



Σχολή Θετικών Επιστημών
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία
«Τεχνικές Ανάλυσης Χημειοθεραπευτικών Φαρμάκων»

Μαριάνθη Τάνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαλβίνα Όρκουλα

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Τάνη Μαριάνθη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



«Τεχνικές Ανάλυσης Χημειοθεραπευτικών Φαρμάκων»

Μαριάνθη Τάνη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μαλβίνα Όρκουλα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα
Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Χρήστος Κοντογιάννης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής
Πανεπιστημίου Πατρών

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

*Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια μου, κα Μαλβίνα Όρκουλα, για τη βοήθεια και τις
πολύτιμες συμβουλές της κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.*

*Αφιερώνω αυτή μου την προσπάθεια στον άντρα μου, Κώστα, για την στήριξη, την
ενθάρρυνση και την υπομονή του σε όλο το ταξίδι του μεταπτυχιακού προγράμματος.*

Περίληψη

Ο σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνήσει και να αναλύσει τις διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι κύριοι στόχοι περιλαμβάνουν την κατανόηση των αρχών που διέπουν κάθε τεχνική, την παρουσίαση πραγματικών παραδειγμάτων εφαρμογής και την σύγκριση αυτών.

Η αύξηση του αριθμού των ασθενών που λαμβάνουν χημειοθεραπεία τις τελευταίες δεκαετίες έχει οδηγήσει σε αυξημένη ανάγκη για ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση, την παρακολούθηση και την ανάλυση των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις θεραπείες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η χημειοθεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση κυτταροτοξικών ουσιών που μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, τόσο για τους ασθενείς όσο και για επαγγελματίες υγείας.

Η ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων είναι ζωτικής σημασίας για την ασφαλή και αποτελεσματική χορήγηση της χημειοθεραπείας. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να περιλαμβάνουν τεχνικές ανάλυσης όπως η υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η φασματομετρία μάζας, μεταξύ άλλων. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ανίχνευση, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την αξιολόγηση των κυτταροτοξικών φαρμάκων σε διάφορα δείγματα, όπως αίμα, ούρα, ιστούς κ.λπ.

Στην παρούσα εργασία, γίνεται αναφορά αρχικά στον ορισμό του καρκίνου (Κεφάλαιο 1ο), έπειτα στα διάφορα είδη θεραπείας του (Κεφάλαιο 2ο), στις τεχνικές ανάλυσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (Κεφάλαιο 3ο), σε επιστημονικές αναφορές σχετικές με την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυτταροτοξικών ουσιών σε διάφορες μήτρες (Κεφάλαιο 4ο), και τέλος γίνεται σύγκριση των αναλυτικών τεχνικών που αναφέρθηκαν (Κεφάλαιο 5ο).

Λέξεις – Κλειδιά

Καρκίνος, Αντικαρκινικά Φάρμακα, Χημειοθεραπευτικά Φάρμακα, HPLC, GC, CE, MS, UV

«Analytical Techniques for Chemotherapeutic Drugs»

Marianthi Tani

Abstract

The purpose of this thesis is to investigate and analyze the various techniques used for the analysis of anticancer drugs. The main objectives include understanding the principles underlying each technique, presenting real-world examples of applications, and comparing these methods.

The increase in the number of patients undergoing chemotherapy over the past decades has led to a growing need for the development of reliable analytical methods for the detection, monitoring, and analysis of the drugs used in these treatments. This is due to the fact that chemotherapy involves the use of cytotoxic substances, which may have adverse effects on the human body, both for patients and healthcare professionals.

The development of reliable analytical methods is essential for the safe and effective administration of chemotherapy. These methods can include analytical techniques such as liquid chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis, mass spectrometry, among others. These techniques enable the detection, quantification, and evaluation of cytotoxic drugs in various samples, such as blood, urine, tissues, etc.

This thesis begins with an introduction to the definition of cancer (Chapter 1), followed by a discussion of the various types of cancer treatments (Chapter 2), the techniques for analyzing chemotherapeutic drugs (Chapter 3), scientific studies related to the detection and quantification of cytotoxic substances in various matrices (Chapter 4), and concludes with a comparison of the analytical techniques discussed (Chapter 5).

Keywords

Cancer, Anticancer Drugs, Chemotherapeutic Drugs, HPLC, GC, CE, MS, UV

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων	x
Κατάλογος Πινάκων	xiii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiv
1. Εισαγωγή στον καρκίνο	1
1.1 Ορισμός καρκίνου και γενικά στοιχεία	1
1.2 Μορφές καρκίνου και παράγοντες εμφάνισης	1
1.3 Συμπτώματα και διάγνωση του καρκίνου	2
2. Θεραπεία του καρκίνου.....	4
2.1 Χειρουργική επέμβαση	4
2.2 Ακτινοθεραπεία.....	4
2.3 Ανοσοθεραπεία	5
2.4 Ορμονοθεραπεία	7
2.5 Χημειοθεραπεία	9
2.5.1 Αλκυλιωτικοί Παράγοντες	9
2.5.2 Αντιμεταβολίτες	11
2.5.3 Ανθρακυκλίνες	12
2.5.4 Φυσικά Αλκαλοειδή και Ταξάνες	13
2.5.5 Αναστολείς Τοποϊσομερασών	14
2.5.6 Διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα	15
2.5.7 Μειονεκτήματα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων	15
2.6 Στοχευμένη Φαρμακευτική Θεραπεία	17

3. Τεχνικές Ανάλυσης	19
3.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC	19
3.1.1 Εισαγωγή στην HPLC	19
3.1.2 Αρχή λειτουργίας της HPLC.....	19
3.1.3 Οργανολογία της HPLC.....	20
3.1.4 Προετοιμασία δείγματος	20
3.1.5 Ταξινόμηση της HPLC	20
3.2 Αέρια Χρωματογραφία GC.....	21
3.2.1 Εισαγωγή στην GC.....	21
3.2.2 Αρχή λειτουργίας της GC.....	21
3.2.3 Οργανολογία της GC.....	22
3.2.4 Προετοιμασία δείγματος	23
3.3 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση CE	23
3.3.1 Εισαγωγή στην CE	23
3.3.2 Αρχή λειτουργίας της CE	23
3.3.3 Οργανολογία της CE.....	24
3.3.4 Προετοιμασία δείγματος	24
3.3.5 Σύγκριση με άλλες τεχνικές	25
4. Τεχνικές Ανάλυσης των διάφορων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων	26
4.1 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων γενικά	26
4.1.1 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα φαρμακευτικά σκευάσματα.....	26
4.1.2 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα βιολογικά δείγματα	27
4.1.3 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα περιβαλλοντικά δείγματα...	28
4.2 Επισκόπηση αναλυτικών μεθόδων για συγκεκριμένα κυτταροτοξικά φάρμακα.....	29

4.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	29
4.2.2 Αέρια χρωματογραφία (GC)	49
4.2.3 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE)	59
5. Συμπεράσματα	76
5.1 Σύγκριση αναλυτικών τεχνικών	76
Βιβλιογραφία	82

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1-1 Παράγοντες που προκαλούν ορισμένους τύπους καρκίνου.....	2
Εικόνα 1-2 Παραδείγματα βιοδεικτών ως μέσο διάγνωσης του καρκίνου.....	3
Εικόνα 2-1 Ανοσοθεραπεία του καρκίνου.....	5
Εικόνα 2-2 Κατηγορίες των νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ανοσοθεραπεία, οι συχνά χρησιμοποιούμενοι παράγοντες και οι κύριες τοξικότητες που προκαλούν.....	7
Εικόνα 2-3 Ορμονικές θεραπείες κατά του καρκίνου του μαστού.....	8
Εικόνα 2-4 Ορμονικές θεραπείες κατά του καρκίνου του προστάτη.....	8
Εικόνα 2-5 Αλκυλιωτικοί Παράγοντες: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	10
Εικόνα 2-6 Αντιμεταβολίτες: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	12
Εικόνα 2-7 Ανθρακυκλίνες: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	13
Εικόνα 2-8 Ταξάνες: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	13
Εικόνα 2-9 Φυσικά Αλκαλοειδή: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	14
Εικόνα 2-10 Αναστολείς Τοποϊσομερασών: Κλινική δράση και τοξικότητες.....	14
Εικόνα 2-11 Διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.....	15
Εικόνα 2-12 Φάρμακα που προκαλούν αιματολογικές παρενέργειες.....	16
Εικόνα 2-13 Φάρμακα που προκαλούν γαστρεντερικές παρενέργειες.....	16
Εικόνα 2-14 Μονοκλωνικά αντισώματα για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου.....	17
Εικόνα 2-15 Αναστολείς μικρών μορίων για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων.....	18
Εικόνα 3-1 Οργανολογία της HPLC.....	20
Εικόνα 3-2 Σύνοψη HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης.....	21
Εικόνα 3-3 Οργανολογία της GC.....	22
Εικόνα 3-4 Οργανολογία της CE.....	24
Εικόνα 4-1 Βιοανάλυση με χρήση μάζας υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής μάζας.....	29

Εικόνα 4-2 Χημική δομή της 5-φθοροουρακίλης (5-FU).....	32
Εικόνα 4-3 Χημική δομή της μεθοτρεξάτης.....	33
Εικόνα 4-4 Χημική δομή της γεμισιταβίνης.....	34
Εικόνα 4-5 Χημική δομή της μελφαλάνης.....	35
Εικόνα 4-6 Χημική δομή της βουσουλφάνης.....	35
Εικόνα 4-7 Χημική δομή της σισπλατίνης.....	36
Εικόνα 4-8 Χημική δομή της δοξορουβικίνης.....	37
Εικόνα 4-9 Χημική δομή της δαουνορουβικίνης.....	38
Εικόνα 4-10 Χημική δομή της βινβλαστίνης.....	39
Εικόνα 4-11 Χημική δομή της ετοποσίδης.....	40
Εικόνα 4-12 Χημική δομή της χλωρομπουκίλης.....	41
Εικόνα 4-13 Χημική δομή της πεμετρεξέδης (Α) και του L-γλουταμινικού οξέος (Β).....	42
Εικόνα 4-14 Χημική δομή της 5-Αζακυτιδίνης.....	43
Εικόνα 4-15 Χημική δομή της πακλιταξέλης.....	44
Εικόνα 4-16 Χημική Δομή της καρβοπλατίνης.....	45
Εικόνα 4-17 Χημική Δομή της βινκριστίνης.....	47
Εικόνα 4-18 Στάδια ανάλυσης αντικαρκινικών φαρμάκων.....	49
Εικόνα 4-19 Χημική δομή του υδροξυκαρβαμιδίου.....	51
Εικόνα 4-20 Χημική δομή της κυκλοφωσφαμίδης.....	52
Εικόνα 4-21 Χημική δομή του ιφωσφαμιδίου.....	53
Εικόνα 4-22 Χημική δομή της φωσφορικής εστραμυστίνης.....	54
Εικόνα 4-23 Χημική δομή της εστραμυστίνης & της εστρομυστίνης.....	55
Εικόνα 4-24 Χημική δομή της οιστραδιόλης & της οιστρόνης.....	55
Εικόνα 4-25 Χημική δομή του θειοτέπα.....	56
Εικόνα 4-26 Χημική δομή της προκαρβαζίνης.....	57

Εικόνα 4-27 Χημική δομή της 6-μερκαπτοπουρίνης.....	58
Εικόνα 4-28 Χημική Δομή της τεμοζολομίδης.....	60
Εικόνα 4-29 Χημική Δομή της ιδαρουβικίνης.....	61
Εικόνα 4-30 Χημική Δομή της αζαθειοπρίνης.....	62
Εικόνα 4-31 Χημική Δομή της θειογουανίνης.....	63
Εικόνα 4-32 Χημική Δομή της κυταραβίνης.....	65
Εικόνα 4-33 Χημική Δομή της μιτοξαντρόνης.....	66
Εικόνα 4-34 Χημική Δομή της ιματινίμπης.....	67
Εικόνα 4-35 Χημική Δομή της οξαλιπλατίνης και των εναντιομερών της.....	68
Εικόνα 4-36 Χημική Δομή της S-ραλιτιρεξέδης.....	69
Εικόνα 4-37 Χημική Δομή της επιρουβικίνης.....	70
Εικόνα 4-38 Χημική Δομή ιρινοτεκάνης.....	72
Εικόνα 4-39 Χημική Δομή βινορελβίνης.....	73

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Εύρη της γραμμικότητας, τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυταραβίνης, γεμισιταβίνης, μεθοτρεξάτης, φωσφορική ετοποσίδης, κυκλοφωσφαμίδης, ιφοσφαμίδης, ιρινοτεκάνης, δοξορουβικίνης, επιρουβικίνης και βινκριστίνης.....	48
Πίνακας 2 Συγκεντρωτικός πίνακας συνδυασμένων τεχνικών που περιλαμβάνει τα επίπεδα συγκέντρωσης, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	78
Πίνακας 3 Συγκεντρωτικός πίνακας συνδυασμένων τεχνικών ανάλογα με την κατηγορία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.....	80

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
GC	Αέρια Χρωματογραφία
CE	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση
CT	Υπολογιστική Τομογραφία
IHC	Ανοσοϊστοχημεία
PCR	Polymerase Chain Reaction
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
MS	Φασματομετρία μαζών
UV	Φασματομετρία Υπεριώδους
FIA	Ανάλυση Έγχυσης Ροής
DAD	Ανίχνευση συστοιχίας διόδων
PK	Φαρμακοκινητικές Μελέτες
PD	Φαρμακοδυναμικές Μελέτες
TDM	Παρακολούθηση Θεραπείας Φαρμάκων
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
FTIR	Φασματοσκοπία υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier
ICP-MS	Επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία πλάσματος-μάζας
LC-MS/MS	Υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας
5AC	5-Αζακυτιδίνη
MDS	Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
ESI	Διεπαφή ηλεκτρονικού ψεκασμού
SRM	Λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων
PPT	Καθίζηση πρωτεϊνών

LLE	Εκχύλιση Υγρού-Υγρού
SPE	Εκχύλιση Στερεής Φάσης
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
LOD	Όριο ανίχνευσης
ELSD	Ανιχνευτής Εξατμιζόμενης Σκέδασης Φωτός
SIM	Παρακολούθηση Επιλεγμένων Ιόντων
EaM	Εστραμυστίνη
EoM	Εστρομυστίνη
NPD	Ανιχνευτής φωσφόρου-αζώτου
FID	Ανιχνευτής Ιονισμού με Φλόγα
ECD	Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων
HPRT	Υποξανθίνη-φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση
TPMT	Μεθυλοτρανσφεράσης θειοπουρίνης
XO	Οξειδάση ξανθίνης
LSE	Εκχύλιση υγρού-στερεού
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
CML	Μυελογενή λευχαιμία
GIST	Γαστρεντερικοί στοματικοί όγκοι
SDS	Sodium dodecyl sulfate
CM-β-CD	Carboxymethyl-beta-cyclodextrin
6-MP	6-Μερκαπτοπουρίνη
BGE	Ηλεκτρολύτης
EOF	Ροή ηλεκτρο-ώσμωσης

1.Εισαγωγή στον καρκίνο

1.1 Ορισμός καρκίνου και γενικά στοιχεία

Όλο ένα και περισσότεροι άνθρωποι σήμερα διαγιγνώσκονται με κάποια μορφή καρκίνου, ενώ παγκοσμίως αποτελεί συχνή αιτία θανάτου. Μάλιστα, έρευνες δείχνουν πως το 20% του ανδρικού και το 16,66% του γυναικείου πληθυσμού είναι ευάλωτοι στην ανάπτυξη καρκίνου κάποια στιγμή στη ζωή τους, και περίπου 12% και 9% αντίστοιχα οδηγούνται στον θάνατο εξαιτίας της νόσου [Meegan et al., 2019]. Ως καρκίνος ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα αναπτύσσονται μη φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, ένα φυσιολογικό κύτταρο μετασχηματίζεται σε καρκινικό λόγω βλαβών στο DNA του. Η νόσος αυτή μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο ή δομή του ανθρώπινου σώματος, όπου τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται και αναπτύσσονται ακατάστατα, επειδή τα ανοσοκύτταρα του οργανισμού αδυνατούν να εντοπίσουν και να εξολοθρεύσουν τα καρκινικά κύτταρα που μόλις έχουν σχηματιστεί και είναι ολιγάριθμα, δημιουργώντας έτσι έναν όγκο ή μάζα που αποτελεί τον καρκίνο (Roy et al., 2016).

1.2 Μορφές καρκίνου και παράγοντες εμφάνισης

Οι πιο συνηθισμένες μορφές καρκίνου σε όλο το κόσμο βάσει του οργάνου που προσβάλλεται είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του στομάχου, οι οποίες συχνά οδηγούν σε θάνατο (Ames et al., 1995). Απ' την άλλη, οι πιο συνηθισμένοι τύποι καρκίνου βάσει του ιστού που προσβάλλεται είναι τα καρκινώματα (εσωτερικά και εξωτερικά όργανα του σώματος προσβάλλονται από καρκινικά κύτταρα), τα σαρκώματα (αναπτύσσονται από τα φυσιολογικά κύτταρα των οστών, των χόνδρων, του λίπους, του συνδετικού ιστού, των μυών που έχουν μετατραπεί σε καρκινικά κύτταρα), τα λεμφώματα (η έναρξή τους γίνεται στους λεμφαδένες και στους ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος), η λευχαιμία (η έναρξη γίνεται από τον μυελό των οστών και συχνά ακολουθεί συσσώρευση στην κυκλοφορία του αίματος) και τα αδενώματα (παρατηρούνται στο θυρεοειδή αδένα, την υπόφυση, τον επινεφριδιακό αδένα και άλλους αδενώδεις ιστούς) (Mathur et al., 2015).

Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση του καρκίνου είναι οξειδωτικοί παράγοντες του φυσιολογικού μεταβολισμού που μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και καταστροφές της δομής του DNA, διατροφή φτωχή σε φρούτα και

λαχανικά αλλά πλούσια σε ζωικά λίπη και κόκκινο κρέας, το κάπνισμα, ορμονολογικοί παράγοντες, χρόνιες λοιμώξεις και φλεγμονές, ακτινοβολία και κληρονομικοί παράγοντες (Ames et al., 1995).

Table 3: Some of the Factors Causing Cancer

Name of cancer	Causes
1. Brain Cancer	Ionizing radiation [Strong], Chromium [Good], methylene chloride [Good]
2. Melanoma	UV radiation [Strong]
3. Thyroid Cancer	Ionizing radiation [Strong], ethylene thiourea (ETU) [Good]
4. Bone Cancer	radium [Strong], Pesticides [Good]
5. Colo-rectal Cancer	1,1-dichloroethane [Good], alachlor [Good], Aromatic amines [Good], Chlorination by-products [Good], Ionizing radiation [Good], Solvents [Good]
6. Prostate Cancer	Agent Orange [Good], Aromatic amines [Good], methyl bromide [Good], Organ chlorine pesticides [Good], PAHs [Good], Pesticides [Good], Solvents [Good]
7. Leukemia's	benzene [Strong], Ionizing radiation [Strong], Agent Orange [Good], carbon tetrachloride [Good], Chlorinated solvents [Good], Metal dusts [Good], Pesticides [Good], Secondhand smoke [Good], trichloroethylene (TCE) [Good]
8. Liver Cancer	aflatoxin B1 (Aflatoxins) [Strong] androgens [Strong], ethyl alcohol (ethanol) [Strong], Hydrocarbons [Strong], N-nitrosodimethylamine [Strong], arsenic [Good], captafol [Good], PCBs [Good], thorium dioxide (Thorostat) [Good], trichloroethylene (TCE) [Good], vinyl chloride [Good]

Εικόνα 1-1: Παράγοντες που προκαλούν ορισμένους τύπους καρκίνου (Mathur et al., 2015)

1.3 Συμπτώματα και διάγνωση του καρκίνου

Τα συμπτώματα που εμφανίζονται σε κάποιον ασθενή που νοσεί με καρκίνο ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο και το όργανο που προσβάλλει. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του πνεύμονα παρατηρούνται συμπτώματα όπως βήχας, δύσπνοια ή πόνος στο στήθος. Ορισμένες φορές, μάλιστα, οι ασθενείς δεν εμφανίζουν κανένα σύμπτωμα, μέχρις ότου η ασθένεια να έχει προχωρήσει αρκετά. Ωστόσο, τα πιο συχνά συμπτώματα που παρατηρούνται στους περισσότερους τύπους καρκίνου περιλαμβάνουν κόπωση, πυρετό, απώλεια όρεξης ή βάρους, ανεξήγητη αιμορραγία ή έκκριση, πόνος (Mathur et al., 2015).

Όσον αφορά την διάγνωση του καρκίνου, αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους και ένας από αυτούς είναι μέσω μοριακών τεχνικών. Τέτοιες τεχνικές είναι οι παρακάτω:

- Κυτταρογενετική
- FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
- PCR (Polymerase Chain Reaction)
- Ανάλυση DNA Microarray
- Ανοσοϊστοχημεία (IHC)
- Κυτταρομετρία Ροής
- Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (Emole, 2012)

Επιπλέον, συχνά χρησιμοποιούνται μέθοδοι Δειγματοληψίας για Παθολογική Εξέταση, όπως είναι η βιοψία, η αναρρόφηση με βελόνα και η κυτταρολογία (Emole, 2012), αλλά και απεικονιστικά τεστ που περιλαμβάνουν την μαστογραφία και την Υπολογιστική Τομογραφία (CT) (Mathur et al., 2015).

Άλλος ένας τρόπος διάγνωσης είναι μέσω των βιοδεικτών. Πρόκειται για πρωτεΐνες που απελευθερώνουν τα καρκινικά κύτταρα και η ανίχνευση ή η αύξησή τους στον ορό του αίματος ή στα ούρα χρησιμοποιείται για την έγκαιρη ανίχνευση, την πρόβλεψη της έκβασης και την ανίχνευση της υποτροπής της νόσου. Μερικά παραδείγματα βιοδεικτών με ευρεία κλινική χρήση φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Emole, 2012):

Biomarker	Type	Source	Cancer type	Clinical use
α-FP	glycoprotein	serum	nonseminomatous testicular	staging
HCG-β	glycoprotein	serum	testicular	staging
CA19-9	carbohydrate	serum	pancreatic	monitoring
CA125	glycoprotein	serum	ovarian	monitoring
CEA	protein	serum	colon	monitoring
Thyroglobulin	protein	serum	thyroid	monitoring
PSA	protein	serum	prostate	screening and monitoring

Εικόνα 1-2 (Emole, 2012)

2.Θεραπεία του καρκίνου

Καθώς η νόσος αυτή είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και διαφέρει ανάλογα με τον τύπο αλλά και την κατάσταση της υγείας του ασθενή, είναι αναμενόμενο και η θεραπευτική προσέγγιση να ποικίλλει για κάθε περίπτωση και να εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου, την έκταση της νόσου και την γενική κατάσταση του ατόμου. Η κάθε είδους θεραπεία, ωστόσο, στοχεύει στην εξάλειψη όλων των καρκινικών κυττάρων αλλά συγχρόνως την μη καταστροφή των υγιών ιστών. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω της αναστολής των σημάτων που απαιτούνται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό άμεσα ή έμμεσα στα καρκινικά κύτταρα, ή μέσω της ανοσοθεραπείας που οδηγεί το ανοσολογικό σύστημα του ασθενούς να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα (Chorawala et al., 2012).

Οι κύριοι τύποι θεραπείας περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία και φάρμακα, και είναι δυνατόν να εφαρμοστούν ξεχωριστά ή να συνδυαστούν είτε συγχρόνως είτε κατά σειρά (Chorawala et al., 2012).

2.1 Χειρουργική επέμβαση

Η αφαίρεση του όγκου του καρκίνου μέσω χειρουργείου αποτελεί συχνά την πρώτη επιλογή για την θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου, και σε περιπτώσεις όπου η νόσος βρίσκεται σε αρχικό στάδιο μπορεί να αποτελέσει μια θεραπευτική οδό, χωρίς να απαιτεί συνδυασμό άλλων τύπων θεραπείας (Chorawala et al., 2012).

2.2 Ακτινοθεραπεία

Όσον αφορά την ακτινοθεραπεία, αυτή αποτελεί μια από τις βασικές θεραπευτικές επιλογές για τον καρκίνο, καθώς σε περίπου 50% των ασθενών χορηγείται κάποιο είδος ακτινοθεραπείας αποκλειστικά, παράλληλα ή μετά από άλλου είδους θεραπεία. Πρόκειται ουσιαστικά για ακτινοβολία υψηλής ενέργειας, όπως είναι οι ακτίνες X, οι ακτίνες γ, η οποία οδηγεί σε συρρίκνωση των όγκων και εξολόθρευση των καρκινικών κυττάρων. Η ακτινοβολία αυτή οδηγεί είτε σε άμεση είτε σε έμμεση βλάβη του DNA με τη δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσα στα κύτταρα. Διακρίνεται σε ακτινοθεραπεία εξωτερικής δέσμης, όταν η ακτινοβολία μεταδίδεται από συσκευή έξω από το σώμα, και σε ακτινοθεραπεία

εσωτερικής δέσμης, όταν η ακτινοβολία μεταδίδεται από ραδιενεργό υλικό, το οποίο είναι τοποθετημένο εντός του σώματος σε κοντινή απόσταση από τα καρκινικά κύτταρα. Τέτοιο υλικό είναι για παράδειγμα το ραδιενεργό ιώδιο, το οποίο κυκλοφορεί στο αίμα καταστρέφοντας τα καρκινικά κύτταρα (Freres et al., 2017).

2.3 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία βασίζεται στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς για την καταπολέμηση του καρκίνου. Σε αυτό τον τύπο θεραπείας, υπερεκφράζονται διάφορα αντιγόνα, τα οποία είναι σχετικά με τον καρκίνο. Αυτά τα αντιγόνα είναι μοναδικά και εντοπίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Λειτουργούν, μάλιστα, ως μοριακά σήματα που στοχεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα να εντοπίσει και να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στην καταστροφή ή την αναστολή της ανάπτυξής τους (Espinosa et al., 2009).

Antibody based
• Unconjugated antibodies
• Conjugated antibodies
• Immunogens
Cytokines
• Interferon alpha, beta, gamma
• Interleukin-2, interleukin-15, interleukin-12, interleukin-21
• GM-CSF
Vaccines
• Peptide vaccines
• Dendritic cells-based vaccines
• Cellular vaccines
• DNA vaccines
• Heat shock protein vaccines
Adoptive T-cell transfer
NK cell based
Regulatory cells
• Antibodies against IL-2 receptor
• Antibodies against CTLA4
• IL-2 conjugated with toxin
Toll-like receptors agonists

Εικόνα 2-1: Ανοσοθεραπεία του καρκίνου (Espinosa et al., 2009)

Τα εργαλεία της ανοσοθεραπείας περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα, κυτοκίνες, εμβόλια, επεξεργασία/ενίσχυση T, NK ή δενδριτικών κυττάρων, τα οποία ενεργοποιούν το

ανοσοποιητικό σύστημα για την καταπολέμηση του καρκίνου. Ευρέως χρησιμοποιούνται η ιντερφερόνη άλφα και η ιντερλευκίνη-2 που ανήκουν στην κατηγορία των κυτοκινών (Espinosa et al., 2009) και τα αντι-CTLA4 και αντι-PD που είναι αναστολείς σημείων ελέγχου (Kennedy et al., 2020).

Παρακάτω απεικονίζονται οι διαφορετικές κατηγορίες των νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ανοσοθεραπεία, οι συχνά χρησιμοποιούμενοι παράγοντες και οι κύριες τοξικότητες που προκαλούν (Kroschinsky et al., 2017):

Agent	Target	Indications	Toxicities
Monoclonal antibodies			
Rituximab Ofatumumab Obinutuzumab	CD20	B-cell lymphomas and leukemias	CRS Immunodeficiency
Trastuzumab	HER2neu	Breast cancer	Cardiac disease
Cetuximab	EGFR	Colorectal cancer	Diarrhea Exanthema
Bevacizumab	VEGF	Colorectal cancer Breast cancer Renal cell cancer NSCLC	Hypertension GI bleeding or perforation Thromboembolism
Ramucirumab	VEGFR	Gastric cancer	
Tyrosine kinase inhibitors			
Imatinib Dasatinib	BCR-ABL	CML ALL	Pleural/pericardial effusions Pulmonary hypertension
Ponatinib			Thromboembolism
Erlotinib	EGFR	NSCLC Pancreatic cancer	Exanthema, diarrhea GI bleeding or perforation
Idelalisib	PI3K	B-cell lymphoma	Pneumonitis Colitis, hepatitis
Trametinib	MEK	Melanoma	Diarrhea, edema Decrease of LVEF
Aflibercept Axitinib	VEGF VEGFR	Colorectal cancer Renal cell cancer	Hypertension GI bleeding or perforation Thromboembolism PRES
Sorafenib Sunitinib Pazopanib	Multiple kinases	Renal cell cancer GIST Soft tissue sarcoma	Decrease of LVEF Hypertension
Bispecific antibodies (BAB)			
Blinatumomab	CD3/CD19	ALL B-cell lymphomas	CRS Neurotoxicity (e.g., convulsions) Liver toxicity (transaminitis)

Checkpoint inhibitors			
Ipilimumab	CTLA-4	Melanoma	IRAEs: Diarrhea, colitis Hypophysitis Immunhepatitis Polyarthritis
Nivolumab Pembrolizumab	PD-1	Melanoma NSCLC RCC Hodgkin's lymphoma	
Cellular treatments			
CAR T cells	CD19	ALL B-cell lymphomas	CRS Neurotoxicity (e.g., convulsions, encephalopathy, or ischemia)

Εικόνα 2-2 (Kroschinsky et al., 2017)

2.4 Ορμονοθεραπεία

Η ορμονοθεραπεία αποτελεί ακόμη έναν τύπο θεραπείας κατά του καρκίνου, και ειδικά κατά του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες και του προστάτη στους άνδρες. Το πλεονέκτημά της είναι ότι έχει υψηλή αποτελεσματικότητα, ενώ παρουσιάζει μικρή τοξικότητα προς τον οργανισμό. Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση των επιπέδων ορμονών, όπως της οιστραδιόλης και της τεστοστερόνης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με την ανάπτυξη των παραπάνω τύπων καρκίνου. Για την καταστολή, λοιπόν, της παραγωγής των ορμονών αυτών, πραγματοποιείται ευνουχισμός στις γυναίκες ασθενείς (συγκεκριμένα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες η παραγωγή της οιστραδιόλης γίνεται στις ωοθήκες) και στους άνδρες ασθενείς, αντίστοιχα. Σε γυναίκες μεταεμμηνοπαυσιακές, γίνεται χρήση εκλεκτικών ρυθμιστών υποδοχέων οιστρογόνων, όπως για παράδειγμα το φάρμακο ταμοξιφαίνη, ή χρήση αναστολέων αρωματάσης. Αυτού του είδους θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε πριν από χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία με στόχο την μείωση του όγκου, ή μετά από τις προαναφερθέντες θεραπείες με σκοπό την μείωση του κινδύνου υποτροπής. Παρόλο που αρχικά οι ασθενείς ανταποκρίνονται στη θεραπεία και ανακουφίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, οι περισσότεροι τελικά υποτροπιάζουν (Abraham et al., 2011).

Hormonal therapies in routine clinical practice for breast cancer

Drug	Type	Dose/route	Mode of action
Tamoxifen	Anti-oestrogen	20 mg daily orally	Competes with oestradiol for ER binding
Anastrozole	Non-steroidal aromatase inhibitor	1 mg daily orally	Competitive aromatase inhibition
Letrozole	Non-steroidal aromatase inhibitor	2.5 mg daily orally	Competitive aromatase inhibition
Exemestane	Steroidal aromatase inhibitor	25 mg daily orally	Irreversible aromatase inhibition
Fulvestrant	Oestrogen receptor antagonist	250 mg monthly IM	Down-regulation of the ER protein
Megestrol acetate	Progestin	80–160 mg daily orally	Cellular action not fully understood Down-regulation of ovarian steroidogenesis. Now rarely used
Aminoglutethimide	First-generation aromatase inhibitor	250 mg twice daily orally	Inhibits the aromatase enzyme, but requires co-administration with hydrocortisone (to prevent adrenal insufficiency) and has a high side effect profile including rash, dizziness, and nausea. Now rarely used

ER, oestrogen receptor; IM, intramuscular.

Εικόνα 2-3: Ορμονικές θεραπείες κατά του καρκίνου του μαστού (Abraham et al., 2011).

Hormonal therapies in routine clinical practice for prostate cancer

Drug	Type	Dose/route	Mode of action
Goserelin	LHRH agonist	3.6 mg every 28 days or 10.8 mg every 3 months SC	Reduced pituitary production of LH and FSH
Leuprorelin	LHRH agonist	3.75 mg every 28 days or 11.25 mg every 3 months SC or IM	Reduced pituitary production of LH and FSH
Triptorelin	LHRH agonist	3 mg every 28 days or 11.25mg every 3 months or 22.5 mg every 6 months IM	Reduced pituitary production of LH and FSH
Degarelix	LHRH antagonist	120 mg x 2 starting dose then 80 mg maintenance every month SC	Immediately reduced pituitary production of LH and FSH
Bicalutamide	Non-steroidal anti-androgen	50 mg (combination dose) or 150 mg (single agent) daily orally	Competitive AR inhibition
Flutamide	Non-steroidal anti-androgen	250 mg three times daily orally	Competitive AR inhibition
Cyproterone acetate	Steroidal anti-androgen	100 mg three times daily orally	Reduced pituitary production of LH and FSH
Diethylstilboestrol	Oestrogen	1–5 mg daily orally	Reduced pituitary production of LH and FSH
Prednisolone	Corticosteroid	5–10 mg daily orally	Adrenal suppression
Dexamethasone	Corticosteroid	0.5–2 mg daily orally	Adrenal suppression
Abiraterone acetate	CYP17 inhibitor	1 g daily orally with prednisolone 5 mg 12-hrly	Reduced prostatic production of androgens

LHRH, luteinizing hormone-releasing hormone; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone; AR, androgen receptor; SC, subcutaneous; IM, intramuscular.

Εικόνα 2-4 Ορμονικές θεραπείες κατά του καρκίνου του προστάτη (Abraham et al., 2011).

2.5 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία έχει τρεις κύριες κλινικές χρήσεις, μπορεί δηλαδή να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη γραμμής θεραπεία σε περιπτώσεις όπου δεν είναι αποτελεσματικές εναλλακτικές θεραπευτικές λύσεις ή η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, με στόχο την ελαχιστοποίηση του μεγέθους του όγκου του καρκίνου ή τον έλεγχο της εξάπλωσής του, ως νεοεπικουρική θεραπεία σε περιπτώσεις όπου η εφαρμογή άλλων θεραπειών δεν οδηγεί σε αντιμετώπιση της νόσου, με στόχο την εξασφάλιση του ελέγχου ή της μείωσης του όγκου πρωτού ο ασθενής υποβληθεί σε μια πιθανή χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία, και ως επικουρική θεραπεία συνδυαστικά με άλλες θεραπείες (πριν, μετά ή κατά τη διάρκεια αυτών), με στόχο την βελτίωση των αποτελεσμάτων αυτών των θεραπειών (Katzung, 2018).

Η λειτουργία των περισσότερων διαθέσιμων χημειοθεραπευτικών παραγόντων βασίζεται στη παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης ή σύνθεσης του DNA, οδηγώντας στην απόπτωση των διαιρούμενων κυττάρων. Η ταξινόμηση αυτών των ενώσεων γίνεται με βάση την ειδικότητα ή μη, ως προς τον κυτταρικό κύκλο, με την διαφορά ότι οι πρώτες δρουν σε μια φάση του κύκλου ενώ οι δεύτερες σε όλες τις φάσεις του. Με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα μπορούν να χαρακτηριστούν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες, αντιμεταβολίτες, ανθρακυκλίνες, φυσικά αλκαλοειδή και ταξάνες, και αναστολείς τοποϊσομεράσης (Baudino, 2015, Freres et al., 2017).

2.5.1 Αλκυλιωτικοί Παράγοντες και παράγωγα πλατίνας

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην χημειοθεραπευτική θεραπεία ανήκουν στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων, οι οποίοι βλάπτουν το πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA. Ο τρόπος δράσης τους συνίσταται στην προσθήκη αλκυλομάδων, ο ρόλος των οποίων είναι να προκαλούν τη δημιουργία θραυσμάτων σε κλώνους του DNA ή μεταλλάξεις του DNA. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής αποτελούν η σισπλατίνη, την καρβοπλατίνη, την κυκλοφωσφαμίδη και την οξαλιπλατίνη. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες ανήκουν στην κατηγορία των μη ειδικών-ως προς τον κυτταρικό κύκλο-χημειοθεραπευτικών παραγόντων, και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί για την αντιμετώπιση της λευχαιμίας. Τα μειονεκτήματά τους, ωστόσο, είναι ότι μπορεί να οδηγήσουν σε ανάπτυξη δευτερογενών καρκίνων ή ότι ενδέχεται να

προκαλέσουν υπογονιμότητα στους άνδρες και διακοπή της εμμήνου ρύσεως στις γυναίκες (Baudino, 2015).

Alkylating Agent	Mechanism of Action	Clinical Applications	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Mechlorethamine	Forms DNA cross-links, resulting in inhibition of DNA synthesis and function	Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma	Nausea and vomiting	Moderate depression of peripheral blood count; excessive doses produce severe bone marrow depression with leukopenia, thrombocytopenia, and bleeding; alopecia and hemorrhagic cystitis occasionally occur with cyclophosphamide; cystitis can be prevented with adequate hydration; busulfan is associated with skin pigmentation, pulmonary fibrosis, and adrenal insufficiency
Chlorambucil	Same as above	CLL and non-Hodgkin's lymphoma	Nausea and vomiting	
Cyclophosphamide	Same as above	Breast cancer, ovarian cancer, non-Hodgkin's lymphoma, CLL, soft tissue sarcoma, neuroblastoma, Wilms' tumor, rhabdomyosarcoma	Nausea and vomiting	
Bendamustine	Same as above	CLL and non-Hodgkin's lymphoma	Nausea and vomiting	
Melphalan	Same as above	Multiple myeloma, breast cancer, ovarian cancer	Nausea and vomiting	
Thiotepa	Same as above	Breast cancer, ovarian cancer, superficial bladder cancer	Nausea and vomiting	
Busulfan	Same as above	CML	Nausea and vomiting	
Carmustine	Same as above	Brain cancer, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma	Nausea and vomiting	Myelosuppression; rarely interstitial lung disease and interstitial nephritis
Lomustine	Same as above	Brain cancer	Nausea and vomiting	
Altretamine	Same as above	Ovarian cancer	Nausea and vomiting	Myelosuppression, peripheral neuropathy, flu-like syndrome
Temozolomide	Methylates DNA and inhibits DNA synthesis and function	Brain cancer, melanoma	Nausea and vomiting, headache and fatigue	Myelosuppression, mild elevation in liver function tests, photosensitivity
Procarbazine	Methylates DNA and inhibits DNA synthesis and function	Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, brain tumors	Central nervous system depression	Myelosuppression, hypersensitivity reactions
Dacarbazine	Methylates DNA and inhibits DNA synthesis and function	Hodgkin's lymphoma, melanoma, soft tissue sarcoma	Nausea and vomiting	Myelosuppression, central nervous system toxicity with neuropathy, ataxia, lethargy, and confusion
Cisplatin	Forms intrastrand and interstrand DNA cross-links; binding to nuclear and cytoplasmic proteins	Non-small cell and small cell lung cancer, breast cancer, bladder cancer, cholangiocarcinoma, gastroesophageal cancer, head and neck cancer, ovarian cancer, germ cell cancer	Nausea and vomiting	Nephrotoxicity, peripheral sensory neuropathy, ototoxicity, nerve dysfunction
Carboplatin	Same as cisplatin	Non-small cell and small cell lung cancer, breast cancer, bladder cancer, head and neck cancer, ovarian cancer	Nausea and vomiting	Myelosuppression; rarely peripheral neuropathy, renal toxicity, hepatic dysfunction
Oxaliplatin	Same as cisplatin	Colorectal cancer, gastroesophageal cancer, pancreatic cancer	Nausea and vomiting, laryngopharyngeal dysesthesias	Myelosuppression, peripheral sensory neuropathy, diarrhea

CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia.

Εικόνα 2-5: Αλκυλιωτικοί Παράγοντες: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018).

2.5.2 Αντιμεταβολίτες

Οι αντιμεταβολίτες είναι νουκλεϊκά οξέα, παράγωγα τους ή πρόδρομες ενώσεις αυτών. Ομοίως με τους αλκυλιωτικούς παράγοντες, και αυτή η κατηγορία φαρμάκων οδηγεί σε βλάβη του DNA των κυττάρων. Ο τρόπος λειτουργίας τους συχνά συνίσταται στη μίμηση πουρινών, προκαλώντας έτσι αλλοιώσεις στον γενετικό κώδικα των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ενσωματώνονται στο DNA ή το RNA των κυττάρων και παρεμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA και την κυτταρική διαίρεση, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, το μειονέκτημά τους είναι ότι καταστρέφουν όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και όλα κύτταρα που διαιρούνται ταχύτατα και μπορεί να είναι χρήσιμα για τον οργανισμό. Η κύρια χρήση τους έγκειται στο να θεραπευτούν αιματολογικές κακοήθειες (π.χ λευχαιμία) αλλά και στο να αντιμετωπιστούν όγκοι του μαστού, του γαστρεντερικού, κακοήθειες κεφαλής και τραχήλου. Οι αντιμεταβολίτες ανήκουν στους μη ειδικούς-ως προς τον κυτταρικό κύκλο-χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ενώ χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν η μεθοτρεξάτη, η μερκαπτοπουρίνη, η 5-φθοροουρακίλη (5-FU), η θειογουανίνη, κυταραμπίνη, η γεμισιταβίνη και η φλουδαραβίνη (Baudino, 2015).

Drug	Mechanism of Action	Clinical Applications	Toxicity
Capecitabine	Inhibits TS; incorporation of FUTP into RNA resulting in alteration in RNA processing; incorporation of FdUTP into DNA resulting in inhibition of DNA synthesis and function	Breast cancer, colorectal cancer, gastroesophageal cancer, hepatocellular cancer, pancreatic cancer	Diarrhea, hand-foot syndrome, myelosuppression, nausea and vomiting
5-Fluorouracil	Inhibits TS; incorporation of FUTP into RNA resulting in alteration in RNA processing; incorporation of FdUTP into DNA resulting in inhibition of DNA synthesis and function	Colorectal cancer, anal cancer, breast cancer, gastroesophageal cancer, head and neck cancer, hepatocellular cancer	Nausea, mucositis, diarrhea, bone marrow depression, neurotoxicity
Methotrexate	Inhibits DHFR; inhibits TS; inhibits de novo purine nucleotide synthesis	Breast cancer, head and neck cancer, osteogenic sarcoma, primary central nervous system lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, bladder cancer, choriocarcinoma	Mucositis, diarrhea, myelosuppression with neutropenia and thrombocytopenia
Pemetrexed	Inhibits TS, DHFR, and purine nucleotide synthesis	Mesothelioma, non-small cell lung cancer	Myelosuppression, skin rash, mucositis, diarrhea, fatigue, hand-foot syndrome
Cytarabine	Inhibits DNA chain elongation, DNA synthesis and repair; inhibits ribonucleotide reductase with reduced formation of dNTPs; incorporation of cytarabine triphosphate into DNA	AML, ALL, CML in blast crisis	Nausea and vomiting, myelosuppression with neutropenia and thrombocytopenia, cerebellar ataxia

Gemcitabine	Inhibits DNA synthesis and repair; inhibits ribonucleotide reductase with reduced formation of dNTPs; incorporation of gemcitabine triphosphate into DNA resulting in inhibition of DNA synthesis and function	Pancreatic cancer, bladder cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, ovarian cancer, non-Hodgkin's lymphoma, soft tissue sarcoma	Nausea, vomiting, diarrhea, myelosuppression
Fludarabine	Inhibits DNA synthesis and repair; inhibits ribonucleotide reductase; incorporation of fludarabine triphosphate into DNA; induction of apoptosis	Non-Hodgkin's lymphoma, CLL	Myelosuppression, immunosuppression, nausea and vomiting, fever, myalgias, arthralgias
Cladribine	Inhibits DNA synthesis and repair; inhibits ribonucleotide reductase; incorporation of cladribine triphosphate into DNA; induction of apoptosis	Hairy cell leukemia, CLL, non-Hodgkin's lymphoma	Myelosuppression, nausea and vomiting, and immunosuppression
6-Mercaptopurine (6-MP)	Inhibits de novo purine nucleotide synthesis; incorporation of triphosphate into RNA; incorporation of triphosphate into DNA	AML	Myelosuppression, immunosuppression, and hepatotoxicity
6-Thioguanine	Same as 6-MP	ALL, AML	Same as 6-MP

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; DHFR, dihydrofolate reductase; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; FdUTP, 5-fluorodeoxyuridine-5'-triphosphate; FUTP, 5-fluorouridine-5'-triphosphate; TS, thymidylate synthase.

Εικόνα 2-6: Αντιμεταβολίτες: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018).

2.5.3 Ανθρακυκλίνες

Η κατηγορία αυτή των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων βασίζεται στη δαουνοζαμίνη και τη τετραϋδروναφθακενεδιόνη και ανήκει στους μη ειδικούς-ως προς τον κυτταρικό κύκλο-χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Οι ανθρακυκλίνες είναι αρκετά θεραπευτικοί για την αντιμετώπιση λευχαιμίας, λεμφώματος, καρκίνου των ωοθηκών, του πνεύμονα και του μαστού. Μερικά παραδείγματα αποτελούν η δαουνορουβική και η δοξορουβική που πρωτοανακαλύφθηκαν, ιδारουβική, επιρουβική και μιτοξαντρόνη. Οι ανθρακυκλίνες λειτουργούν ως εξής: 1) δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες βλάπτουν τους κλώνους του DNA και την κυτταρική μεμβράνη, και τελικά οδηγούν σε απόπτωση, 2) αποτρέπουν την σύνθεση DNA και RNA, καθώς παρεμβαίνουν στα ζεύγη βάσεων, και έτσι δεν αναπαράγονται καρκινικά κύτταρα, και 3) αποτελούν αναστολείς της τοποϊσομεράση II, με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται επιτυχώς η μεταγραφή και η αντιγραφή του DNA και άρα να προκαλείται κυτταρικός θάνατος. Το μειονέκτημα των χημειοθεραπευτικών αυτών παραγόντων είναι ότι μπορούν να προκαλέσουν καρδιακή τοξικότητα, το οποίο αποφεύγεται με συνδυαστική χορήγηση ανθρακυκλινών και δεξραζοζάνης (Baudino, 2015).

Drug	Mechanism of Action	Clinical Applications	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Daunorubicin	Oxygen free radicals bind to DNA causing single- and double-strand DNA breaks; inhibits topoisomerase II; intercalates into DNA	AML, ALL	Nausea and vomiting, fever, red urine (not hematuria)	Cardiotoxicity (see text), alopecia, myelosuppression
Doxorubicin	Oxygen free radicals bind to DNA causing single- and double-strand DNA breaks; inhibits topoisomerase II; intercalates into DNA	Breast cancer, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, soft tissue sarcoma, ovarian cancer, non-small cell and small cell lung cancer, thyroid cancer, Wilms' tumor, neuroblastoma	Nausea, red urine (not hematuria)	Cardiotoxicity (see text), alopecia, myelosuppression, stomatitis
Idarubicin	Oxygen free radicals bind to DNA causing single- and double-strand DNA breaks; inhibits topoisomerase II; intercalates into DNA	AML, ALL, CML in blast crisis	Nausea and vomiting	Myelosuppression, mucositis, cardiotoxicity

Εικόνα 2-7: Ανθρακυκλίνες: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018).

2.5.4 Φυσικά Αλκαλοειδή και Ταξάνες

Η πρόελευση των φυσικών αλκαλοειδών είναι το φυτό μυρτιάς, με χαρακτηριστικά παραδείγματα να αποτελούν η βινκριστίνη και η βινμπλαστίνη. Τα φυσικά αλκαλοειδή ανήκουν στους ειδικούς-ως προς τον κυτταρικό κύκλο-χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, και μάλιστα στοχεύουν τη φάση M, καθώς συνδέονται με μικροσωληνιακές πρωτεΐνες και έτσι αναστέλλουν τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων. Η βινβλαστίνη είναι αποτελεσματική για την θεραπεία κατά του καρκίνου των όρχεων, ενώ η βινκριστίνη κατά της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και του σαρκώματος Ewing (Baudino, 2015).

Drug	Mechanism of Action	Clinical Applications	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Vinblastine	Inhibits mitosis	Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, germ cell cancer, breast cancer, Kaposi's sarcoma	Nausea and vomiting	Myelosuppression, mucositis, alopecia, syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH), vascular events
Vincristine	Inhibits mitosis	ALL, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, Wilms' tumor	None	Neurotoxicity with peripheral neuropathy, paralytic ileus, myelosuppression, alopecia, SIADH

Εικόνα 2-8: Φυσικά Αλκαλοειδή: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018).

Απ' την άλλη, οι ταξάνες περιλαμβάνουν την πακλιταξέλη, την ντοξिताξέλη και την καβαζιταξέλη, και συγκεκριμένα, η πακλιταξέλη προέρχεται από το δέντρο *Taxus brevifolia* (Πασιφική δρυς), το οποίο φημίζεται για την αντικαρκινική του δράση. Ο μηχανισμός δράσης των ταξανών έγκειται στην δέσμευσή τους στους μικροσωληνίσκους,

με στόχο την συναρμολόγηση αυτών. Ως αποτέλεσμα, οι σταθεροί και ανθεκτικοί στην αποδιάταξη μικροσωληνίσκοι καθίστανται μη λειτουργικοί και αποτρέπουν τα κύτταρα να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της μιτωτικής διαίρεσης, με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων (Freres et al., 2017).

Drug	Mechanism of Action	Clinical Applications	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Docetaxel	Inhibits mitosis	Breast cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, gastric cancer, head and neck cancer, ovarian cancer, bladder cancer	Hypersensitivity	Neurotoxicity, fluid retention, myelosuppression with neutropenia
Paclitaxel	Inhibits mitosis	Breast cancer, non-small cell and small cell lung cancer, ovarian cancer, gastroesophageal cancer, prostate cancer, bladder cancer, head and neck cancer	Nausea, vomiting, hypotension, arrhythmias, hypersensitivity	Myelosuppression, peripheral sensory neuropathy

Εικόνα 2-9: Ταξάνες: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018)

2.5.5 Αναστολείς Τοποϊσομερασών

Πρόκειται για χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, οι οποίοι αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα της Τοποϊσομεράσης είτε τύπου I ή τύπου II. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο των μεταβολών της δομής του DNA, και μάλιστα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, οι τοποϊσομεράσες επιτρέπουν τη θραύση και την επανασύνδεση του φωσφοδιεστερικού σκελετού του DNA, η οποία είναι απαραίτητη για πολλές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του γονιδίου. Ως αποτέλεσμα, η αναστολή των τοποϊσομερασών να προκαλεί βλάβη στο DNA, και εν τέλει κυτταρικό θάνατο (Freres, 2017).

Drug	Mechanism of Action	Clinical Applications	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Etoposide	Inhibits topoisomerase II	Non-small cell and small cell lung cancer; non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer	Nausea, vomiting, hypotension	Alopecia, myelosuppression
Topotecan	Inhibits topoisomerase I	Small cell lung cancer, ovarian cancer	Nausea and vomiting	Myelosuppression
Irinotecan	Inhibits topoisomerase I	Colorectal cancer, gastroesophageal cancer, non-small cell and small cell lung cancer	Diarrhea, nausea, vomiting	Diarrhea, myelosuppression, nausea and vomiting

Εικόνα 2-10: Αναστολείς Τοποϊσομερασών: Κλινική δράση και τοξικότητες (Katzung, 2018)

Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης τύπου I περιλαμβάνουν την καμπτοθεκίνη, τα παράγωγά της ιρινοτεκάνη και τοποτεκάνη, ενώ οι αντίστοιχοι της τύπου II περιλαμβάνουν την αμσακρίνη, ετοποσίδη και τενιποσίδη (Baudino, 2015).

2.5.6 Διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Διάφορα άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, που δεν ανήκουν σε κάποια απ' τις παραπάνω κατηγορίες, απεικονίζονται παρακάτω (Katzung, 2018):

Drug	Mechanism of Action ¹	Clinical Applications ¹	Acute Toxicity	Delayed Toxicity
Bortezomib	Inhibitor of the 26S proteasome; results in down-regulation of the NF-κB signaling pathway	Multiple myeloma, mantle cell lymphoma	Nausea and vomiting, fever	Peripheral sensory neuropathy, diarrhea, orthostatic hypotension, fever, pulmonary toxicity, reversible posterior leukoencephalopathy (RPLS), congestive heart failure (CHF), rare cases of QT prolongation
Carfilzomib	Inhibitor of the 26S proteasome; results in down-regulation of the NF-κB signaling pathway; maintains activity in bortezomib-resistant tumors	Multiple myeloma	Fever	Fatigue, cardiac toxicity with CHF and myocardial infarction, myelosuppression, pulmonary toxicity, hepatotoxicity, orthostatic hypotension
Erlotinib	Inhibits EGFR tyrosine kinase leading to inhibition of EGFR signaling	Non-small cell lung cancer, pancreatic cancer	Diarrhea	Skin rash, diarrhea, anorexia, interstitial lung disease
Imatinib	Inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and other receptor tyrosine kinases, including PDGFR, and c-kit	CML, gastrointestinal stromal tumor (GIST), Philadelphia chromosome-positive ALL	Nausea and vomiting	Fluid retention with ankle and periorbital edema, diarrhea, myalgias, congestive heart failure

Εικόνα 2-11

2.5.7 Μειονεκτήματα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Παρά τη σημαντική συμβολή των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται χημειοθεραπευτικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου, η συχνότητα και η σοβαρότητα των παρενεργειών τους είναι εξίσου αξιοσημείωτη. Πιο συγκεκριμένα, τα φάρμακα αυτά στοχεύουν όλα τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, δηλαδή όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα υγιή, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται τοξικότητες (Nussbaumer et al., 2011). Οι τοξικότητες αυτές χρήζουν άμεσης διαχείρισης, καθώς συμβάλλουν αρνητικά στο θεραπευτικό αγώνα αλλά και γενικότερα στην ομαλή ποιότητα ζωής των καρκινοπαθών. Οι παρενέργειες αυτές μπορεί να είναι μικρής ή μεγάλης διάρκειας, προσωρινές ή μόνιμες, λιγότερο ή περισσότερο επικίνδυνες και συχνά μεταξύ άλλων συναντώνται στο αίμα, στο δέρμα, στην καρδιά, στα ούρα, στο γαστρεντερικό σύστημα, στους πνεύμονες (Remesh, 2012).

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα παραδείγματα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τα οποία προκαλούν τοξικότητες (Remesh, 2012):

Carboplatin	Dactinomycin	Vinblastine	Doxorubicin
Chlorambucil	Mitomycin	Melphelan	Gemcitabine
Oxaliplatin	Fludarabine	Oxaliplatin	Methotrexate
Cyclophosphamide	Mustine	Idarubicin	Daunorubicin
Cytarabine	Topotecan	Irinotecan	Paclitaxel
Vinorelbine	FU	Rituximab	Hydroxyurea
Ifosamide	Mitoxantrone	Transtuzumab	

Εικόνα 2-12: Φάρμακα που προκαλούν αιματολογικές παρενέργειες (Remesh, 2012)

Antimetabolites	Methotrexate, 5-Fluorouracil, Cytarabine, Irinotecan
Antitumor antibiotics	Doxorubicin, Dactinomycin, Mitomycin, Bleomycin
Plant alkaloids	Vincristine, Vinblastine, Etoposide
Others	Alkylating agents in high doses
Biologic agents	Interleukins

Εικόνα 2-13: Φάρμακα που προκαλούν γαστρεντερικές παρενέργειες (Remesh, 2012)

Ως απόρροια των παραπάνω, η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων υψίστης αξιοπιστίας και ακρίβειας για τη μελέτη αυτών των φαρμάκων έχει καταστεί αναγκαία, ώστε να μειωθεί η τοξικότητα αυτών, τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους επαγγελματίες υγείας. Οι κυριότερες πτυχές που καλύπτονται από τις αναλυτικές αυτές μεθόδους είναι τα Φαρμακευτικά προϊόντα, τα Βιολογικά δείγματα, όπως αίμα ή ούρα και τα Περιβαλλοντικά δείγματα, όπως εξηγούνται και παρακάτω (Nussbaumer et al., 2011).

2.6 Στοχευμένη φαρμακευτική θεραπεία

Πρόκειται για φάρμακα των οποίων ο ρόλος είναι η αναστολή της ανάπτυξης του όγκου επιδρώντας σε καθορισμένα μόρια-στόχους που συμμετέχουν στις διαδικασίες που οδηγούν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Δυο κύριες κατηγορίες των φαρμάκων αυτών είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι αναστολείς μικρών μορίων. Οι μηχανισμοί δράσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων συνήθως στοχεύουν στο να ενεργοποιήσουν το ανοσιακό σύστημα του ξενιστή (δηλαδή του ατόμου που λαμβάνει το φάρμακο) να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό γίνεται είτε μέσω της δέσμευσης σε συνδέσεις ή υποδοχείς στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου, είτε μέσω άλλων μηχανισμών που επηρεάζουν τις βασικές διαδικασίες του καρκινικού κυττάρου. Επιπλέον, τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να μεταφέρουν ένα θανατηφόρο φορτίο, όπως ραδιοϊσότοπο ή τοξίνη, στο καρκινικό κύτταρο (Debela et al., 2021). Ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι η ειδικότητα που έχουν να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλλά μόνο επιφανειακά των κυττάρων, και έτσι δεν έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (Baudino, 2015).

Brand Name (Generic Name)	Drug Target	FDA-approved Indications
Gleevec (Imatinib mesylate)	BCR-ABL	Acute Lymphocytic Leukemia, Chronic Myeloid Leukemia, Gastrointestinal Stromal Tumor
Iressa (Gefitinib)	EGFR	Non-small Cell Lung Cancer
Nexavar (Sorafenib)	VEGF	Renal Cell Cancer, Hepatocellular Carcinoma
Nolvadex (Tamoxifen)	Oestrogen receptor	Breast Cancer, Ductal Carcinoma In Situ
Sprycel (Dasatinib)	BCR-ABL, Src	Chronic Myeloid Leukemia, Acute Lymphocytic Leukemia
Sutent (Sunitinib malate)	c-Kit, PDGFR, VEGFR	Renal Cell Cancer, Gastrointestinal Stromal Tumor
Tarceva (Erlotinib)	EGFR	Non-small Cell Lung Cancer, Pancreatic Cancer
Torisel (Temsirolimus)	mTOR	Advanced Renal Cell Carcinoma
Tykerb (Lapatinib)	Her2 receptor	Her2 positive Breast cancers
Velcade (Bortezomib)	Proteasome 26s	Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma

Εικόνα 2-14: Μονοκλωνικά αντισώματα για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου (Baudino, 2015).

Όσον αφορά την δεύτερη κατηγορία, στοχεύουν σε πρωτεΐνες μικρού μεγέθους ($\leq 500\text{Da}$), που τις καθιστά ιδιαίτερα ευκίνητες ώστε να διεισδύουν με ευκολία μέσα από τις πλασματικές μεμβράνες. Ο ρόλος τους είναι να αναστέλλουν την δράση της κινάσης

τυροσίνης και να προωθούν την έναρξη μιας αλυσίδας αντιδράσεων που οδηγούν στη διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης, στην αποφυγή της δημιουργίας νέων κυττάρων και της μετάστασής τους και στην αναστολή της διαδικασίας δημιουργίας νέων αγγείων, οι οποίες είναι συχνά χαρακτηριστικές των κακοήθων ιστών (Debela et al., 2021).

Brand Name (Generic Name)	Drug Target	FDA-approved Indications
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Colorectal Cancer, Non-small Cell Lung Cancer
BexxaR (Tositumomab)	CD20	Non-Hodgkin's Lymphoma
Erbitux (Cetuximab)	EGFR	Colorectal Cancer, Head and Neck Cancers
Herceptin (Trastuzumab)	Her2 receptor	Her2 Positive Breast Cancers
Rituxan (Rituximab)	CD20	Non-Hodgkin's Lymphoma, Rheumatoid Arthritis
Vectibix (Panitumumab)	EGFR	Colorectal Cancer
Zevalin (⁹⁰ Y-Ibritumomab tiuxetan)	CD20	Non-Hodgkin's Lymphoma
Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	CD33	Acute Myeloid Leukemia
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Chronic Lymphocytic Leukemia

Εικόνα 2-15: Αναστολείς μικρών μορίων για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων (Debela et al., 2021).

3. Τεχνικές Ανάλυσης

3.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC

3.1.1 Εισαγωγή στην HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον διαχωρισμό των συστατικών διάφορων ενώσεων. Ιδιαίτερα στον τομέα της φαρμακευτικής, η HPLC προτιμάται έναντι των άλλων τεχνικών, καθώς έχει την ικανότητα να διαχωρίζει και ποσοτικοποιεί αποτελεσματικά, δεδομένου πως η πλειοψηφία των φαρμάκων περιλαμβάνει πληθώρα συστατικών, ενώ ταυτόχρονα παρέχει ανίχνευση με υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας, είναι γρήγορη και ακριβής μέθοδος. Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής ενός φαρμάκου, από την ανακάλυψη μέχρι την ανάπτυξη και παραγωγή αυτού, όπου χρησιμοποιείται για να ελέγξει την καθαρότητα του νέου προϊόντος με την απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών ή στον ποιοτικό έλεγχο για την διασφάλιση του τελικού προϊόντος, για παράδειγμα (Bhardwaj et al., 2015).

3.1.2 Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας της HPLC έγκειται στην έγχυση του διαλύματος που περιέχει το δείγμα σε μία στήλη από πορώδες υλικό, που ονομάζεται στατική φάση, ενώ γίνεται άντληση μιας υγρής φάσης, που ονομάζεται κινητή φάση, μέσω της στήλης υπό συνθήκες υψηλής πίεσης, ώστε το υγρό δείγμα να διαπεράσει το δείγμα τη στήλη (Bhardwaj et al., 2015). Με την διέλευση της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη, υφίσταται αλληλεπίδραση των διάφορων συστατικών του δείγματος με το πορώδες υλικό της στατικής φάσης. Ο διαφορετικός βαθμός συγγένειας του κάθε συστατικού ως προς τη στατική φάση οδηγεί σε διαφορετικό τρόπο προσρόφησής του από αυτή, και άρα διαχωρισμού. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια ενός συστατικού προς τη στατική φάση, τόσο περισσότερο χρόνο θα παραμείνει στη στήλη και τόσο πιο αργά θα εκλουσθεί (θα εξέρθει από τη στήλη). Τα διαχωρισμένα συστατικά, στο τέλος, καταγράφονται από έναν ανιχνευτή, κάνοντας ταυτόχρονα ποσοτική ανάλυση (Ali, 2022).

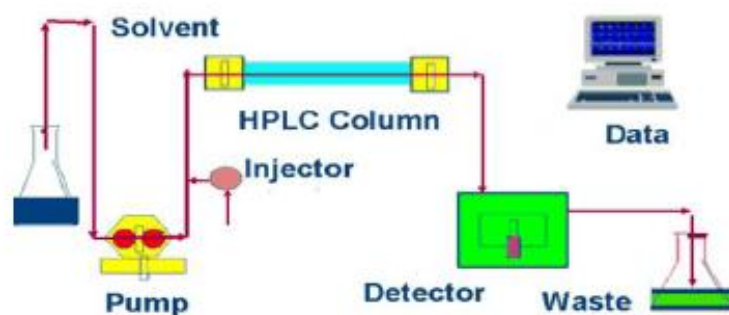


Fig-1: Flow Diagram of HPLC

Εικόνα 3-1: Οργανολογία της HPLC (Bhardwaj et al., 2015)

3.1.3 Οργανολογία της HPLC

Η οργανολογία της HPLC περιλαμβάνει:

- Κινητή φάση
- Αντλίες
- Εγχυτήρας
- Στήλη
- Ανιχνευτής (Ali, 2022).

3.1.4 Προετοιμασία δείγματος

Όσον αφορά την προετοιμασία του δείγματος πριν την έγχυση στη στήλη, για τα υγρά δείγματα απαιτείται μόνο καθαρισμός για να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια ή εκχύλιση για να απομακρυνθούν παρεμβολές της μήτρας, για τα στερεά δείγματα απαιτείται αρχικά διάλυση σε κατάλληλο διαλύτη ή εξαγωγή και τέλος όταν πρόκειται για αέρια δείγματα, μια παγίδα που περιέχει κατάλληλο διαλύτη συλλέγει τα αέρια με τη μορφή φυσαλίδων καθώς αυτά περνούν απ' την παγίδα (Ali, 2022).

3.1.5 Ταξινόμηση HPLC

Η HPLC μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες, HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης:

- Η πρώτη χρησιμοποιεί μία πολική στατική φάση όπως το πυρίτιο και μια μη πολική κινητή φάση, όπως είναι το χλωροφόρμιο ή το οκτάνιο.

- Η δεύτερη χρησιμοποιεί μία μη πολική στατική φάση, όπως το πυρίτιο που έχει επεξεργαστεί με RMe_2SiCl , όπου R είναι μια γραμμική αλκυλική ομάδα όπως $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ή C_8H_{17} και μία μέτρια πολική κινητή φάση (Ali, 2022).

Summary of NP and RP-HPLC

Type	Mobile Phase	Stationary Phase	Elution Order
Normal - Phase	Non-polar (hexane, toluene, methanol)	Polar (silica or chemically-modified Si such as $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$)	Least polar first, most polar last
Reversed-Phase	Polar (water + miscible organic solvent (acetonitrile, ethanol, methanol))	Non-polar (chemically-modified silica, C8, C12, C18 groups) 5 μm diam. particle size	Most polar first, least polar last

Εικόνα 3-2: Σύνοψη HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης (Ali, 2022).

3.2 Αέρια Χρωματογραφία GC

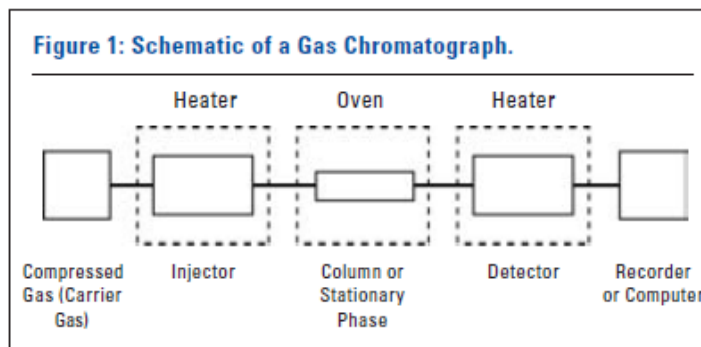
3.2.1 Εισαγωγή στην GC

Η Αέρια Χρωματογραφία (GC) αποτελεί άλλη μία τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό των συστατικών διάφορων ενώσεων, και συγκεκριμένα αέριων ή πτητικών ενώσεων. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη γκάμα πεδίων, μέσα στα οποία συγκαταλέγεται και το πεδίο της φαρμακευτικής, καθώς δίνει αποτελέσματα γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία, ενώ το δείγμα μπορεί να αναλυθεί ποιοτικά αλλά και ποσοτικά, απαιτώντας μια μικρή ποσότητα αυτού (Kaur et al., 2018).

3.2.2 Αρχή λειτουργίας της GC

Η αρχή λειτουργίας της GC έγκειται στην διάλυση του δείγματος σε έναν διαλύτη και η εξάτμισή του, έτσι ώστε να ακολουθήσει ο διαχωρισμός των συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, οι ατμοί αναμιγνύονται με την κινητή φάση, χωρίς να υφίσταται αλληλεπίδραση, και διαπερνούν τη στήλη. Τα συστατικά που είναι πιο φιλικά με τη στατική φάση, αλληλεπιδρούν με αυτή και εκλούνται πιο αργά σε σχέση με αυτά που είναι λιγότερο φιλικά με τη στατική φάση, επιτυγχάνοντας έτσι τον διαχωρισμό. Σε αυτή

την τεχνική, η κινητή φάση είναι ένα χημικά αδρανές αέριο όπως το ήλιο, το άζωτο κ.α., ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε ένα στερεό προσροφητικό ή ένα υγρό σε ένα αδρανές υπόστρωμα, όπου χαρακτηρίζεται ως αέριο-στερεό χρωματογραφία (GSC) και αέριο-υγρό χρωματογραφία (GLC), αντίστοιχα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την GC ανάλυση αποτελεί οι ενώσεις να είναι πτητικές και θερμοάντοχες (Kaur et al., 2018).



Εικόνα 3-3: Οργανολογία της GC (Kuriec, 2004)

3.2.3 Οργανολογία της GC

Η οργανολογία της GC περιλαμβάνει:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Φέρον αέριο
- Στήλη
- Θερμοστατικός φούρνος
- Ανιχνευτής
- Σύστημα καταγραφής (Kaur et al., 2018).

3.2.4 Προετοιμασία δείγματος

Η GC προτιμάται για το διαχωρισμό δειγμάτων με μικρότερα μόρια (επ' εναντίας με την HPLC που προτιμάται για ανάλυση δειγμάτων με μεγαλύτερα μόρια). Απαραίτητη προϋπόθεση για GC ανάλυση αποτελεί τα δείγματα να είναι σε αέρια μορφή ή πτητικά. Σε περίπτωση που η αναλυόμενη ουσία είναι μη πτητική, ακολουθείται μία τεχνική γνωστή

ως παραγωγή, κατά την οποία πραγματοποιείται τροποποίηση της μοριακής δομής της ουσίας, ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητά και η πτητικότητα της. Ωστόσο, μερικές φορές η διαδικασία αυτή μπορεί να καταστήσει τη μέθοδο περίπλοκη (Kuriec, 2004).

3.3 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση CE

3.3.1 Εισαγωγή στην CE

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE) είναι μια τεχνική διαχωρισμού κυρίως πολικών και δύσκολα πτητικών ουσιών που προτιμάται συχνά για την ανάλυση των φαρμάκων, καθώς παρέχει υψηλή επιλεκτικότητα, ακρίβεια και ευαισθησία, ενώ το κόστος της είναι πιο χαμηλό σε σχέση με άλλες τεχνικές και συνήθως δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος (Wätzig et al., 2003). Επιπλέον, η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση (Suntornsuk, 2007).

3.3.2 Αρχή λειτουργίας της CE

Πρόκειται για μία ηλεκτροφορητική τεχνική διαχωρισμού, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κινητικότητα των διαλυμένων ουσιών σε ηλεκτρικό πεδίο και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τριχοειδή στενής οπής γεμάτα με ηλεκτρολύτη. Πιο συγκεκριμένα, η μετανάστευση των αναλυτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το μέγεθος, το φορτίο και τον βαθμό ιονισμού τους, το ιξώδες, τη θερμοκρασία και τη διηλεκτρική σταθερά του υποβάθρου ηλεκτρολύτη (BGE), ενώ εφαρμόζοντας τάση, δύο δυνάμεις, η ηλεκτροφορητική μετανάστευση και η ροή ηλεκτρο-ώσμωσης (EOF), κινούν τους αναλύτες. Το υλικό κατασκευής των τριχοειδών σωλήνων συνήθως είναι το πυρίτιο, το οποίο προκαλεί αρνητικά φορτία στην επιφάνειά τους σε pH πάνω από 3, εξαιτίας της παρουσίας των ομάδων σιλανόλης που δημιουργούν την EOF.

Η σημασία της EOF είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιτρέπει να διαχωρίζονται ταυτόχρονα κατιόντα, ανιόντα και ουδέτερες ενώσεις στον ίδιο τριχοειδή σωλήνα. Πιο αναλυτικά, η εισαγωγή των αναλυτών γίνεται από την άνοδο (θετικό ηλεκτρόδιο) και η ανίχνευσή τους στην κάθοδο (αρνητικό ηλεκτρόδιο), καθώς πρώτα γίνεται η κίνηση των κατιόντων προς την κάθοδο, εξαιτίας της συνδυασμένης επίδρασης της ηλεκτροφορητικής δύναμης και της EOF που τα κατευθύνουν προς τα εκεί, η κίνηση των ουδέτερων ενώσεων γίνεται παράλληλα με την EOF προς την κάθοδο, δίνοντας μια ενιαία κορυφή

χωρίς να επηρεάζονται από την ηλεκτροφορητική δύναμη και τέλος, η κίνηση των ανιόντων γίνεται προς την κάθοδο λόγω της EOF αλλά με χαμηλότερη ταχύτητα από τα κατιόντα, εξαιτίας της ηλεκτροφορητικής δύναμης που τα κατευθύνει προς την άνοδο (Suntornsuk, 2007).

3.3.3 Οργανολογία της CE

Τα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα τυπικό όργανο Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής:

- Ηλεκτρόδια (θετικό και αρνητικό)
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Τριχοειδής σωλήνας
- Τάση
- Ανιχνευτές
- Συστήματα χειρισμού υγρών (Suntornsuk, 2007).

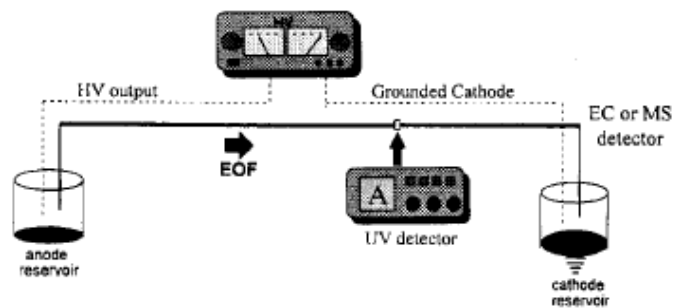


Fig. 1. Diagram of capillary electrophoresis setup.

Εικόνα 3-4: Οργανολογία της CE (Holland et al., 1997)

3.3.4 Προετοιμασία δείγματος

Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το γεγονός ότι τα δείγματα δεν χρειάζονται ιδιαίτερη προκατεργασία πριν την ανάλυση, δίνοντας ταυτόχρονα αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια. Συνήθως, όταν πρόκειται να αναλυθούν φαρμακευτικά προϊόντα σε πλάσμα ή ορό, γίνεται προσθήκη SDS στο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες του πλάσματος και του ορού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μετανάστευση των πρωτεϊνών να γίνεται αργά μέσω του τριχοειδούς σωλήνα και επομένως να αργούν να εμφανιστούν στο ηλεκτροφορητικό διάγραμμα, ενώ στο διάστημα

αυτό μπορεί να γίνει η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των φαρμακευτικών ουσιών ανεξάρτητα των πρωτεϊνών και άλλων ενδογενών συστατικών λόγω υψηλής εκλεκτικότητας. Η διαδικασία αυτή έχει χαμηλό κόστος και είναι αποδοτική, χωρίς να απαιτεί πολύ χρόνο (Wätzig et al., 2003).

3.2.5 Σύγκριση με άλλες τεχνικές διαχωρισμού

Μεταξύ CE και GC δεν παρατηρείται έντονος ανταγωνισμός, καθώς οι δύο αυτές τεχνικές χρησιμοποιούνται για διαφορετικούς σκοπούς, διαχωρισμός πολικών, δύσκολα πτητικών ουσιών και διαχωρισμός πτητικών και ημι-πτητικών ουσιών, αντίστοιχα.

Απ' την άλλη, συγκρίνοντας την CE με την HPLC, και οι δύο είναι εξίσου ακριβείς, ωστόσο η CE φαίνεται να υπερτερεί στις περισσότερες περιπτώσεις, καθώς έχει μεγαλύτερη απόδοση διαχωρισμού, λιγότερα συστηματικά σφάλματα, μειωμένο κόστος και χρόνο προετοιμασίας των δειγμάτων και μεγαλύτερη ευκολία καθαρισμού και αντικατάστασης των σωλήνων έναντι των στηλών (Wätzig et al., 2003).

4. Τεχνικές Ανάλυσης των διάφορων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

4.1 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων γενικά

4.1.1 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα φαρμακευτικά σκευάσματα

Από την παραγωγή των φαρμάκων μέχρι τη χορήγησή τους σε ασθενείς κατά τη χημειοθεραπεία, η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων στη φαρμακευτική βιομηχανία είναι ύψιστης σημασίας για την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση τους. Οι μέθοδοι αυτοί επικεντρώνονται i) στον έλεγχο ποιότητας των συσκευασμένων και μη, φαρμακευτικών σκευασμάτων, ώστε να πληρούν τα προδιαγεγραμμένα πρότυπα ποιότητας πριν από τη διάθεσή τους στην αγορά, ii) στον έλεγχο ποιότητας των σκευασμάτων που έχουν υποστεί αραίωση πρώτου χορηγηθούν στον ασθενή, iii) και σε μελέτες που εξετάζουν τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών του φαρμάκου και την αντοχή του στις διάφορες συνθήκες (Nussbaumer et al., 2011).

- Έλεγχος ποιότητας των χύδην και εμπορευματοποιημένων σκευασμάτων: πρόκειται για τη μαζική παραγωγή των φαρμάκων και για εκείνα που είναι συσκευασμένα και έτοιμα προς πώληση και χρήση από τους καταναλωτές. Χρησιμοποιούνται τεχνικές για να διαχωρίσουν τα συστατικά, όπως είναι η Υγρή Χρωματογραφία (LC) και η Ηλεκτροφορητική Χρωματογραφία (CE) που παρέχουν υψηλή ειδικότητα συνδυαστικά με τεχνικές ανίχνευσης, όπως η φασματομετρία μαζών (MS) ή UV φασματοφωτομετρία που προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα (Nussbaumer et al., 2011).
- Έλεγχος ποιότητας των αραιωμένων σκευασμάτων: πρώτου χορηγηθεί ένα φάρμακο στον ασθενή, συχνά αυτό υπόκειται σε αραίωση με διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) ή γλυκόζης, προκειμένου να προσαρμοστεί στην επιθυμητή συγκέντρωση. Ωστόσο, απαιτείται ανάλυση για να ελεγχθεί η σταθερότητα των αραιωμένων αυτών σκευασμάτων και να διασφαλιστεί ότι η συγκέντρωση του φαρμάκου παραμένει σταθερή και ότι δεν υπάρχουν ανεπιθύμητες αλλαγές στην ποιότητα του. Στην περίπτωση αυτή, προτιμώνται τεχνικές όπως η ανάλυση έγχυσης ροής (FIA) με ανίχνευση συστοιχίας διόδων UV (DAD) που χαρακτηρίζεται από απλότητα και ταχύτητα, Φασματοφωτομετρία Υπερύθρου με

Μετασχηματισμό Fourier συνδυασμένη με φασματοφωτομετρία UV που χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα ή Φασματοσκοπία Raman, η οποία είναι πιο ειδική, μη καταστροφική και γρήγορη τεχνική (Nussbaumer et al., 2011).

- Μελέτες των φαρμάκων που περιέχονται στα σκευάσματα: οι μελέτες αυτές εστιάζουν στη σταθερότητα των κυτταροτοξικών φαρμάκων και στη συμβατότητά τους με τα υλικά συσκευασίας προς αποφυγή της προσρόφησης ή της αποικοδόμησης του δραστικού συστατικού. Σε αυτές τις μελέτες, η υγρή χρωματογραφία με υπέρυθρο ανιχνευτή (LC-UV) ήταν η πιο συνήθης αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε (Nussbaumer et al., 2011).

4.1.2 Ανάλυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε βιολογικά δείγματα

Ακόμη, σημαντικός είναι ο ρόλος που έχει η ανάλυση στην μέτρηση της ποσότητας κυτταροτοξικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά, στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας νέων φαρμάκων πριν αυτά φθάσουν στην αγορά, στις Φαρμακοκινητικές (PK) και Φαρμακοδυναμικές (PD) Μελέτες, στη παρακολούθηση Θεραπείας Φαρμάκων (TDM) και στη παρακολούθηση των εργαζομένων που εκτίθενται σε κυτταροτοξικές ουσίες στο περιβάλλον της εργασίας τους (Nussbaumer et al., 2011).

- Ανακάλυψη και αξιολόγηση νέων φαρμάκων: η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και των φαρμάκων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ανακάλυψη και την αξιολόγηση των νέων φαρμάκων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι DNA-footprinting, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR), Φασματομετρία Μάζας (MS) και άλλες φασματομετρικές τεχνικές, FTIR και Raman Φασματοσκοπία, Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση και μοριακές τεχνικές μοντελοποίησης. Επιπλέον, οι μελέτες φαρμακοκινητικής (PK) και φαρμακοδυναμικής (PD) είναι η κινητήρια δύναμη πίσω από την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό κυτταροτοξικών παραγόντων σε βιολογικά δείγματα (Nussbaumer et al., 2011).
- Παρακολούθηση Θεραπείας Φαρμάκων (TDM): το TDM είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη χημειοθεραπεία, καθώς είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την προσαρμογή της δοσολογίας ενός φαρμάκου σε έναν ασθενή. Ως αποτέλεσμα, επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και τη μείωση των παρενεργειών της (Rousseau et al., 2000).

- Παρακολούθηση εκτεθειμένων επαγγελματιών υγείας: Η έκθεση σε κυτταροτοξικά φάρμακα έχει αναγνωριστεί ως επικίνδυνη για τους επαγγελματίες υγείας, καθώς έρευνες έχουν δείξει πως η έκθεση σε αυτά μπορεί να συνδέεται με ανάπτυξη καρκίνου. Για την παρακολούθηση, λοιπόν, της έκθεσης στα φάρμακα αυτά και την αξιολόγηση των επιπτώσεων της στην υγεία των ατόμων απαιτούνται τεχνικές που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση ιχνοστοιχείων τους σε δείγματα ούρων ή αίματος. Τέτοιες τεχνικές είναι συνήθως το GC-MS και το LC-MS, αλλά χρήσιμες μπορούν να φανούν και η επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία πλάσματος-μάζας (ICP-MS) ή βολταμετρία για ενώσεις πλατίνας (Nussbaumer et al., 2011).

4.1.3 Ανάλυση κυτταροτοξικών παραγόντων σε περιβαλλοντικά δείγματα

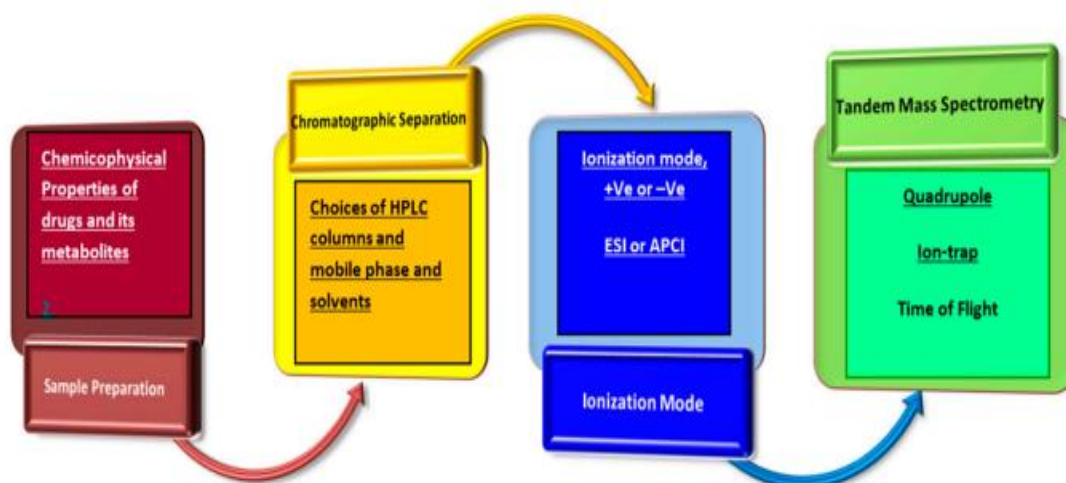
Η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων σε ασθενείς οδηγεί στην αποβολή σημαντικών ποσοτήτων τοξικών ουσιών στα ούρα και κατά συνέπεια στο σύστημα αποχέτευσης. Αυτές οι ουσίες μπορεί να είναι επιβλαβείς τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον. Συνεπώς, είναι σημαντικό να πραγματοποιείται ανάλυση των κυτταροτοξικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε νοσοκομειακά λύματα και λύματα δειγμάτων. Χρήσιμες αναλυτικές τεχνικές για το σκοπό αυτό μπορεί να είναι η ICP-MS για ενώσεις πλατίνας, CE-UV για φθοριοουρακίλη, LC με ανίχνευση φθορισμού για ανθρακυκλίνες και LC-MS/MS για αντιμεταβολίτες και άλλες κυτταροτοξικές ενώσεις (Nussbaumer et al., 2011).

Επιπλέον, απαραίτητος κρίνεται και ο εντοπισμός υπολειμμάτων των αντικαρκινικών φαρμάκων στο περιβάλλον, ειδικά σε επιφάνειες (π.χ. πάγκους εργασίας ή εξοπλισμό). Για τον λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες διαδικασίες συλλογής και ανάλυσης δειγμάτων, όπως οι τεχνικές σκουπίσματος (*wipe sampling*), όπου μετά τη συλλογή ακολουθεί ανάλυση με τεχνικές υψηλής ευαισθησίας, όπως η υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), ενώ στη περίπτωση μεγάλου αριθμού διαφορετικών αντικαρκινικών φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι πολλαπλών ενώσεων (*multicompound methods*), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών φαρμάκων (Nussbaumer et al., 2011).

4.2 Επισκόπηση αναλυτικών μεθόδων για συγκεκριμένα κυτταροτοξικά φάρμακα

4.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Γενικά, τα στάδια που απαιτούνται για τις ποσοτικές και βιοαναλυτικές αναλύσεις είναι τρία και περιλαμβάνουν την προετοιμασία του δείγματος, τον διαχωρισμό των αναλυτών σε μια χρωματογραφική στήλη και την ανίχνευσή τους από κατάλληλο ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας. Επιπλέον, είναι σημαντικό η μέθοδος που χρησιμοποιείται να έχει επικυρωθεί, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να χαρακτηρίζονται από ακρίβεια, επιλεκτικότητα, ειδικότητα, επαναληψιμότητα και γραμμικότητα (Sabourian et al., 2020).



Εικόνα 4-1: Βιοανάλυση με χρήση μάζας υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής μάζας (Wong et al., 2018)

Προετοιμασία δείγματος

Το στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων αποτελεί κρίσιμο σημείο της ανάλυσης των αντικαρκινικών φαρμάκων, καθώς η αποτελεσματικότητά του αποτρέπει την καταστολή του σήματος και άρα οδηγεί σε αποτελέσματα μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας [18]. Τα συστατικά των βιολογικών δειγμάτων είναι άπειρα, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, αλάτι και άλλες ενδογενείς και υποστρωμένες ενώσεις, τα οποία μάλιστα συχνά βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Στόχος της προετοιμασίας των δειγμάτων, λοιπόν, είναι η απομόνωση των φαρμάκων από

αυτά τα συστατικά στις διάφορες βιολογικές μήτρες, πρωτού αρχίσει η χρωματογραφική ανάλυση. Επιπλέον, όταν η ουσία που πρόκειται να αναλυθεί βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση ή είναι ασταθής, τότε η ανάγκη για ορθή προετοιμασία του δείγματος γίνεται μεγαλύτερη, προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα πιο ευρέως βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι το πλάσμα, ο ορός και τα ούρα (Sabourian et al., 2020).

Οι τρεις κύριες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), ή καταβύθιση πρωτεΐνης (PPT) (Wong et al., 2018).

Κατά τη SPE αξιοποιείται η συγγένεια μεταξύ των επιθυμητών ουσιών που είναι διαλυμένες σε ένα υγρό (κινητή φάση) και μιας στερεάς μήτρας (στατική φάση). Συγκεκριμένα, ένα δείγμα περνά μέσα από μια στήλη ή ένα φυσίγγιο που περιέχει μια στερεά μήτρα. Κατά τη διάρκεια της διέλευσης αυτής, οι επιθυμητές ουσίες αιχμαλωτίζονται ή απορροφώνται από τη στερεά μήτρα, ενώ οι μη επιθυμητές ουσίες παραμένουν στο διάλυμα, αφού έχουν τη μικρότερη συγγένεια με τη στερεά μήτρα. Στη συνέχεια, οι επιθυμητές ουσίες εκχυλίζονται από τη στερεά μήτρα με τη χρήση ενός άλλου διαλύτη, στον οποίο οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα (Wong et al., 2018).

Ο διαχωρισμός ενώσεων μέσω της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE) βασίζεται στη σχετική διαλυτότητα αυτών σε δυο υγρά, τα οποία δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους και συχνά πρόκειται για υδατικά ή βιορευστά δείγματα και έναν οργανικό διαλύτη όπως εξάνιο ή αιθέρες. Ουσιαστικά, μια ουσία ενός υγρού εξάγεται σε μια άλλη υγρή φάση, ενώ συνίσταται για λιπόφιλες ενώσεις εξαιτίας της εύκολης μεταφοράς τους από μια υδατική μήτρα σε μια οργανική φάση που εξατμίζεται με OFN (άζωτο χωρίς οξυγόνο) (Wong et al., 2018).

Η καταβύθιση πρωτεΐνης (PPT) αποτελεί μια απλή, οικονομική και γρήγορη μέθοδο προκατεργασίας, καθώς απαιτεί τρία βήματα: προσθήκη διαλύτη καταβύθισης (συνήθως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη), ομογενοποίηση και φυγοκέντρωση, το προϊόν της οποίας είναι έτοιμο για ανάλυση (Wong et al., 2018).

Συγκρίνοντας τις παραπάνω τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων, η LLE αποτελεί μια πιο οικονομική και εύχρηστη τεχνική σε σχέση με τη SPE, ενώ και οι δυο προτείνονται για λιπόφιλα φάρμακα. Η PPT πλεονεκτεί ως προς δυο προηγούμενες, καθώς είναι ιδανική

τόσο για λιπόφιλες όσο και για υδρόφιλες αναλυόμενες ουσίες, ενώ μπορεί να προσδιορίσει συγχρόνως ποικίλα φάρμακα με διαφορετική λιποφιλικότητα ή υδροφιλικότητα αλλά και τους μεταβολίτες τους. Ο ταυτόχρονος αυτός προσδιορισμός καθιστά εφικτή την ποσοτικοποίηση των ουσιών, χρησιμοποιώντας πολύ μικρή ποσότητα δείγματος. Παρά το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου να παράγει μη εντελώς καθαρά εκχυλίσματα που μπορεί να επηρεάσουν την περαιτέρω ανάλυση, αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο προκατεργασίας δειγμάτων ειδικά πριν από ανάλυση HPLC (Wong et al., 2018).

Για την διευκόλυνση του σταδίου της προκατεργασίας των δειγμάτων, συστήνεται να χρησιμοποιείται ένα εσωτερικό πρότυπο. Πρόκειται, ουσιαστικά, για μη ενδογενή ένωση του οποίου οι φυσικοχημικές ιδιότητες μοιάζουν αρκετά με αυτές της ουσίας που αναλύεται (Sabourian et al., 2020).

Χρωματογραφική Ανάλυση

Η χρωματογραφική ανάλυση, και ιδιαίτερα η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, αποτελεί αναμφίβολα την πιο διαδεδομένη τεχνική για ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση φαρμάκων και μεταβολιτών τους, κυρίως λόγω της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Το πιο συχνό είδος της που χρησιμοποιείται είναι HPLC αντίστροφης φάσης, με στατική φάση στήλες C_{18} ή C_8 και κινητή φάση πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα ή οξέα, όπως οξικό ή μυρμηκικό αμμώνιο, οξικό (AA) ή μυρμηκικό οξύ (Sabourian et al., 2020).

Ανιχνευτής

Το φασματόμετρο μάζας (MS) αποτελεί μια εξαιρετική επιλογή ως ανιχνευτής στην ποσοτική ανάλυση LC, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, μπορεί να ανιχνεύει μεγάλο φάσμα ενώσεων υπό την προϋπόθεση ότι έχουν την ικανότητα του ιονισμού. Η αποτελεσματικότητα του MS συνδέεται άμεσα με τη μοριακή δομή της ένωσης, ενώ μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση ενός εσωτερικού προτύπου, το οποίο είναι ένα σταθερό ισοτοπικά επισημασμένο ή παράγωγο του αναλύτη (Stokvis et al, 2005). Για καλύτερη ανάλυση δείγματος, χρησιμοποιείται διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS), όπου πραγματοποιείται σύνδεση δύο ή περισσότερων ανιχνευτών MS. Μπορεί να αποτελείται από φασματόμετρο τριπλής τετραπολικής μάζας (QqQ), τετραπλού χρόνου πτήσης (Q-TOF) ή υβριδικής μάζας (Sabourian et al., 2020).. Το πλεονέκτημα του ανιχνευτή αυτού είναι πως έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τον

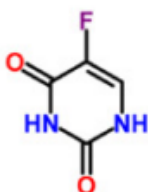
αναλύτη από τα υπόλοιπα συστατικά της μήτρας ακόμη και αν συνυπάρχουν ενδογενείς ενώσεις ή εσωτερικά πρότυπα που ενδεχομένως να συνεκκλύζονται (Wong et al., 2018).

Ένα άλλο είδος ανιχνευτή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην HPLC είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους (UV). Μάλιστα, με έναν πιο ειδικό ανιχνευτή της κατηγορίας αυτής, τον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) είναι εφικτή η καταγραφή πλήρους φάσματος από το UV έως το ορατό (Sabourian et al., 2020). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, η δυσκολία στη προετοιμασία του δείγματος είναι μεγαλύτερη λόγω της ανάγκης για απομάκρυνση των ενδογενών ενώσεων που επηρεάζουν την ανάλυση. Επιπλέον, ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης είναι μεγαλύτερος, καθώς είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των φαρμάκων ή των μεταβολιτών από ενδογενείς και εξωγενείς ενώσεις πρώτου ακολουθήσει η ανίχνευση και η μέτρηση (Wong et al., 2018).

Εφαρμογές

Διάφορες έρευνες έχουν δημοσιευτεί για την ανάλυση των αντιμεταβολιτών. Σημαντικός

5-fluorouracil



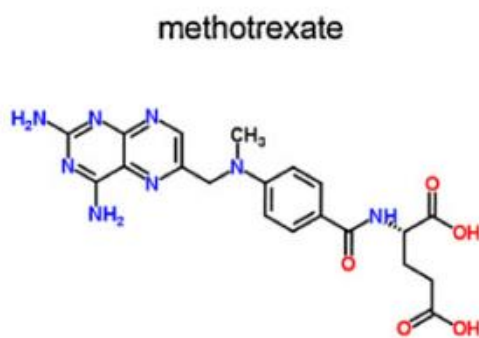
κυτταροτοξικός παράγοντας της κατηγορίας αυτής που χρησιμοποιείται ευρέως για να θεραπευτεί ο καρκίνος του μαστού, του γαστρεντερικού σωλήνα, του παχέος εντέρου και συγκεκριμένων καρκίνων του δέρματος είναι η 5-φθοροουρακίλη (5-FU) (Nussbaumer et al., 2011).

Εικόνα 4-2: Χημική δομή της 5-φθοροουρακίλης (5-FU) (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Casale et al. (2002), στην εργασία τους ανέπτυξαν και επικύρωσαν μια μέθοδο HPLC-UV, κατά την οποία προσδιορίζεται η **5-FU** στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο, ενώ οι

μετρήσεις βοηθούν στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας και της στην αξιολόγηση της τοξικότητας στους ασθενείς. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ισοκρατικές συνθήκες για την πραγματοποίηση της έκλουσης, η οποία παρακολουθήθηκε στα 210 nm σε UV ανιχνευτή. Η κινητή φάση ήταν 1,5 mM ρυθμιστικό διάλυμα K_3PO_4 / CH_3CN 99,5:0,5 (κατ' όγκο) σε pH 5 με ρυθμό ροής 1.0 ml/min και η στατική φάση μια στήλη τύπου C18. Κατά την προκατεργασία του δείγματος, εφαρμόστηκε η τεχνική της καταβύθισης πρωτεΐνης (PPT), όπου προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο και ποσότητα κορεσμένου θεικού αμμωνίου ώστε να καθιζάνουν οι πρωτεΐνες, και στη συνέχεια ακολούθησε στροβιλισμός και φυγοκέντριση. Τέλος, το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν 0.5 g/mL για την 5-FU, η γραμμικότητα από 0.5 έως 100 g/mL και η ακρίβεια σε τιμές αποδεκτές.

Η μεθοτρεξάτη αποτελεί ακόμη ένα παράδειγμα των αντιμεταβολιτών με σημαντική κλινική χρήση, αφού ανταγωνίζεται το φολικό οξύ και έτσι επηρεάζει την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των κυττάρων. Μάλιστα, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του πρωτοπαθούς λεμφώματος του κεντρικού νευρικού συστήματος (PCNSL), αποτελώντας τον βασικό πυλώνα της χημειοθεραπείας για αυτόν τον τύπο λεμφώματος (Danafar et al. 2016).



Εικόνα 4-3: Χημική δομή της μεθοτρεξάτης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Danafar et al. (2016) ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC-ESI-MS για τον προσδιορισμό της μεθοτρεξάτης σε πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Αναλυτικότερα, ως μέθοδος προκατεργασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η καταβύθιση πρωτεΐνης (PPT), ως κινητή φάση μίγμα ακετονιτριλίου/ νερού/ μυρμηκικού οξέος 74:26:1 (v/v) με ρυθμό ροής

στα 0.2 mL/min, ως στατική φάση μια στήλη τύπου C18 και ως ανιχνευτής ένα φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπολικού σε λειτουργία θετικού ιόντος (positive mode), με διεπαφή ESI. Τέλος, η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν μεταξύ 0.1 - 100 ng/mL, το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) βρέθηκε 0.10 ng/mL και το όριο ανίχνευσης 0.05 ng/mL, ενώ η μέθοδος εκτιμήθηκε να έχει καλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια σε αποδεκτά όρια.

Ένας άλλος αντικαρκινικός παράγοντας που ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών είναι η γεμισιταβίνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών, ουροθηλίου, του πνεύμονα, του παγκρέατος και της ουροδόχου κύστης (Sottani et al. 2004).

gemcitabine

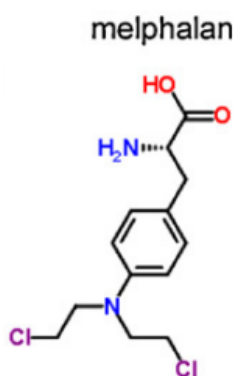


Εικόνα 4-4: Χημική δομή της γεμισιταβίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Sottani et al. (2004) ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό της γεμισιταβίνης σε ούρα ασθενών με καρκίνο. Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της πιθανής έκθεσης στο νοσοκομειακό προσωπικό. Πιο αναλυτικά, η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), προσθέτοντας 2'-δεοξυκυτιδίνη ως εσωτερικό πρότυπο. Ως κινητή φάση στην χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε φορμικό οξύ με ακετονιτρίλιο με ρυθμό ροής στα 0.3 mL/s και ως στατική φάση μια στήλη τύπου C8. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν βαθμωτές συνθήκες για την πραγματοποίηση της έκλουσης, ενώ η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε μέσω διαδοχικού τριπλού τετραπολικού φασματομέτρου μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος (positive mode), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με διεπαφή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Τέλος, το όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της γεμισιταβίνης βρέθηκαν

0.05 mg/L και 0.2 mg/L αντίστοιχα, η γραμμικότητα μεταξύ 0–50 mg/L, ενώ η μέθοδος φάνηκε να είναι ακριβής. Συμπερασματικά, εντοπίστηκε γεμισιταβίνη και μεταβολίτης στα ούρα και έτσι δόθηκε έμφαση για ενισχυμένα μέτρα προστασίας.

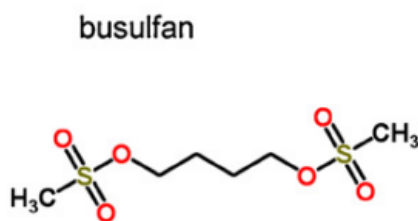
Ποικίλες μελέτες έχουν διεξαχθεί για την ανάλυση των αλκυλιωτικών παραγόντων. Μία σημαντική ένωση της κατηγορίας αυτής είναι η μελφαλάνη, η χρήση της οποίας έγκειται στην αντιμετώπιση κατά του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, των όρχεων και των ωοθηκών, του πολλαπλού μυελώματος, κακοηθούς λεμφώματος, σαρκώματος και λευχαιμίας (Nath et al. 2008).



Εικόνα 4-5: Χημική δομή της μελφαλάνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Nath et al. (2008), στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-UV για τον προσδιορισμό **μελφαλάνης** στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Σκοπός της εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της δοσολογίας για εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καθίζησης πρωτεϊνών με μεθανόλη, ενώ στην χρωματογραφική ανάλυση η κινητή φάση ήταν μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικού νατρίου (0,016 M, pH 3,75) και ακετονιτρίλιου με ρυθμό ροής στο 1 mL min⁻¹, η στατική φάση ήταν μια στήλη τύπου C18 με ανιχνευτή UV στα 264 nm. Τέλος, η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν μεταξύ 0.5 - 40 μg mL⁻¹, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε στο 0.1 μg mL⁻¹, το όριο ποσοτικοποίησης στο 0.5 μg mL⁻¹ και η ακρίβεια σε ικανοποιητικά επίπεδα. Τελικά, βρέθηκε πως η ποσότητα του φαρμάκου στο αίμα των ασθενών μετά τη χορήγηση διαφοροποιούνταν, ακόμη κι αν η δόση ήταν η ίδια.

Ένας άλλος σημαντικός ακτυλιωτικός παράγοντας στο πεδίο της χημειοθεραπείας είναι η βουσουλφάνη, η οποία χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση κατά της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Peris et al., 1999).



Εικόνα 4-6: Χημική δομή της βουσουλφάνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Peris et al. (1999), δημοσίευσαν μία μέθοδο HPLC- Fluorescence που ανέπτυξαν για τον προσδιορισμό της **βουσουλφάνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν βάση μεθόδου καταβύθισης πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και μεθυλενοχλωρίδιο, και προσθήκη [1,5-δισ(μεθανοσουλφονυλοξυ)πεντάνιο] ως εσωτερικό πρότυπο. Όσον αφορά τη χρωματογραφική ανάλυση, ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα ρυθμιστικού οξικού οξέος (100 mM, pH 5) με ακετονιτρίλιο με ρυθμό ροής 1 ml/min, ως στατική φάση μία στήλη τύπου C8, ενώ η αναλυόμενη ουσία και το εσωτερικό πρότυπο παραγωγοποιήθηκαν με 8-μερκαπτοκινολίνη ώστε οι φθορίζουσες ενώσεις που θα προκύψουν να ανιχνευτούν με ανιχνευτή φθορισμού εξοπλισμένο με φίλτρα 360 nm για τη διέγερση και 426 nm για την εκπομπή. Τέλος, η γραμμικότητα της μεθόδου κυμαινόταν από 20 έως 2000 ng/ml, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης 9 ng/ml και 20 ng/ml, αντίστοιχα.

Ακόμη ένας κυτταροτοξικός παράγοντας της κατηγορίας αυτής είναι η σισπλατίνη. Η σισπλατίνη αποτελεί ένα φάρμακο που βασίζεται σε πλατίνη και χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του όρχεως, των ωοθηκών, του πνεύμονα, και του κεφαλιού και του λαιμού. Ο βασικός μηχανισμός δράσης της είναι η δημιουργία διασυνδέσεων με τα άτομα αζώτου στο DNA, οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου και οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα στον θάνατο (Bell et al., 2006).

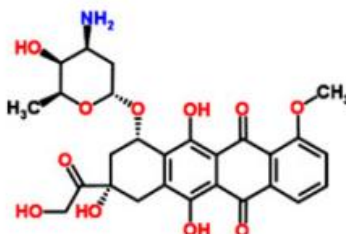
cisplatin

**Εικόνα 4-7: Χημική δομή της σισπλατίνης (Nussbaumer et al., 2011)**

Οι Bell et al. (2006) στην εργασία τους ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC-ICP-MS για τον προσδιορισμό της **σισπλατίνης** σε ανθρώπινο πλάσμα υπερδιήθησης και σε υπερδιηθημένο μέσο καλλιέργειας κυττάρων. Η κινητή φάση που χρησιμοποίησαν ήταν μίγμα δωδεκυλοθειικού νατρίου και μεθανόλης, ρυθμισμένο με τριφλικό οξύ σε pH 2,5 με ρυθμό ροής 0.5 mL/min, ενώ η στατική φάση μια στήλη τύπου C18. Ο ιονισμός των δειγμάτων έγινε με ICP και η ανίχνευση έγινε με φασματομετρία μάζας (ICP-MS). Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν 0.05–8 μM , το όριο ποσοτικοποίησης βρέθηκε στο 0.1 μM , ενώ η μέθοδος φάνηκε να είναι αξιόπιστη.

Μια αντικαρκινική ανθρακυκλίνη που χρησιμοποιείται κατά τη χημειοθεραπεία είναι η δοξορουβικίνη, και μάλιστα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αντιμετώπιση πολλών τύπων καρκίνου, από συμπαγείς όγκους μέχρι λευχαιμία, ενώ ανιχνεύεται στο πλάσμα, στα ούρα και σε καλλιέργειες κυττάρων (Katzenmeyer et al., 2010).

doxorubicin

**Εικόνα 4-8: Χημική δομή της δοξορουβικίνης (Nussbaumer et al., 2011)**

Οι Katzenmeyer et al. (2010) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-LIF-MS για τον χαρακτηρισμό της **δοξορουβικίνης** και των μεταβολιτών της στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Στην περίπτωση αυτή, συνδυάστηκαν δυο διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης: **Ανίχνευση με Laser-Induced Fluorescence (LIF)** για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μεταβολικών ενώσεων σε δείγματα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ είναι ιδανική για την ποσοτική ανάλυση φθοριστικών ξενοβιοτικών ουσιών, όπως για παράδειγμα οι ανθρακυκλίνες, οι οποίες εκπέμπουν φως (φθορίζουν) όταν εκθέτονται σε laser και **Ανίχνευση με Φασματομετρία Μάζας (MS)** σε λειτουργία θετικού ιόντος για την ταυτοποίηση των μεταβολικών ενώσεων που έχουν ανιχνευθεί με τη LIF. Ως μέθοδος προκατεργασίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η SPE με προσθήκη εσωτερικού προτύπου, η κινητή φάση ήταν μίγμα νερού/ακετονιτριλίου σε ισοκρατικές συνθήκες και με ρυθμό ροής στα 3.5 mL/min και η στατική φάση ήταν μια στήλη τύπου C18. Η γραμμικότητα της μεθόδου κυμαινόταν μεταξύ 2 και 50 μM , το όριο ανίχνευσης ήταν 2.0 μM ή 1.0×10^{-12} moles και η ακρίβεια αρκετά υψηλή.

Η δαουνορουβικίνη αποτελεί ακόμη έναν σημαντικό κυτταροτοξικό παράγοντα που ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλινών, η οποία ενδείκνυται κυρίως για την αντιμετώπιση οξέων λεμφωμάτων και σαρκωμάτων (Łukawska et al., 2009).



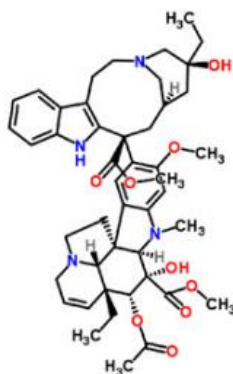
Εικόνα 4-9: Χημική δομή της δαουνορουβικίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Akrofure et al. (1982) ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-Fluorescence-EC για τον προσδιορισμό της **δαουνορουβικίνης** σε πλάσμα καρκινοπαθών. Με αυτή τη μέθοδο, τα δείγματα δεν χρειάστηκε να υποβληθούν σε κάποια προκαταρκτική επεξεργασία πριν την ανάλυση, παρά μόνο η προσθήκη αδριαμυκίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Όσον αφορά τις χρωματογραφικές συνθήκες, η έκλουση πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με κινητή φάση

μίγμα ακετονιτριλίου-νερού-οξικού οξέος με ρυθμό ροής 2 ml/min και στατική φάση μια στήλη τύπου C18. Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή φθορισμού και αμπερομετρικό ανιχνευτή διαδοχικά. Το εύρος γραμμικότητας της μεθόδου ήταν 15-150 ng/ml, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν μικρότερο από 2 ng/ml και μικρότερο από 10 ng/ml αντίστοιχα.

Η βινβλαστίνη είναι ένα αλκαλοειδές βίνκα που έχει απομονωθεί από το δικοτυλήδοιο φυτό *Catharanthus roseus* της Μαδαγασκάρης (Achanta et al., 2013). Η ουσία αυτή έχει ενδιαφέρον ως αντικαρκινικός παράγοντας, καθώς είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της λευχαιμίας, του καρκίνου του μαστού, του ήπατος, των ωθηκών, της κεφαλής και του τραχήλου, των όρχεων, συμπαγούς σαρκόματος (Zhang et al., 2018).

vinblastine

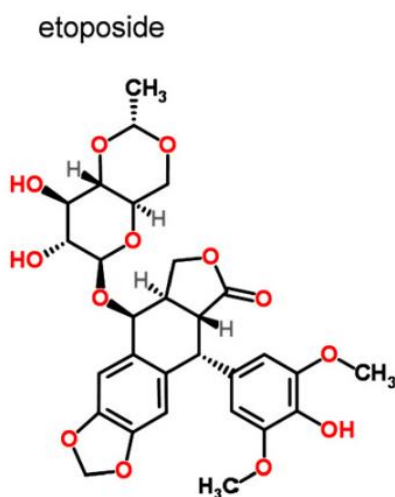


Εικόνα 4-10: Χημική δομή της βινβλαστίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Achanta et al. (2013) ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-APCI-MS/MS για τον προσδιορισμό της βινβλαστίνης σε δείγματα πλάσματος και ούρων. Τα δείγματα προκατεργάστηκαν με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης και προστέθηκε βινορελβίνη ως εσωτερικό πρότυπο, ενώ η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε ισοκρατικές συνθήκες. Η κινητής φάση της χρωματογραφικής ανάλυσης αποτελούνταν από μίγμα οξικού αμμωνίου- μεθανόλης ρυθμισμένο σε pH 3,5 με ρυθμό ροής 0.75 mL/min και η στατική φάση μία στήλη PFP (pentafluorophenyl). Ως μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιήθηκε ο ιοντισμός με Χημική Διέγερση σε Ατμοσφαιρική Πίεση, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία, και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτές διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Το εύρος γραμμικότητας κυμαινόταν από 0.126–100 ng/mL στο

πλάσμα και 1–2000 ng/mL στα ούρα, ενώ το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκαν 0.45 και 0.126 ng/mL αντίστοιχα και στις δυο μήτρες.

Η ετοποσίδη αποτελεί έναν αναστολέα της ενζυμικής δραστηριότητας της τοποϊσομεράσης II. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργεί ένα τριμερές σύμπλοκο με το ένζυμο και το DNA, το οποίο οδηγεί σε θραύσματα του δίκλωνου μορίου που δεν μπορεί να επιδιορθωθούν από το ένζυμο, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η είσοδος του κυττάρου στη μιτωτική φάση της κυτταρικής διαίρεσης, επηρεάζοντας έτσι τη διπλασιαστική του ικανότητα. Ως εκ τούτου, εμποδίζεται η σύνθεση του DNA και άρα η εξάπλωση του καρκίνου. Ο αντικαρκινικός αυτός παράγοντας χρησιμοποιείται ευρύτατα στην θεραπεία του καρκινώματος των όρχεων, του μικροκυτταρικού και μη καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του γαστρικού, των ωοθηκών, της οξείας λευχαιμίας, λεμφωμάτων και σαρκώματος Kaposi (Algan et al., 2016).



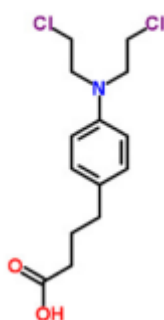
Εικόνα 4-11: Χημική δομή της ετοποσίδης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Algan et al. (2016) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-DAD για τον προσδιορισμό της **ετοποσίδης** σε εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα και πολυμερείς σωληνωτούς νανοφορείς. Σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος σταθερότητας του φαρμάκου υπό διαφορετικές συνθήκες, όπως αλλαγή θερμοκρασίας, pH, υγρασία κ.α. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν υπό συνθήκες στρες, δηλαδή υπέστησαν οξείδωση, θερμική αποσύνθεση, έκθεση σε υπεριώδεις ακτίνες UV και έλεγχος της σταθερότητας λύσης τους. Για την χρωματογραφική ανάλυση, ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα

ακετονιτριλίου και φωσφορικού ανιόντος σε ισοκρατικές συνθήκες με ρυθμό ροής 1 mL/min και ως στατική φάση μια στήλη τύπου C18, ενώ η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων DAD. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ 0.2 και 100 g / mL, το όριο ανίχνευσης στο 0.015 g/mL, το όριο ποσοτικοποίησης στο 0.045 g/mL και η ακρίβεια αρκετά υψηλή. Εν τέλει, επιβεβαιώθηκε η σταθερότητα του φαρμάκου στις διάφορες συνθήκες στις οποίες υποβλήθηκε.

Η χλωρομπουκίλη (CLB) αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο, το οποίο χημικά είναι γνωστό ως 4-(4-(δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο)φαινύλιο)βουτανικό οξύ. Η κατηγορία στην οποία εντάσσεται είναι αυτή των αλκυλιωτικών παραγόντων, και συγκεκριμένα των αζωτούχων μoustάρδων. Δεσμεύεται στο DNA των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας διασταυρωτές συνδέσεις και αναστολή της αντιγραφής. Ως αποτέλεσμα είναι ο κατακερματισμός του DNA, η εσφαλμένη μεταγραφή του mRNA και, τελικά, η παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης. Η CLB χρησιμοποιείται για τη θεραπεία χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL) (Lipska et al., 2021).

chlorambucil

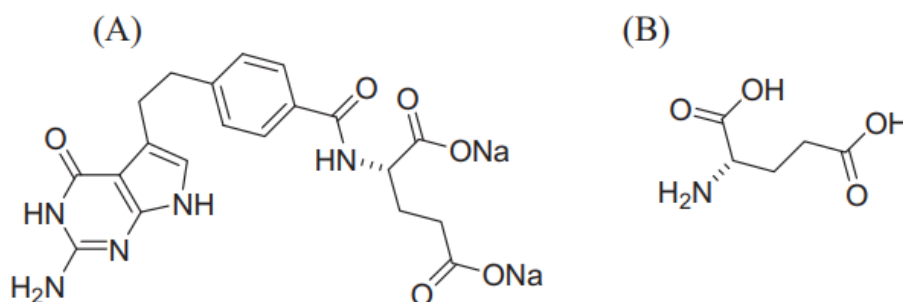


Εικόνα 4-12: Χημική δομή της χλωρομπουκίλης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Lipska et al. (2001) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο HPLC-UV για την ανίχνευση της **χλωραμπουκίλης** σε δείγματα πλάσματος. Συγκεκριμένα, τα δείγματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο της καταβύθισης πρωτεΐνης (PPT), κάνοντας χρήση μεθανόλης, ενώ πραγματοποιήθηκε προσθήκη μεφαιναμικού οξέος ως εσωτερικό πρότυπο. Όσον αφορά τη χρωματογραφική ανάλυση, η κινητή φάση περιείχε ακτονιτρίλιο, νερό και μυρμηκικό οξύ με ρυθμό ροής 1.0 mL/min και η στατική φάση ήταν μια στήλη LiChrospher® 100 RP18, end-capped. Η ανίχνευση έγινε στα 258 nm,

δηλαδή στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV, σε θερμοκρασία περίπου 23°C). Τέλος, η γραμμικότητα βρέθηκε μεταξύ του εύρους 0.075-15 µg/mL, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι 0.024 µg/mL και το όριο ποσοτικοποίησης βρέθηκε να είναι 0.075 µg/mL, δείχνοντας ότι η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη.

Η πεμετρεξέδη αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως μονοθεραπεία είτε συνδυαστικά με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Συγκεκριμένα, συνδυάζεται με την σιπλατίνη (cisplatin) για την αντιμετώπιση του κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος, όταν η χειρουργική επέμβαση είναι ανέφικτη ή δεν υπάρχει άλλη θεραπευτική επιλογή. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία για τη θεραπεία τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), όταν η αρχική (πρώτης γραμμής) θεραπεία δεν έχει αποδώσει το επιθυμητό αποτέλεσμα ή ως θεραπεία συντήρησης μετά την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας, για να βοηθήσει στον έλεγχο της νόσου (Respaud et al., 2011)



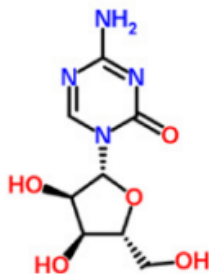
Εικόνα 4-13: Χημική δομή της πεμετρεξέδης (A) και του L-γλουταμινικού οξέος (B)
(Respaud et al., 2011)

Οι Respaud et al. (2011) στην εργασία τους επικύρωσαν μια μέθοδο HPLC-UV-ELSD για την ποσοτικοποίηση της **πεμετρεξέδης** και την ανίχνευση του L-γλουταμινικού οξέος, ως προϊόν αποδόμησής της, σε φαρμακευτικά σκευάσματα με στόχο τον έλεγχο της σταθερότητας. Πιο αναλυτικά, πρόκειται για μια μέθοδο αντίστροφης φάσης με ιοντική σύζευξη (ion-pairing, reversed-phase), όπου ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε μια στήλη τύπου C12 ειδικά σχεδιασμένη για αντίστροφη φάση (reversed-phase) και ως κινητή φάση διάλυμα οξέος τριδεκαφθοροεπτανοϊκού (1 mM) σε νερό και ακετονιτρίλιο, ενώ η έκλυση ήταν βαθμωτή για τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ πεμετρεξέδης και

γλουταμικού οξέος. Όσον αφορά την ανίχνευση, η πεμετρεξέδη ανιχνεύεται με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) στα 254 nm, καθώς η ουσία απορροφά το UV φως σε αυτό το μήκος κύματος, ενώ το L-γλουταμικό οξύ ανιχνεύεται με ανιχνευτή σκέδασης εξατμιζόμενου φωτός (ELSD), ο οποίος είναι κατάλληλος για ενώσεις που δεν απορροφούν UV φως και δεν έχουν ισχυρή χρωμοφόρο ομάδα. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι από 0.4 έως 0.6 mg/mL για την πεμετρεξέδη και από 0.005 έως 0.025 mg/mL για το L-γλουταμικό οξύ, και το όριο ανίχνευσης για το L-γλουταμικό οξύ στο 0.0018 mg/mL.

Η 5-Αζακυτιδίνη (5AC) αποτελεί άλλο ένα αντικαρκινικό φάρμακο της οικογένειας των αντιμεταβολιτών που χρησιμοποιείται ευρύτατα. Συγκεκριμένα, είναι ανάλογο νουκλεοσιδίου και παράγοντας υπομεθυλίωσης και έχει εγκριθεί με στόχο τη θεραπεία και των πέντε μορφών μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (MDS). Συχνά, η χορήγησή της γίνεται υποδορίως συνδυαστικά με φαινυλβουτυρική για τη θεραπεία είτε συμπαγών όγκων είτε αιματολογικών κακοηθειών (Zhao et al., 2004).

azacitidine



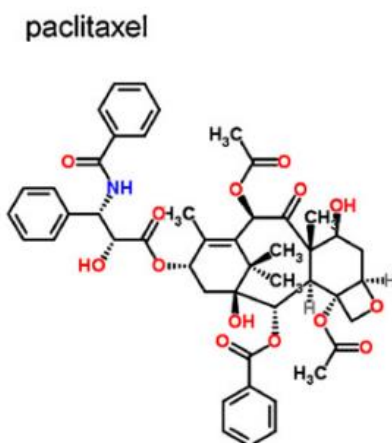
Εικόνα 4-14: Χημική δομή της 5-Αζακυτιδίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Zhao et al. (2004) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS για την ποσοτικοποίηση της **5-Αζακυτιδίνης** σε δείγματα πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη C18, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού αμμωνίου με μυρμηκικό οξύ και μεθανόλη. Επιπλέον, ο φασματογράφος μαζών χρησιμοποίησε μια πηγή ιονισμού που ονομάζεται ηλεκτροψεκαστήρας (ESI), η λειτουργία του οποίου γίνεται με θετικό τρόπο (ανίχνευση θετικά φορτισμένων ιόντων). Όσον αφορά τα δείγματα, η προκατεργασία τους έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE), ενώ προστέθηκε 5-μεθυλ-2-δεοξυκυτιδίνη ως εσωτερικό

πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ 5 και 500 ng/mL και το όριο ποσοτικοποίησης στα 5 της 5-Αζακυτιδίνης ng/mL.

Οι Li et al. (2016) στην εργασία τους μελέτησαν μια μέθοδο HPLC-FD για την ανίχνευση της **6-μερκαπτοπουρίνης** σε δείγματα ανθρώπινων ούρων. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης Synergi Hydro-RP και μείγμα μεθανόλης και νερού ως κινητή φάση. Επιπλέον, η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE), ενώ η αδενίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ του εύρους 0.0615- 2.40 $\mu\text{g L}^{-1}$, και το όριο ανίχνευσης στα 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Ένας άλλος σημαντικός κυτταροτοξικός παράγοντας που αξίζει να αναφερθεί είναι η πακλιταξέλη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των ταξανών και δρα ως αντισωληνίσκος παράγοντας. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά πολύπλοκο τετρακυκλικό διτερπένιο, το οποίο απομονώνεται από τις βελόνες και το φλοιό του Δυτικού Ύξου (*Taxus brevifolia*), ένα είδος δέντρου που βρίσκεται στην περιοχή του Ειρηνικού Ωκεανού (Nussbaumer et al., 2011). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών, του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου των πνευμόνων και του καρκίνου του κεφαλιού και του τραχήλου, ενώ στις κύριες παρενέργειες που προκαλεί συμπεριλαμβάνονται η καταστολή του μυελού των οστών και η βλάβη στο έμβρυο εάν χορηγηθεί σε έγκυο γυναίκα (Larson et al., 2003).



Εικόνα 4-15: Χημική δομή της πακλιταξέλης (Nussbaumer et al., 2011)

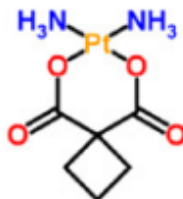
Οι Larson et al. (2003) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-UV για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πέντε αντικαρκινικών φαρμάκων: **5-φθοροουρακίλη**,

ιφωσφαμίδη, κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη και πακλιταξέλη σε δείγματα αέρα και επιφανειών, με στόχο την εκτίμηση του γενικού κινδύνου της υγείας των εργαζομένων στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης, λόγω της έκθεσης σε αυτά τα φάρμακα. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε ένας υγρός χρωματογράφος αντιστροφής φάσης εξοπλισμένος με ανιχνευτή UV-VIS, όπου η στατική φάση ήταν μια στήλη C8, η κινητή φάση ήταν διάλυμα ακετονιτριλίου με νερό ρυθμισμένο σε pH 6.0 και το μήκος κύματος της ανίχνευσης UV στα 195 nm (σε αυτό το μήκος κύματος παρατηρείται ισχυρή απορρόφηση και των πέντε φαρμάκων). Τέλος, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε στο 0.5 $\mu\text{g/mL}$ για την 5-φθοροουρακίλη, ιφωσφαμίδη, κυκλοφωσφαμίδη και δοξορουβικίνη, ενώ για την πακλιταξέλη στα 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

Οι Qian et al. (2011) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS για τον προσδιορισμό της **βινορελβίνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία αντιστροφής φάσης συνδυαστικά με διαδοχική φασματομετρία μάζας και ιονισμό εκνεφωτή (ESI-MS/MS), ενώ η ανίχνευση MS/MS πραγματοποιήθηκε σε θετική λειτουργία. Όσον αφορά τα δείγματα, αυτά προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο υγρής-υγρής εκχύλισης (LLE) μίας φάσης με τη χρήση μεθυλο-τριτοταγούς βουτυλαιθέρα, και παράλληλα έγινε προσθήκη βινβλαστίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Η στατική φάση ήταν μια στήλη Spursil C18, ενώ η κινητή φάση ήταν μίγμα ακετονιτριλίου και μυρμηκικού αμμωνίου σε pH 3,0 σε σταθερή σύσταση. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ του εύρους 0,1–200 ng/mL και το όριο ποσοτικοποίησης στο 0,1 ng/mL.

Η καρβοπλατίνη [2,3] (cis-διαμίνη-1,1-κυκλοβουτάνιο-δικαρβοξυλικό-πλατίνα(II)) αποτελεί ένα παράγωγο της σισπλατίνης, το οποίο σε αντίθεση με άλλα χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου παγκοσμίως, και συγκεκριμένα για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του πνεύμονα. Συγκρίνοντας τα δυο μόρια, η καρβοπλατίνη τείνει να προτιμάται έναντι της σισπλατίνης, επειδή είναι λιγότερο αντιδραστική λόγω της σταθερότητας του καρβοξυλικού προσδέματος της σε σχέση με το χλωριούχο προσδέμα της σισπλατίνης και επειδή προκαλεί λιγότερη νεφροτοξικότητα και έχει πιο έντονη μυελοκαταστολή (Küng et al., 2001).

carboplatin

**Εικόνα 4-16:** Χημική Δομή της καρβοπλατίνης (Nussbaumer et al., 2011)

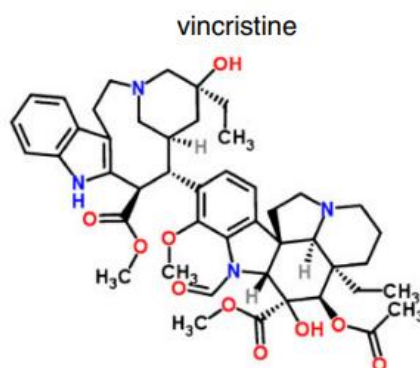
Οι Zufia et al. (2001) στην εργασία τους ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC-UV για τον προσδιορισμό της **καρβοπλατίνης** σε δείγματα πλάσματος. Χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος συνδυαστικά με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, όπου η στατική φάση ήταν μία στήλη Inertsil ODS-2, η κινητή φάση αποτελούνταν από διυδρογονοφωσφορικό κάλιο και διποτασικό EDTA, ρυθμισμένο σε pH μεταξύ 3 και 3.5, ενώ η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 229 nm. Η μόνη προετοιμασία που απαιτήθηκε για τα δείγματα ήταν η υπερδιήθηση μέσω του μικροδιαχωριστικού συστήματος. Τέλος, το εύρος γραμμικότητας της μεθόδου βρέθηκε να κυμαίνεται από 3 έως 350 mg/L, το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 1 mg/L και το όριο ανίχνευσης ήταν 0.5 mg/L.

Οι He et al. (2003) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο HPLC-ESI-MS για την ανίχνευση της **προκαρβαζίνης** σε δείγματα πλάσματος. Αναλυτικότερα, η στατική φάση ήταν μια στήλη C-18, η κινητή φάση ήταν μίγμα μεθανόλης και ρυθμιστικού οξικού αμμωνίου σε pH 5,1 και το φασματόμετρο μάζας ήταν τύπου μονό-τετραπολικό, το οποίο λειτουργούσε με θετική ιοντοποίηση, χρησιμοποιώντας το σύστημα εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καθίζησης των πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ και στη συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα χωρίς πρωτεΐνες εκπλύθηκε με μεθυλο-τριτοταγή βουτυλαιθέρα, ενώ προστέθηκε και 3-διμεθυλαμινο-2-μεθυλοπροπιοφαινόνη ως εσωτερικό πρότυπο. Τέλος, η γραμμικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 0,5 έως 50 ng/ml, το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 0,5 ng/ml και το όριο ανίχνευσης ήταν 25 pg στην στήλη χρωματογραφίας.

Οι Koellensperger et al. (2010) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-ICP-MS για τον προσδιορισμό της **οξιπλατίνης** σε ανθρώπινα δείγματα ούρων. Χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση μια στήλη C18 και ως κινητή φάση μίγμα νερού, μεθανόλης και μυρμηκικού οξέος, ενώ ο ιονισμός πραγματοποιήθηκε με αργό πλάσμα. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, η μόνη διεργασία που απαιτήθηκε ήταν αραίωση με υπερκαθαρό νερό. Τέλος, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 0.05 µg/L οξαλιπλατίνης (150 fg στη στήλη) και το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 0.17µg/L.

Οι Pujari et al. (1997) στην εργασία τους μελέτησαν μια μέθοδο HPLC-ECD για τον προσδιορισμό του **υδροξυκαρβαμιδίου** σε δείγματα πλάσματος και περιτοναϊκού υγρού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (HPLC) με ηλεκτροχημική ανίχνευση, όπου η στατική φάση ήταν μια στήλη C18, η κινητή φάση αποτελούνταν από υπερχλωρικό νάτριο–μεθανόλη ρυθμισμένο σε pH 5,0 σε ισοκρατικές συνθήκες και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα σε δυναμικό +800 mV. Και τα δυο είδη δειγμάτων προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο καθίζησης πρωτεϊνών με χρήση ακετονιτριλίου. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι από 25 έως 400 ng/ml στο πλάσμα και 5 έως 30 ng/ml στο περιτοναϊκό υγρό, ενώ το όριο ανίχνευσης ήταν 2 ng/ml και 5 ng/ml, αντίστοιχα.

Άλλος ένας κυτταροτοξικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία του καρκίνου είναι η βινκριστίνη. Η βινκριστίνη ανήκει στην οικογένεια των αλκαλοειδών της βίνκα και βρίσκεται στο φυτό *Catharanthus roseus*. Δρα ως αντισωληνίσκος παράγοντας, προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ωστόσο προκαλεί και σοβαρές παρενέργειες, κυρίως νευροτοξικότητα. Συνήθως, η χορήγησή της γίνεται συνδυαστικά με άλλα φάρμακα, όπως κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη και πρεδνιζόνη, μεθοτρεξάτη ή προκαρβαζίνη και δακαρβαζίνη (Škubník et al., 2021).



Εικόνα 4-17: Χημική Δομή της βινκριστίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Nussbaumer et al. (2010) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC–ESI–MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δέκα αντικαρκινικών φαρμάκων σε φαρμακευτικό σκεύασμα, **κυταραβίνη, γεμισιταβίνη, μεθοτρεξάτη, φωσφορική ετοποσίδη, κυκλοφωσφαμίδη, ιφωσφαμίδη, ιρινοτεκάνη, δοξορουβικίνη, επιρουβικίνη και βινκριστίνη**. Με άλλα λόγια, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης, το οποίο είχε συνδεθεί με διαδοχικό φασματομέτρο μάζας τριπλού τετράπολου που ήταν εξοπλισμένο με διεπαφή ηλεκτρονικού ψεκασμού (ESI). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε μια στήλη C18, ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από τρία διαλύματα, και συγκεκριμένα υπερκαθαρό νερό (διάλυμα Α), ακετονιτρίλιο (διάλυμα Β) και φορμικό οξύ (διάλυμα Γ). Η φασματομετρία μάζας (MS/MS) πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) σε θετική λειτουργία, χρησιμοποιώντας αργόν ως αέριο σύγκρουσης. Επιπλέον, για αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια, προστέθηκε [^{13}C , $^2\text{H}_3$]-μεθοτρεξάτη ως εσωτερικό πρότυπο. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα εύρη της γραμμικότητας, τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης:

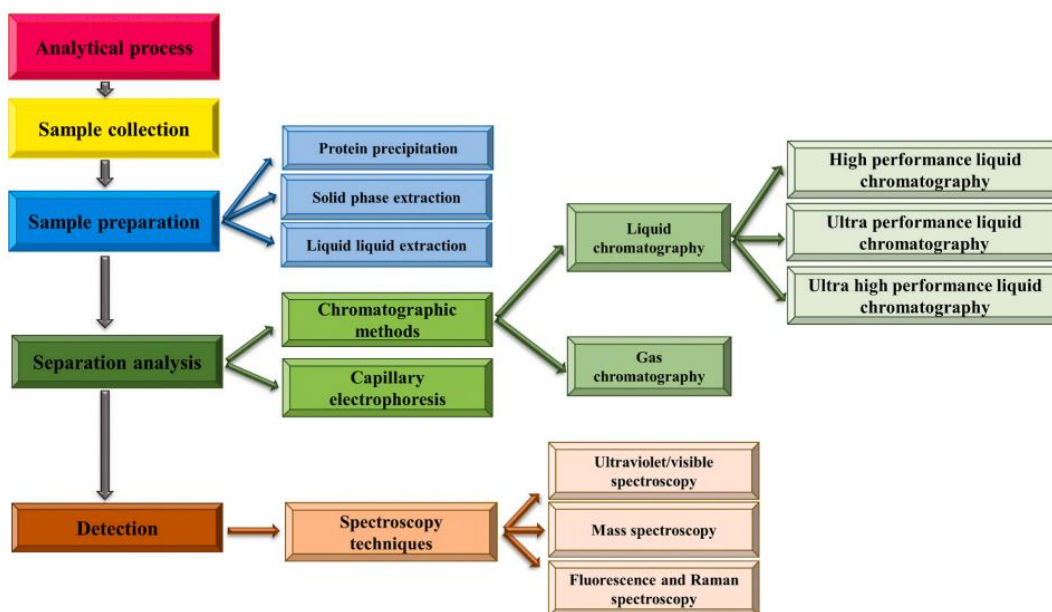
	Γραμμικότητα (ng/mL)	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) (ng/mL)	Όριο ανίχνευσης (LOD) (ng/mL)
Κυταραβίνη	1–200	0.25	0.025
Γεμισιταβίνη	1–200	0.5	0.25
Μεθοτρεξάτη	1–200	0.25	0.01
Φωσφ. ετοποσίδη	1–200	1	0.5

Κυκλοφωσφαμίδη	1–200	1	0.25
Ισοσφαμίδη	1–200	0.5	0.25
Ιρινοτεκάνη	1–200	1	0.025
Δοξορουβικίνη	2–200	2	0.5
Επιρουβικίνη	2–200	2	0.5
Βινκριστίνη	1–200	1	0.25

Πίνακας 1

Οι Kim et al. (2000) στην εργασία τους επικύρωσαν μια μέθοδο HPLC-UV για τον προσδιορισμό της **τεμοζολομίδης** σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Πιο αναλυτικά, η στατική φάση ήταν μια στήλη C18, κατάλληλη για αντίστροφης φάσης χρωματογραφία, η κινητή φάση ήταν ένα μίγμα οξικού οξέος σε νερό και ακετονιτριλίου, και η ανίχνευση έγινε στα 316 nm. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο υγρής-υγρής εκχύλισης, όπου η εξαγωγή έγινε με αιθυλοακετάτη και έγινε προσθήκη αιθαζολασόνης ως εσωτερικό πρότυπο. Τέλος, η γραμμικότητα της μεθόδου είχε εύρος 0,1–20 mg/ml και το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 0,1 mg/ml.

4.2.2 Αέρια χρωματογραφία (GC)



Εικόνα 4-18: Στάδια ανάλυσης αντικαρκινικών φαρμάκων (Safaei et al., 2021)

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια ακόμη χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων και είναι ιδανική για αέρια δείγματα, για πτητικά οργανικά υγρά, καθώς και για στερεά δείγματα που περιέχουν πτητικές ενώσεις υπό κατάλληλη προεπεξεργασία, σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία που είναι ιδανική για θερμικά μη σταθερά και μη πτητικά δείγματα (Safaei et al., 2021).

Προετοιμασία δείγματος

Ομοίως με την υγρή χρωματογραφία, η προετοιμασία του δείγματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάλυση των δειγμάτων και κατά την αέρια χρωματογραφία, με στόχο τον προσδιορισμό υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, ενώ χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές προκατεργασίας (SPE, LLE, PPT) (Safaei et al., 2021).

Χρωματογραφική Ανάλυση

Η αέρια χρωματογραφία απαιτεί τα δείγματα να έχουν σημαντική πίεση ατμού σε θερμοκρασίες μεταξύ 30 και 300 °C, και έτσι να μπορούν να εξατμίζονται εύκολα σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών ώστε να μπορούν να αναλυθούν. Ωστόσο, η GC είναι δύσχρηστη για ουσίες που δεν είναι αρκετά πτητικές. Ως αποτέλεσμα, πολλές από τις φαρμακευτικές ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία οδηγούνται σε παραγωγή, μια διαδικασία αύξησης της πτητικότητας των ενώσεων με στόχο να μπορούν να αναλυθούν (Safaei et al., 2021).

Ανίχνευση

Για την ανίχνευση ουσιών μετά από GC χρησιμοποιούνται μέθοδοι φασματοσκοπίας, όπου χρησιμοποιείται η αλληλεπίδραση μεταξύ της ύλης και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για την μέτρηση και την ανάλυση των συστατικών ενός μίγματος, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των ουσιών. Τέτοιες μέθοδοι αποτελούν:

- UV/Vis που δίνει αποτελέσματα αξιόπιστα και γρήγορα,
- Φθορισμός που είναι ιδανικός για ποσοτικοποίηση μικροδειγμάτων δίνοντας αποτελέσματα υψηλής ευαισθησίας,
- Φασματοσκοπία Raman, και ιδιαίτερα η Φασματοσκοπία Raman Enhanced Surface-Enhanced (SERS) που συμβάλλει στην παρακολούθηση της

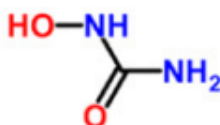
αποτελεσματικότητας των φαρμάκων δίνοντας ακριβή και ευαίσθητα αποτελέσματα,

- Φασματοσκοπία Μάζων που χρησιμοποιείται για την ανάλυση φορτισμένων από πηγή ιόντων σωματιδίων με βάση τη μάζα τους. Ομοίως με την υγρή χρωματογραφία, για πιο ακριβή και μεγαλύτερης ευαισθησίας αποτελέσματα συχνά χρησιμοποιείται διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) (Safaei et al., 2021).

Εφαρμογές

Η **υδροξουρία** (ή **υδροξυκαρβαμίδιο**) αποτελεί έναν σημαντικό κυτταροτοξικό παράγοντα της κατηγορίας των αντιμεταβολιτών. Συγκεκριμένα, προέρχεται από την ουρία και λόγω της υδροξυλομάδας ($-OH$) που υπάρχει στο μόριό της έχει την ιδιότητα να δρα αναστέλλοντας τη ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης του DNA και κατά συνέπεια στην μείωση της αναπαραγωγής των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται ως μυελοκατασταλτικός παράγοντας για να θεραπεύσει Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές, όπως είναι η πολυκυτταραιμία vera, η ουσιώδης θρομβοκυτταραιμία και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία αλλά και για τη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (Kettani et al., 2009).

hydroxycarbamide



Εικόνα 4-19: Χημική δομή του υδροξυκαρβαμιδίου (Nussbaumer et al., 2011)

Οι James et al. (2006) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο GC-EI-MS για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της **υδροξουρίας** στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας πιο βελτιωμένης τεχνικής. Ως μέθοδο προκατεργασίας δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) σε συνδυασμό με προσθήκη ουρακίλης ως εσωτερικό πρότυπο, ενώ ακολούθησε παραγωγή

με το αντιδραστήριο BSTFA πριν την ανάλυση. Ως στατική φάση χρησιμοποίησαν μία στήλη τύπου HP-1 εμπλουτισμένη με σιλικόνη μεθυλίου (methyl silicone gum phase), ως κινητή φάση φθοριούχο τριβουτυλαμίνιο (PFTBA) με ρυθμό ροής 0.59 ml/min, ενώ η ανίχνευση έγινε με φασματόμετρο μάζας διάσπασης με ιονισμό EI. Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι στο 0.078μg/ml, το όριο ποσοτικοποίησης στο 0.313μg/ml και η γραμμικότητα πάνω από 500μg/ml. Τελικά, οι ερευνητές κατέληξαν πως η μέθοδος που ανέπτυξαν ήταν γρήγορη, απλή, ευαίσθητη και επιλεκτική.

Ανάμεσα στους διάφορους αλκυλιωτικούς παράγοντες αξίζει να αναφερθεί η κυκλοφωσφαμίδα, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε συμβατικές και υψηλές δόσεις για τη θεραπεία τόσο αιματολογικών κακοηθειών όσο και συμπαγών όγκων. Ο μηχανισμός του φαρμάκου αυτού είναι ιδιαίτερα περίπλοκος, καθώς όταν αρχικά χορηγείται, βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή, ενώ όταν εισέλθει στον οργανισμό, γίνεται η ενεργοποίησή του κυρίως σε 4-υδροξυ κυκλοφωσφαμίδιο / αλδοφωσφαμίδιο από το κυτόχρωμα P450 ή μετά από παραγωγή σε 2-DCECP. Οι δυο αυτοί ενεργοί μεταβολίτες εμποδίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην θεραπεία καρκίνου (Huitema et al., 2001).

cyclophosphamide



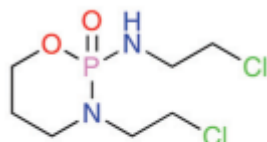
Εικόνα 4-20: Χημική δομή της κυκλοφωσφαμίδης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Huitema et. al (2001) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο GC-NPD για τον προσδιορισμό της **κυκλοφωσφαμίδης** σε πλάσμα ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) σε συνδυασμό με τη προσθήκη τροφοσφαμίδης ως εσωτερικό πρότυπο, ενώ πραγματοποιήθηκε παραγωγή με ανυδρίτη τριφθοροξικού οξέος (TFAA) [7,8] ή N,O-

δισ-(τριμεθυλοσιλυλ)τριφθοροακεταμίδιο. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ήλιον με ρυθμό ροής 3 ml/min, ως στατική φάση μία στήλη αέριας χρωματογραφίας τύπου CP Sil-13 CB, ενώ η ανίχνευση έγινε με Επιλεκτικό Ανιχνευτή Αζώτου/Φωσφόρου με Ιονισμό Φλόγας (NPD). Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι 1 ng/ml, το όριο ποσοτικοποίησης 5 ng/ml, η γραμμικότητα μεταξύ 5 και 5000 ng/ml και η ακρίβεια σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Οι Mullot et al. (2009) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο GC-MS/MS για την ανίχνευση της **5-φθοροουρακίλης** σε λύματα νοσοκομείων. Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση πιθανής ύπαρξης υπολειμμάτων στα νοσοκομειακά λύματα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα χρωματογράφου αερίων με φασματόμετρο μάζας διπλής ανάλυσης και η έκλουση ήταν βαθμωτή. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ήλιον, με ρυθμό ροής 1 mL/min και η στατική φάση ήταν μια στήλη Factor Four 5-ms. Επιπλέον, η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υποβλήθηκαν σε παραγωγή με τα αντιδραστήρια BSTFA και TMCS, ενώ έγινε προσθήκη και ενός εσωτερικού προτύπου (5-Fluorouracil-6C¹³). Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ του εύρους 0.5 και 2.5 µg/L, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι 12 ng/L και το όριο ποσοτικοποίησης 40 ng/L. Συμπερασματικά, οι ερευνητές εντόπισαν και ποσοτικοποίησαν υπολείμματα και τόνισαν την ανάγκη για καλύτερη διαχείριση και επεξεργασία των νοσοκομειακών αποβλήτων.

Το ιφωσφαμίδιο ανήκει στη κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων, και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των οξαζοφωσφορινών. Για να είναι η κυτταροτοξική του δράση ενεργή, το ιφωσφαμίδιο χρειάζεται να βιομετασχηματιστεί σε ιφωσφοραμίδη μουστάρδα μέσω της 4-υδροξυλίωσης, καταλήγοντας έτσι σε μια ισχυρή αλκυλιωτική ένωση, η οποία είναι θεραπευτική για καρκίνους αίματος, σαρκώματα και καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, το ιφωσφαμίδιο εμφανίζεται με δυο εναντιομερή, με το S-εναντιομερές να βιομετασχηματίζεται (Kaljser et al., 1997).



Ifosfamide

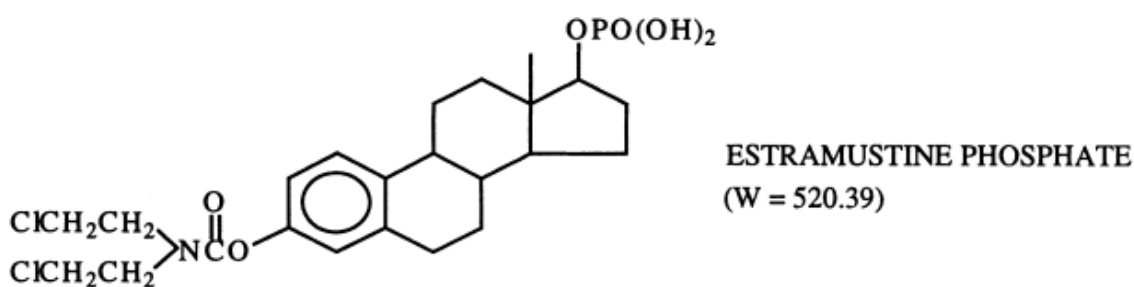
Εικόνα 4-21: Χημική δομή του ιφωσφαμιδίου (Kaljser et al., 1997)

Οι Kaljser et al. (1997) στην εργασία τους μελέτησαν μια μέθοδο GC-NPD για την ανίχνευση του **ιφωσφαμιδίου** σε δείγματα πλάσματος και ουρίας. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε η στήλη Chirasil-L-val για τον διαχωρισμό των εναντιομερών του ιφωσφαμιδίου (R-IF και S-IF), ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ισοθερμικά στους 195°C. Ως φέρον αέριο το ήλιο ως φορέας αέριο, με ροή 3 mL/min και η θερμοκρασία στον εκχυτήρα ήταν 200°C. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας Ανιχνευτής Αζώτου-Φωσφόρου, καθώς είναι κατάλληλος για την ανίχνευση ενώσεων που περιέχουν άζωτο ή φωσφόρο, όπως το ιφωσφαμίδιο. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων αίματος, πραγματοποιήθηκε η συλλογή τους σε σωλήνες που περιέχουν ηπαρίνη έτσι ώστε να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και στη συνέχεια έγινε η απομόνωση του πλάσματος με φυγοκέντριση. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων ούρων, έγινε η συλλογή τους κατά τη διάρκεια 24 ωρών, και διατηρούνταν στους 4°C για να μην διασπαστούν τα συστατικά τους. Στα δείγματα πλάσματος η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι στο εύρος 0-25 µg/ml και το όριο ανίχνευσης στο 20 ng/ml, ενώ για τα δείγματα ούρων στο 0-250 µg/ml και 50 ng/ml αντίστοιχα.

Οι Embreet et al. (1993) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο GC-ECD για τον προσδιορισμό της **βου σουλφάνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος, εξοπλισμένος με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Η στήλη όπου έγινε η ανάλυση ήταν κατασκευασμένη από συντηγμένο διοξειδίο του πυριτίου Supelco 2250. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο και η θερμοκρασία στήλης αυξήθηκε από 232°C στους 250°C σε 6 λεπτά. Όσον αφορά τα δείγματα, πρωτίστως έγινε προσθήκη ενός εσωτερικού προτύπου, του 1,6-δισ (μεθανοσουλφονυλοξυ)εξάνιο, ώστε να εξασφαλιστεί η ακρίβεια της μέτρησης. Ακολούθησε εκχύλιση και φυγοκέντριση της οργανικής φάσης με την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα και έπειτα ξήρανση αυτής με άζωτο. Στην συνέχεια, έγινε η παραγωγή των ουσιών με 2,3,5,6-τετραφθοροθειοφαινόλη, και τέλος ξανά εκχύλιση και φυγοκέντριση με την προσθήκη εξανίου και υδροξειδίου του νατρίου. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι από 0,1 έως 3 µg/ml, το όριο ανίχνευσης 0,06 µg/ml και όριο ποσοτικοποίησης 0,1 µg/ml.

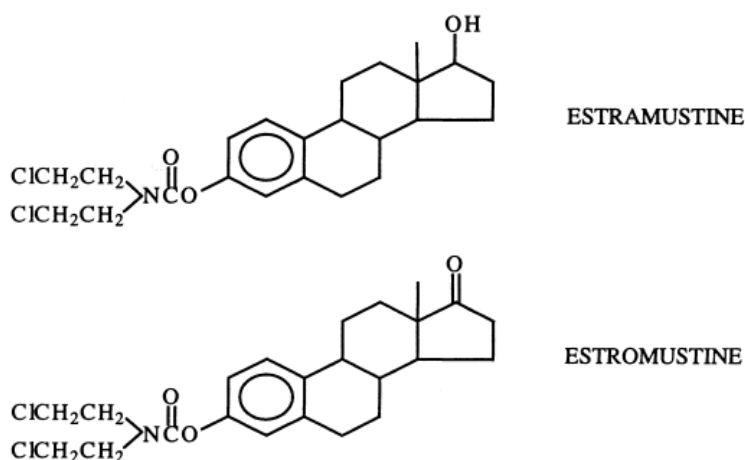
Η φωσφορική εστραμυστίνη (EMP) αποτελεί ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, ενώ η δομή του σχετίζεται με την φυσική ορμόνη

οιστραδιόλη. Έχει αντιμιτωτικές ιδιότητες που οφείλονται στα παράγωγά του, εστραμυστίνη (EaM) και εστρομυστίνη (EoM), αλλά και οιστρογονικές ιδιότητες που οφείλονται στους μεταβολίτες οιστραδιόλη (E2) και οιστρόνη (E1) (Edman et al., 2000).



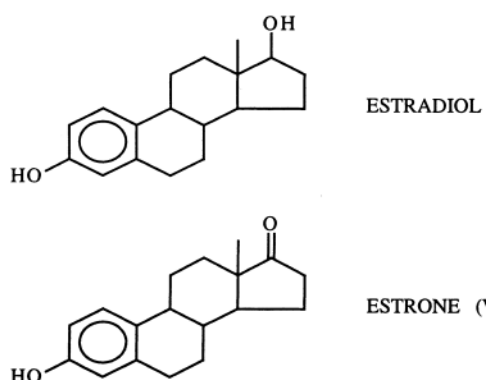
Εικόνα 4-22: Χημική δομή της φωσφορικής εστραμυστίνης (Edman et al., 2000)

Οι Edman et al. (2000) στην εργασία τους μελέτησαν τον προσδιορισμό των αναλυτών της φωσφορικής εστραμυστίνης και συγκεκριμένα, μια μέθοδο GC-NPD για την ποσοτικοποίηση της **εστραμυστίνης** και της **εστρομυστίνης** και μια μέθοδο GC-SIM για την ποσοτικοποίηση της **οιστραδιόλης** και της **οιστρόνης** σε δείγματα πλάσματος. Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC), που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της EaM (εστραμυστίνης) και της EoM (εστρομυστίνης) ήταν ένας αέριος, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτή φωσφόρου-αζώτου (NPD). Το μήκος και η εσωτερική διάμετρος της στήλης ήταν 15 m και 0,32 mm αντίστοιχα, ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο, ενώ η θερμοκρασία αυξήθηκε 135°C σε 280°C.



Εικόνα 4-23: Χημική δομή της εστραμυστίνης & της εστρομυστίνης (Edman et al., 2000)

Από την άλλη, στην περίπτωση της οιστραδιόλης και της οιστρόνης, χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αέριος χρωματογράφος, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με έναν φασματογράφο μάζας που ανιχνεύει μόνο συγκεκριμένα ιόντα αντί να ανιχνεύει το πλήρες φάσμα ιόντων που παράγονται από τη διάσπαση μιας ένωσης. Το μήκος και η εσωτερική διάμετρος της στήλης ήταν 25 m και 0,2 mm αντίστοιχα, ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο, ενώ η θερμοκρασία αυξήθηκε 105°C σε 290°C.



Εικόνα 4-24: Χημική δομή της οιστραδιόλης & της οιστρόνης (Edman et al., 2000)

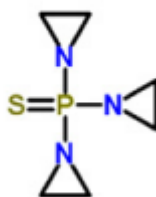
Όσον αφορά τη προετοιμασία των δειγμάτων, αυτά προετοιμάστηκαν με εκχύλιση στερεής φάσης (C18) και με υγρή-υγρή εκχύλιση, έγινε προσθήκη εσωτερικών προτύπων σε κάθε περίπτωση, ενώ τέλος ακολούθησε σιλιλίωση (silanization) για την παραγωγοποίησή τους. Η γραμμικότητα βρέθηκε να είναι για την εστρομυστίνη και την εστραμυστίνη στο εύρος 7–1200 nmol/l, ενώ για την οιστρόνη στο 5–560 nmol/l και για την οιστραδιόλη στο 2–110 nmol/l. Τα όρια ποσοτικοποίησης για την εστρομυστίνη και εστραμυστίνη ήταν 30 nmol/l, για την οιστρόνη 12 nmol/l, και για την οιστραδιόλη 8 nmol/l.

Οι Boutagy et al. (1978) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο GC- NPD-FID για την ανίχνευση της **κυταραβίνης** σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτή FID (Ανιχνευτής Ιονισμού με Φλόγα) που είναι ευαίσθητος σε άζωτο και φώσφορο. Η στήλη της χρωματογραφίας ήταν γυάλινοι σωλήνες γεμισμένοι με SE-30 ή OV-17, μήκους 2 m και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm, και η θερμοκρασία της ήταν 225°C για την στήλη SE-30 και 275°C για την OV-17, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων πλάσματος, αυτά υποβλήθηκαν σε παραγωγή για να

αυξηθεί η πτητικότητα και να βελτιωθεί η σταθερότητα, ενώ έγινε προσθήκη μιας σταθερής ποσότητας κυτιδίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μέχρι 2 µg/mL και το όριο ανίχνευσης στο 40 ng/ml.

Το θειοτέπα (N,N',N''-τριαιθυλενοθειοφωσφαμίδιο) αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων, και η δράση του έγκειται στην προσθήκη αλκυλικών ομάδων στο DNA των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την πρόκληση ζημιών που αποτρέπουν την ανάπτυξή τους. Χρησιμοποιείται στην θεραπεία του καρκίνου εδώ και πολλά χρόνια και συγκεκριμένα στην θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, των ωοθηκών, του μαστού, καθώς και στην αντιμετώπιση κακοήθων συλλογών υγρού, ενώ είναι αποτελεσματικό όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές δόσεις (Maanen et al. 2000, Nussbaumer et al., 2011).

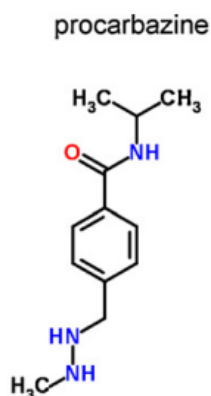
thiotepa



Εικόνα 4-25: Χημική δομή του θειοτέπα (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Maanen et al. (2000) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο GC-NPD για τον προσδιορισμό του **θειοτέπα** σε δείγματα ούρων. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε ένας αέριος χρωματογράφος, εξοπλισμένος με ανιχνευτή επιλεκτικό για N/P (άζωτο/φωσφόρο). Η διαχωριστική στήλη ήταν CP Sil-8 CB, διαστάσεων 25 m x 0,32 mm, η έκλουση ήταν βαθμωτή, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο. Τα δείγματα ακολούθησαν την Υγρή-Υγρή Εκχύλιση με διαλύτη χλωροφόρμιο και 1-προπανόλη και έγινε προσθήκη διφαινυλαμίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ του εύρους 25–5000 ng/ml, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Η προκαρβαζίνη αποτελεί ένα αντικρακινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λεμφωμάτων και καρκινωμάτων των βρόγχων αλλά και όγκων του εγκεφάλου (Nussbaumer et al., 2011).



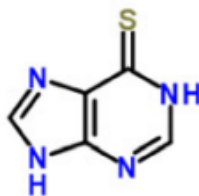
Εικόνα 4-26: Χημική δομή της προκαρβαζίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Gorsen et al. (1980) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο GC-Cl-MS για τον προσδιορισμό της **προκαρβαζίνης** σε δείγματα πλάσματος. Η στήλη ήταν γυάλινη από υλικό OV-1, πραγματοποιήθηκε χημικός ιονισμός χρησιμοποιώντας μεθάνιο και ισοβουτάνιο, ενώ η ανίχνευση των ιόντων έγινε με τη μέθοδο Single Ion Monitoring (SIM). Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου ήταν 30 ml/min, ενώ δεν γίνεται σαφές ποιο αέριο χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Υγρής-Υγρής Εκχύλισης (LLE), ενώ προστέθηκε N-αιθυλ-π-τολουαμίδιο ως εσωτερικό πρότυπο και η παραγωγή τους έγινε με ακετυλοανυδρίτη. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι από 1 ng/ml μέχρι 500 ng/ml, το όριο ανίχνευσης στο 1 ng/ml και το όριο ποσοτικοποίησης στα 10 ng/ml.

Η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) είναι ένα φάρμακο, το οποίο δρα ως ανταγωνιστής πουρινών (απαραίτητων συστατικών του DNA και του RNA), ενώ έχει κυτταροτοξικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η 6-μερκαπτοπουρίνη στην πραγματικότητα αποτελεί προφάρμακο, καθώς δεν έχει αντικαρκινική δράση από μόνη της. Αντιθέτως, πραγματοποιείται εκτενής μεταβολισμός στο έντερο και στο ήπαρ μετά από χορήγηση της από το στόμα, μέσω ανταγωνιστικών οδών, ενώ ενεργοποιείται ενδοκυτταρικά με τη βοήθεια του ενζύμου υποξανθίνη-

φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση (HPRT), της μεθυλοτρανσφεράσης θειοπουρίνης (TPMT) και της οξειδάσης ξανθίνης (XO). Ως αποτέλεσμα, σχηματίζονται ενεργοί μεταβολίτες στα ερυθροκύτταρα, και συγκεκριμένα τα 6-θειογουανίνη νουκλεοτίδια. Η αντικαρκινική δράση έγκειται στην θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Παρόλο που η κυτταροτοξική δράση της 6-μερκαπτοπουρίνης (6-MP) αποδίδεται κυρίως στους μεταβολίτες της, έχει μεγάλο ενδιαφέρον η ανίχνευση της ίδιας της 6-MP με στόχο να παρακολουθηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας, να αποφευχθούν υποτροπές της νόσου και να μειωθούν οι παρενέργειες (Lennard, 1992).

mercaptapurine



Εικόνα 4-27: Χημική δομή της 6-μερκαπτοπουρίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Bailey et al. (1975) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο GC-FID για την ανίχνευση της **6-μερκαπτοπουρίνης** σε δείγματα ορού. Πιο αναλυτικά, η χρωματογραφική στήλη ήταν κατασκευασμένη από γυαλί, ενώ τα δείγματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) με χρήση διαλυμάτων χλωροφορμίου και αιθυλοαιθέρα, υποβλήθηκαν σε παραγωγή με χρήση υδροξειδίου τριμεθυλανιλίνης (Methclute) και προστέθηκε θεοφυλλίνη ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 0.5 έως 20 µg/ml και το όριο ανίχνευσης 0,2 µg/ml.

4.2.3 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE)

Η προετοιμασία των δειγμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάλυση των φαρμάκων, ιδιαίτερα στα βιολογικά δείγματα (αίμα, ούρα, ιστοί, σάλιο), καθώς αυτά μπορεί να αποτελούνται από αμέτρητα αμινοξέα, πρωτεΐνες, ιόντα και πλάσμα, τα οποία ενδεχομένως παρεμβάλλονται στην ανάλυση και πρέπει να απομακρυνθούν. Για το σκοπό

αυτό, και στην περίπτωση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιούνται μέθοδοι, όπως εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), εκχύλιση υγρού-στερεού (LSE) και εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Ωστόσο, τις περισσότερες φορές, δεν απαιτείται κάποια ιδιαίτερη προκατεργασία των δειγμάτων παρά μόνο απλή αραίωση ή διήθηση, καθώς χρησιμοποιούνται πολύ μικροί όγκοι δείγματος. Άλλες μήτρες δειγμάτων αποτελούν τα περιβαλλοντολογικά δείγματα και τα φαρμακευτικά σκευάσματα (Ali et al., 2013).

Αξίζει να σημειωθεί πως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό των εναντιομερών μορίων, μια διαδικασία που απαιτεί τεχνικές με υψηλή διαχωριστική ικανότητα και αποτελεσματικότητα, αφού τα εναντιομερή έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, στη φαρμακευτική βιομηχανία, η χειρικήτητα των εναντιομερών μορίων έχει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς σχεδόν ένα στα δύο φαρμακευτικά συστατικά είναι χειράλ, όπου το ένα απ' τα δυο εναντιομερή αποτελεί το δραστικό συστατικό (Suntornsuk, 2010).

Οι κύριες τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με την CE στην φαρμακευτική ανάλυση παρατίθενται παρακάτω:

- Φασματομετρία Μάζας (MS)
- Φασματοφωτομετρική Ανίχνευση (UV/ DAD)
- Φθορισμομετρική Ανίχνευση (Fluorescence Detection):
- Ανίχνευση Χημειοφωταύγειας (CL)
- Ανίχνευση με Αμπερομετρία (Amperometric Detection, AD) (Suntornsuk, 2010).

Εφαρμογές

Οι Mahnik et al. (2004), στην εργασία τους, ανέπτυξαν μία μέθοδο CE-DAD για τον προσδιορισμό της **5-φθοροουρακίλης** σε λύματα νοσοκομείων. Πιο αναλυτικά, για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE), ενώ οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν οι εξής: θερμοκρασία τριχοειδούς στους 40°C, ως διάλυμα ηλεκτρολύτη για την τριχοειδή στήλη χρησιμοποιήθηκε 80% (160 mM) ρυθμιστικό διάλυμα βορικού νατρίου (pH 9.5) και 20% ακετονιτρίλιο, εφαρμογή τάσης στα 30 kV με ρεύμα 100 μ A, έγχυση δείγματος υπό πίεση 50 mbar, ανίχνευση με DAD στα 265 nm και μέτρηση του χρόνου μετανάστευσης του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) για την παρακολούθηση της EOF. Η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς

ήταν 5-500 $\mu\text{g/L}$, το όριο ανίχνευσης στο 1.7 $\mu\text{g/L}$, το όριο ποσορικοποίησης στο 8.6 $\mu\text{g/L}$, ενώ η ευαισθησία και η ακρίβεια ήταν υψηλές.

Η τεμοζολομίδη (TMZ) είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων. Η λήψη του γίνεται κυρίως από το στόμα, ενώ μπορεί και περνά από το αίμα στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση κακοήθων όγκων στον εγκέφαλο, όπως το γλοιοβλάστωμα. Η αυθόρμητη υδρόλυση της σε φυσιολογικό pH οδηγεί στο σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη MTIC, ο οποίος στη συνέχεια υδρολύεται σε 5-αμινο-ιμιδαζόλη-4-καρβοξαμίδιο (AIC) και μεθυλνυδραζίνη που είναι η ενεργή αλκυλιωτική ένωση (Andrasi et al., 2010).

temozolomide



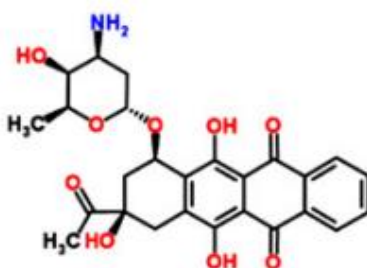
Εικόνα 4-28: Χημική Δομή της τεμοζολομίδης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Andrasi et al. (2010), στην εργασία τους, παρουσίασαν μία μέθοδο CE-UV για τον προσδιορισμό **τεμοζολομίδης** σε δείγμα ορού ασθενούς με γλοιοβλάστωμα. Πιο αναλυτικά, η εισαγωγή του δείγματος έγινε υπό συνθήκες πίεσης 50 mbar και η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 25 kV, ενώ η ανίχνευση έγινε με φωτομετρική διάταξη με διόδους στα μήκη κύματος 200 nm, 214 nm, 260 nm και 325 nm. Επιπλέον, η Τριχοειδής Στήλη ήταν επικαλυμμένη με πολυϊμίδιο και τήγμα πυριτίου. Όσον αφορά την προετοιμασία του δείγματος, δεν απαιτήθηκε ιδιαίτερη προκατεργασία, παρά μόνο φυγοκέντρηση (3000 στροφές το λεπτό) για τον διαχωρισμό του ορού από το αρχικό δείγμα αίματος και διήθηση για την αφαίρεση τυχόν στερεών σωματιδίων, ενώ για τα τριχοειδή χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρολυτικό διάλυμα ρυθμιστικού και SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο). Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ 1 – 50

μg/mL, το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) μεταξύ 0.31–0.93 μg/mL και το όριο ανίχνευσης (LOD) μεταξύ 0.094 - 0.33 μg/mL (Andrasi et al., 2010). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ταχύτητα, καθώς μόλις σε 1.2 λεπτά επιτεύχθηκε η ολοκλήρωση της ανάλυσης. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο, αφού η τεμοζολομίδη χαρακτηρίζεται από χαμηλή σταθερότητα σε διάλυμα και με χρόνο ημιζωής κάτω από 10 λεπτά υπό φυσιολογικές συνθήκες (Nussbaumer et al., 2011).

Η ιδارουβικίνη ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλινών και χρησιμοποιείται ευρύτατα στην θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού, όταν έχει αποτύχει η χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, και της οξείας μη λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Nussbaumer et al., 2011). Οι μεταλλαξιόνες ιδιότητές της, ωστόσο, μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες παρενέργειες και έτσι είναι απαραίτητη η διαχείριση της δόσης του φαρμάκου αυτού (Hu et al. 2000).

idarubicin

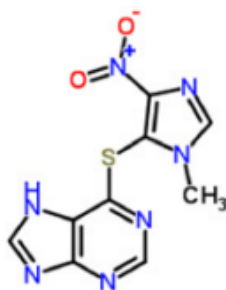


Εικόνα 4-29: Χημική Δομή της ιδارουβικίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Hu et al. (2000), στην εργασία τους, δημοσιοποίησαν μια μέθοδο CE-AD για τον προσδιορισμό της **ιδارουβικίνης** σε ανθρώπινα ούρα. Πιο συγκεκριμένα, δεν χρειάστηκε κάποια προκατεργασία των δειγμάτων, παρά μόνο διήθηση και απαερίωση με υπερήχους, ενώ για ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε μίγμα διόξινο φωσφορικό νάτριο με όξινο δινάτριο φωσφορικό σε τιμή pH 5,6 και η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 22 kV. Η γραμμικότητα βρέθηκε να είναι μεταξύ 4.0×10^{-7} – 2.0×10^{-5} mol/L, ενώ το όριο ανίχνευσης 8.0×10^{-8} mol/L. Ο συνδυασμός τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με αμπερομετρική ανίχνευση παρέχει αποτελέσματα με υψηλή ευαισθησία, καλή επιλεκτικότητα και χαμηλό κόστος.

Ένας άλλος σημαντικός αντιμεταβολίτης που αξίζει να αναφερθεί είναι η αζαθειοπρίνη, καθώς αποτελεί έναν ανοσοκατασταλτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται από πολύ παλιά μέχρι και στις μέρες μας. Στην αρχή, η αζαθειοπρίνη επινοήθηκε ως ένα φάρμακο που μετατρέπεται στον οργανισμό σε 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) με μεγαλύτερη διάρκεια δράσης μέσω αναγωγής από τη γλουταθειόνη. Ωστόσο, σύντομα ανακαλύφθηκε πως η δράση της ήταν πιο ασφαλής και αποτελεσματική από την 6-MP. Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση αζαθειοπρίνη (Maltzman et al., 2003).

azathioprine



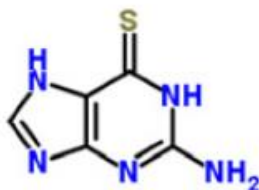
Εικόνα 4-30: Χημική Δομή της αζαθειοπρίνης (Nussbaumer et al., 2011).

Οι Shafaati et al. (2000), στην εργασία τους, παρουσίασαν μια μέθοδο CE-UV για τον προσδιορισμό της **αζαθειοπρίνης** σε χύδην μορφή του φαρμάκου αλλά και σε τελικές μορφές δοσολογίας (δισκία και σκόνη για ένεση). Σκοπός της εργασίας ήταν η διασφάλιση της ποιότητας των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Πιο αναλυτικά, η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε υπό συνθήκες υψηλής πίεσης, ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό νάτριο για το εύρος pH 6–8, και τετραβορικό νάτριο για το εύρος pH 8–10 και ο τριχοειδής σωλήνας πλύθηκε με NaOH και απεσταγμένο νερό. Επιπλέον, η ανίχνευση έγινε στα 214 nm, η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 25 kV, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C και ο τριχοειδής σωλήνας ήταν ακατέργαστος κατασκευασμένος από συντηγμένη πυριτία. Δεν χρειάστηκε κάποια ιδιαίτερη προετοιμασία των δειγμάτων, παρά μόνο άλεση των δισκίων και διαλυτοποίηση αυτών και της σκόνης σε NaOH, ενώ για καλύτερη ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιήθηκε θεοφυλλίνη (THP) ως εσωτερικό πρότυπο. Το εύρος της γραμμικότητας της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ 0.01–0.07 mg/ml και 0.05–0.50 mg/ml, το όριο ανίχνευσης (LOD) στο 2.71×10^{-6} M και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) στο 0.91×10^{-6} M. Τελικά, οι

συγγραφείς προσδιόρισαν υποπροϊόντα και ακαθαρσίες και τόνισαν την ανάγκη για βελτίωση της παραγωγής.

Η θειογουανίνη (TG) είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών και χρησιμοποιείται ευρύτατα στην θεραπεία της οξείας λευχαιμίας (Nussbaumer et al., 2011).

thioguanine



Εικόνα 4-31: Χημική Δομή της θειογουανίνης (Nussbaumer et al., 2011).

Οι Flores et al. (2003), στην εργασία τους, παρουσίασαν μια μέθοδο CE-DAD για τον προσδιορισμό της **θειογουανίνης** σε ούρα ανθρώπων. Ο τριχοειδής σωλήνας ήταν κατασκευασμένος από τηγμένο πυρίτιο, ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε τετραβορικό νάτριο (pH 9,2, 45 mM), ενώ για την χρήση των τριχοειδών απαιτούνταν προηγουμένως πλύση με NaOH και νερό. Επιπλέον, η ανίχνευση έγινε στα 340 nm, η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 25 kV, και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 35°C. Δεν χρειάστηκε προετοιμασία των δειγμάτων, παρά μόνο αραίωση με νερό. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι στο εύρος 3-25 mg/L, το όριο ανίχνευσης (LOD) βρέθηκε 1.58 mg/L και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 5.30 mg/L. Η μέθοδος φάνηκε να είναι απλή, με ικανοποιητικά επίπεδα ευαισθησίας και ακρίβειας.

Οι Kim et al. (2010), στην εργασία τους, δημοσιοποίησαν μια μέθοδο CE-LIF για τον προσδιορισμό της **δοξορουβικίνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Πιο συγκεκριμένα, το υλικό κατασκευής του τριχοειδούς σωλήνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τηγμένη πυριτία, ο οποίος ξεπλύθηκε με NaOH, HCl, SDS, ακετονιτρίλιο και νερό, ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό κάλιο [12,5 mM, pH 7.4], ενώ το μήκος κύματος διέγερσης του ανιχνευτή φωταύγειας επαγόμενης από λέιζερ ήταν 488 nm και το μήκος κύματος εκπομπής ήταν 630 nm. Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν μεταξύ 0.1 και 100 g/ml και το όριο ανίχνευσης στο 0.1 µg/ml.

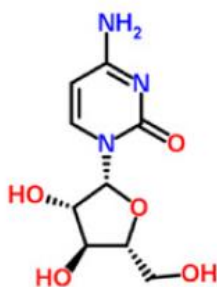
Οι Soetebeer et al. (2001), στην εργασία τους, παρουσίασαν μια μέθοδο CE-UV-LIF για τον προσδιορισμό της **ετοποσίδης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα, ο οποίος ήταν κατασκευασμένος από πυριτία. Χρησιμοποιήθηκε λέιζερ ιόντων αργού για την ανίχνευση UV-LIF (φωταύγεια επαγόμενη από λέιζερ UV), το οποίο λειτουργεί στα 257 nm με ισχύ 200 mW ώστε να παρέχει το μήκος κύματος διέγερσης. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε τετραβορικό νάτριο 150 mM με προσθήκη NaOH 150 mM σε pH 10.6, ενώ η εφαρμοζόμενη τάση ήταν +20 kV και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 19.0 °C. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, έγινε προσθήκη προτύπου διαλύματος ετοποσίδης διαφόρων συγκεντρώσεων σε blank δείγμα πλάσματος υγιούς ατόμου, τα οποία στη συνέχεια υπέστησαν κατακρήμνιση με προσθήκη ακετονιτριλίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, όπου έγινε μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε άλλον σωλήνα και εξάτμιση με απαλό ρεύμα αζώτου για την απομάκρυνση των διαλυτών, ενώ το ίζημα απορρίφθηκε. Τέλος, προστέθηκε απιονισμένο και διπλά αποσταγμένο νερό που περιείχε εσωτερικό πρότυπο για την διαλυτοποίηση των υπολοίπων ουσιών. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνης (MDMA) σε συγκέντρωση 500 µg/L σε νερό και ο ρόλος του ήταν η εξασφάλιση της ακρίβειας των μετρήσεων λόγω της φθοριστικής του ικανότητας. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε μεταξύ 2 και 500 mg/L, το όριο ανίχνευσης στο 100 µg/L, το όριο ποσοτικοποίησης στο 0.2 mg/L, ενώ η μέθοδος φάνηκε να είναι γρήγορη, ακριβής, ευαίσθητη.

Οι Chen et al. (2011), στην εργασία τους, μελέτησαν μία μέθοδο CE-ESI-MS για τον προσδιορισμό της **βινβλαστίνης** στο φαρμακευτικό φυτό *Catharanthus roseus*. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ξήρανση και στη συνέχεια άλεση των δειγμάτων του φυτού σε λεπτή σκόνη και έπειτα προσθήκη θεικού οξέος για 30 λεπτά. Ακολούθησε φίλτρωση και ρύθμιση του pH της λύσης προσθέτοντας αμμωνιακό διάλυμα και εν συνεχεία ανάμειξη με διχλωρομεθάνιο για τρεις φορές. Το διχλωρομεθάνιο σχηματίζει ένα ξεχωριστό οργανικό στρώμα, το οποίο συλλέγεται και από τις τρεις εκχυλίσεις και ως σύνολο εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα που παραμένει διαλύεται σε μεθανόλη, φιλτράρεται και οδηγείται προς ανάλυση. Για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής σωλήνας, οποίος ήταν κατασκευασμένος από πυριτία χωρίς επικάλυψη. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού αμμωνίου με οξικό οξύ, η τάση ρυθμίστηκε στα 20 kV

και η θερμοκρασία στους 25°C, η έγχυση των δειγμάτων έγινε υδροδυναμικά υπό συνθήκες πίεσης 50 mbar, ενώ τα τριχοειδή προετοιμάστηκαν με πλύσιμο με NaOH και νερό. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των μορίων που έχουν διαχωριστεί γίνεται μέσω της σύνδεσης του τριχοειδούς σωλήνα με το φασματόμετρο μάζας στα 825 m/z, τα οποία ιονίστηκαν προηγουμένως με την τεχνική του ηλεκτρονικού ψεκασμού (ESI), εφαρμόζοντας τάση στα -3.500 V σε διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε στο εύρος 2.4–120 mg/mL, και το όριο ανίχνευσης (LOD) στο 0.8 mg/mL.

Η κυταραβίνη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών, ενώ προκαλεί την αναστολή της σύνθεσης του DNA και διαθέτει αντιικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για την αντιμετώπιση της οξείας λευχαιμίας, ειδικά της οξείας μη λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Συχνά, χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλες θεραπείες, όπως η θειογουανίνη και οι ανθρακυκλίνες (π.χ. δοξορουβικίνη ή δαουνορουβικίνη). Επίσης, χορηγείται και σε άλλες καταστάσεις όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία σε κρίση, λεμφώματα και μυελοδυσπλασία (El-Subbagh et al., 2009).

cytarabine

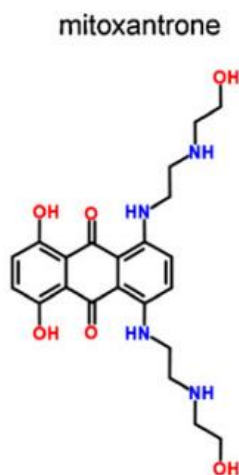


Εικόνα 4-32: Χημική Δομή της κυταραβίνης (Nussbaumer et al., 2011).

Οι Lloyd et al. (1991) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο CE-UV για τον προσδιορισμό της **κυταραβίνης** σε δείγματα πλάσματος. Όσον αφορά την ανάλυση, τα τριχοειδή ήταν κατασκευασμένα από πυρίτιο, η τάση για τον διαχωρισμό εφαρμόστηκε στα 8 kV, ενώ η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30°C. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κιτρικού οξέος και τα τριχοειδή προετοιμάστηκαν με πλύσιμο με HCl, NaOH και νερό. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, αυτά

χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE), ενώ η ανίχνευσή τους έγινε με την απορρόφηση UV μέσα στο τριχοειδές σε μήκος κύματος 280 nm. Το εύρος της γραμμικότητας της μεθόδου κυμάνθηκε από 1 μέχρι 10 μM , ενώ το όριο ανίχνευσης ήταν 0.5 μM .

Η μιτοξαντρόνη αποτελεί ένα συνθετικό φάρμακο, το οποίο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού, της οξείας λευχαιμίας και το λεμφώματος του μη-Hodgkin, ενώ ο προσδιορισμός της σε βιολογικά δείγματα απαιτεί τεχνικές υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Han et al., 2010).



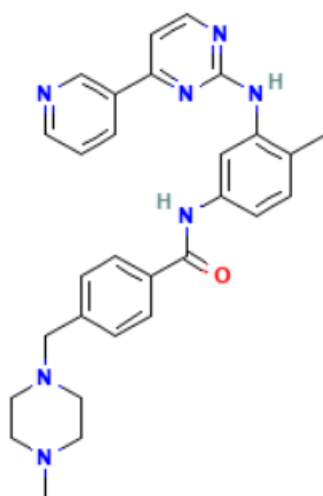
Εικόνα 4-33: Χημική Δομή της μιτοξαντρόνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Han et al. (2010) στην εργασία τους δημοσίευσαν μια μέθοδο CE-CL για την ανίχνευση της **μιτοξαντρόνης** σε δείγματα ανθρώπινων ούρων και πλάσματος. Πιο αναλυτικά, για το σύστημα ηλεκτροφόρησης (CE) και χημειοφωταύγειας (CL) χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη κατασκευασμένη από υλικό fused silica και επικαλυμμένη από πολυϊμίδιο, το οποίο κάηκε και αφαιρέθηκε, μήκους 50 cm και εσωτερικής διαμέτρου 50 μm . Η προετοιμασία των τριχοειδών περιλάμβανε πλύση με NaOH. Η τάση που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό των ουσιών ήταν 20 kV, ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 8,0 mM διάλυμα βορατικού και 0,6 mM διάλυμα λουμινόλης και ως διάλυμα CL μετά τη στήλη διάλυμα 0,1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ και διάλυμα 0,1 M NaOH, καθώς οι ενώσεις αυτές παράγουν φως όταν συνδυάζονται με τη λουμινόλη. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, δεν

απαιτήθηκε κάποια διαδικασία πριν την ανάλυση. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι στο εύρος 7.0×10^{-8} έως 1.0×10^{-6} M, το όριο ανίχνευσης (LOD) στο 1.0×10^{-8} M, ενώ η μέθοδος χαρακτηρίστηκε ως απλή, γρήγορη, ευαίσθητη, επιλεκτική και χαμηλού κόστους.

Η ιματινίμπη, συχνά αναφερόμενη με τις εμπορικές ονομασίες Gleevec ή Glivec, αποτελεί ένα καινοτόμο αντικαρκινικό φάρμακο ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την καταπολέμηση της χρόνιας μυελογενής λευχαιμίας (CML), των γαστρεντερικών στοματικών όγκων (GIST) και άλλων κακοήθων ασθενειών, ενώ η δράση της έγκειται στην αναστολή της τυροσίνης κινάσης. Ωστόσο, η χορήγηση του φαρμάκου σχετίζεται με ορισμένες παρενέργειες, όπως κατακράτηση υγρών, μυαλγία (πόννοι στους μύες) και αναιμία, και έτσι η παρακολούθηση των συγκεντρώσεων ιματινίμπης είναι κρίσιμη για την μείωση της τοξικότητας και την ρύθμιση της δόσης της (Elhamili et al., 2011).

Οι Elhamili et al. (2011), στην εργασία τους, παρουσίασαν μια μέθοδο CE-ESI-TOF-MS για την ανίχνευση **ιματινίμπης** σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

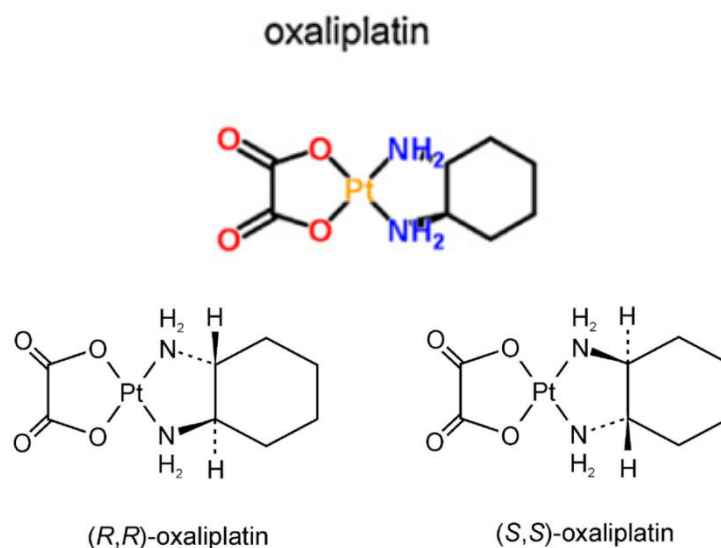


Εικόνα 4-34: Χημική Δομή της ιματινίμπης (pubchem)

Πιο συγκεκριμένα, τα τριχοειδή που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατασκευασμένα από τηγμένο πυρίτιο και προετοιμάστηκαν με πλύση με NaOH και νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν βορικό 25 mM σε pH 9,8, η εφαρμοζόμενη τάση στα -20 kV και η θερμοκρασία στους 25°C. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) πριν την ανάλυση. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε 0–5000 ng/mL, το όριο

ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) στο 5 και 20 ng/mL, αντίστοιχα (Elhamili et al., 2011).

Η οξαλιπλατίνη αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αλκυλιωτικών παραγόντων και χρησιμοποιείται χημειοθεραπευτικά ιδιαίτερα στην θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, των όρχεων και των ωοθηκών. Το φάρμακο αυτό περιέχει πλατίνη και εμφανίζεται με δυο μορφές, με το (R,R) εναντιομερές να είναι η δραστική μορφή του φαρμάκου (Sebestova et al., 2019).



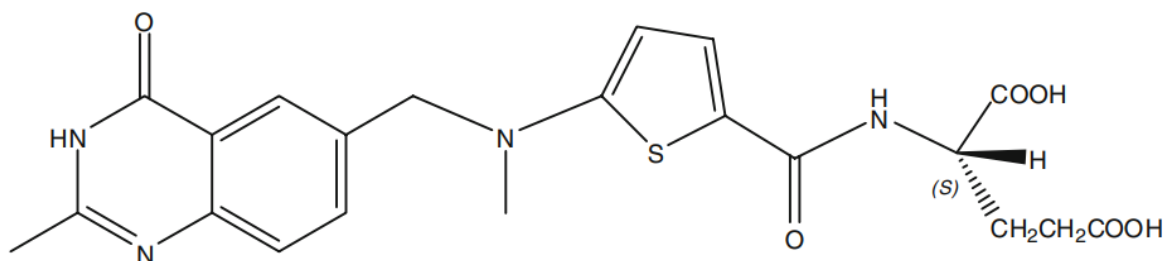
Εικόνα 4-35: Χημική Δομή της οξαλιπλατίνης (Nussbaumer et al., 2011) και των εναντιομερών της (Sebestova et al., 2019)

Οι Sebestova et al. (2019) στην εργασία τους, ανέπτυξαν μια μέθοδο CE-ICP-MS για την ανίχνευση της **οξαλιπλατίνης** σε δείγματα ουρίας. Σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος για ορθή ανίχνευση οξαλιπλατίνης πριν την εφαρμογή σε ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, τα τριχοειδή ήταν κατασκευασμένα από τηγμένο πυρίτιο μήκους 64,5 cm, τα οποία προετοιμάστηκαν με έκπλυση με 0,1 mol L⁻¹ NaOH και νερό υπό θερμοκρασία 20 °C . Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από βορικό νάτριο σε pH=9.5, ενώ η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 15 kV. Όσον αφορά τα δείγματα, αυτά χρειάστηκε να υποβληθούν μόνο σε αραίωση και φυγοκέντριση. Για την ανίχνευση της ουσίας, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση συνδέθηκε με φασματογράφο μάζας που χρησιμοποιεί επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα. Η

γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι 0.1–500 $\mu\text{g/mL}$, το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης 64 ng/mL και 116 ng/mL , αντίστοιχα . Συμπερασματικά, οι ερευνητές κατέληξαν πως η μέθοδος οδήγησε σε επιτυχής ανίχνευση των εναντιομερών της οξαλιπλατίνης.

Οι Kuo et al. (2002) στην εργασία τους δημοσιοποίησαν μια μέθοδο CE-UV για τον προσδιορισμό της **μεθοτρεξάτης** σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Αναλυτικότερα, ο τριχοειδής σωλήνας ήταν μη επεξεργασμένος και κατασκευασμένος από τηγμένο πυρίτιο μήκους 37 cm και προετοιμάστηκε με πλύση με NaOH, νερό και ρυθμιστικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer) συγκέντρωσης 70 mM και pH 7, το οποίο περιείχε κυκλοδεξτρίνη HP- β -CD (3 mg/ml) για να βοηθήσει στο διαχωρισμό των εναντιομερών της μεθοτρεξάτης, ενώ ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 280 nm, η θερμοκρασία στους 25°C και η τάση στα 20 kV. Επιπλέον, προστέθηκε ως εσωτερικό πρότυπο το DMAP (N,N-Διμεθυλο-4-αμινοπυριδίνη) με συγκέντρωση 200 μM για τη βελτίωση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της ανάλυσης. Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν μεταξύ 12.5 και 200 μM , το όριο ανίχνευσης βρέθηκε στα 4 μM , ενώ η ακρίβεια και η ευαισθησία ήταν υψηλή.

Η ραλιτρεξέδη (RD) αποτελεί ένα καινοτόμο αντικαρκινικό φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα και του παγκρέατος. Έχει την ιδιότητα να αναστέλλει το ένζυμο θυμιδυλική συνθάση και τείνει να αντικαθιστά την επιλογή της 5-φθοροουρακίλη σε συνδυασμό με λευκοβορίνη για την αντιμετώπιση του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου, αφού έχει αποδειχθεί ότι τα ποσοστά τοξικότητάς της είναι χαμηλότερα (Liu et al., 2009).



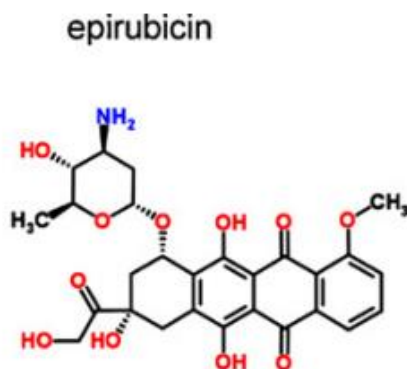
Εικόνα 4-36: Χημική Δομή της S-ραλιτρεξέδης (Liu et al., 2009).

Το μόριο της RD βασίζεται στην κινναζολίνη, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται με δύο εναντιομερείς μορφές, όπου το (S)-RD είναι το ενεργό συστατικό, ενώ το (R)-RD είναι μια ακαθαρσία και μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου (Liu et al., 2009).

Οι Liu et al. (2009) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο CE-UV για τον προσδιορισμό της **ραλτιτρεξέδης** σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Πιο αναλυτικά, η αναλυτική τεχνική πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή διόδων (diode array detector). Ο τριχοειδής σωλήνας που χρησιμοποιήθηκε ήταν μη επεξεργασμένος, μήκους 48,5 εκ. και εσωτερική διάμετρο 50 μm και το υλικό κατασκευής του ήταν τηγμένη πυριτία. Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 228 nm, η θερμοκρασία στους 25 °C και η τάση στα +20 kV. Η προετοιμασία του τριχοειδούς σωλήνα περιλάμβανε πλύση με NaOH, νερό και ρυθμιστικό διάλυμα. Επίσης, ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τριφωσφορικού οξέος με προσθήκη SDS (sodium dodecyl sulfate) και CM- β -CD (carboxymethyl-beta-cyclodextrin) για βελτιωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και να επιτευχθούν καλύτερες διαχωριστικές ικανότητες. Όσον αφορά τα δείγματα, αυτά προετοιμάστηκαν σε μείγμα νερού/μεθανόλης (1:1 v/v) και φιλτραρίστηκαν και απαερώθηκαν με χρήση συσκευής υπερήχων. Η μέθοδος φάνηκε να είναι απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους, ο όριο ανίχνευσης ήταν 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για το εύρος γραμμικότητας.

Οι Huang et al. (2006) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο CE-UV για την ανίχνευση της **σισπλατίνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Το όργανο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το σύστημα CE, εξοπλισμένο με ανιχνευτή φωτοδιόδων (photodiode array detector), ενώ ο τριχοειδής σωλήνας ήταν κατασκευασμένος από τηγμένη πυριτία μήκους 100 cm και εσωτερικής διαμέτρου 75 μm . Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 210 nm, η τάση στα 20 kV και η θερμοκρασία στους 25 °C. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από SDS και NaH_2PO_4 (pH 7,4) και η προετοιμασία των τριχοειδών περιλάμβανε πλύση με NaOH, ηλεκτρολύτη και νερό. Όσον αφορά τα δείγματα, αυτά υποβλήθηκαν σε υπερδιήθηση με στόχο αφενός την αποφυγή της αποδιάταξης των πρωτεϊνών και της κατακρήμνισής τους και αφετέρου να μην επηρεαστεί η ανάλυση. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι μεταξύ 0.030–2.00 mmol/L, και το όριο ανίχνευσης 2.0 $\mu\text{mol/L}$.

Η επιρουβικίνη αποτελεί έναν αντικαρκινικό παράγοντα που ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλινών, είναι ημισυνθετικό ανάλογο της δοξορουβικίνης απ' την οποία διαφοροποιείται μόνο όσον αφορά τη στερεοχημική σύνθεση, ενώ και τα δυο είναι αποτελεσματικά για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Nussbaumer et al., 2011).



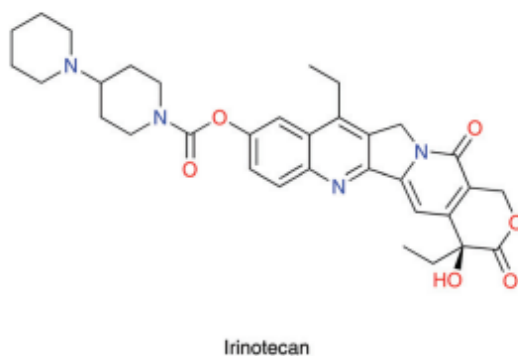
Εικόνα 4-37: Χημική Δομή της επιρουβικίνης (Nussbaumer et al., 2011)

Οι Reinhoud et al. (1992) στην εργασία τους μελέτησαν μια μέθοδο CE-LIF για τον προσδιορισμό της **επιρουβικίνης** σε ανθρώπινο πλάσμα. Πιο αναλυτικά, έγινε χρήση τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένη πυριτία, ενώ ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο (ACN) σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου (PB) με pH 4.2 (αναλογία 7:3 κατά όγκο). Η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 20-25 kV και η ρύθμιση του ανιχνευτή έγινε στα 476.5 nm. Επειδή η επιρουβικίνη απορροφάται σε γυαλικά και γενικά εργαστηριακά υλικά με αποτέλεσμα να προκαλούνται προβλήματα στην επαναληψιμότητα, όλες οι διαλύσεις περιείχαν 10% ακετονιτρίλιο (ACN). Η μέθοδος ήταν γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας, το όριο ανίχνευσης ήταν 250 pg /ml, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με το εύρος γραμμικότητας.

Οι Perez-Ruiz et al. (2001) στην εργασία τους ανέπτυξαν μια μέθοδο CE-LIF για την ταυτόχρονη ανίχνευση της **δοξορουβικίνης**, της **δαουνορουβικίνης** και της **ιδαρουβικίνης** σε δείγματα ορού. Τα φάρμακα αυτά έχουν παρόμοια δομή και μάζα, και έτσι απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά στον διαχωρισμό τους. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας πιο βελτιωμένης τεχνικής. Στη παρούσα μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε όργανο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης συνδεδεμένο με ανιχνευτή LIF, ο οποίος ρυθμίστηκε σε μήκος κύματος 560 nm. Ο τριχοειδής σωλήνας ήταν μη επικαλυμμένος και κατασκευασμένος από τηγμένο πυρίτιο, με μήκος 57 cm και εσωτερική διάμετρο 75 μm, και η προετοιμασία του περιλάμβανε πλύση με HCl, NaOH,

νερό και ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο αποτελούνταν από βορικό οξύ και ακετονιτρίλιο, ρυθμισμένο σε pH 9.5. Η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 25°C και η τάση στα 15 kV. Όσον αφορά τη προετοιμασία των δειγμάτων, αυτά υπέστησαν αποπρωτεΐνωση με την προσθήκη ακετονιτρίλιου και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση και διήθηση. Τα όρια ανίχνευσης που βρέθηκαν για την δοξορουβικήνη, τη δαουνορουβικήνη και τη ιδαρουβικήνη ήταν 15, 10 και 8 pg/mL αντίστοιχα, το όριο ποσοτικοποίησης 0.9, 0.8 και 0.6 ng/mL αντίστοιχα, ενώ το εύρος γραμμικότητας ήταν 10–500 ng/mL. Εν τέλει, η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν ταχεία, ευαίσθητη και αξιόπιστη με υψηλή εκλεκτικότητα.

Η ιρινοτεκάνη αποτελεί έναν αντικαρκινικό παράγοντα, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων της τοποϊσομεράσης I και χρησιμοποιείται χημειοθεραπευτικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Θεωρείται προφάρμακο, καθώς απαιτείται η μετατροπή του σε μια ενεργή μορφή ώστε η δράση του να είναι θεραπευτική. Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιείται μετά τη χορήγηση, και μετατρέπεται στην ενεργή μορφή της (SN-38) στο ήπαρ, με τη βοήθεια των ενζύμων καροξυλαιοστερασών. Αξίζει να σημειωθεί πως τόσο η ιρινοτεκάνη όσο και η ενεργή της μορφή είναι σταθερές σε όξινες τιμές pH, με αποτέλεσμα η αύξηση του pH πάνω από 4 να οδηγεί σε ανενεργή μορφή του φαρμάκου (Guichard et al., 2017).

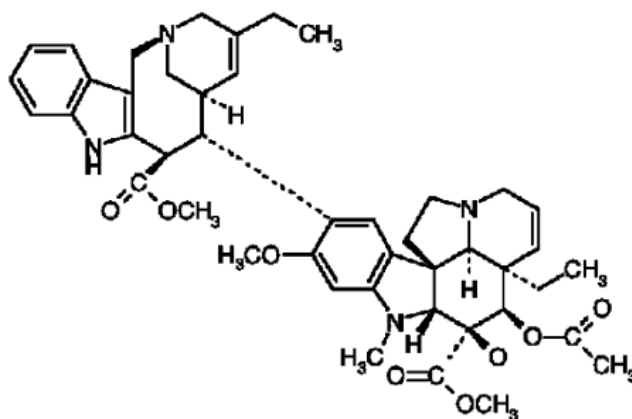


Εικόνα 4-38: Χημική Δομή ιρινοτεκάνης (Guichard et al., 2017)

Οι Hurtado-Sánchez et al.(2015) στην εργασία τους δημοσίευσαν μια μέθοδο CE-DAD-LIF για τον προσδιορισμό **ιρινοτεκάνης** σε δείγματα ανθρώπινων ούρων. Πιο αναλυτικά, έγινε χρήση ενός συστήματος CE συστήματος, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή φθορισμού και έναν ανιχνευτή DAD. Ο τριχοειδής σωλήνας που

χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένος από τηγμένη πυριτία μήκους 58,5 cm και εσωτερική διάμετρο 75 μm , ενώ η προετοιμασία του περιλάμβανε πλύση με NaOH, νερό και ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιείχε όξινο φωσφορικό δινάτριο σε pH 11,34. Η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 25°C, η τάση στα 25 kV, ενώ για την πρόκληση φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο διέλευσης με εύρος 240–400 nm και για την εκπομπή χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο κοπής στα 418 nm. Όσον αφορά τη προετοιμασία των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Στερεά Υποστηριζόμενη Υγρού-Υγρού Εξαγωγή, ενώ προστέθηκε και καμπτοθεκίνη (CPT) ως εσωτερικό πρότυπο. Η γραμμικότητα της μεθόδου για την ενεργή μορφή της ιρινοτεκάνης βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ του εύρους 1.0–30.0 mg/L για τον DAD ανιχνευτή και 0.05–3.5 mg/L για τον ανιχνευτή φθορισμού, ενώ τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.22 mg/L και 0.01 mg/L αντίστοιχα και τα όρια ποσοτικοποίησης 0.73 mg/L και 0.03 mg/L αντίστοιχα.

Η βινореλβίνη (VNB) αποτελεί ένα τρίτης γενιάς παράγωγο των αλκαλοειδών της βίνκας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για την θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού και μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Χαρακτηριστικό της VNB είναι ότι περιλαμβάνει λειτουργικές ομάδες τριτοταγούς αμίνης, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ηλεκτροχημικής λαμπρότητας (ECL) μέσω της αντίδρασής τους με το $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (Zhou et al., 2013).



Εικόνα 4-39: Χημική Δομή βινореλβίνης (Zhou et al., 2013)

Οι Zhou et al. (2013) στην εργασία τους παρουσίασαν μια μέθοδο CE-ECL για την ανίχνευση **βινореλβίνης** σε δείγματα ανθρώπινων ούρων. Το σύστημα CE που χρησιμοποιήθηκε ήταν εξοπλισμένο με σύστημα ανίχνευσης ECL. Ο τριχοειδής σωλήνας

ήταν κατασκευασμένος από τηγμένη πυριτία και προετοιμάστηκε με πλύση με NaOH, νερό και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=9). Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, αυτά αρχικά αναμείχθηκαν με 10 ml HCl και στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε ξήρανση υπό κενό, ενώ τα στερεά κατάλοιπα που πρόκυψαν διαλύθηκαν σε μεθανόλη και προχώρησαν για ανάλυση. Η τάση ρυθμίστηκε στα 15 kV, η θερμοκρασία στους 25°C, ενώ το κύτταρο ανίχνευσης ECL αποτελούνταν από ένα Ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt), ένα να πλατινένιο ηλεκτρόδιο ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, και ένα αναφορικό ηλεκτρόδιο Ag/AgCl. Η γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι από 2.8×10^{-10} mol/L έως 1.6×10^{-8} mol/L, και το όριο ανίχνευσης στο 1.0×10^{-11} mol/L. Συνολικά, η μέθοδος φάνηκε να είναι απλή και υψηλής ευαισθησίας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Σύγκριση αναλυτικών τεχνικών

Ο στόχος της παρούσας βιβλιογραφικής εργασίας ήταν η παρουσίαση σύγχρονων και αποτελεσματικών αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Ανάμεσα σε αυτές, μελετήθηκαν η HPLC, η GC και η CE, οι οποίες αποτελούν θεμελιώδη μέσα στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης.

Τα ευρήματα της βιβλιογραφικής επισκόπησης έδειξαν ότι τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα αναλύθηκαν με την τεχνική HPLC, γεγονός που επιβεβαιώνει την ευελιξία της, την ταχύτητα, την ακρίβεια, την υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Απ' την άλλη, ο αριθμός των φαρμάκων για την ανάλυση των οποίων χρησιμοποιήθηκε η GC ήταν αρκετά μικρότερος, καθώς η τεχνική αυτή περιορίζεται κυρίως στα αέρια δείγματα και στα πτητικά οργανικά υγρά. Ικανοποιητικός ήταν ο αριθμός των φαρμάκων που αναλύθηκαν με την CE, αφού η τεχνική αυτή αποτελεί μια καινοτόμα προσθήκη στον τομέα της ανάλυσης και φημίζεται για την υψηλή επιλεκτικότητα, ακρίβεια και ευαισθησία και το χαμηλό κόστος, ενώ συνήθως δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος.

Στην παρούσα ενότητα, πραγματοποιείται σύγκριση των τεχνικών που μελετήθηκαν στη βιβλιογραφία βάσει των δεδομένων που παρέχουν οι συγγραφείς σχετικά με τα επίπεδα συγκέντρωσης των αναλυόμενων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), όπου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Επειδή ο αριθμός των αναφορών είναι σχετικά μεγάλος, επιλέχθηκαν οι πιο αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις για κάθε τεχνική.

Αναλυόμενη Ουσία	Τεχνική	Είδος δείγματος	Επίπεδα Συγκέντρωσης	LOD	LOQ	Εργασία
Μεθοτρεξάτη	HPLC-ESI-MS	πλάσμα	0.1-100 ng/mL	0.05 ng/mL	0.1 ng/mL	Danafar et al., 2016
Γεμισταβίνη	HPLC-ESI-MS/MS	ούρα	0-50 mg/L	0.05 mg/L	0.2 mg/L	Sottani et al., 2004

Μελφαλάνη	HPLC-UV	πλάσμα	0.5-40 µg/mL	0.1 µg/mL	0.5 µg/mL	Nath et al., 2008
Βου σουλφάνη	HPLC-Fluorescence	πλάσμα	20- 2000 ng/ml	9 ng/ml	20 ng/mL	Peris et al., 1999
Δαουνορουβικήνη	HPLC-Fluorescence-EC	πλάσμα	15-150 ng/ml	2 ng/ml	10 ng/mL	Akpofure et al., 1982
Βινβλαστίνη	HPLC-APCI-MS/MS	πλάσμα & ούρα	0.126–100 ng/mL(πλάσμα) 1–2000 ng/mL (ούρα)	0.45 ng/mL	0.126ng/mL	Achanta et al., 2013
Ετοποσίδη	HPLC-DAD	εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα και πολυμερείς σωληνωτούς νανοφορείς	0.2-100 g/mL	0.015 g/mL	0.045 g/mL	Algan et al., 2016
Χλωραμπουκίλη	HPLC-UV	πλάσμα	0.075-15 µg/mL	0.024 µg/mL	0.075 µg/mL	Lipska et al., 2001
Υδροξουρία	GC-EI-MS	πλάσμα	> 500 µg/ml	0.078µg/ml	0.313µg/ml	James et al., 2006
Κυκλοφωσφαμίδιο	GC-NPD	πλάσμα	5-5000 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	Huitema et. al., 2001
5-FU	GC-MS/MS	λύματα νοσοκομείων	0.5-2.5 µg/L	12 ng/L	40 ng/L	Casale et al., 2002
Θειογουανίνη	CE-DAD	ούρα	3-25 mg/L	1.58 mg/L	5.3 mg/L	Flores et al., 2003
Αζαθειοπρίνη	CE-UV	χύδην μορφή του φαρμάκου & τελικές μορφές δοσολογίας (δισκία και σκόνη για ένεση)	0.01–0.07 mg/ml	2.71x10 ⁻⁶ M	0.91x10 ⁻⁵ M	Shafaati et al., 2000
Οξαλιπλατίνη	CE-ICP-MS	ούρα	0.1–500 µg/mL	64 ng/mL	116 ng/mL	Sebestova et al., 2019

Ιρινοτεκάνη	CE-DAD-LIF	ούρα	1.0–30.0 mg/L (DAD) και 0.05–3.5 mg/L (LIF)	0.22 mg/L (DAD) και 0.01 mg/L (LIF)	0.73 mg/L (DAD) και 0.03 mg/L (LIF)	Hurtado-Sánchez et al.(2015)
Δοξορουβικίνη Δαουνορουβικίνη Ιδ αρουβικίνη	CE-LIF	ορός	10–500 ng/mL	15 10 8 pg/mL	0.9 0.8 0.6 ng/mL	Perez-Ruiz et al., 2001
5-FU	CE-DAD	λύματα νοσοκομείων	5-500 µg/ L	1.7 µg/L	8.6 µg/L	Mahnik et al., 2004

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας συνδυασμένων τεχνικών που περιλαμβάνει τα επίπεδα συγκέντρωσης, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Απ' τον Πίνακα 2, συμπεραίνουμε ότι, όσον αφορά τις ουσίες που αναλύθηκαν με **HPLC**, μικρότερα όρια ανίχνευσης παρουσίασαν οι τεχνικές που συνδυάστηκαν με φασματομετρία μάζας, μονής και διπλής ανάλυσης (HPLC-MS(/MS)), με τις τιμές να φτάνουν τα 0.05 ng/mL, γεγονός που υποδεικνύει υψηλή ευαισθησία. Ακόμη, οι τεχνικές στις οποίες εφαρμόστηκε Ηλεκτροψεκασμός Ιονισμού (ESI) παρουσίασαν χαμηλότερη τιμή LOD σε σχέση με την τεχνική στην οποία εφαρμόστηκε χημικός ιονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (APCI), με την τελευταία τεχνική να δίνει το μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων (1–2000 ng/mL). Επιπλέον, παρατηρείται πως οι περιπτώσεις, όπου ως μέθοδος ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία UV είχαν μεγαλύτερες τιμές στα όρια ανίχνευσης συγκριτικά με τις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε φθορισμός. Μια παρόμοια τάση παρατηρείται και στις τιμές του ορίου ποσοτικοποίησης.

Όσον αφορά τις ουσίες που αναλύθηκαν με **GC**, παρατηρείται πως η επιλογή φασματομετρίας μάζας διπλής ανάλυσης ως ανιχνευτής επιφέρει χαμηλότερες τιμές ορίου ανίχνευσης (12 ng/L), σε σύγκριση με αυτόν μονής ανάλυσης που χρησιμοποιεί Ηλεκτροψεκασμό Ιονισμού (ESI) και με τον ανιχνευτή Αζώτου-Φωσφόρου, γεγονός που υποδεικνύει υψηλή ευαισθησία για μικρές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, τα όργανα GC-NPD φαίνεται να έχουν το ευρύτερο φάσμα συγκεντρώσεων (5-5000 ng/ml). Η ίδια τάση παρατηρείται και στις τιμές του ορίου ποσοτικοποίησης.

Τέλος, όσον αφορά τις ουσίες που αναλύθηκαν με **CE**, η τεχνική που συνδυάζει CE-LIF δείχνει να έχει τις μικρότερες τιμές για το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, και

συγκεκριμένα για την ιδαρουβική στα 8 pg/mL και 0.6 ng/mL, αντίστοιχα. Απ' την άλλη, η τεχνική CE-DAD παρουσίασε το υψηλότερο LOD, όπως στην περίπτωση της Θειογουανίνης (1.58 mg/L), αλλά και το μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων (3 –25 mg/L).

Συγκρίνοντας συνολικά τις παραπάνω τεχνικές, παρατηρείται ότι η CE-LIF πλεονεκτεί ως προς τις άλλες ως την υψηλή ευαισθησία της σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, το οποίο επιβεβαιώνεται και από την τιμή των 8 pg/mL. Η CE-UV φαίνεται να είναι χρήσιμη για τα εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα, ενώ η GC-MS/MS είναι ιδανική σε περιπτώσεις περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως λύματα νοσοκομείου. Αναμφισβήτητα, η HPLC-MS(/MS) χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων λόγω της ευαισθησίας και της αξιοπιστίας της.

Κατηγορία	Αναλυόμενη Ουσία	Τεχνική	Μέθοδος προ/ργασίας	Κινητή φάση/Ρυθμιστικό διάλυμα	Στατική φάση/ Τριχοειδής Σωλήνας
Αντιμεταβολίτης	Μεθοτρεξάτη	HPLC-ESI-MS	PPT	ACN/H ₂ O/HCOOH 74:26:1 (v/v), ρυθμός ροής 0.2 mL/min	στήλη τύπου C18
Αντιμεταβολίτης	Γεμισταβίνη	HPLC-ESI-MS/MS	SPE	HCOOH/ACN, ρυθμός ροής 0.3 mL/s	στήλη τύπου C8
Αντιμεταβολίτης	Υδροξουρία	GC-EI-MS	LLE & παραγωγή	φθοριούχο τριβουτυλαμίνιο (PFTBA), ρυθμός ροής 0.59 ml/min	στήλη τύπου HP-1 εμπλουτισμένη με σιλικόνη μεθυλίου
Αντιμεταβολίτης	5-FU	GC-MS/MS	SPE & παραγωγή	ήλιον, ρυθμός ροής 1 mL/min	στήλη Factor Four 5-ms
Αντιμ/της	5-FU	CE-DAD	SPE	80% (160 mM) διάλυμα βορικού νατρίου (pH 9.5) και 20% ακετονιτρίλιο	τηγμένο πυρίτιο
Αντιμεταβολίτης	Θειογουανίνη	CE-DAD	αραίωση	τετραβορικό νάτριο (pH 9,2, 45 mM)	τηγμένο πυρίτιο
Αντιμεταβολίτης	Αζαθειοπρίνη	CE-UV	άλεση των δισκίων και διαλ/ποίηση αυτών και της σκόνης σε NaOH	φωσφορικό νάτριο (για pH 6–8) & τετραβορικό νάτριο (για pH 8–10)	τηγμένο πυρίτιο
Αλκυλιωτικός Παράγοντας	Μελφαλάνη	HPLC-UV	PPT	ρυθμιστικό διάλυμα Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·NaH ₂ PO ₄ (0,016 M, pH 3,75) και ACN, ρυθμός ροής 1 mL min ⁻¹	στήλη τύπου C18

Αλκυλιωτικός Παράγοντας	Βουλσουφάνη	HPLC- Fluorescence	PPT & παραγωγή	AcOH (100 mM, pH 5) / ACN, ρυθμός ροής 1 ml/min	στήλη τύπου C8
Αλκυλιωτικός Παράγοντας	Χλωραμπουκίλη	HPLC-UV	PPT	ακετονιτρίλιο, νερό και μυρμηκικό οξύ, ρυθμός ροής 1.0 mL/min	στήλη LiChrospher® 100 RP18, end- capped
Αλκυλιωτικός Παράγοντας	Κυκλοφωσφα- μίδιο	GC-NPD	SPE & παραγωγή	ήλιον, ρυθμός ροής 3 ml/min	στήλη τύπου CP Sil- 13 CB
Αλκυλιωτικός παράγοντας	Οξαλιπλατίνη	CE-ICP- MS	αραίωση & φυγοκέντριση	βορικό νάτριο, pH 9,5	τηγμένο πυρίτιο
Ανθρακυκλίνη	Δαουνουρβικίνη	HPLC- Fluorescence -EC	-	ACN/H ₂ O/AcOH, ρυθμός ροής 2 ml/min	στήλη τύπου C18
Ανθρακυκλίνη	Δοξορουβικίνη Δαουνουρβικίνη Ιδαρουβικίνη	CE-LIF	αποπρωτεΐνωση φυγοκέντριση και διήθηση	βορικό οξύ και ακετονιτρίλιο, ρυθμισμένο σε pH 9.5	τηγμένο πυρίτιο
Αναστολέας της τοποϊσο- μεράσης II	Ετοποσίδη	HPLC- DAD	υπό συνθήκες στρες	μείγμα ακετονιτρίλιου και φωσφορικού ανιόντος, ρυθμός ροής 1 mL/min	στήλη τύπου C18
Αναστολέας της τοποϊσο- μεράσης I	Ιρινοτεκάνη	CE-DAD- LIF	SS-LLE	όξινο φωσφορικό δινάτριο σε pH 11,34	τηγμένο πυρίτιο
Αλκαλοειδές βίνκα	Βινβλαστίνη	HPLC- APCI- MS/MS	SPE	AA-MeOH ρυθμισμένο σε pH 3,5, ρυθμός ροής 0.75 mL/min	στήλη PFP (pentafluorophenyl)

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας συνδυασμένων τεχνικών ανάλογα με την κατηγορία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Απ' τον παραπάνω πίνακα, γίνεται αντιληπτό πως κάθε φαρμακευτική ουσία απαιτεί εξατομικευμένη μέθοδο ανάλυσης λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών τους, οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς τη μέθοδο προκατεργασίας, την κινητή φάση/ρυθμιστικό διάλυμα και την στατική φάση/τριχοειδή σωλήνα.

Πιο συγκεκριμένα,

- αντιμεταβολίτες όπως Μεθοτρεξάτη, Γεμισταβίνη, Υδροξουρία, 5-FU χρησιμοποιούνται κυρίως τεχνικές όπως HPLC-MS/MS, GC-MS/MS και CE-DAD
- αλκυλιωτικοί παράγοντες όπως Μελφαλάνη, Βουλσουφάνη, Χλωραμπουκίλη, Κυκλοφωσφαμίδιο, Οξαλιπλατίνη αναλύονται μέσω HPLC-UV, HPLC-Fluorescence, GC-NPD, CE-ICP-MS
- για ανθρακυκλίνες όπως Δαουνουρβικήνη, Δοξορουβικήνη, Ιδαρουβικήνη χρησιμοποιούνται κυρίως τεχνικές HPLC-Fluorescence-EC και CE-LIF
- για αναστολείς των τοποϊσομερασών (π.χ. Ετοποσίδη, Ιρινοτεκάνη) προτιμώνται τεχνικές όπως HPLC-DAD και CE-DAD-LIF
- αλκαλοειδές βίνκα όπως Βινβλαστίνη αναλύεται με HPLC-APCI-MS/MS.

Επιπλέον, παρατηρούμε πως στην περίπτωση που χρησιμοποιείται CE δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία των δειγμάτων, ενώ ως υλικό κατασκευής τριχοειδούς σωλήνα είναι το τηγμένο πυρίτιο και στην περίπτωση της HPLC η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη είναι αυτή τύπου C18.

Εν κατακλείδι, παρατηρείται πως και οι τρεις τεχνικές (HPLC, GC, CE) μπορούν να είναι αποτελεσματικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στις διάφορες μήτρες δειγμάτων, προσαρμόζοντας κάθε φορά τις εκάστοτε αναλυτικές συνθήκες, έχοντας ως απώτερο στόχο τον έλεγχο της τοξικότητάς τους.

Βιβλιογραφία

- Meegan, M. J., & O'Boyle, N. M. (2019). Special Issue "Anticancer Drugs." *Pharmaceuticals*, 12(3), 134. <https://doi.org/10.3390/ph12030134>
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441–442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>.
- Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5258–5265. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5258>
- Mathur, G., Nain, S., & Sharma, P. K. (2015). *Cancer: An Overview.*, Academic Journal of Cancer Research 8 (1): 01-09
- Emole ,J. (2012). *Cancer Diagnosis and Treatment: An Overview for the General Practitioner* (Vol. 11), University of Texas Health Center at Houston, Houston
- M. R. Chorawala, P. M. Oza, G. B. Shah, Mechanisms of Anticancer Drugs Resistance: An .
- Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., & Schellongowski, P. (2017). New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1678-1>
- Abraham, J., & Staffurth, J. (2011). Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 39(12), 723–727. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.006>
- Bertram G. Katzung, Basic & Clinical Pharmacology, Fourteenth Edition, 2018
- Baudino, T. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3–20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New Approaches and Procedures for Cancer treatment: Current Perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 205031212110343. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>

- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., & Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, 85(5), 2265–2289. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>
- Remesh A. (2012), Toxicities of anticancer drugs and its management, *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* | Vol 1 | Issue 1
- Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K., & Agarwala, D. D. (2015). *A Review: HPLC Method Development and Validation*. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015; 5(4): 76-81.
- Ali, A. H. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6(1), 010–020. <https://www.advancechemjournal.com/abstract/aac-aid1026>
- Kaur, G., & Sharma, S. S. (2018). *Gas Chromatography – A Brief Review*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INFORMATION AND COMPUTING SCIENCE* Volume 5, Issue 7, July 2018 ISSN NO: 0972-1347 .
- Kupiec, T. (2004). *Quality-Control Analytical Methods: Gas Chromatography*. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* Vol. 8 No. 4
- Wätzig, H., & Günter, S. (2003). Capillary Electrophoresis – A High Performance Analytical Separation Technique. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(6). <https://doi.org/10.1515/cclm.2003.112>
- Suntornsuk, L. (2007). Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis: A Survey on Recent Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 45(9), 559–559. <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.9.559>
- Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., & Lunte, S. M. (1997). Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 372–387. <https://doi.org/10.1023/a:1012018709641>
- Rousseau, A., Marquet, P., Debord, J., Sabot, C., & Lachâtre, G. (2000). Adaptive Control Methods for the Dose Individualisation of Anticancer Agents. *Clinical Pharmacokinetics*, 38(4), 315–353. <https://doi.org/10.2165/00003088-200038040-00003>

- Sabourian, R., Mirjalili, S. Z., Namini, N., Chavoshy, F., Hajimahmoodi, M., & Safavi, M. (2020). HPLC methods for quantifying anticancer drugs in human samples: A systematic review. *Analytical Biochemistry*, 610, 113891. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113891>
- Wong, A., Xiang, X., Ong, P., Mitchell, E., Syn, N., Wee, I., Kumar, A., Yong, W., Sethi, G., Goh, B., Ho, P., & Wang, L. (2018). A Review on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Rapid Quantification of Oncology Drugs. *Pharmaceutics*, 10(4), 221. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040221>
- Stokvis, E., Rosing, H., & Beijnen, J. H. (2005). Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(6), 887–917. <https://doi.org/10.1002/mas.20046>
- Casale, F., R. Canaparo, E. Muntoni, Serpe, L., Zara, G. P., Pepa, C. D., Berno, E., Costa, M., & M. Eandi. (2002). Simultaneous HPLC determination of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma of cancer patients. *Biomedical Chromatography*, 16(7), 446–452. <https://doi.org/10.1002/bmc.181>
- HOSSEIN, D., & MEHRDAD, H. M. (2016). PHARMACOKINETICS AND BIOEQUIVALENCE OF METHOTREXATE IN HUMAN PLASMA STUDIED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (LC-MS). *JUNDISHAPUR JOURNAL OF NATURAL PHARMACEUTICAL PRODUCTS*, 11(2), 0-0. SID
- Sottani, C., Massimo Zucchetti, Zaffaroni, M., Bettinelli, M., & Minoia, C. (2004). Validated procedure for simultaneous trace level determination of the anti-cancer agent gemcitabine and its metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(10), 1017–1023. <https://doi.org/10.1002/rcm.1436>
- Nath, C. N., Zeng, L., Eslick, A., Trotman, J., & Earl, J. E. (2008). An isocratic UV HPLC assay for analysis of total and free melphalan concentrations in human plasma. *Acta Chromatographica*, 20(3), 383–398. <https://doi.org/10.1556/achrom.20.2008.3.6>
- Peris, J.-E., Latorre, J.-A., Castel, V., Verdeguer, A., Esteve, S., & Torres-Molina, F. (1999). Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of*

Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 730(1), 33–40.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00214-5)

Bell, D. N., Liu, J. J., Tingle, M. D., & McKeage, M. J. (2006). Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 837(1-2), 29–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.063>

Katzenmeyer, J. B., Eddy, C. V., & Arriaga, E. A. (2010). Tandem laser-induced fluorescence and mass spectrometry detection for high-performance liquid chromatography analysis of the In Vitro metabolism of doxorubicin. *Analytical Chemistry*, 82(19), 8113–8120. <https://doi.org/10.1021/ac1011415>

M. Łukawska, I. Oszczapowicz, A. Jelińska, J. Cielecka-Piontek, M. Zając, Dobrowolski, L., G. Ziółkowska, Zalewski, P., Piekarski, M., Krause, A., & J. Uszak. (2015). Development of validation of RP-HPLC method for determination of novel derivatives of daunorubicin. *Chemia Analityczna, Vol. 54, No. 5*, 907–917.
<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-article-BPP2-0003-0007>

Akpofure, C., Riley, C. A., Sinkule, J. A., & Evans, W. E. (1982). Quantitation of daunorubicin and its metabolites by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography. Biomedical Applications*, 232(2), 377–383. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)84177-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)84177-8)

Achanta, S., Ngo, M., Veitenheimer, A., Maxwell, L. K., & Wagner, J. R. (2013). Simultaneous quantification of vinblastine and desacetylvinblastine concentrations in canine plasma and urine samples using LC–APCI–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 913-914, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.11.012>

Zhang, Y.-W., Kong, X.-Y., Wang, J.-H., & Du, G.-H. (2018). Vinblastine and Vincristine. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*, 551–557.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7_91

Algan, A. H., Gumustas, M., Karatas, A., & Ozkan, S. A. (2016). A selective and sensitive stability-Indicating HPLC method for the validated assay of etoposide from commercial

dosage form and polymeric tubular nanocarriers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 124, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.007>

Lipska, K., Gumieniczek, A., Pietraś, R., & Filip, A. A. (2021). HPLC-UV and GC-MS Methods for Determination of Chlorambucil and Valproic Acid in Plasma for Further Exploring a New Combined Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Molecules*, 26(10), 2903. <https://doi.org/10.3390/molecules26102903>

Respaud, R., Tournamille, J.-F., Croix, C., Laborie, H., Elfakir, C., & Viaud-Massuard, M.-C. (2010). Development of an ion-pairing reversed-phase liquid chromatography method using a double detection analysis (UV and evaporative light scattering detection) to monitor the stability of Alimta®-pemetrexed preparations: Identification and quantification of l-glutamic acid as a potential degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.031>

Zhao, M., Rudek, M. A., He, P., Hartke, C., Gore, S., Carducci, M. A., & Baker, S. D. (2004). Quantification of 5-azacytidine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 813(1-2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.012>

Li, A. P., Peng, J. D., Zhou, M., & Zhang, J. (2016). Resonance light scattering determination of 6-mercaptopurine coupled with HPLC technique. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 154, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.010>

Larson, R. R., Khazaeli, M. B., & Dillon, H. K. (2003). Development of an HPLC Method for Simultaneous Analysis of Five Antineoplastic Agents. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 18(2), 109–119. <https://doi.org/10.1080/10473220301432>

Küng, A., Zenker, A., Galanski, M. S., & Keppler, B. K. (2001). Capillary electrophoretic study of carboplatin and analogues with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83(2-3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00182-3](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00182-3)

Qian, J., Wang, Y., Chang, J., Zhang, J., Wang, J., & Hu, X. (2011). Rapid and sensitive determination of vinorelbine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass

spectrometry and its pharmacokinetic application. *Journal of Chromatography B*, 879(9-10), 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.039>

Zuñia, Aldaz, A., Castellanos, C., & Giráldez, J. (2001). Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high-performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 764(1-2), 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00320-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00320-6)

HE, X., BATCHELOR, T., GROSSMAN, S., SUPKO, J., & FORTHENEWAPPROACHESTOBRAINTU. (2004). Determination of procarbazine in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 799(2), 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.061>

Gunda Koellensperger, & Hann, S. (2010). Ultra-fast HPLC-ICP-MS analysis of oxaliplatin in patient urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(1), 401–406. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3504-3>

Pujari, M. P., Barrientos, A., Muggia, F. M., & Koda, R. T. (1998). Determination of hydroxyurea in plasma and peritoneal fluid by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 694(1), 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00120-5)

Škubník, J., Pavlíčková, V. S., Ruml, T., & Rimpelová, S. (2021). Vincristine in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. *Biology*, 10(9), 849. <https://doi.org/10.3390/biology10090849>

Nussbaumer, S., Fleury-Souverain, S., Antinori, P., Sadeghipour, F., Hochstrasser, D. F., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., & Geiser, L. (2010). Simultaneous quantification of ten cytotoxic drugs by a validated LC–ESI–MS/MS method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(7-8), 3033–3042. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4243-1>

Kim, H., Likhari, P., Parker, D., Statkevich, P., Marco, A., Lin, C.-C., & Nomeir, A. A. (2001). High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(3), 461–468.

- Safaei, M., & Shishehbore, M. R. (2021). A review on analytical methods with special reference to electroanalytical methods for the determination of some anticancer drugs in pharmaceutical and biological samples. *Talanta*, 229, 122247. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122247>
- Kettani, T., Cotton, F., Gulbis, B., Ferster, A., & Kumps, A. (2009). Plasma hydroxyurea determined by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(4), 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.048>
- James, H., Nahavandi, M., Wyche, M. Q., & Taylor, R. E. (2006). Quantitative analysis of trimethylsilyl derivative of hydroxyurea in plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 831(1-2), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.033>
- Huitema, A. D. R., Reinders, C., Tibben, M. M., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. (2001). Sensitive gas chromatographic determination of the cyclophosphamide metabolite 2-dechloroethylcyclophosphamide in human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757(2), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00178-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00178-5)
- Mullot, J.-U., Karolak, S., Fontova, A., Huart, B., & Levi, Y. (2009). Development and validation of a sensitive and selective method using GC/MS-MS for quantification of 5-fluorouracil in hospital wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(8), 2203–2212. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2902-x>
- Kaijser, G. P., Beijnen, J. H., Bult, A., Keizer, H. J., & Underberg, W. J. M. (1998). Chromatographic analysis of the enantiomers of ifosfamide and some of its metabolites in plasma and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 690(1-2), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00376-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00376-3)
- Embree, L., Burns, R. B., Heggie, J. R., Phillips, G. L., Reece, D. E., Spinelli, J. J., Hartley, D. O., Hudon, N. J., & Goldie, J. H. (1993). Gas-chromatographic analysis of busulfan for therapeutic drug monitoring. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 32(2), 137–142. <https://doi.org/10.1007/bf00685617>
- Edman, K., Svensson, L., Eriksson, B., & Gunnarsson, P. O. (2000). Determination of estramustine phosphate and its metabolites estromustine, estramustine, estrone and

estradiol in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 738(2), 267–279. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00526-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00526-5)

Boutagy, J., & Harvey, D. J. (1978). Determination of cytosine arabinoside in human plasma by gas chromatography with a nitrogen-sensitive detector and by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 146(2), 283–296. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)81894-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)81894-0)

van Maanen, M. J., Doesburg Smits, K., & Beijnen, J. H. (2000). Simultaneous determination of thioTEPA, TEPA and a novel, recently identified thioTEPA metabolite, monochloroTEPA, in urine using capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 742(2), 335–343. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00181-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00181-x)

Gorsen, R. M., Weiss, A., & Manthei, R. W. (1980). Analysis of procarbazine and metabolites by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 221(2), 309–318. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)84316-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)84316-9)

Lennard, L. (1992). The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 43(4), 329–339. <https://doi.org/10.1007/bf02220605>

Bailey, D. G., Wilson, T. W., & Johnson, G. E. (1975). A gas chromatographic method for measuring 6-mercaptopurine in serum. *Journal of Chromatography A*, 111(2), 305–311. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)99279-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)99279-3)

Ali, I., Haque, A., Wani, W. A., Saleem, K., & Al Za'abi, M. (2013). Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review. *Biomedical Chromatography*, 27(10), 1296–1311. <https://doi.org/10.1002/bmc.2953>

Suntornsuk, L. (2010). Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 29–52. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3741-5>

- Susanne N. Mahnik, Blanka Rizovski, Fuerhacker, M., & Mader, R. (2004). Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(1). <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2727-6>
- Andrási, M., Bustos, R., Attila Gáspár, Gomez, F. A., & Álmos Klekner. (2010). Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 878(21), 1801–1808. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.008>
- Hu, Q., Zhou, T., Zhang, L., Li, H., & Fang, Y. (2000). Determination of idarubicin in human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368(8), 844–847. <https://doi.org/10.1007/s002160000571>
- Maltzman, J. S., & Koretzky, G. A. (2003). Azathioprine: old drug, new actions. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(8), 1122–1124. <https://doi.org/10.1172/JCI18384>
- Shafaati, A., & Clark, B. J. (2000). Determination of Azathioprine and Its Related Substances by Capillary Zone Electrophoresis and Its Application to Pharmaceutical Dosage Forms Assay. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(3), 267–273. <https://doi.org/10.1081/ddc-100100355>
- Rodríguez Flores, J., Berzas Nevado, J. J., Castañeda Peñalvo, G., & Rodríguez Cáceres, M. I. (2003). Direct capillary electrophoretic determination of three chemotherapeutic drugs in human urine. *Chromatographia*, 57(7-8), 493–496. <https://doi.org/10.1007/bf02492546>
- Kim, H. S., & Wainer, I. W. (2010). Simultaneous analysis of liposomal doxorubicin and doxorubicin using capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(3), 372–376. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.06.028>
- Uta Birgitta Soetebeer, Marc-Oliver Schierenberg, Schulz, H., Hempel, G., Andresen, P., & Blaschke, G. (2001). Simultaneous Quantification of Etoposide and Etoposide Phosphate in Human Plasma by Capillary Electrophoresis Using Laser-Induced Native Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 73(10), 2178–2182. <https://doi.org/10.1021/ac001467v>

- Chen, Q., Li, N., Zhang, W., Chen, J., & Chen, Z. (2011). Simultaneous determination of vinblastine and its monomeric precursors vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus* by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 34(20), 2885–2892. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100359>
- El-Subbagh, H. I., & Al-Badr, A. A. (2009). Cytarabine. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 37–113. [https://doi.org/10.1016/s1871-5125\(09\)34002-9](https://doi.org/10.1016/s1871-5125(09)34002-9)
- Lloyd, D. K., Cypess, A. M., & Wainer, I. W. (2002). Determination of cytosine-β-d-arabinoside in plasma using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 568(1), 117–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80345-D](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80345-D)
- Han, S., & Wang, H. (2010). On-line chemiluminescence determination of mitoxantrone by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 878(28), 2901–2904. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.006>
- Elhamili, A., & Bergquist, J. (2011). A method for quantitative analysis of an anticancer drug in human plasma with CE-ESI-TOF-MS. *ELECTROPHORESIS*, 32(13), 1778–1785. <https://doi.org/10.1002/elps.201100121>
- Šebestová, A., Baron, D., Pechancová, R., Pluháček, T., & Petr, J. (2019). Determination of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary electrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 205, 120151. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120151>
- Kuo, C. Y., Wu, H. L., & Wu, S. M. (2002). Enantiomeric analysis of methotrexate in pharmaceuticals by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 471(2), 211–217. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00935-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00935-2)
- Liu, Y., Fu, X., Ma, C., Zhong, J., Liao, Y., & Liu, H. (2008). Chiral separation of raltitrexed by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 321–326. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2444-7>
- Zhuo, H., Timerbaev, A. R., Keppler, B. K., & Hirokawa, T. (2006). Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis

techniques. *Journal of Chromatography A*, 1106(1-2), 75–79.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.042>

Reinhoud, N. J., Tjaden, U. R., Irth, H., & van der Greef, J. (2002). Bioanalysis of some anthracyclines in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 574(2), 327–334. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80047-T](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80047-T)

Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., & Bravo, E. (2001). *Simultaneous determination of doxorubicin, daunorubicin, and idarubicin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. *Electrophoresis*, 22, 134–138.
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200101\)22:1<134::AID-ELPS134>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200101)22:1<134::AID-ELPS134>3.0.CO;2-X)

Guichard, N., Guillarme, D., Bonnabry, P., & Fleury-Souverain, S. (2017). Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. *The Analyst*, 142(13), 2273–2321.
<https://doi.org/10.1039/c7an00367f>

del Carmen Hurtado-Sánchez, M., Acedo-Valenzuela, M. I., Durán-Merás, I., & Rodríguez-Cáceres, M. I. (2015). Determination of chemotherapeutic drugs in human urine by capillary electrophoresis with UV and fluorimetric detection using solid-supported liquid-liquid extraction for sample clean-up. *Journal of Separation Science*, 38(11), 1990–1997. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401443>

Zhou, Q.-W., Wu, D., Meng, Q., Tang, H.-B., Wei, Z.-R., Kuang, Y., Yin, J.-Y., & Chen, J.-J. (2013). Rapid and Sensitive Detection of Vinorelbine in the Urine of Tumor Patients by Capillary Electrophoresis with Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-based Electrochemiluminescence Assay. *Analytical Sciences*, 29(7), 757–760.
<https://doi.org/10.2116/analsci.29.757>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.