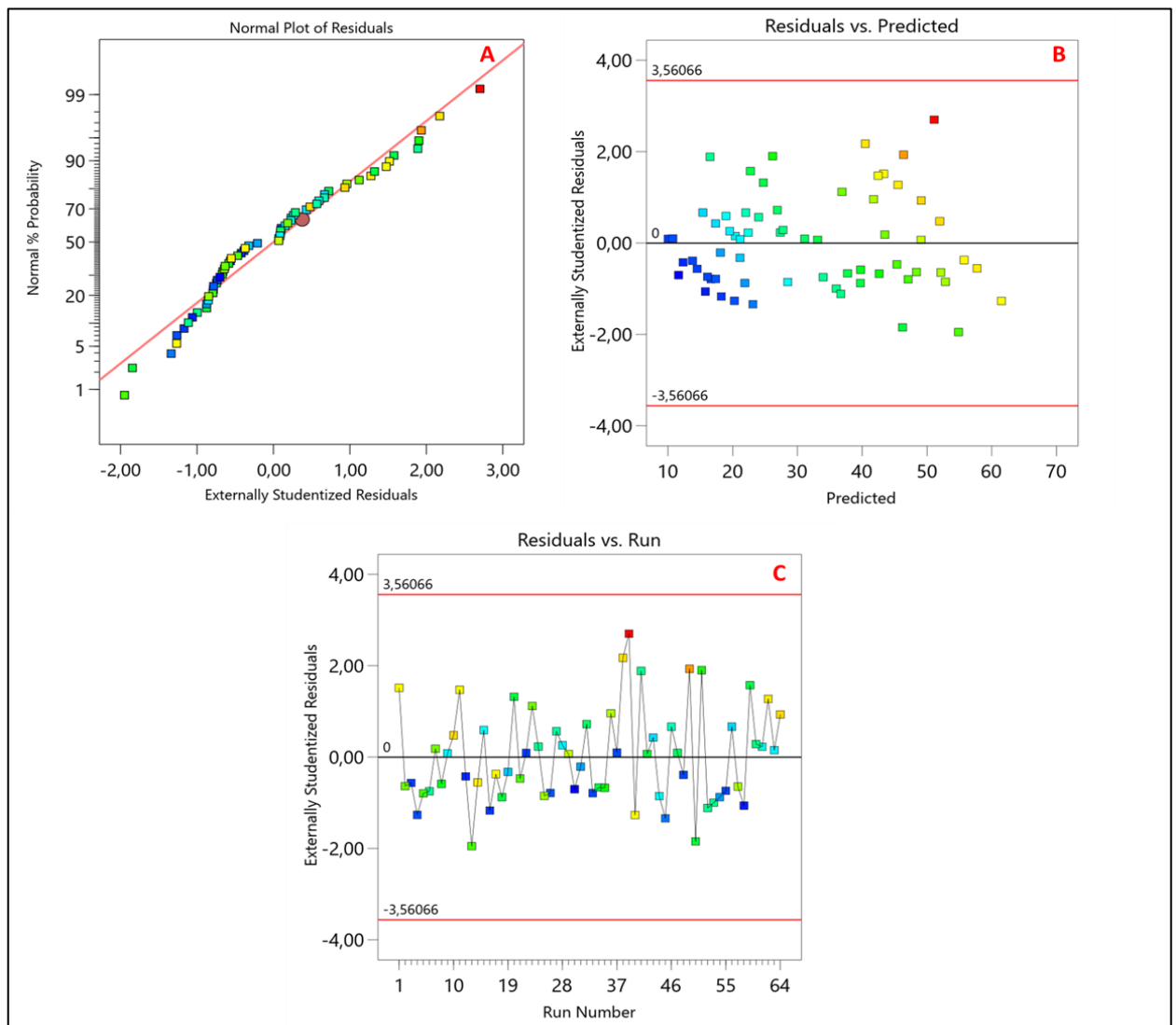
$$\text{Nateglinide recovery} = +31,84 - 1,88A - 0,26B + 3,31C + 12,58D + 2,88E + 2,74F + 2,34G + 0,32H + 2,02BH + 1,94DF + 1,98DG$$

<b>R<sup>2</sup></b>	0,8345
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,7995
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,7494
<b>Adeq Precision</b>	16,3805

### Διαγνωστικά διαγράμματα υπολοίπων

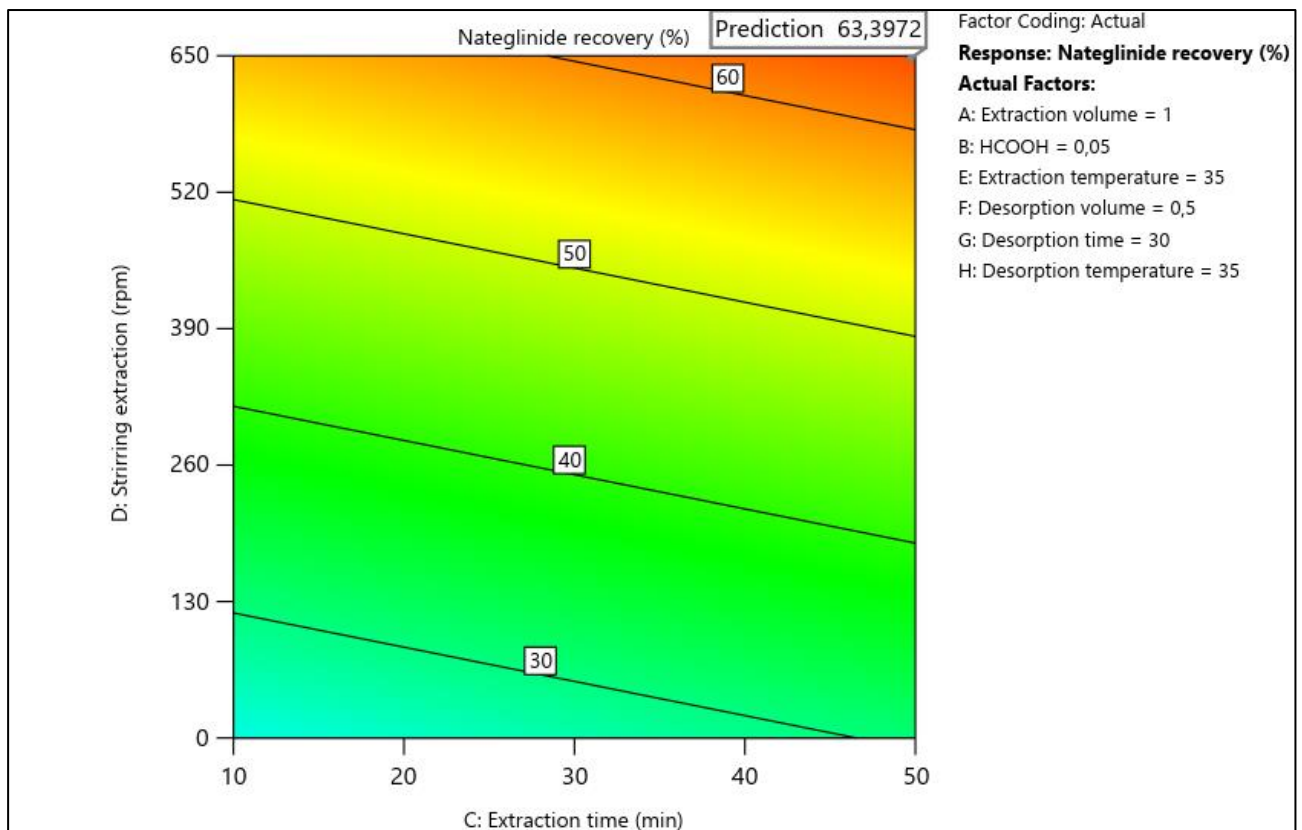
Στο σχήμα 6.23 παρουσιάζονται τα ενδεικτικά διαγνωστικά διαγράμματα των υπολοίπων, τα οποία επιβεβαιώνουν πως το μαθηματικό μοντέλο είναι έγκυρο και περιγράφει ορθά την πειραματική απόκριση, καθώς από την εξέτασή τους είναι εμφανές πως ικανοποιούνται οι βασικές προϋποθέσεις για την διεξαγωγή της δοκιμασίας ANOVA, όπως περιεγράφηκαν αναλυτικά

προηγουμένως Ενδεικτικά αναφέρεται πως το διάγραμμα των υπολοίπων έναντι των προβλεπόμενων τιμών της πειραματικής απόκρισης (διάγραμμα Β) εμφανίζει τυχαιότητα και ομοιογένεια ως προς την διασπορά των υπολοίπων σε όλο το εύρος των προβλεπόμενων τιμών  $Y_{NTG}$ , ενώ από την εξέταση του διαγράμματος των υπολοίπων έναντι της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων (διάγραμμα C) δεν προκύπτουν χρονικές συσχετίσεις και τάσεις μεταξύ των σημείων, γεγονός που επιβεβαιώνει πως η σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων δεν έχει επηρεάσει την εγκυρότητα των εξαγόμενων συμπερασμάτων.



**Σχήμα 6.23** Διαγνωστικά διαγράμματα υπολοίπων για την πειραματική απόκριση  $Y_{NTG}$  Α) διάγραμμα κανονικής πιθανότητας Β) διάγραμμα υπολοίπων έναντι προβλεπόμενων τιμών C) διάγραμμα υπολοίπων έναντι σειράς εκτέλεσης πειραμάτων.

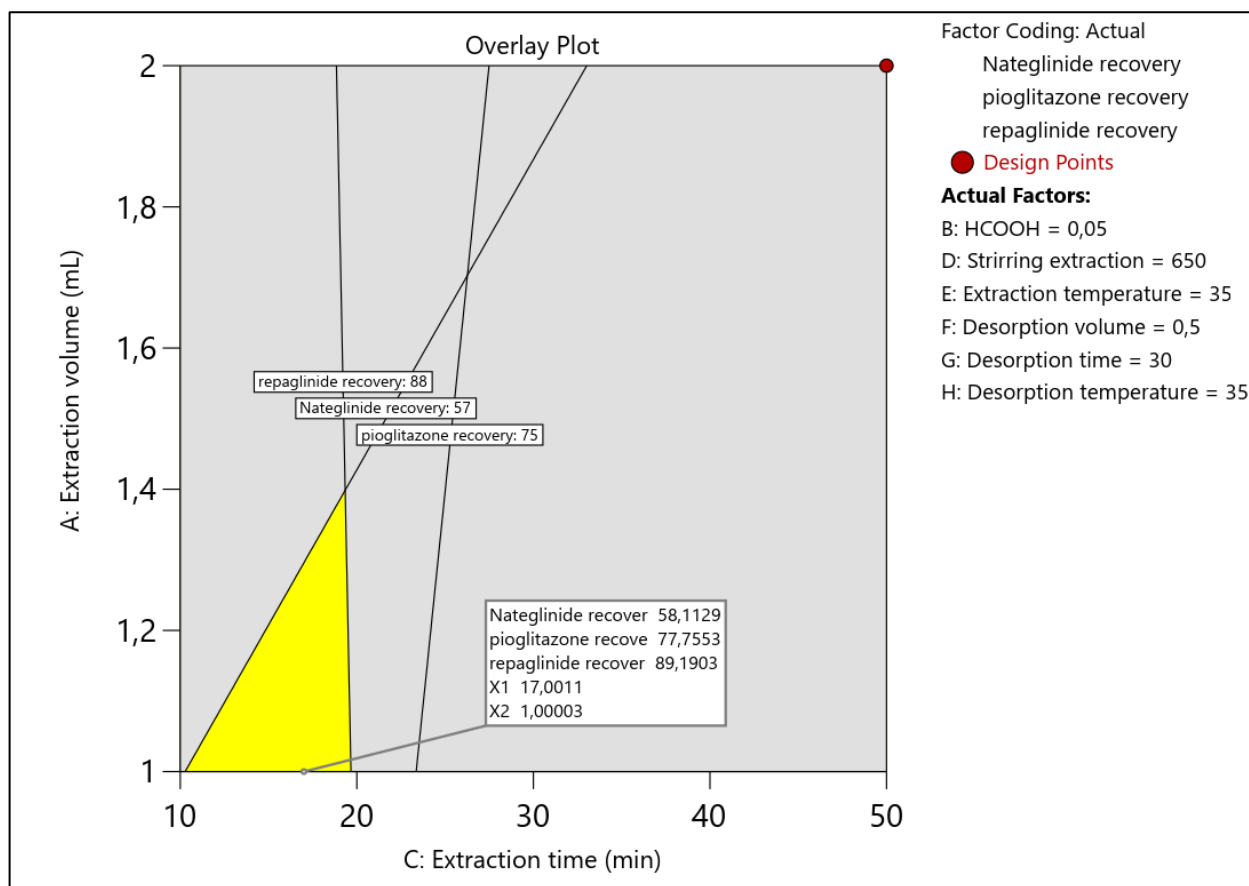
## Εκτίμηση ανάκτησης nateglinide



**Σχήμα 6.24** Διάγραμμα ισοϋψών κορυφών για την πειραματική απόκριση  $Y_{NTG}$ .

Στο σχήμα 6.24 παρουσιάζεται το διάγραμμα ισοϋψών κορυφών (contour plot) για την πειραματική απόκριση  $Y_{NTG}$ , το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με την μεταβολή της ανάκτησης του αναλύτη συναρτήσεως των παραγόντων C (χρόνος εκχύλισης) και D (μαγνητική ανάδευση). Όπως είναι εμφανές από το προκύπτον διάγραμμα, όταν όλοι οι παράγοντες, εξαιρουμένου του παράγοντα A (όγκος εκχύλισης) τίθενται στο υψηλό τους επίπεδο (επίπεδο +1) η ανάκτηση του αναλύτη λαμβάνει την μέγιστη θεωρητική τιμή της, η οποία ανέρχεται σε 63,4%. Ακόμη, παρατηρείται πως σε αντίθεση με τις πειραματικές αποκρίσεις  $Y_{PGL}$  και  $Y_{RPG}$  η ανάκτηση του nateglinide μεγιστοποιείται όταν ο παράγοντας C (χρόνος εκχύλισης) τίθεται στο επίπεδο +1, δηλαδή για χρόνο εκχύλισης 50 min. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι προφανές πως οι εξεταζόμενες πειραματικές αποκρίσεις διαφοροποιούνται ως προς τις πειραματικές συνθήκες που πετυχαίνουν την μέγιστη θεωρητική τιμή ανάκτησης και ειδικότερα ως προς τις τιμές των παραγόντων A (όγκος εκχύλισης) και C (χρόνος εκχύλισης), γεγονός το οποίο υποδηλώνει δεν είναι δυνατή η ταυτόχρονη επίτευξη της μέγιστης τιμής ανάκτησης και για τους τρεις αναλύτες. Ωστόσο, η υπέρθεση των σχετικών διαγραμμάτων ισοϋψών καμπυλών φανερώνει την ύπαρξη μιας οριοθετημένης περιοχής στον πειραματικό χώρο εντός της οποίας οι ανακτήσεις των αναλυτών φαίνεται πως λαμβάνουν τιμές κοντά στην μέγιστη προβλεπόμενη τιμή τους. Το σχετικό διάγραμμα παρατίθεται στο σχήμα 6.25 και επισημαίνεται η θεωρητική ανάκτηση των αναλυτών

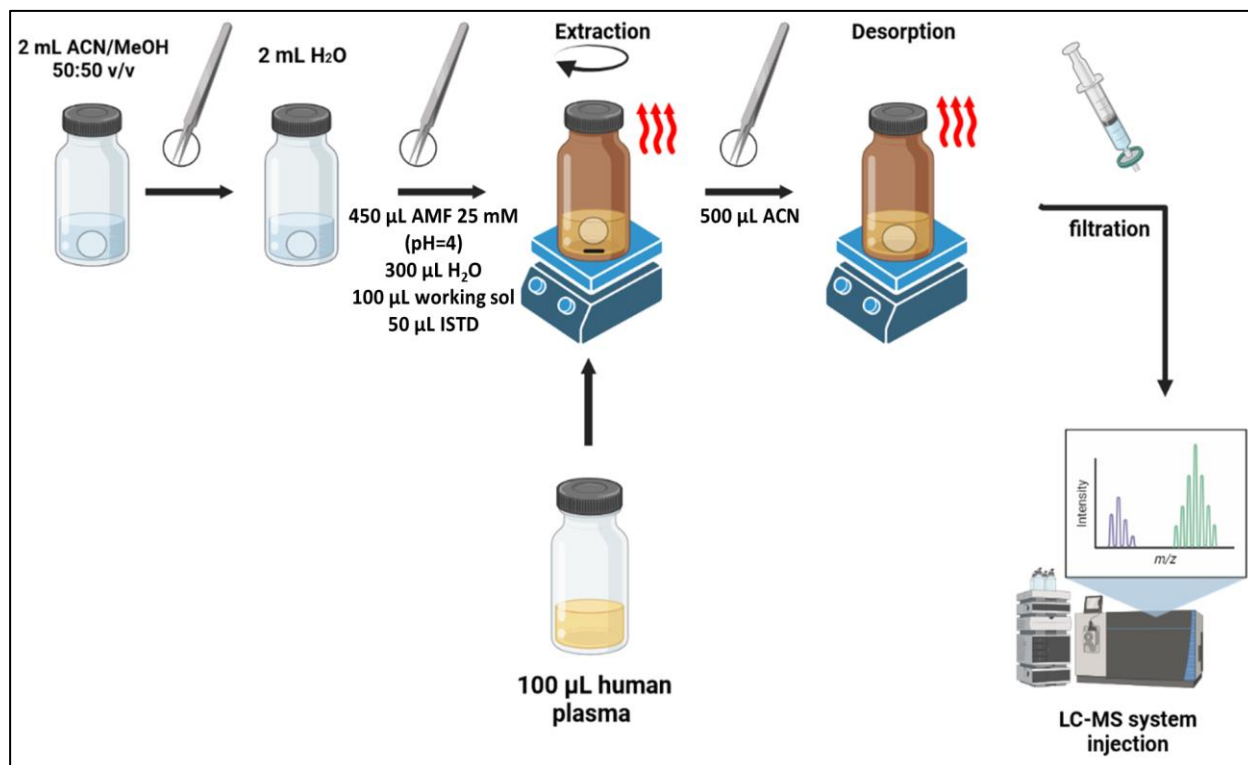
για ένα σημείο εντός της προαναφερόμενης περιοχής, το οποίο συνιστά τη βέλτιστη λύση που προέκυψε ύστερα από την εφαρμογή της συνάρτησης επιθυμητότητας (desirability function), θέτοντας ως στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των τριών αναλυτών [104].



**Σχήμα 6.25** Διάγραμμα υπέρθεσης των πειραματικών αποκρίσεων, στο οποίο επισημαίνεται το σύνολο των εναλλακτικών λύσεων για τη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των τριών αναλυτών.

Αναλυτικότερα, από την εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας υπό τις πειραματικές συνθήκες που αντιστοιχούν στο εν λόγω σημείο και περιγράφονται στο σχετικό υπόμνημα (σχήμα 6.25) προέκυψαν τιμές ανάκτησης σε λογική συμφωνία με τις αντίστοιχες προβλεπόμενες τιμές και για τους τρεις αναλύτες, οι οποίες ανέρχονται σε 80,9% για την ουσία pioglitazone (προβλεπόμενη τιμή 77,7% ), 91,9% για το repaglinide (προβλεπόμενη τιμή 89,2% ) και 61,3% για το nateglinide (προβλεπόμενη τιμή 58,1 %). Οι παραπάνω ανακτήσεις χαρακτηρίστηκαν ως αρκούτως ικανοποιητικές για τους σκοπούς της αναπτυχθείσας μεθόδου, καθώς επιτεύχθηκε μια σημαντικότερη αύξηση της ανάκτησης του αναλύτη repaglinide, ο οποίος εντοπίζεται σε σημαντικά χαμηλότερα θεραπευτικά επίπεδα στο ανθρώπινο πλάσμα ( $\sim 100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) σε σχέση με τους υπογλυκαιμικούς παράγοντες pioglitazone και nateglinide, τα θεραπευτικά επίπεδα των οποίων είναι υψηλότερα κατά μία και δύο τάξεις μεγέθους αντίστοιχα. Συνεπώς, από την ανασκόπηση των σχέσεων κόστους οφέλους δεν κρίθηκε σκόπιμη η περεταίρω ανάπτυξη της μεθόδου προκατεργασίας μέσω της διενέργειας ενός πρόσθετου σχεδιασμού βελτιστοποίησης και οι

δεδομένες τιμές των πειραματικών παραμέτρων αποτέλεσαν τις τελικές συνθήκες της μεθόδου προκατεργασίας. Στο σχήμα 6.26 παρουσιάζεται σχηματικά το πρωτόκολλο της σχετικής μεθόδου FPSE που αναπτύχθηκε και στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 16) συνοψίζονται οι τελικές τιμές των εξεταζόμενων πειραματικών παραμέτρων.



**Σχήμα 6.26** Σχηματικό διάγραμμα εργασίας της αναπτυχθείσας μεθόδου προκατεργασίας FPSE και σύνοψη των τελικών πειραματικών συνθηκών, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού.

**Πίνακας 16** Σύνοψη των τελικών συνθηκών των πειραματικών παραμέτρων των σταδίων εκχύλισης και εκρόφησης που μελετήθηκαν κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου προκατεργασίας FPSE.

Εκχύλιση		
	Παράγοντες	Τελικές συνθήκες
A	Όγκος εκχύλισης	1 mL
B	%v/v HCOOH	0,05 %
C	Χρόνος εκχύλισης	17 min
D	Μαγνητική ανάδευση	650 rpm
E	Θερμοκρασία εκχύλισης	35 °C
Εκρόφηση		
F	Όγκος εκρόφησης	0,5 mL
G	Χρόνος εκρόφησης	30 min
H	Θερμοκρασία εκρόφησης	35 °C

## Κεφάλαιο 7: Αξιολόγηση χαρακτηριστικών ποιότητας της βιοαναλυτικής μεθόδου

### 7.1 Έλεγχος γραμμικότητας

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου διενεργείται μέσω της κατασκευής 3 καμπυλών αναφοράς σε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες και χρονικό διάστημα ενός μήνα. Για τους σκοπούς του συγκεκριμένου ελέγχου κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης εμβολιασμένα σε βιολογικό υλικό, τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την πορεία που περιεγράφηκε στο σχετικό εδάφιο 6.4.3. Τα αναλυόμενα δείγματα ενίονται εις διπλούν στο χρωματογραφικό σύστημα και για κάθε ανάλυση υπολογίζεται ο λόγος των εμβαδών της χρωματογραφικής κορυφής του εκάστοτε αναλύτη προς τη χρωματογραφική κορυφή του εσωτερικού προτύπου. Ακολούθως, τα σχετικά αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, εφαρμόζοντας παράγοντα ζύγισης  $1/Y^2$  και για τους 3 ουσίες με σκοπό την εξαγωγή των μαθηματικών εξισώσεων για την περιγραφή της πειραματικής απόκρισης συναρτήσει της συγκέντρωσης αναλύτη. Η στατιστική επεξεργασία των σχετικών δεδομένων έγινε με το λογισμικό SPSS Statistics v28.0 (IBM).

Για κάθε καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ), το τυπικό σφάλμα εκτίμησης ( $S_r$ ) καθώς και η τυπική απόκλιση της τομής ( $S_a$ ) και της κλίσης ( $S_b$ ). Ακόμα, υπολογίζεται το % σχετικό σφάλμα ( $\%Er$ ) για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, το οποίο αναφέρεται στην επί τοις εκατό απόκλιση της υπολογιζόμενης μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης συγκέντρωσης από την αντίστοιχη ονομαστική τιμή της. Ως κριτήρια αποδοχής χρησιμοποιούνται οι αντίστοιχες τιμές που ορίζονται στις σχετικές οδηγίες M10 του ICH αναφορικά με την επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων, δηλαδή  $\pm 20\%$  για το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) και  $\pm 15\%$  για τα υπόλοιπα επίπεδα συγκεντρώσεων.

Στους παρακάτω πίνακες (πίνακας 17-18) παρουσιάζονται οι σχετικές εξισώσεις παλινδρόμησης για κάθε εργαστηριακή ημέρα, η μέση εξίσωση παλινδρόμησης καθώς και οι αντίστοιχοι στατιστικοί δείκτες που προέκυψαν ύστερα από την επεξεργασία των δεδομένων ελέγχου γραμμικότητας για τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Από τα σχετικά αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η αναπτυχθείσα μέθοδος επιδεικνύει ικανοποιητική γραμμικότητα και για τους τρεις αναλύτες, αφού σε κάθε περίπτωση επιτυγχάνονται τιμές  $r > 0,991$ . Επιπλέον, τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό του % αναλυτικού σφάλματος (πίνακας 19) συμμορφώνονται πλήρως με τα προβλεπόμενα κριτήρια, αφού καμία από τις πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις δεν διαφέρει περισσότερο του 14% από την αντίστοιχη ονομαστική τιμή της. Τέλος, στο σχήμα 7.1 παρουσιάζονται οι ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide για τη δεύτερη σειρά μετρήσεων.

**Πίνακας 17** Σύνοψη των εξισώσεων παλινδρόμησης και των σχετικών στατιστικών δεικτών για τις επιμέρους εργαστηριακές ημέρες, όπως προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων ελέγχου γραμμικότητας της βιοαναλυτικής μεθόδου.

Αναλύτης	Εύρος συγκεντρώσεων (ng mL <sup>-1</sup> )	Εξίσωση παλινδρόμησης <sup>a</sup>	Τυπική απόκλιση		r <sup>b</sup>	S <sub>r</sub> <sup>c</sup>
			κλίσης	τομής		
Pioglitazone	25-2000	R <sub>PGL</sub> = 25,27 x 10 <sup>-4</sup> x C <sub>PGL</sub> +0,0496	0,000078	0,0056	0,997	0,059
		R <sub>PGL</sub> = 23,57 x 10 <sup>-4</sup> x C <sub>PGL</sub> +0,0313	0,000077	0,0050	0,997	0,063
		R <sub>PGL</sub> = 25,10 x 10 <sup>-4</sup> x C <sub>PGL</sub> -0,0180	0,000070	0,0032	0,9980	0,058
Repaglinide	6,25-500	R <sub>RPG</sub> =10,31 x 10 <sup>-3</sup> x C <sub>RPG</sub> + 0,0294	0,00053	0,0085	0,992	0,10
		R <sub>RPG</sub> = 11,81 x 10 <sup>-3</sup> x C <sub>RPG</sub> - 0,0066	0,00042	0,0054	0,996	0,072
		R <sub>RPG</sub> =10,31 x 10 <sup>-3</sup> x C <sub>RPG</sub> -0,00436	0,00032	0,00042	0,997	0,063
Nateglinide	125-10000	R <sub>NTG</sub> = 12,50 x 10 <sup>-5</sup> x C <sub>NTG</sub> -0,0004	0,0000040	0,0010	0,997	0,063
		R <sub>NTG</sub> = 15,90 x 10 <sup>-5</sup> x C <sub>NTG</sub> +0,00001	0,0000050	0,0013	0,997	0,061
		R <sub>NTG</sub> = 16,09 x 10 <sup>-5</sup> x C <sub>NTG</sub> +0,0002	0,0000061	0,0016	0,996	0,078

<sup>a</sup> Παράγοντας ζύγισης 1/Y<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Συντελεστής συσχέτισης

<sup>c</sup> Τυπικό σφάλμα εκτίμησης

**Πίνακας 18** Μέση τιμή των εξισώσεων παλινδρόμησης (n=3) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

Αναλύτης	Εύρος συγκεντρώσεων (ng mL <sup>-1</sup> )	Εξίσωση παλινδρόμησης	Τυπική απόκλιση		r <sup>b</sup>	S <sub>r</sub> <sup>c</sup>
			κλίσης	τομής		
Pioglitazone	25-2000	R <sub>PGL</sub> = 24,81 10 <sup>-4</sup> x C <sub>PGL</sub> +0,0204	0,000049	0,0030	0,998	0,039
Repaglinide	6,25-500	R <sub>RPG</sub> =10,87 10 <sup>-3</sup> x C <sub>RPG</sub> + 0,0051	0,00027	0,0037	0,998	0,049
Nateglinide	125-10000	R <sub>NTG</sub> = 14,90 10 <sup>-5</sup> x C <sub>NTG</sub> + 0,00001	0,0000026	0,0007	0,9991	0,036

<sup>a</sup> Παράγοντας ζύγισης 1/Y<sup>2</sup>

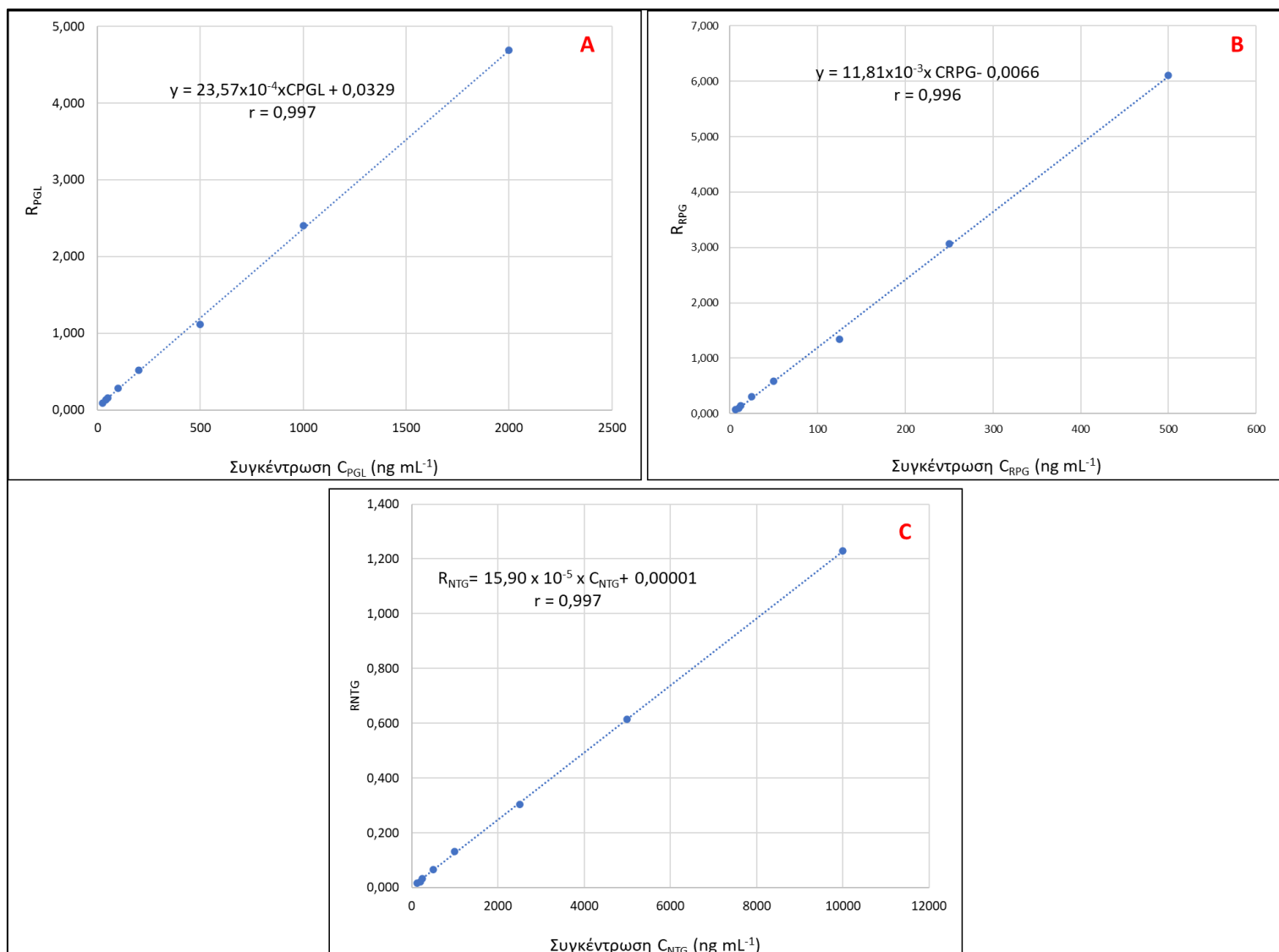
<sup>b</sup> Συντελεστής συσχέτισης

<sup>c</sup> Τυπικό σφάλμα εκτίμησης



Πίνακας 19 Σύνοψη των πειραματικών δεδομένων ελέγχου γραμμικότητας που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των εξισώων παλινδρόμησης.

Pioglitazone				Repaglinide				Nateglinide			
Συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	Μέση τιμή λόγου επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	% Σχετικό σφάλμα	Συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	Μέση τιμή λόγου επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	% Σχετικό σφάλμα	Συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	Μέση τιμή λόγου επιφανειών	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL <sup>-1</sup> )	% Σχετικό σφάλμα
25	0,107	22,7	-9,1	6,25	0,091	6,02	-3,7	125	0,016	130,2	4,2
	0,084	22,2	-11,0		0,070	6,46	3,4		0,019	121,4	-2,9
	0,045	25,2	0,8		0,064	6,63	6,1		0,019	116,7	-6,7
40	0,153	41,0	2,5	10	0,122	9,0	-9,6	200	0,022	176,1	-12,0
	0,130	41,9	4,7		0,101	9,1	-8,7		0,033	209,6	4,8
	0,079	38,9	-2,7		0,093	9,5	-5,4		0,036	222,0	11,0
50	0,178	50,9	1,7	12	0,173	14,0	12,3	250	0,032	259,9	4,0
	0,160	54,7	9,3		0,147	13,0	4,0		0,043	269,9	8,0
	0,111	51,5	3,1		0,119	12,0	-4,3		0,044	270,7	8,3
100	0,333	112,0	12,0	25	0,311	27,5	10,2	500	0,065	522,6	4,5
	0,285	107,5	7,5		0,312	27,0	7,9		0,077	486,9	-2,6
	0,233	100,3	0,3		0,266	26,2	4,8		0,079	489,3	-2,1
200	0,593	215,1	7,6	50	0,610	56,9	13,8	1000	0,132	1053,2	5,3
	0,517	206,1	3,0		0,581	49,8	-0,5		0,174	1092,6	9,3
	0,474	196,6	-1,7		0,483	47,2	-5,5		0,146	906,1	-9,4
500	1,290	490,7	-1,9	100	1,257	120,3	-3,7	2000	0,304	2433,2	-2,7
	1,112	458,1	-8,4		1,346	114,6	-8,3		0,399	2510,8	0,4
	1,390	563,2	12,6		1,383	134,6	7,7		0,409	2539,0	1,6
1000	2,433	943,2	-5,7	200	2,455	237,7	-4,9	5000	0,615	4921,4	-1,6
	2,403	1005,3	0,5		3,068	260,5	4,2		0,746	4689,9	-6,2
	2,471	995,5	-0,5		2,701	262,4	5,0		0,787	4887,5	-2,3
2000	4,949	1938,9	-3,1	500	4,863	473,7	-5,3	10000	1,229	9831,5	-1,7
	4,686	1972,6	-1,4		6,111	518,2	3,6		1,572	9886,2	-1,1
	4,675	1877,0	-6,1		4,987	484,1	-3,2		1,706	10597,6	6,0



**Σχήμα 7.1** Γραφικές παραστάσεις των εξισώσεων παλινδρόμησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών A) pioglitazone B) repaglinide C) nateginide, όπως προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση της δεύτερης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος.

## 7.2 Έλεγχος ορθότητας & πιστότητας

Η ορθότητα (trueness) και η πιστότητα (precision) αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά ποιότητας μιας αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού, καθώς σχετίζονται άμεσα με την ακρίβεια (accuracy) των διενεργούμενων μετρήσεων και κατ' επέκταση την αξιοπιστία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων. Η ορθότητα σχετίζεται με τη συνιστώσα του συστηματικού σφάλματος της μεθόδου (bias) και ορίζεται ως η απόσταση της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων από την αληθή τιμή (τιμή αναφοράς) της μετρούμενης ποσότητας. Εκφράζεται μαθηματικά μέσω του επί τοις εκατό σχετικού σφάλματος  $E_r(\%)$  και της σχετικής εκατοστιαίας ανάκτησης σε σχέση με την τιμή αναφοράς του αναλύτη (Recovery (%)). Η πιστότητα (precision) από την άλλη, σχετίζεται με τη συνιστώσα του τυχαίου σφάλματος και ορίζεται ως ο βαθμός διασποράς των αποτελεσμάτων μιας

σειράς μετρήσεων που ελήφθησαν ύστερα από πολλαπλή δειγματοληψία του ίδιου ομοιογενούς δείγματος, κάτω από σαφώς καθορισμένες συνθήκες. Η πιστότητα εκφράζεται μαθηματικά μέσω των στατιστικών μέτρων διασποράς και ειδικότερα μέσω της τυπικής απόκλισης και της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως ο προσεκτικός σχεδιασμός και ο σαφής ορισμός των συνθηκών κάτω από τις οποίες εφαρμόζεται η μέθοδος είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς οι συνθήκες εφαρμογής της μεθόδου σχετίζονται άμεσα με το υποσύνολο της πιστότητας το οποίο μπορεί να εκτιμηθεί. Συνολικά, διακρίνονται 3 υποσύνολα της πιστότητας, τα οποία περιλαμβάνουν την επαναληψιμότητα (repeatability), την ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) [105].

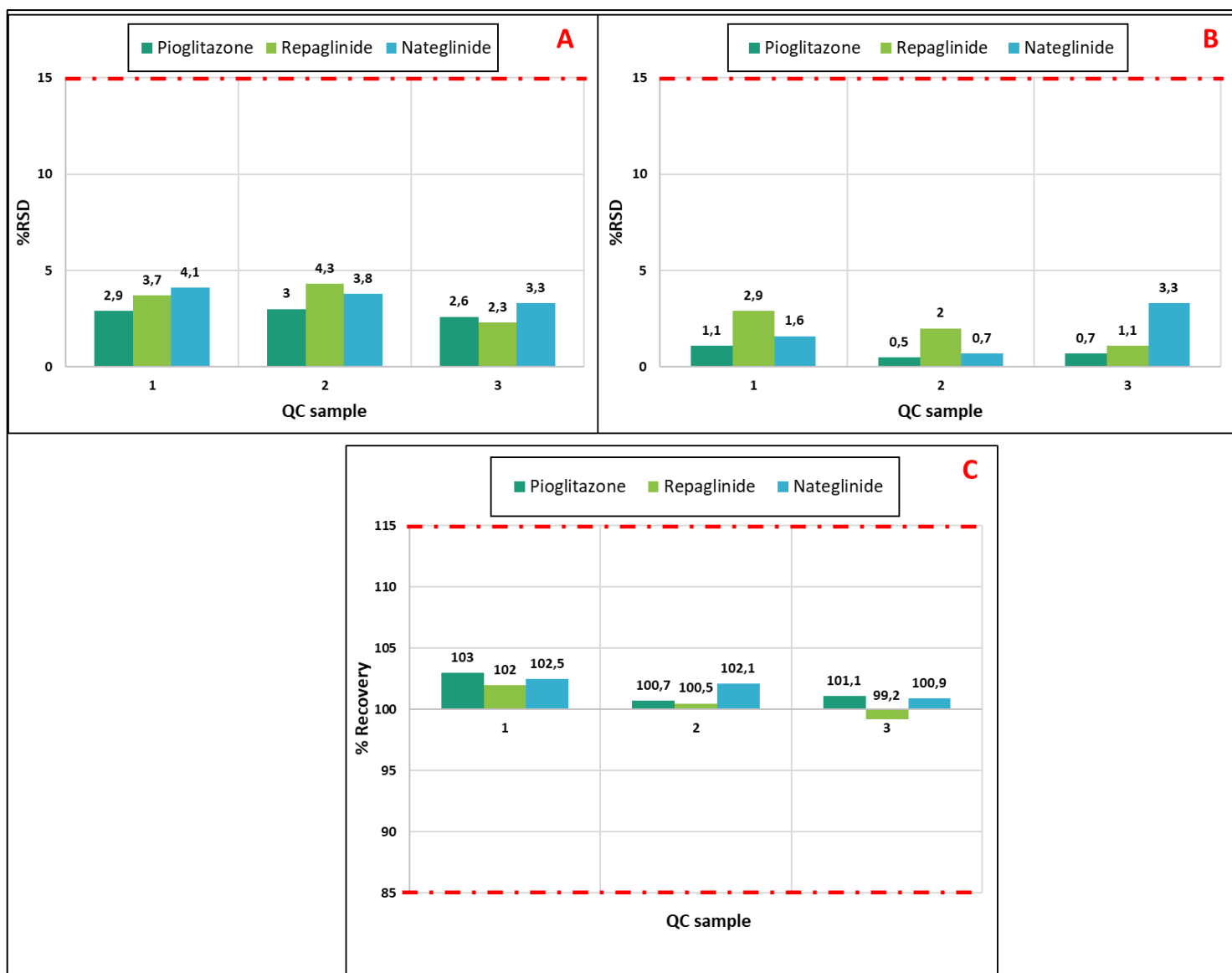
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, διενεργήθηκε αξιολόγηση της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας σειράς μετρήσεων, όσο και μεταξύ διαφορετικών σειρών μετρήσεων, με κάθε σειρά να πραγματοποιείται σε διαφορετική εργαστηριακή ημέρα. Για τους σκοπούς του συγκεκριμένου ελέγχου αναλύθηκαν πρότυπα δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control samples), τα οποία προετοιμάστηκαν σύμφωνα με την πορεία που περιεγράφηκε στο εδάφιο 6.4.4, χρησιμοποιώντας διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων βαθμονόμησης. Οι σχετικοί έλεγχοι διενεργήθηκαν σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό), τα οποία αντιστοιχούν σε τιμές συγκέντρωσης 25, 500 και 2000 ng mL<sup>-1</sup> για το pioglitazone, 6,25, 125 και 500 ng mL<sup>-1</sup> για το repaglinide και 125, 2500 και 10000 ng mL<sup>-1</sup> για το nateglinide. Συνολικά, παρασκευάζονται και αναλύονται 5 δείγματα ανά επίπεδο συγκέντρωσης και σειρά μετρήσεως, δηλαδή διενεργήθηκαν 15 μετρήσεις ανά επίπεδο συγκέντρωσης, οι οποίες κατανέμονται ισάριθμα μεταξύ τριών εργαστηριακών ημερών. Η στατιστική επεξεργασία των προκύπτων αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS Statistics v28.0. και ο υπολογισμός των σχετικών στατιστικών παραμέτρων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της μονόδρομης ανάλυσης διακύμανσης (One-way ANOVA), όπως περιγράφεται στον σχετικό οδηγό της Eurachem για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων [105]. Για την αξιολόγηση της ορθότητας της μεθόδου χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική ανάκτηση (Recovery %), ενώ ως μέτρο για την αξιολόγηση της πιστότητας χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Αναλυτικότερα, για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες υπολογίζονται οι ακόλουθες παράμετροι:

- Η ολική μέση τιμή (overall average)
- Η σχετική τυπική απόκλιση εντός μιας σειράς μετρήσεων (%RSD<sub>intra-run</sub>)
- Η σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ των σειρών (%RSD<sub>inter-run</sub>)
- Η επί τοις εκατό σχετική ανάκτηση (%Recovery)

Τα σχετικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 20) και στα παρακάτω διαγράμματα (σχήμα 7.2).

**Πίνακας 20** Σύνοψη αποτελεσμάτων ελέγχου ορθότητας και πιστότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

<b>Pioglitazone</b>			
Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL <sup>-1</sup> )	<b>25</b>	<b>500</b>	<b>2000</b>
1η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	25,5±0,4	495,7 ± 5,0	2002,5±69,9
2η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	25,5±1,0	510,2±10,8	2049,9±23,2
3η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	26,3±0,7	504,2±23,5	2010,7±55,9
Ολική μέση τιμή (overall average)	25,7	503,4	2021,0
Αριθμός μετρήσεων (n)	15	15	15
MS intra-run	0,965	268,23	3897,14
MSinter-run	0,553	231,204	2750,83
<b>% RSD intra-run</b>	2,9	3,0	2,6
<b>% RSD inter-run</b>	1,1	0,5	0,7
<b>Recovery (%)</b>	103,0	100,7	101,1
<b>Repaglinide</b>			
Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL <sup>-1</sup> )	<b>6,25</b>	<b>125</b>	<b>500</b>
1η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	6,26±0,36	123,9±1,5	498,4±6,2
2η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	6,17±0,22	127,3±8,6	487,9±17,6
3η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	6,61±0,16	125,7±4,1	501,7±5,7
Ολική μέση τιμή (overall average)	6,38	125,6	496,0
Αριθμός μετρήσεων (n)	15	15	15
MS intra-run	0,055	29,802	131,211
MSinter-run	0,224	60,815	281,669
<b>% RSD intra-run</b>	3,7	4,3	2,3
<b>% RSD inter-run</b>	2,9	2,0	1,1
<b>Recovery (%)</b>	102,0	100,5	99,2
<b>Nateglinide</b>			
Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL <sup>-1</sup> )	<b>125</b>	<b>2500</b>	<b>10000</b>
1η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	130,8±4,5	2503,1±110	9695,9±170,5
2η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	124,7±5,1	2594,8±122,4	10168,0±378,2
3η σειρά μετρήσεων (mean ±SD)	128,7±5,9	2556,9±28,6	10404,3±395,7
Ολική μέση τιμή (overall average)	128,1	2551,6	10089,4
Αριθμός μετρήσεων (n)	15	15	15
MS intra-run	27,003	9478,096	109570,9
MSinter-run	49,304	11116,81	650421,7
<b>% RSD intra-run</b>	4,1	3,8	3,3
<b>% RSD inter-run</b>	1,6	0,7	3,3
<b>Recovery (%)</b>	102,5	102,1	100,9



**Σχήμα 7.2** Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων ελέγχου ορθότητας και πιστότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου A) εντός των προσδιορισμών πιστότητα B) μεταξύ των προσδιορισμών πιστότητα C) αποτελέσματα ελέγχου ορθότητας.

Από την εξέταση των σχετικών αποτελεσμάτων συμπεραίνεται πως η αναπτυχθείσα μέθοδος μπορεί να παρέχει ακριβή αποτελέσματα και για τους 3 αναλύτες, αφού σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης τα αποτελέσματα της σχετικής ανάκτησης και της σχετικής τυπικής απόκλισης, που σχετίζονται με την επίδραση των συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων, συμμορφώνονται πλήρως με τις προβλεπόμενες από τις αντίστοιχες οδηγίες προδιαγραφές, οι οποίες ορίζουν ως αποδεκτή μια απόκλιση της τάξης του  $\pm 20\%$  για το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) και  $\pm 15\%$  για τα υπόλοιπα επίπεδα συγκέντρωσης.

### 7.3 Όριο ποσοτικοποίησης

Ως όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation, LOQ) νοείται το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης του αναλύτη, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα και ορίζεται ως η συγκέντρωση εκείνη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα ενός λευκού δείγματος

κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του λευκού. Η παράμετρος LOQ σχετίζεται ως έναν βαθμό με την ευαισθησία της μεθόδου και είναι ιδιαίτερα σημαντική για αναλυτικές μεθόδους που προορίζονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών με χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης στα αναλυόμενα υλικά μήτρας, όπως προϊόντα διάσπασης και προσμίξεις. Συνολικά, το όριο ποσοτικοποίησης μιας αναλυτικής μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις μεθόδων που επιδεικνύουν θόρυβο γραμμής βάσης είναι δυνατός ο πειραματικός υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης μέσω της ανάλυσης λευκών δειγμάτων και αραιών πρότυπων δειγμάτων μέχρι την επίτευξη τιμής λόγου σήματος προς θόρυβο (s/n)=10. Εναλλακτικά, μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα από την κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς για τις χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη και εφαρμογή της ακόλουθης μαθηματικής εξίσωσης:

$$LOQ = \frac{10 \times S_a}{b}$$

Όπου  $S_a$  η τυπική απόκλιση της τομής και  $b$  η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Στην περίπτωση αυτή τα σχετικά αποτελέσματα συνιστούν απλή εκτίμηση και θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και πειραματικά, μέσω της παρασκευής και ανάλυσης πρότυπων εμβολιασμένων δειγμάτων στο προτεινόμενο επίπεδο συγκέντρωσης. Τέλος, σύμφωνα με τις πρόσφατα αναθεωρημένες οδηγίες Q2(R2)/Q14 του ICH σχετικά με την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων, το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να επικυρωθεί άμεσα από τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου [105,106]. Με βάση λοιπόν την τελευταία προσέγγιση, ως όριο ποσοτικοποίησης για τους αναλύτες pioglitazone, repaglinide και nateglinide ορίζονται οι χαμηλές συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας που εξετάστηκαν στα πλαίσια αξιολόγησης της ορθότητας και πιστότητας της βιοαναλυτικής μεθόδου. Οι τιμές των αντίστοιχων ορίων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 21).

**Πίνακας 21** Σύνοψη των τιμών του ορίου ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών pioglitazone, repaglinide nateglinide σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

Όριο ποσοτικοποίησης (ng mL <sup>-1</sup> )	
Pioglitazone	25
Repaglinide	6,25
Nateglinide	125

#### 7.4 Αξιολόγηση επίδρασης υλικού μήτρας (Matrix effect)

Ως επίδραση υλικού μήτρας (matrix effect) νοείται η εκδήλωση φαινομένων μεταβολής (καταστολής ή ενίσχυσης) της έντασης του αναλυτικού σήματος, ως αποτέλεσμα των παρεμποδιστικών δράσεων που ασκούν τα συστατικά της μήτρας του αναλυόμενου δείγματος. Η επίδραση υλικού μήτρας αφορά κυρίως την τεχνική της φασματομετρίας μαζών και εκδηλώνεται συνήθως μέσω φαινομένων καταστολής της έντασης σήματος του οργάνου (ion suppression). Το μέγεθος της προκαλούμενης ιοντικής καταστολής ποικίλει σε μεγάλο βαθμό και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται μεταξύ άλλων με τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του αναλυόμενου δείγματος, την εκλεκτικότητα της μεθόδου προκατεργασίας, την εφαρμοζόμενη τεχνική ιοντισμού και τα χαρακτηριστικά της χρωματογραφικής μεθόδου. Η επίδραση υλικού μήτρας αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τις αναλυτικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού, καθώς σε περίπτωση που δεν αντιμετωπιστεί επαρκώς μπορεί να διαταράξει σε σημαντικό βαθμό και κατά απρόβλεπτο τρόπο κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, όπως είναι η γραμμικότητα, η ορθότητα και η αναπαραγωγιμότητα, οδηγώντας στην εξαγωγή αποτελεσμάτων περιορισμένης αξιοπιστίας.

Κύρια αιτία του προβλήματος της ιοντικής καταστολής είναι η παρουσία οργανικών και ανόργανων ενώσεων στο χρωματογραφικό έκλουσμα, οι οποίες ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά ενδέχεται να μεταβάλλουν σε σημαντικό βαθμό την απόδοση του ιοντισμού και κατά επέκταση την απόκριση του οργάνου. Με βάση την πηγή προέλευσής τους οι παρεμποδίζουσες ουσίες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς καταστολείς σήματος. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται όσες ενώσεις συνιστούν ενδογενή συστατικά του αναλυόμενου δείγματος (πχ. αμινοξέα, πεπτίδια, λιπίδια, υδατάνθρακες, πολικοί και άπολοι μεταβολίτες κοκ), ενώ στη δεύτερη ομάδα συγκαταλέγονται όσες ενώσεις έχουν προέλθει από τα επιμέρους στάδια της προκατεργασίας δείγματος και του χρωματογραφικού διαχωρισμού και περιλαμβάνονται κατάλοιπα πλαστικοποιητών και πολυμερών υλικών, φθαλικές ενώσεις, οργανικά οξέα και επιφανειοδραστικοί παράγοντες. Ο πλήρης μηχανισμός μέσω του οποίου συντελείται η ιοντική καταστολή δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, ωστόσο έχουν προταθεί αρκετές σημαντικές θεωρίες για την επεξήγηση του φαινομένου. Ορισμένες από τις επικρατέστερες εξ αυτών προτείνουν την εκδήλωση φαινομένων ανταγωνισμού φορτίου ανάμεσα στις παρεμποδίζουσες ουσίες και τα μόρια του αναλύτη με αποτέλεσμα την αποφόρτιση των ιόντων, καθώς και την εκδήλωση φαινομένων ανταγωνισμού για την επιφάνεια των φορτισμένων νανοσταγονιδίων, από την οποία λαμβάνει χώρα η μετάβαση των σχηματιζόμενων ιόντων στην αέριο φάση. Ακόμα, η παρουσία μη-πτητικών ενώσεων και επιφανειοδραστικών συστατικών στο χρωματογραφικό έκλουσμα μπορεί να μεταβάλει ορισμένες κρίσιμες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το ιξώδες και η επιφανειακή τάση, περιορίζοντας τους ρυθμούς συρρίκνωσης και σχάσης των φορτισμένων μικροσταγονιδίων, οι οποίοι σχετίζονται σε σημαντικό βαθμό με την απόδοση του ιοντισμού. Το μέγεθος των

προκαλούμενων μεταβολών είναι συνήθως ανάλογο της συγκέντρωσης των παρεμποδιστών στο ενιώμενο δείγμα και έχει πεπερασμένη διάρκεια δράσης, αφορά δηλαδή την απόκριση όσων ουσιών εκκλύονται στο ίδιο χρονικό παράθυρο. Ωστόσο έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις αθροιστικής καταστολής, κατά τις οποίες το μέγεθος της ελάττωσης του σήματος αυξάνεται προοδευτικά με κάθε ένεση δείγματος.

Το φαινόμενο της επίδρασης υλικού μήτρας συνιστά ένα σημαντικό πρόβλημα στο πεδίο της σύγχρονης βιοανάλυσης, καθώς τα βιολογικά δείγματα χαρακτηρίζονται από υψηλή πολυπλοκότητα και αυξημένη διατομική μεταβλητότητα ως προς την σύσταση και την περιεκτικότητα των δευτερευόντων συστατικών τους, καθιστώντας πιθανή την εκδήλωση απρόβλεπτων αποκλίσεων στην απόδοση των εφαρμοζόμενων βιοαναλυτικών μεθόδων. Για τον λόγο αυτό ήδη από το 2001 ο FDA έχει συμπεριλάβει στις σχετικές οδηγίες για την επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων την απαίτηση της αξιολόγησης των επιδράσεων του υλικού μήτρας στα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, ενώ το 2011 οι παραπάνω απαιτήσεις συμπεριελήφθησαν και στις αντίστοιχες οδηγίες του EMA. Πλέον, ο έλεγχος της επίδρασης υλικού μήτρας αποτελεί έναν από τους βασικούς ελέγχους που διενεργούνται κατά την επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων και περιλαμβάνεται στις εναρμονισμένες τεχνικές απαιτήσεις της οδηγίας M10 του ICH [107,108].

Στην παρούσα εργασία, διενεργήθηκε αξιολόγηση της επίδρασης υλικού μήτρας για τους προσδιοριζόμενους υπογλυκαιμικούς παράγοντες και το εσωτερικό πρότυπο. Για τους σκοπούς του παρόντος ελέγχου, παρασκευάστηκαν συνολικά 2 ομάδες δειγμάτων. Η μία ομάδα αποτελείται από λευκά δείγματα πλάσματος, τα οποία εμβολιάζονται με πρότυπα διαλύματα των ουσιών ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας (post-spiked samples), ενώ η άλλη ομάδα αποτελείται από διαλύματα αντίστοιχης συγκέντρωσης, τα οποία παρασκευάζονται στον διαλύτη εργασίας της χρωματογραφικής μεθόδου (ακετονιτρίλιο). Ο σχετικός έλεγχος διενεργείται σε δυο επίπεδα συγκέντρωσης για τους αναλύτες (100 και 2000 ng mL<sup>-1</sup> για το pioglitazone, 25 και 500 ng mL<sup>-1</sup> για το repaglinide, 500 και 10000 ng mL<sup>-1</sup> για το nateglinide) και ένα επίπεδο συγκέντρωσης για το εσωτερικό πρότυπο (125 ng mL<sup>-1</sup>). Κάθε δείγμα ενίεται εις τριπλούν στο χρωματογραφικό σύστημα και για την ποσοτική αξιολόγηση της επίδρασης του υλικού μήτρας χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση [109]:

$$M.E.(%) = \left( \frac{\text{Mean peak area}_{\text{post-spiked sample}}}{\text{Mean peak area}_{\text{standard solution}}} - 1 \right) \times 100\%$$



Στον πίνακα 22 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα πλαίσια του παρόντος ελέγχου. Όπως είναι εμφανές, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκαν φαινόμενα ιοντικής καταστολής ποικίλου βαθμού σημαντικότητας. Επιπλέον, παρατηρείται πως η ουσία nateglinide δέχεται την υψηλότερη καταστολή σήματος συγκριτικά με τους υπόλοιπους αναλύτες, η οποία ανέρχεται σε 33% και 36% για την χαμηλή και την υψηλή συγκέντρωση αντίστοιχα. Για τους αναλύτες pioglitazone repaglinide καθώς και για το εσωτερικό πρότυπο παρατηρείται μια ήπια μόνο ελάττωση της έντασης του αναλυτικού σήματος, η οποία δεν υπερβαίνει το 20% σε καμία περίπτωση.

### 7.5 Αξιολόγηση ανάκτησης

Ο έλεγχος ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου πραγματοποιήθηκε μέσω της παρασκευής και ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος σε δυο επίπεδα συγκέντρωσης για τους αναλύτες και ένα επίπεδο συγκέντρωσης για το εσωτερικό πρότυπο, τα οποία ταυτίζονται με τα επίπεδα του ελέγχου της επίδρασης υλικού μήτρας (ενότητα 7.4). Παράλληλα, παρασκευάστηκαν δείγματα πλάσματος σε αντίστοιχα επίπεδα συγκέντρωσης, μέσω του εμβολιασμού λευκών δειγμάτων με πρότυπα διαλύματα των ουσιών, ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας (post-spiked samples). Για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό ανάκτησης (%Recovery) συγκρίνεται το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του εκάστοτε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα που υποβλήθηκε σε εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας με το εμβαδόν της κορυφής του ίδιου αναλύτη στο δείγμα πλάσματος το οποίο δέχθηκε εμβολιασμό μετά την εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 22).

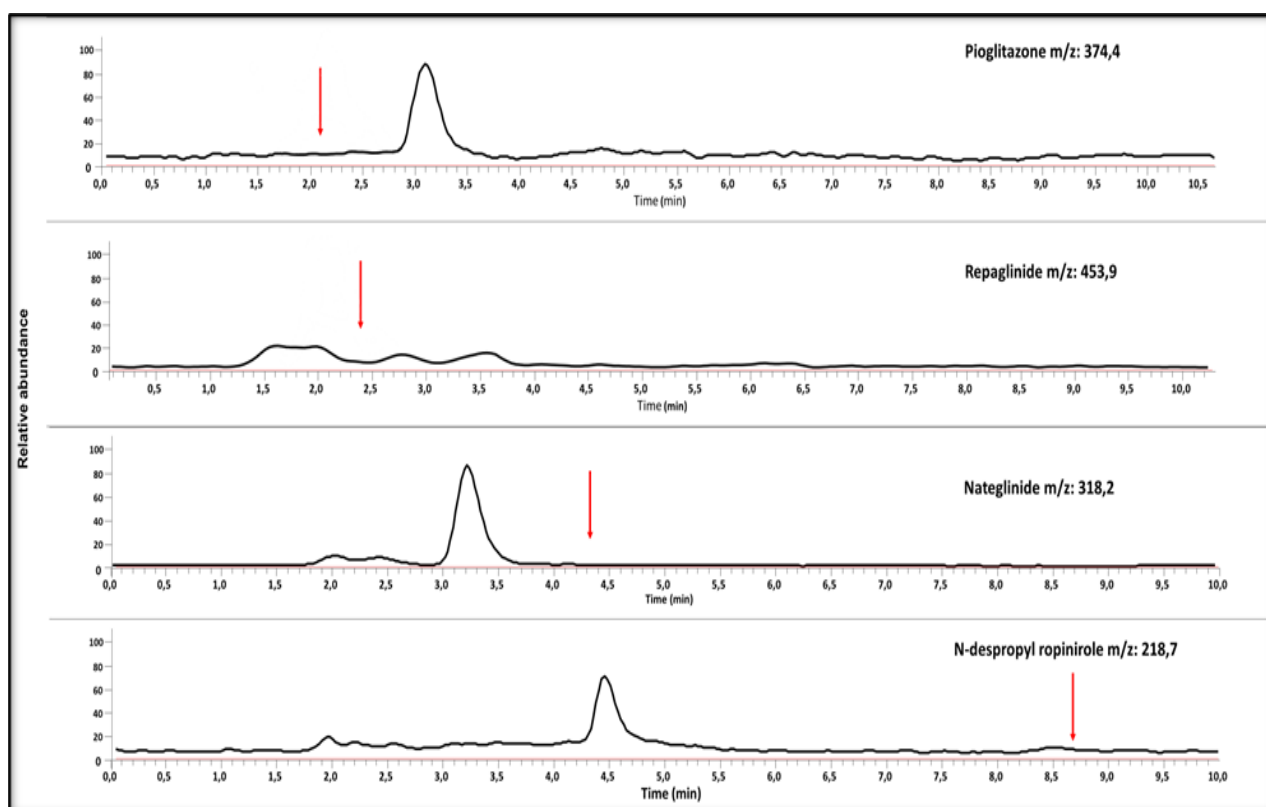
**Πίνακας 22** Αποτελέσματα της επί τοις εκατό ανάκτησης και επίδρασης υλικού μήτρας για την αναπτυχθείσα μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

Αναλύτης	Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL <sup>-1</sup> )	% Ανάκτηση (mean±SD)	% Επίδραση υλικού μήτρας <sup>a</sup>
Pioglitazone	100	76,6 ± 2,7	-13,7
	2000	69,4 ± 5,6	-5,4
Repaglinide	25	82,4 ± 6,0	-9,3
	500	87,0 ± 4,7	-12,5
Nateglinide	500	68,5 ± 5,3	-36,7
	10000	69,3 ± 4,2	-33,3
N-despropyl ropinirole (IS)	125	67,0 ± 1,5	-18,7

<sup>a</sup> Υπολογισμός σύμφωνα με τη μέθοδο των Karampela et al [109].

## 7.6 Έλεγχος εκλεκτικότητας

Στα πλαίσια αξιολόγησης της εκλεκτικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου αναλύθηκαν 6 λευκά δείγματα πλάσματος, προερχόμενα από διαφορετικές πηγές χωρίς συνένωση (pooling). Όπως διαπιστώθηκε, σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν παρατηρήθηκαν συνεκλουθείσες χρωματογραφικές κορυφές με εμβαδόν μεγαλύτερο από το 20% του LLOQ για τους αναλύτες και εμβαδόν μεγαλύτερο του 5% για το εσωτερικό πρότυπο. Στο σχήμα 7.3 παρατίθεται ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος πλάσματος, το οποίο λήφθηκε υπό τις βέλτιστες συνθήκες του χρωματογραφικού συστήματος και επιβεβαιώνει την απουσία παρεμποδισμών στους αντίστοιχους χρόνους έκλυσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.



**Σχήμα 7.3** Ιονικό χρωματογράφημα λευκού δείγματος ανθρώπινου πλάσματος, το οποίο λήφθηκε κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες της αναλυτικής μεθόδου, όπως περιεγράφηκαν αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο 6.5.3. Με κόκκινο βέλος επισημαίνονται οι χρόνοι έκλυσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου.

## 7.7 Έλεγχος σταθερότητας

Η τεκμηρίωση της σταθερότητας των προσδιοριζόμενων ουσιών στο προς ανάλυση υλικό μήτρας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή μιας βιοαναλυτικής μεθόδου στην κλινική πράξη. Συγκεκριμένα, θα πρέπει μεταξύ άλλων να αποδειχθεί πως οι εξεταζόμενοι αναλύτες επιδεικνύουν επαρκή σταθερότητα τόσο κατά το διάστημα συντήρησής που διαμεσολαβεί μέχρι την ανάλυση (long-term stability), όσο και κατά την διάρκεια χειρισμού των δειγμάτων υπό τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στο εργαστήριο (short-term stability). Ακόμα, είναι σημαντικό να μελετηθεί η επίδραση της έκθεσης σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης (freeze and thaw), προκειμένου να διασφαλιστεί πως η υποβολή των δειγμάτων σε

τυχόν απρόσμενες καταστάσεις (πχ. διακοπή παροχής ρεύματος) δεν θα υποβαθμίσει την αξιοπιστία των εξαγόμενων αναλυτικών αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η σταθερότητα των pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος κάτω από διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Αναλυτικότερα, διενεργήθηκε έλεγχος σταθερότητας μακράς διάρκειας υπό τυπικές συνθήκες συντήρησης (28 ημέρες/ -20 °C), έλεγχος βραχείας διάρκειας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (4 ώρες/ 20 °C) καθώς και έλεγχος σταθερότητας έναντι επαναλαμβανόμενων κύκλων ψύξης-απόψυξης. (3 κύκλοι/ 7 ημέρες ανά κύκλο/ -20 °C). Οι προαναφερόμενοι έλεγχοι διενεργήθηκαν σε 2 επίπεδα συγκεντρώσεων που αντιστοιχούν σε 100 και 2000 ng mL<sup>-1</sup> για το pioglitazone, 25 και 500 ng mL<sup>-1</sup> για το repaglinide, 500 και 10000 ng mL<sup>-1</sup> για το nateglinide. Για τους σκοπούς της μελέτης σταθερότητας παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου σύμφωνα με την πορεία που περιεγράφηκε στο εδάφιο 6.4.4. και για κάθε σειρά μετρήσεων των επιμέρους ελέγχων αναλύθηκαν τρία δείγματα ανά επίπεδο συγκέντρωσης. Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο λόγος εμβαδών της χρωματογραφικής κορυφής του εκάστοτε αναλύτη προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου και εν συνεχεία τα αποτελέσματα της πειραματικής συγκέντρωσης από την ανάλυση των δειγμάτων ελέγχου σταθερότητας συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση φρέσκων δειγμάτων αντίστοιχης συγκέντρωσης. Ακολούθως, υπολογίστηκε η % διαφορά της ευρεθείσας συγκέντρωσης του εκάστοτε αναλύτη στο δείγμα ελέγχου σταθερότητας από την συγκέντρωση του στο αντίστοιχο φρέσκο δείγμα αναφοράς (%Er). Ως αποδεκτές ορίζονται τιμές απόκλισης μικρότερες του ±15%. Τα σχετικά αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 23).

**Πίνακας 23** Σύνοψη αποτελεσμάτων μελέτης σταθερότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος

Αναλύτης	Επίπεδο συγκέντρωσης (ng mL <sup>-1</sup> )	Διάρκεια αποθήκευσης/ συνθήκες					
		4 ώρες/ 20 °C		28 ημέρες/ -20 °C		3 κύκλοι ψύξης-απόψυξης/ -20 °C	
		mean±SD	Er(%)	mean±SD	Er(%)	mean±SD	Er(%)
Pioglitazone	100	107 ± 1	6,6	101 ± 2	1,3	102 ± 2	1,8
	2000	2008 ± 59	0,4	1989 ± 39	-0,5	1951 ± 15	-2,5
Repaglinide	25	24,8 ± 0,5	-0,7	25,2 ± 0,6	0,7	26,4 ± 0,3	5,6
	500	475 ± 14	-5,0	498 ± 7	-0,3	491 ± 3	-1,9
Nateglinide	500	487 ± 4	-2,8	513 ± 7	2,7	510 ± 10	2,0
	10000	10225 ± 554	2,3	9489 ± 259	-5,1	9182 ± 172	-8,2

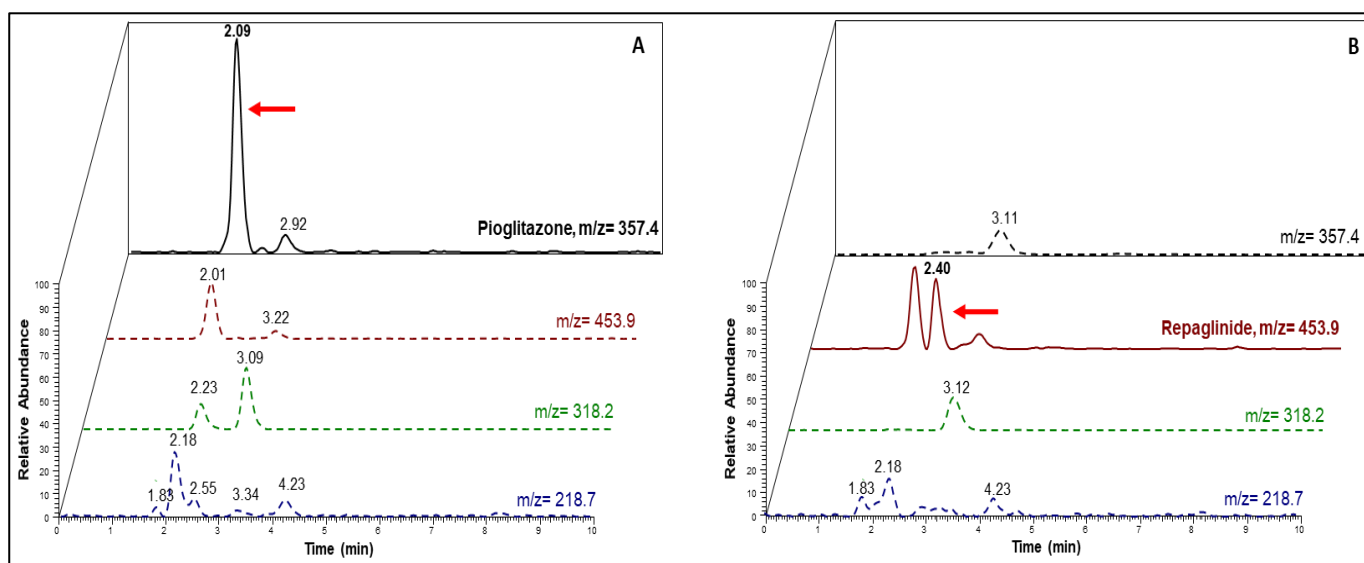
Όπως προκύπτει από την εξέταση των παραπάνω αποτελεσμάτων, και οι τρεις αναλύτες επιδεικνύουν επαρκή σταθερότητα για χρονικό διάστημα 28 ημερών, όταν φυλάσσονται σε τυπικές συνθήκες συντήρησης (- 20 °C). Επιπλέον, η έκθεση των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος σε συνθήκες περιβάλλοντος για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην συγκέντρωση των αναλυτών, συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των φρέσκων δειγμάτων, αφού σε κάθε περίπτωση το μέγεθος της σχετικής απόκλισης δεν υπερβαίνει το 6,6%. Τέλος, διαπιστώνεται πως η υποβολή των δειγμάτων πλάσματος σε 3 πλήρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης, συνολικής διάρκειας 21 ημερών δεν οδήγησε σε σημαντική διάσπαση των προσδιοριζόμενων ουσιών, καθώς οι τιμές της % διαφοράς από την συγκέντρωση αναφοράς είναι εντός αποδεκτών ορίων. Η πληροφορία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανάλυση μεγάλου αριθμού κλινικών δειγμάτων, καθώς διασφαλίζει πως η έκθεση των βιολογικών δειγμάτων σε φαινόμενα ακούσιας απόψυξης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους δεν αναμένεται να υποβαθμίσει την αξιοπιστία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων.

### **7.8 Εφαρμογή μεθόδου στην ανάλυση κλινικών δειγμάτων**

Εφόσον ολοκληρώθηκε επιτυχώς η διαδικασία της επικύρωσης, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου για την ανάλυση δύο δειγμάτων πλάσματος προερχόμενα από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι οποίοι λάμβαναν τις φαρμακευτικές ουσίες pioglitazone και repaglinide. Παράλληλα, συμπληρωματικά με τους παραπάνω υπογλυκαιμικούς παράγοντες κατά το διάστημα της αιμοληψίας οι ασθενείς λάμβαναν και άλλες φαρμακευτικές ουσίες καθώς και ορισμένα συμπληρώματα διατροφής. Αναλυτικότερα, η συλλογή των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια αιμοληψίας παρουσία του αντιπηκτικού παράγοντα lithium heparin και ακολούθως διενεργήθηκε φυγοκέντρηση τους με σκοπό την απομόνωση του πλάσματος, το οποίο καταψύχθηκε αμέσως στους -20 °C μέχρις ότου αναλυθεί. Κάθε δείγμα πλάσματος αναλύθηκε εις διπλούν κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες της προτεινόμενης βιοαναλυτικής μεθόδου και για την ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις παλινδρόμησης της τρίτης σειράς μετρήσεων, με τα σχετικά αποτελέσματα να συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 24). Επιπλέον, στο σχήμα 7.4 παρατίθενται δύο ενδεικτικά ιοντικά χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων πλάσματος των ασθενών χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου, τα οποία επιβεβαιώνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης των προσδιοριζόμενων ουσιών, καθώς και την απουσία παρεμποδιζουσών κορυφών στον χρόνο έκλουσης του εσωτερικού προτύπου ( $t_r = 8,76 \text{ min}$ ).

**Πίνακας 24** Σύνοψη αποτελεσμάτων από την ανάλυση δειγμάτων πλάσματος ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2

α/α	Φύλλο, ηλικία	Φάρμακο/ δοσολογία	Συγχορηγούμενα Φάρμακα-συμπληρώματα	Αποτελέσματα C (ng mL <sup>-1</sup> )
1	♀, 57	Pioglitazone 15 mg/1x1	Ramipril 5 mg/1x1, ascorbic acid 950 mg/1x1	520
2	♂, 73	Repaglinide 2mg/1x1	Olmesartan 40mg +hydrochlorothiazide 25 mg/1x1	247



**Σχήμα 7.4** Α) Ιοντικό χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε από ασθενή που λάμβανε τη φαρμακευτική ουσία pioglitazone. Β) Ιοντικό χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε από ασθενή που λάμβανε τη φαρμακευτική ουσία repaglinide. Η καταγραφή των σχετικών χρωματογραφημάτων έγινε κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες της αναλυτικής μεθόδου, όπως περιεγράφηκαν αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο 6.5.3.

## 7.9 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μιας βιοαναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των per os χορηγούμενων υπογλυκαιμικών φαρμάκων pioglitazone, repaglinide και nateglinide σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Για την ανάκτηση των αναλυτών από το βιολογικά δείγμα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο, η οποία συνάδει σε μεγάλο βαθμό με τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας και χαρακτηρίζεται από αυξημένη απλότητα εφαρμογής και μειωμένες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό. Παράλληλα, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των προσροφητικών μέσων FPSE για έναν αριθμό 20 αναλύσεων χωρίς την εκδήλωση σημαντικών μεταβολών στην απόδοση της εκχύλισης συνέβαλε καθοριστικά στη μείωση των λειτουργικών εξόδων εφαρμογής της μεθόδου και την εξοικονόμηση οικονομικών και εργαστηριακών πόρων. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών διενεργήθηκε με την τεχνική HILIC/ESI-MS και ο συνολικός χρόνος

ανάλυσης ανέρχεται στα 10 λεπτά. Όπως διαπιστώθηκε, η σύζευξη της υδροχρωματογραφίας HILIC με τη φασματομετρία μαζών μπορεί να εξασφαλίσει την απαιτούμενη ευαισθησία για την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των αναλυτών ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ως αποτέλεσμα της υψηλής συμβατότητάς των χρησιμοποιούμενων υδατο-οργανικών κινητών φάσεων με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Η προτεινόμενη μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και βρέθηκε αρκούντως εκλεκτική, ορθή και επαναλήψιμη. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την τεκμηριωμένη σταθερότητα των αναλυτών στο ανθρώπινο πλάσμα καθιστά δυνατή την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου στα πλαίσια κλινικών δοκιμών αλλά και στην καθημερινή κλινική πράξη με σκοπό τον έλεγχο των θεραπευτικών επιπέδων των εν λόγω φαρμάκων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

**Πίνακας 25** Σύνοψη πειραματικών παραμέτρων και αποτελεσμάτων του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 2<sup>8-2</sup>

		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Response 1	Response 2	Response 3
Std	Run	A:Extraction volume	B: %v/v HCOOH	C:Extraction time	D:Strirring extraction	E:Extraction temperature	F:Desorption volume	G:Desorption time	H:Desorption temperature	pioglitazone recovery	repaglinide recovery	Nateglinide recovery
46	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	47,43	49,09	53,4
32	2	1	1	1	1	1	-1	1	-1	48,38	72,91	44,1
1	3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	25,36	28,95	10,7
17	4	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	29,51	34,98	11,83
47	5	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	46,19	47,82	41,75
14	6	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	61,63	67,13	28,94
31	7	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	57,5	60,21	44,76
11	8	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	57,55	62,71	35,81
51	9	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	27,54	28,24	21,73
48	10	1	1	1	1	-1	1	1	-1	55,83	66,69	55,21
60	11	1	1	-1	1	1	1	-1	1	69,34	84,19	52,27
36	12	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	14,36	13,52	9,49
59	13	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	74,21	77,11	42,11
64	14	1	1	1	1	1	1	1	1	70,47	64,12	54

38	15	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	21,68	18,59	22,98
40	16	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	34,78	4,74	10,42
45	17	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	44,96	69,92	53,23
30	18	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	42,34	50,45	33,84
7	19	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	31,31	31,15	18,94
54	20	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	44,75	56,89	33,55
42	21	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	65,21	65,25	42,19
2	22	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	24,06	23,66	10,64
25	23	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	45,65	71,92	44,39
12	24	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	62,2	68,58	28,92
63	25	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	48,94	50,7	47,14
50	26	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	25,77	27,27	12,1
56	27	1	1	1	-1	1	1	-1	1	32,71	44,46	27,84
19	28	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	31,58	33,17	21,32
62	29	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	62,72	71,59	49,56
34	30	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	12,29	9,92	6,9
52	31	1	1	-1	-1	1	1	1	1	26,58	26,42	16,69
23	32	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	44,34	43,55	31,76
8	33	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	29,29	30,96	11,34
15	34	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	52,44	54,17	33,26



16	35	1	1	1	1	-1	-1	1	1	58,57	61,15	38,09
26	36	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	80,79	96,15	48,21
4	37	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	17,9	22,52	11,43
41	38	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	59,19	68,18	54,61
58	39	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	54,48	93,34	68,3
61	40	-1	-1	1	1	1	1	1	1	48,81	49,65	53,04
20	41	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	23,65	16,48	28,9
28	42	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	39,24	43	33,59
6	43	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	27,92	33,48	20,27
55	44	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	45,32	57,01	22,75
22	45	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	2,71	4,96	14,2
37	46	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	42,12	50,49	26,51
9	47	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	30,43	44,54	31,75
3	48	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	23,23	21,47	11,17
13	49	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	49,11	79,8	59,06
57	50	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	54,06	58,53	34,1
21	51	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	59,5	66,68	38,65
44	52	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	49,04	52,02	29,24
10	53	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	37,03	55	29,3
49	54	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	26,43	36,7	15,99

33	55	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	21,85	18,44	11,15
35	56	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	36,59	42,33	19,9
29	57	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	43,12	69,34	47,8
18	58	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	28,21	26,88	8,66
39	59	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	40,33	34,3	33,18
53	60	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	50,87	57,64	29,72
24	61	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	34,39	30,94	23,95
27	62	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	76,62	100,65	54,04
5	63	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	33,92	40,82	21,44
43	64	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	87,35	101,27	55,4

## Βιβλιογραφία

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of instrumental analysis, Sixth edition, Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, 2007.
- [2] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass spectrometry: principles and applications, 3rd ed, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- [3] G. Theodoridis, S. Girousi, G. Zachariadis, A.S. Zotou, V. Samanidou, Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α.Σ. Ζώτου, Β. Σαμανίδου, Βιοαναλυτική χημεία, 2016. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/3667> (accessed October 13, 2022).
- [4] Introduction to Mass Spectrometry, 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470516898>.
- [5] R.E. Ardrey, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction, 1st ed., Wiley, 2003. <https://doi.org/10.1002/0470867299>.
- [6] Ειρήνη Παντερή, Παρίση-Πούλου Μαρία, Σημειώσεις προχωρημένης φαρμακευτικής ανάλυσης, Αθήνα, 2015.
- [7] J.B. Fenn, Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 3871–3894. <https://doi.org/10.1002/anie.200300605>.
- [8] (PDF) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, ResearchGate. (n.d.). [https://www.researchgate.net/publication/5288628\\_Electrospray\\_Ionisation\\_Mass\\_Spectrometry\\_Principles\\_and\\_Clinical\\_Applications](https://www.researchgate.net/publication/5288628_Electrospray_Ionisation_Mass_Spectrometry_Principles_and_Clinical_Applications) (accessed September 30, 2022).
- [9] Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition, 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470929278>.
- [10] M. Guilhaus, MASS SPECTROMETRY | Time-of-Flight, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.*, Elsevier, Oxford, 2005: pp. 412–423. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00347-2>.
- [11] L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, S. Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2–9. <https://doi.org/10.1021/ac302789c>.
- [12] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization–principles and practice, *Mass Spectrom. Rev.* 9 (1990) 37–70. <https://doi.org/10.1002/mas.1280090103>.
- [13] S. Banerjee, S. Mazumdar, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *Int. J. Anal. Chem.* 2012 (2012) e282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [14] Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry, 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd, 2015. <https://doi.org/10.1002/9783527673391>.
- [15] Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition | Wiley, Wiley.Com. (n.d.). <https://www.wiley.com/en-us/Mass+Spectrometry%3A+Principles+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780470033104> (accessed October 2, 2022).
- [16] A.M. Haag, Mass Analyzers and Mass Spectrometers, in: H. Mirzaei, M. Carrasco (Eds.), *Mod. Proteomics – Sample Prep. Anal. Pract. Appl.*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 157–169. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7).
- [17] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (fpse), US20140274660A1, 2014. <https://patents.google.com/patent/US20140274660A1/en> (accessed March 8, 2023).
- [18] M. Roldán-Pijuán, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, A. Kabir, K.G. Furton, Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1376 (2015) 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.027>.
- [19] N.P. Kalogiouri, A. Kabir, B. Olayanju, K.G. Furton, V.F. Samanidou, Development of highly hydrophobic fabric phase sorptive extraction membranes and exploring their applications for

- the rapid determination of tocopherols in edible oils analyzed by high pressure liquid chromatography-diode array detection, *J. Chromatogr. A.* 1664 (2022) 462785. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462785>.
- [20] E. Zilfidou, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou, An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with diode array detection, *J. Chromatogr. B.* 1125 (2019) 121720. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121720>.
- [21] M. Locatelli, A. Kabir, D. Innosa, T. Lopatriello, K.G. Furton, A fabric phase sorptive extraction-High performance liquid chromatography-Photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine, *J. Chromatogr. B.* 1040 (2017) 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.045>.
- [22] A. Kabir, V. Samanidou, Fabric Phase Sorptive Extraction: A Paradigm Shift Approach in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation, *Mol. Basel Switz.* 26 (2021) 865. <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>.
- [23] A. Kabir, R. Mesa, J. Jurmain, K.G. Furton, Fabric Phase Sorptive Extraction Explained, *Separations.* 4 (2017) 21. <https://doi.org/10.3390/separations4020021>.
- [24] A. Kabir, Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry, *TrAC Trends Anal. Chem.* (2013). [https://www.academia.edu/33634173/Innovations\\_in\\_sol\\_gel\\_microextraction\\_phases\\_for\\_solvent\\_free\\_sample\\_preparation\\_in\\_analytical\\_chemistry](https://www.academia.edu/33634173/Innovations_in_sol_gel_microextraction_phases_for_solvent_free_sample_preparation_in_analytical_chemistry) (accessed March 9, 2023).
- [25] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [26] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [27] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta.* 692 (2011) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [28] L. Redón, X. Subirats, M. Rosés, HILIC characterization: Estimation of phase volumes and composition for a zwitterionic column, *Anal. Chim. Acta.* 1130 (2020) 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.035>.
- [29] P. Jandera, T. Hájek, A New Definition of the Stationary Phase Volume in Mixed-Mode Chromatographic Columns in Hydrophilic Liquid Chromatography, *Molecules.* 26 (2021) 4819. <https://doi.org/10.3390/molecules26164819>.
- [30] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)96972-3).
- [31] E. Wikberg, T. Sparrman, C. Viklund, T. Jonsson, K. Irgum, A 2H nuclear magnetic resonance study of the state of water in neat silica and zwitterionic stationary phases and its influence on the chromatographic retention characteristics in hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6630–6638. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.056>.
- [32] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449–1464. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700624>.
- [33] P. Jandera, T. Hájek, Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 145–162. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701010>.
- [34] H.P. Nguyen, K.A. Schug, The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465–1480. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700630>.
- [35] Y. Guo, S. Gaiki, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5920–5938. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.052>.

- [36] G. Greco, T. Letzel, Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 684–693. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>.
- [37] B.A. Olsen, B.W. Pack, eds., *Hydrophilic interaction chromatography: a guide for practitioners*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2013.
- [38] R. Leardi, Experimental design in chemistry: A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 652 (2009) 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.015>.
- [39] S.L.C. Ferreira, V.A. Lemos, V.S. de Carvalho, E.G.P. da Silva, A.F.S. Queiroz, C.S.A. Felix, D.L.F. da Silva, G.B. Dourado, R.V. Oliveira, Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview, *Microchem. J.* 140 (2018) 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>.
- [40] D.W. Lendrem, B.C. Lendrem, D. Woods, R. Rowland-Jones, M. Burke, M. Chatfield, J.D. Isaacs, M.R. Owen, Lost in space: design of experiments and scientific exploration in a Hogarth Universe, *Drug Discov. Today.* 20 (2015) 1365–1371. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.015>.
- [41] A. Jankovic, G. Chaudhary, F. Goia, Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems, *Energy Build.* 250 (2021) 111298. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>.
- [42] G.D. Bowden, B.J. Pichler, A. Maurer, A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated <sup>18</sup>F-Fluorination Reactions of Arylstannanes, *Sci. Rep.* 9 (2019) 11370. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47846-6>.
- [43] Ž.R. Lazić, *Design of experiments in chemical engineering: a practical guide*, Wiley-VCH, Weinheim [Germany], 2010.
- [44] G.W. Oehlert, *A first course in design and analysis of experiments*, W.H. Freeman, New York, 2000.
- [45] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, Eighth edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2013.
- [46] M.N. Hart, A.G. Loeffler, T.H. Kent, *Introduction to human disease: pathophysiology for health professionals*, 5th ed, Jones & Bartlett Learning, Sudbury, MA, 2012.
- [47] A.J. Vander, J.H. Sherman, D.S. Luciano, *Human physiology: the mechanisms of body function*, 8th ed, McGraw-Hill, Boston, 2001.
- [48] L. Stryer, *Biochemistry*, 9th edition, W.H. Freeman, New York, 2019.
- [49] R.A. DeFronzo, E. Ferrannini, L. Groop, R.R. Henry, W.H. Herman, J.J. Holst, F.B. Hu, C.R. Kahn, I. Raz, G.I. Shulman, D.C. Simonson, M.A. Testa, R. Weiss, Type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 1 (2015) 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- [50] W.T. Cade, Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting, *Phys. Ther.* 88 (2008) 1322–1335. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080008>.
- [51] A.B. Olokoba, O.A. Obateru, L.B. Olokoba, Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends, *Oman Med. J.* 27 (2012) 269–273. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.68>.
- [52] HEARTS D: diagnosis and management of type 2 diabetes, (n.d.). <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-ucn-ncd-20.1> (accessed January 28, 2023).
- [53] Y. Seino, K. Nanjo, N. Tajima, T. Kadowaki, A. Kashiwagi, E. Araki, C. Ito, N. Inagaki, Y. Iwamoto, M. Kasuga, T. Hanafusa, M. Haneda, K. Ueki, Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus, *J. Diabetes Investig.* 1 (2010) 212–228. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00074.x>.
- [54] B. Lorenzati, C. Zucco, S. Miglietta, F. Lamberti, G. Bruno, Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action, *Pharmaceuticals.* 3 (2010) 3005–3020. <https://doi.org/10.3390/ph3093005>.
- [55] I.W.G. on the E. of C.R. to Humans, Exposure Data, International Agency for Research on Cancer, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK350392/> (accessed January 31, 2023).
- [56] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R.J. Flower, G. Henderson, Rang and Dale's pharmacology, Seventh edition, main edition, Elsevier, Churchill Livingstone, Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St. Louis Sydney Toronto, 2012.

- [57] B.G. Katzung, A.J. Trevor, eds., *Basic & clinical pharmacology*, 13. ed, McGraw-Hill Education, New York, 2015.
- [58] Ευαγγελία Παπαδημητρίου, ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, 1η έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Μεταμόρφωση Αττικής, n.d. <https://www.politeianet.gr/books/9789603946090-papadimitriou-euaggelia-parisianou-ae-moriaki-farmakologia-251655> (accessed January 31, 2023).
- [59] J. Waugh, G.M. Keating, G.L. Plosker, S. Easthope, D.M. Robinson, Pioglitazone, *Drugs*. 66 (2006) 85–109. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666010-00005>.
- [60] M.L. Christensen, B. Meibohm, E.V. Capparelli, P. Velasquez-Mieyer, G.A. Burghen, W.V. Tamborlane, Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics of Pioglitazone in Adolescents With Type 2 Diabetes, *J. Clin. Pharmacol.* 45 (2005) 1137–1144. <https://doi.org/10.1177/0091270005279578>.
- [61] T. Jaakkola, *Pharmacokinetic interactions of pioglitazone*, Tiina Jaakkola, Helsinki, 2007.
- [62] A.J. Scheen, Pharmacokinetic Interactions with Thiazolidinediones, *Clin. Pharmacokinet.* 46 (2007) 1–12. <https://doi.org/10.2165/00003088-200746010-00001>.
- [63] American Diabetes Association, 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2018, *Diabetes Care*. 41 (2017) S73–S85. <https://doi.org/10.2337/dc18-S008>.
- [64] repaglinide-teva-epar-public-assessment-report\_en.pdf, (n.d.). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/repaglinide-teva-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/repaglinide-teva-epar-public-assessment-report_en.pdf) (accessed February 4, 2023).
- [65] R. Guardado-Mendoza, A. Prioleta, L.M. Jiménez-Ceja, A. Sosale, F. Folli, The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitinide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Arch. Med. Sci. AMS*. 9 (2013) 936–943. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.34991>.
- [66] C.R. Culy, B. Jarvis, Repaglinide, *Drugs*. 61 (2001) 1625–1660. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00008>.
- [67] V. Hatorp, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide, *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 471–483. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241070-00002>.
- [68] V. Hatorp, W.C. Huang, P. Strange, Pharmacokinetic profiles of repaglinide in elderly subjects with type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 1475–1478. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.4.5726>.
- [69] J. Gan, W. Chen, H. Shen, L. Gao, Y. Hong, Y. Tian, W. Li, Y. Zhang, Y. Tang, H. Zhang, W.G. Humphreys, A.D. Rodrigues, Repaglinide-gemfibrozil drug interaction: inhibition of repaglinide glucuronidation as a potential additional contributing mechanism, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 70 (2010) 870–880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03772.x>.
- [70] P.N.M. van Heiningen, V. Hatorp, K. Kramer Nielsen, K.T. Hansen, J.J. van Lier, N.C. De Merbel, B. Oosterhuis, J.H.G. Jonkman, Absorption, metabolism and excretion of a single oral dose of <sup>14</sup>C-repaglinide during repaglinide multiple dosing, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55 (1999) 521–525. <https://doi.org/10.1007/s002280050667>.
- [71] prandin-epar-product-information\_el.pdf, (n.d.). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prandin-epar-product-information\\_el.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prandin-epar-product-information_el.pdf) (accessed February 9, 2023).
- [72] J.S. Grant, L.J. Graven, Progressing From Metformin to Sulfonylureas or Meglitinides, *Workplace Health Saf.* 64 (2016) 433–439. <https://doi.org/10.1177/2165079916644263>.
- [73] 077467s000lbl.pdf, (n.d.). [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/077467s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/077467s000lbl.pdf) (accessed February 4, 2023).
- [74] starlix-epar-product-information\_el.pdf, (n.d.). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/starlix-epar-product-information\\_el.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/starlix-epar-product-information_el.pdf) (accessed February 9, 2023).
- [75] S. Hu, B. Boettcher, B. Dunning, The mechanisms underlying the unique pharmacodynamics of nateglinide, *Diabetologia*. 46 (2003) M37–M43. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0935-1>.

- [76] M.L. Weaver, B.A. Orwig, L.C. Rodriguez, E.D. Graham, J.A. Chin, M.J. Shapiro, J.F. Mcleod, J.B. Mangold, PHARMACOKINETICS AND METABOLISM OF NATEGLINIDE IN HUMANS, (n.d.).
- [77] E.-C. Dobrică, M.-A. Găman, M.-A. Cozma, O.G. Bratu, A. Pantea Stoian, C.C. Diaconu, Polypharmacy in Type 2 Diabetes Mellitus: Insights from an Internal Medicine Department, *Medicina (Mex.)*. 55 (2019) 436. <https://doi.org/10.3390/medicina55080436>.
- [78] R.P. Austin, Polypharmacy as a Risk Factor in the Treatment of Type 2 Diabetes, *Diabetes Spectr.* 19 (2006) 13–16. <https://doi.org/10.2337/diaspect.19.1.13>.
- [79] K.A. H.V. Gangadharappa, AN APPROACH TO BIOANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH, *IJPSR*(2016). 7 (2016) 2291–2301.
- [80] B. Alden, C. Hudalla, K. Wyndham, T. Walter, N. Lawrence, E. Bouvier, D. Walsh, P. Iraneta, Synthesis and Applications of BEH Particles in Liquid Chromatography, *LCGC Suppl.* 30 (2012) 20–29.
- [81] N.P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5880–5891. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.037>.
- [82] W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode, *J. Chromatogr. A.* 1127 (2006) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.080>.
- [83] G. Weber, N. von Wirén, H. Hayen, Hydrophilic interaction chromatography of small metal species in plants using sulfobetaine- and phosphorylcholine-type zwitterionic stationary phases, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1615–1622. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800060>.
- [84] Y. Guo, A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity, *Biomed. Chromatogr.* 36 (2022) e5332. <https://doi.org/10.1002/bmc.5332>.
- [85] J. Mathew, P. Sankar, M. Varacallo, Physiology, Blood Plasma, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/> (accessed November 21, 2022).
- [86] A.A. Spector, Plasma lipid transport, *Clin. Physiol. Biochem.* 2 (1984) 123–134.
- [87] S. Lussier-Cacan, M. Xhignesse, A. Kessler, J. Davignon, C. Sing, Sources of Variation in Plasma Lipid and Lipoprotein Traits in a Sample Selected for Health, *Am. J. Epidemiol.* 150 (2000) 1229–37. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009950>.
- [88] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (fpse), US20140274660A1, 2014. <https://patents.google.com/patent/US20140274660A1/en> (accessed October 7, 2022).
- [89] A. Parla, E. Zormpa, N. Paloumpis, A. Kabir, K.G. Furton, Ž. Roje, V. Samanidou, I. Vinković Vrček, I. Panderi, Determination of Intact Parabens in the Human Plasma of Cancer and Non-Cancer Patients Using a Validated Fabric Phase Sorptive Extraction Reversed-Phase Liquid Chromatography Method with UV Detection, *Mol. Basel Switz.* 26 (2021) 1526. <https://doi.org/10.3390/molecules26061526>.
- [90] G. Tiris, I. Gazioglu, K.G. Furton, A. Kabir, M. Locatelli, Fabric phase sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of favipiravir in human plasma and breast milk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 223 (2023) 115131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115131>.
- [91] A. Kabir, K.G. Furton, N. Tinari, L. Grossi, D. Innosa, D. Macerola, A. Tartaglia, V. Di Donato, C. D'Ovidio, M. Locatelli, Fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography-photo diode array detection method for simultaneous monitoring of three inflammatory bowel disease treatment drugs in whole blood, plasma and urine, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1084 (2018) 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.028>.
- [92] K. Mazaraki, A. Kabir, K.G. Furton, K. Fytianos, V.F. Samanidou, C.K. Zacharis, Fast fabric phase sorptive extraction of selected  $\beta$ -blockers from human serum and urine followed by UHPLC-ESI-MS/MS analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 199 (2021) 114053. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114053>.

- [93] A. Kabir, V. Samanidou, Fabric Phase Sorptive Extraction: A Paradigm Shift Approach in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation, *Molecules*. 26 (2021) 865. <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>.
- [94] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th ed, Prentice Hall/Pearson, Harlow, 2010.
- [95] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, Eighth edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2013.
- [96] C.-L. Cheng, Shalabh, G. Garg, Coefficient of determination for multiple measurement error models, *J. Multivar. Anal.* 126 (2014) 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.jmva.2014.01.006>.
- [97] V. Watts, 13.4 Coefficient of Multiple Determination, (2022). <https://ecampusontario.pressbooks.pub/introstats/chapter/13-4-coefficient-of-multiple-determination/> (accessed November 30, 2022).
- [98] D.C. Montgomery, E.A. Peck, G.G. Vining, *Introduction to linear regression analysis*, 5th ed, Wiley, Hoboken, NJ, 2012.
- [99] Stat-Ease » v11 » General Sequence of Analysis » ANOVA Output, (n.d.). <https://www.statease.com/docs/v11/contents/analysis/anova-output/> (accessed December 3, 2022).
- [100] Χ.Χ. Δαμιανός, Χ.Α. Χαραλαμπίδης, *Εισαγωγή στις Πιθανότητες και την Στατιστική, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 2010.*
- [101] S. Weisberg, *Applied linear regression*, 3rd ed, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2005.
- [102] P.W. Atkins, J. De Paula, *Physical chemistry*, 9th ed, W.H. Freeman, New York, 2010.
- [103] L. Meng, Y. Dai, C. Chen, J. Zhang, Determination of amphetamines, ketamine and their metabolites in hair with high-speed grinding and solid-phase microextraction followed by LC-MS, *Forensic Sci. Res.* 6 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1838403>.
- [104] B. Dejaegher, Y. Heyden, Response surface designs (part 2) - Data analysis and multiresponse optimization, *LC GC Eur.* 22 (2009).
- [105] *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, 2nd ed, Eurachem, Teddington, 2014.
- [106] ICH\_Q2-R2\_Document\_Step2\_Guideline\_2022\_0324.pdf, (n.d.). [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2-R2\\_Document\\_Step2\\_Guideline\\_2022\\_0324.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf) (accessed February 21, 2023).
- [107] H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509. <https://doi.org/10.1002/mas.20298>.
- [108] L. Silvestro, I. Tarcomnicu, S. Rizea, Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods — Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects, in: A.V. Coelho (Ed.), *Tandem Mass Spectrom. - Mol. Character., InTech*, 2013. <https://doi.org/10.5772/55982>.
- [109] S. Karampela, J. Smith, I. Panderi, Determination of 19 Psychoactive Substances in Premortem and Postmortem Whole Blood Samples Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Separations*. 8 (2021) 78. <https://doi.org/10.3390/separations8060078>.