

Σχολή Θετικών Επιστημών
«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»



Πτυχιακή / Διπλωματική Εργασία

«Μέθοδοι Προσδιορισμού Αντιψυχωσικών και Αντικαταθλιπτικών
Φαρμάκων στο Πλάσμα του Αίματος»

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΖΥΓΟΥΛΗΣ

Επιβλέπων καθηγητής: **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΣΙΑΦΟΥΛΗΣ**

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Ψυχικές διαταραχές.....	9
1.2. Μικρή ιστορική αναδρομή: Από το πρώτο αντιψυχωσικό φάρμακο μέχρι την σύγχρονη θεραπευτική	10
1.2.1. Η “γέννηση” των αντιψυχωσικών.....	10
1.2.2. Χλωροπρομαζίνη: Το πρωτοποριακό αντιψυχωσικό	10
1.2.3. Η άνοδος των αντιψυχωσικών δεύτερης γενιάς	10
1.2.4. Το μέλλον της ανάπτυξης των αντιψυχωσικών	11
1.3. Η επανάσταση των αντικαταθλιπτικών: Καταπολεμώντας την Κατάθλιψη.....	11
1.3.1 Ιπρονιαζίδη.....	11
1.3.2. Η άνοδος των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών (Tricyclic antidepressants-, TCA) ...	11
1.3.3. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective serotonin reuptake inhibitors-, SSRI): Σημείο καμπής.....	11
1.3.4. Το μέλλον της ανάπτυξης αντικαταθλιπτικών.....	12
2. Κοινές Ψυχικές Διαταραχές	13
2.1. Σχιζοφρένιες	13
2.2. Διπολική διαταραχή	13
2.3. Ψυχικές διαταραχές και αντικαταθλιπτικά φάρμακα.....	14
2.4. Αντιψυχωσικά φάρμακα	14
2.5. Αντικαταθλιπτικά φάρμακα.....	15
2.5.1. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs)	15
2.5.2. Αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης-, Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors- SNRI	16
2.5.3. Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Tricyclic antidepressants- TCA) και οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (Monoamine oxidase inhibitors- MAOIs)	17
2.5.4. NaSSA- NDRI- SARI	18
3. Παρακολούθηση θεραπευτικής δόσης φαρμάκου- Therapeutic Drug Monitoring (TDM).....	20
4. Μεθοδολογίες εκχύλισης και χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού	22
4.1. Γενικά	22
4.1.1 Προκατεργασία δείγματος: Αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωσικά φάρμακα στο πλάσμα αίματος ασθενών.....	23
4.2. Υγρή - Υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction – LLE).....	24
4.2.1. Πειραματική πορεία της LLE	24
4.2.2. Σύγχρονες μέθοδοι βασισμένες στην LLE	25

4.3. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid-Phase Extraction – SPE).....	26
4.3.1. Πειραματική πορεία SPE.....	27
4.3.1. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase Microextraction) (SPME)	27
4.4. Μέθοδος QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe technique)	28
4.5. Εκχύλιση υγρού-υγρού- Liquid-liquid Extraction πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα	29
4.6. Εκχύλιση στερεάς φάσης- Solid Phase Extraction (SPE) πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα	29
4.6.1. LLE και SPE και συνδυασμός με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές	30
4.7. Εφαρμογές των LLE και SPE στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών .	31
5. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης- High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	34
5.1. Γενικά	34
5.2. Προετοιμασία δείγματος	34
5.3. Βελτιστοποίηση HPLC	35
5.4. Ανάλυση και παρουσίαση αποτελεσμάτων	36
5.5. Πλεονεκτήματα χρήσης HPLC για την ανάλυση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών	38
6. High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS)..	39
7. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας- (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS))	41
7.1. Οργανολογία- Παράμετροι	41
7.2. Ανάλυση δεδομένων	42
7.3. Σύγκριση GC-MS με GC-MS/MS	44
7.4. Σύγκριση και διαφορές HPLC-MS/MS με GC-MS	44
8. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC))	46
8.1. Γενικά και σύγκριση με την HPLC	46
8.2. Σημαντικές οργανολογικές παράμετροι UPLC	46
8.3. Στήλες UPLC	47
8.3.1. Σύστημα Ανίχνευσης	47
8.4. Η εξέλιξη: από HPLC σε UHPLC	47
8.5. Σύγκριση HPLC με UPLC	48
8.6. Εφαρμογές των αναλυτικών τεχνικών HPLC, UPLC, GC-MS και LC/MS-MS στην ανίχνευση αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε πλάσμα αίματος	49
8.6.1. Υγρή χρωματογραφία	51
8.6.2. Φασματογραφία Μάζας	51
8.7. Επιπρόσθετες εφαρμογές των αναλυτικών μεθόδων στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών	52

9. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού- Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	60
9.1. Βασικές αρχές NMR	60
9.2. Τύποι φασμάτων NMR	61
9.3. Ποσοτική φασματοσκοπία qNMR: Πλεονεκτήματα	62
9.4. Διαφορετικοί Τύποι NMR	63
9.5. Εφαρμογή της NMR στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων	63
10. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση-(Capillary Electrophoresis (CE))	67
10.1. Capillary Electrophoresis για ανίχνευση ενώσεων σε πλάσμα ασθενών	68
10.2. CE: Εφαρμογές και προκλήσεις	69
10.3. Εφαρμογή της CE στην ανάλυση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων	69
11. Συζήτηση	72
12. Συμπεράσματα	74
13. Βιβλιογραφία	75

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει σταθερή αύξηση των ψυχικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένια, η διπολική διαταραχή και η κατάθλιψη. Ταυτόχρονα αυξάνονται οι ασθενείς που κάνουν χρήση εξειδικευμένων φαρμακευτικών προϊόντων με σκοπό την καταπολέμηση αυτών των ψυχικών νόσων. Η χορήγηση αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων αυξάνεται ραγδαία. Στην παρούσα εργασία αναφέρουμε αναλυτικές μεθόδους που εφαρμόζονται (LLE, GC/MS) ή που θα φανούν χρήσιμες στο μέλλον (NMR), για την ανίχνευσή αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο πλάσμα αίματος ασθενών. Δίνεται βάση σε μεθοδολογίες εκχύλισης και διαχωρισμού (SPE, LLE), σε χρωματογραφικές τεχνικές όπως HPLC, UPLC, LC-MS/MS, GC-MS, σε τεχνικές ηλεκτροφόρησης όπως η CE αλλά και ακόμα πιο προηγμένες και ακριβείς μεθόδους όπως το NMR. Αναλύονται, οι βασικές αρχές κάθε τεχνικής, όπως η προετοιμασία του υπό μελέτη δείγματος, η οργανολογία και η παραμετροποίηση του μηχανήματος και τα βασικά για την ερμηνεία και την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ακόμα γίνεται σύγκριση των αναλυτικών μεθόδων ως προς την αποτελεσματικότητά τους, την ποιότητά τους, την ακρίβεια, την ταχύτητα και άλλους σημαντικούς παράγοντες. Η βελτίωση των είδη υπάρχον μεθόδων αλλά και η παραγωγή νέων εξειδικευμένων μηχανημάτων είναι αναγκαία για την αύξηση της απόδοσης ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων φαρμάκων στο πλάσμα των ασθενών. Το ιατρικό προσωπικό, και με γνώμονα το Therapeutic Drug Monitoring (TDM) θα δημιουργήσει καλύτερες στρατηγικές περίθαλψης των ψυχικών νοσημάτων, βελτιώνοντας το βιοτικό επίπεδο των ασθενών και εξελίσσοντας το σύστημα υγείας.

Λέξεις Κλειδιά: Αντικαταθλιπτικά, Αντιψυχωσικά, πλάσμα αίματος, LLE, SPE, HPLC, UPLC, GC-MS, NMR, CE.

Abstract

In recent years there has been a steady increase in mental disorders such as schizophrenia, bipolar disorder, and depression. At the same time, there is an increase in the number of patients who use pharmaceutical products to combat these mental illnesses. The administration of antipsychotic and antidepressant drugs is increasing rapidly. In this paper we report analytical methods that are applied (LLE, GC/MS) or that will be useful in the future (NMR) for the detection of antipsychotic and antidepressant drugs in the blood plasma of patients. Methodologies for extraction and separation (SPE, LLE), chromatographic techniques such as HPLC, UPLC, LC-MS/MS, GC-MS, electrophoresis techniques such as CE and even more advanced and accurate methods such as NMR are discussed. The basic principles of each technique, such as the preparation of the sample under, the instrumentation and parameterization of the machine and the basics for the interpretation and analysis of the results are analyzed. It also compares the analytical methods in terms of their efficiency, quality, accuracy, speed, and other important factors. The improvement of the existing methods and the production of new specialized machines is necessary to increase the efficiency of detecting insignificant amounts of drugs in the patient's blood plasma. The medical staff, driven by Therapeutic Drug Monitoring (TDM) will create better strategies for the care of mental illnesses, improving the living standards of patients and evolving the health care system.

Keywords: Antidepressants, Antipsychotics, blood plasma, LLE, SPE, HPLC, UPLC, GC-MS, NMR, CE.

1. Εισαγωγή

1.1. Ψυχικές διαταραχές

Οι ψυχικές διαταραχές αποτελούν μείζον πρόβλημα για την παγκόσμια υγεία και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων που επηρεάζουν τον συλλογισμό, τα συναισθήματα και τις πράξεις αυτές καθ' αυτές. Εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως υποφέρουν από αυτές τις καταστάσεις, όπως το άγχος, κατάθλιψη, σχιζοφρένεια αλλά και διπολική διαταραχή. Συχνά προκαλούν σημαντική “ταλαιπωρία” και παρεμβαίνουν στην καθημερινή ποιοτική και βιώσιμη λειτουργικότητα (Vihang N. Vahia, 2013).

Ένας στους τέσσερις ενήλικες παγκοσμίως θα αντιμετωπίσει ψυχική ασθένεια κάποια στιγμή της ζωής του. Οι δύο πιο διαδεδομένες ψυχικές διαταραχές, που επηρεάζουν το 17% και το 30% του πληθυσμού, αντίστοιχα, είναι οι αγχώδεις διαταραχές και η κατάθλιψη. Στα κράτη με χαμηλό εισόδημα, οι γυναίκες πλήττονται δυσανάλογα από ψυχικά προβλήματα, τα οποία αυξάνουν τον κίνδυνο αυτοκτονίας, καθώς και την κοινωνική απομόνωση, την ανεργία και την έλλειψη στέγης. Υπολογίζεται ότι οι ψυχικές ασθένειες κοστίζουν στην οικονομία 2,5 τρισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (M. K. Christensen et al., 2020). Υπάρχει επείγουσα ανάγκη για περισσότερη χρηματοδότηση της έρευνας και της θεραπείας στον τομέα της ψυχικής υγείας, μείωση του στίγματος που συνδέεται με τις ψυχικές ασθένειες, καλύτερη πρόσβαση στη φροντίδα ψυχικής υγείας και προώθηση της εκπαίδευσης σε θέματα ψυχικής υγείας και της πρόληψης των καταστάσεων (Borwin Bandelow & Sophie Michaelis, 2015; Mahbub Hossain et al., 2020).

Μια πολύτροπη στρατηγική χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία των ψυχικών ασθενειών προκειμένου να ελεγχθούν αποτελεσματικά τα συμπτώματα και να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής. Αυτό περιλαμβάνει τον συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής και θεραπείας. Τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι δύο από τις ομάδες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψυχικής υγείας και είναι απαραίτητα για τη μείωση των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής όσων επηρεάζονται από αυτές τις ασθένειες (JA Lieberman, 2003; Seiya Miyamoto et al., 2015).

1.2. Μικρή ιστορική αναδρομή: Από το πρώτο αντιψυχωσικό φάρμακο μέχρι την σύγχρονη θεραπευτική

1.2.1. Η “γέννηση” των αντιψυχωσικών

Τα αντιψυχωσικά είναι μια κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ψυχωσικών ασθενειών, όπως η σχιζοφρένεια. Η ιστορία τους είναι μια ιστορία τυχαίας ανακάλυψης. Η προμεθαζίνη, ένα παράγωγο της φαινοθειαζίνης, χορηγήθηκε σε στρατιώτες που υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση από τον Γάλλο στρατιωτικό χειρουργό Henri-Marie Laborit στα μέσα της δεκαετίας του 1900, γεγονός που σηματοδότησε μια σημαντική καμπή στην αναζήτηση αποτελεσματικών θεραπειών για τις ψυχικές ασθένειες. Προς έκπληξή του, ο Laborit παρατήρησε ότι η προμεθαζίνη όχι μόνο ηρεμούσε τους στρατιώτες αλλά προκαλούσε και μια κατάσταση προσαρμογής στο περιβάλλον τους. Η διερεύνηση των φαινοθειαζινών ως πιθανών αντιψυχωσικών φαρμάκων παρακινήθηκε, μετά από αυτή τη διαπίστωση (Joel T. Braslow & Stephen R. Marder, 2019).

1.2.2. Χλωροπρομαζίνη: Το πρωτοποριακό αντιψυχωσικό

Το 1952, ο κόσμος έγινε μάρτυρας της εισαγωγής της χλωροπρομαζίνης, του πρώτου πραγματικού αντιψυχωσικού φαρμάκου. Αναπτυγμένο από τη γαλλική φαρμακευτική εταιρεία Rhône-Poulenc, η χλωροπρομαζίνη (Χημική δομή: **Εικόνα 1**) έφερε επανάσταση στη θεραπεία της σχιζοφρένειας, προσφέροντας μια πιο ανθρώπινη και αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι της ιδρυματοποίησης και της θεραπείας με ηλεκτροσόκ. Η ικανότητά της να μειώνει τις ψευδαισθήσεις, τις παραληρητικές ιδέες και την αποδιοργανωμένη σκέψη σηματοδότησε μια σημαντική ανακάλυψη στην ψυχιατρική (Seiya Miyamoto et al., 2015).

1.2.3. Η άνοδος των αντιψυχωσικών δεύτερης γενιάς

Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς (Second Generation Antipsychotics, S.G.A.) εμφανίστηκαν μετά από παρατεταμένες μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή της ντοπαμίνης στην ψύχωση. Όταν τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς (SGA) αναπτύχθηκαν, αρχικά τη δεκαετία του 1990, ήταν λιγότερο πιθανό να προκαλέσουν σημαντικές παρενέργειες, καθώς κατασκευάστηκαν για να στοχεύουν ειδικά τους υποδοχείς της ντοπαμίνης. Αυτά τα πιο πρόσφατα φάρμακα έχουν αποδειχθεί πιο επιτυχημένα στη μείωση των αρνητικών συμπτωμάτων, στην ενίσχυση της συνολικής λειτουργικότητας των ασθενών και στον έλεγχο των συμπτωμάτων της ψύχωσης (Joseph P McEvoy et al., 2010).

1.2.4. Το μέλλον της ανάπτυξης των αντιψυχωσικών

Σήμερα, η αναζήτηση ακόμη πιο αποτελεσματικών και ανεκτών από τον οργανισμό αντιψυχωσικών συνεχίζεται. Οι ερευνητές διερευνούν νέους φαρμακευτικούς στόχους, όπως οι υποδοχείς του γλουταμινικού και της σεροτονίνης, για να αναπτύξουν φάρμακα που προσφέρουν αυξημένη αποτελεσματικότητα και ευρύτερο φάσμα δράσης. Επιπλέον, οι προσεγγίσεις εξατομικευμένης ιατρικής κερδίζουν έδαφος, με στόχο την προσαρμογή της αντιψυχωσικής θεραπείας στις μοναδικές ανάγκες και τα χαρακτηριστικά των μεμονωμένων ασθενών (Joseph P McEvoy et al., 2010).

1.3. Η επανάσταση των αντικαταθλιπτικών: Καταπολεμώντας την Κατάθλιψη

1.3.1 Ιπρονιαζίδη

Ένα άλλο αξιοσημείωτο ορόσημο στην ιστορία των θεραπειών ψυχικής υγείας είναι η ανακάλυψη των αντικαταθλιπτικών, μιας κατηγορίας φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της κατάθλιψης (*Χημική δομή: Εικόνα 1*). Η αφήγηση ξεκίνησε με την τυχαία ανακάλυψη της ιπρονιαζίδης, ενός αντιβιοτικού που αποδείχθηκε ότι βελτίωνε τη διάθεση των ασθενών σε περιπτώσεις φυματίωσης. Ως αποτέλεσμα, οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (Monoamine oxidase inhibitors, MAOIs) διερευνήθηκαν ως πιθανά αντικαταθλιπτικά (JA Lieberman, 2003; Lopez-Munoz & Francisco Alamo Cecilio, 2009).

1.3.2. Η άνοδος των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών (Tricyclic antidepressants-, TCA)

Στη δεκαετία του 1960, η εισαγωγή των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών (TCA) σηματοδότησε μία νέα εποχή στη θεραπεία της κατάθλιψης. Τα TCAs δρουν αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης και της νορεπινεφρίνης, νευροδιαβιβαστές που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της διάθεσης. Αν και αποτελεσματικά στη διαχείριση των καταθλιπτικών συμπτωμάτων, τα TCAs συνοδεύονταν συχνά από πολλαπλές παρενέργειες.

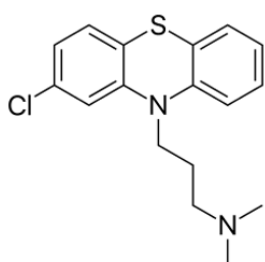
1.3.3. Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective serotonin reuptake inhibitors-, SSRI): Σημείο καμπής

Η αντικαταθλιπτική φαρμακευτική αγωγή τροποποιήθηκε όταν αναπτύχθηκαν οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) τη δεκαετία του 1980. Σε σύγκριση με τα προηγούμενα αντικαταθλιπτικά, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI), όπως η φλουοξετίνη (Prozac) και η σερτραλίνη (Zoloft), (*Εικόνα 1*) προσφέρουν καλύτερη ανεκτικότητα και ευρύτερο θεραπευτικό εύρος. Δεδομένου ότι λειτουργούν καλά για τη μείωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, οι SSRI

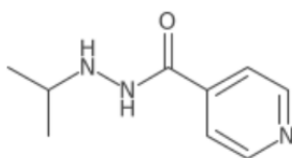
αποτελούν πλέον τη θεραπεία πρώτης γραμμής για τη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (Chaitra T. Ramachandrai et al., 2011).

1.3.4. Το μέλλον της ανάπτυξης αντικαταθλιπτικών

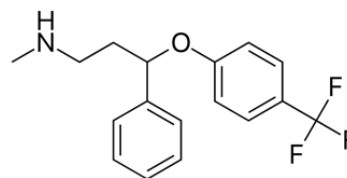
Η αναζήτηση πιο αποτελεσματικών αντικαταθλιπτικών συνεχίζεται. Οι ερευνητές διερευνούν νέους μηχανισμούς δράσης, όπως η στόχευση στα συστήματα του γλουταμικού και των νευροπεπτιδίων, για την ανάπτυξη φαρμάκων που θα αντιμετωπίζουν την ανθεκτική στη θεραπεία κατάθλιψη και θα παρέχουν πιο εξατομικευμένες θεραπευτικές επιλογές (Chaitra T. Ramachandrai et al., 2011)



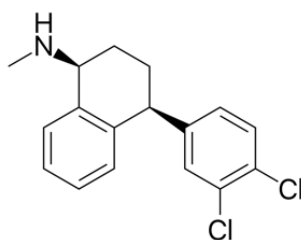
Χλωροπρομαζίνη



Ιπρονιαζίδη



Φλουοξετίνη



Σερτραλίνη

Εικόνα 1: Χλωροπρομαζίνη: Το πρώτο αντιψυχωσικό φάρμακο. Ιπρονιαζίδη: Ένα αντιβιοτικό με αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Φλουοξετίνη και Σερτραλίνη: αντικαταθλιπτικά που ανήκουν στην κατηγορία SSRI (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

2. Κοινές Ψυχικές Διαταραχές

2.1. Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι μια σύνθετη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μια σειρά συμπτωμάτων που επηρεάζουν πολύπλευρα τον ασθενή. Οι παραληρητικές ιδέες, η αναστάτωση στα πρότυπα συλλογισμού και οι ψευδαισθήσεις αποτελούν παραδείγματα συμπτωμάτων. Ταυτόχρονα προκαλείται, συναισθηματική ισοπέδωση, κοινωνική απομάκρυνση αλλά και ανηδονία. Τα προβλήματα μνήμης και η κακή εκτελεστική λειτουργία είναι παραδείγματα γνωστικών συμπτωμάτων. Μπορεί να ακολουθηθεί μια χρόνια πορεία, με την έναρξη να λαμβάνει χώρα συνήθως στα τέλη της εφηβείας ή στην πρώιμη ενήλικη ζωή. Τα αντιψυχωσικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ως βασικός πυλώνας της θεραπείας για τον έλεγχο των συμπτωμάτων. Επίσης ψυχοκοινωνικές θεραπείες, όπως η συμβουλευτική και η ανάπτυξη δεξιοτήτων, χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της καθημερινής λειτουργικότητας και της ποιότητας ζωής. Το ευρύ φάσμα των κλινικών φαινοτύπων που σχετίζονται με την πάθηση αναδεικνύει τη σημασία των ενδεδειγμένων και εξατομικευμένων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας (E. Stengel, 1959; Vihang N. Vahia, 2013).

2.2. Διπολική διαταραχή

Η διπολική διαταραχή είναι μια πολύπλευρη διαταραχή της διάθεσης που χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα επεισόδια μανίας, υπομανίας και κατάθλιψης. Τα μανιακά επεισόδια περιλαμβάνουν αυξημένη διάθεση, αυξημένη ενέργεια και παρορμητικότητα, ενώ τα καταθλιπτικά επεισόδια εκδηλώνονται ως βαθιά θλίψη και απώλεια ενδιαφέροντος. Αν και τα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία, συχνά πρωτοεμφανίζονται στα τέλη της εφηβείας ή στην πρώιμη ενήλικη ζωή. Λόγω της χρόνιας φύσης της διαταραχής, τα άτομα μπορεί να έχουν σταθερά διαστήματα μεταξύ των επεισοδίων, ενώ η κατάσταση είναι δια βίου και χαρακτηρίζεται από ποικίλα πρότυπα επεισοδίων. Στη θεραπεία χρησιμοποιούνται συνήθως αντιψυχωσικά φάρμακα κατά τη διάρκεια των μανιακών επεισοδίων, σταθεροποιητές της διάθεσης όπως το λίθιο και ψυχοεκπαίδευση για να βοηθηθούν οι ασθενείς να διαχειριστούν τα συμπτώματά τους και να κατανοήσουν τη φύση της νόσου. Η ποικιλία του κλινικού φαινότυπου αναδεικνύει την αναγκαιότητα εξατομικευμένων μεθόδων για τη διάγνωση και τη συνεχή φροντίδα (E. Stengel, 1959; Vihang N. Vahia, 2013)

2.3. Ψυχικές διαταραχές και αντικαταθλιπτικά φάρμακα

Οι ψυχικές διαταραχές που αντιμετωπίζονται με αντικαταθλιπτικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της Μείζονος Καταθλιπτικής Διαταραχής (ΜΚΔ), της Γενικευμένης Αγχώδους Διαταραχής (ΓΑΔ), της Ιδιοψυχαναγκαστικής Διαταραχής (ΙΨΔ), της Διαταραχής Πανικού και της Διαταραχής Κοινωνικού Άγχους, μοιράζονται κοινά στοιχεία όσον αφορά τον κλινικό τους φαινότυπο.

Οι ανωμαλίες των νευροδιαβιβαστών, ιδίως εκείνες που αφορούν τη σεροτονίνη και τη νορεπινεφρίνη, εμπλέκονται σε όλες αυτές τις ασθένειες. Για τη διόρθωση αυτών των ανισορροπιών χρησιμοποιούνται αντικαταθλιπτικά, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης (SNRI) και των εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI). Η ψυχοθεραπεία είναι συχνά απαραίτητη για τη διαχείριση αυτών των ασθενειών όταν συνδυάζεται με φαρμακευτική αγωγή. Αυτό αναδεικνύει τη σημασία μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης της θεραπείας που λαμβάνει υπόψη τις ατομικές διαφορές στα συμπτώματα και τις αντιδράσεις (JA Lieberman, 2003; Lopez-Munoz & Francisco Alamo Cecilio, 2009).

2.4. Αντιψυχωσικά φάρμακα

Αντιψυχωσικά φάρμακα όπως η κλοζαπίνη (Εμπορικό Όνομα (Ε.Ο.) Clozaril, Denzapine and Zaponex), η αριπιπραζόλη (Ε.Ο. Abilify, Abilify Maintena, and Aristada), η κουετιαπίνη (Ε.Ο. Atrolak, Biquelle, Sondate, Zaluron), η ολανζαπίνη και η ρισπεριδόνη συνιστώνται συχνά για τη σχιζοφρένεια (Χημικές δομές: **Εικόνα 3**). Αυτά τα φάρμακα ανακουφίζουν κυρίως συμπτώματα όπως οι ψευδαισθήσεις, τον αποδιοργανωμένο συλλογισμό, δρώντας στα συστήματα νευροδιαβιβαστών, ιδίως σε εκείνα που αφορούν την ντοπαμίνη και τη σεροτονίνη. Σε ποσοστό άνω του 27%, η φουμαρική κουετιαπίνη -που κυκλοφορεί επίσης με την εμπορική ονομασία Seroquel, είναι το αντιψυχωσικό φάρμακο που συνταγογραφείται συχνότερα σε ασθενείς στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το φάρμακο χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας και της διπολικής διαταραχής (Seiya Miyamoto et al., 2015).

Οι αντιδράσεις ασθενή στην φαρμακευτική αγωγή, διαφέρουν από άτομο σε άτομο, γεγονός που υπογραμμίζει την αξία της εξατομικευμένης φροντίδας υπό την επίβλεψη ειδικών. Τα αντιψυχωσικά όπως η λουρασιδόνη, η ολανζαπίνη και η κουετιαπίνη χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία της διπολικής διαταραχής, ιδίως σε μανιακά ή μικτά επεισόδια. Τα φάρμακα αυτά βοηθούν στην αποφυγή καταθλιπτικών υποτροπών, στη μείωση των μανιακών συμπτωμάτων και στη σταθεροποίηση της διάθεσης (Joel T. Braslow & Stephen R. Marder, 2019).

Οι μεταβολίτες αυτών των φαρμάκων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φαρμακοκινητική τους. Για παράδειγμα, η ρισπεριδόνη υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό για να σχηματίσει τον ενεργό μεταβολίτη της, την παλιπεριδόνη. Η ολανζαπίνη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ προς τον ενεργό μεταβολίτη της, τη νορκετιαπίνη. Στην περίπτωση της βαλπροάτης, οι μεταβολίτες της συμβάλλουν στην αντισπασμωδική και στη σταθεροποιητική δράση. Η κατανόηση του μεταβολισμού αυτών των φαρμάκων είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των δόσεων, την πρόβλεψη των θεραπευτικών αποτελεσμάτων, την ανίχνευσή τους στο αίμα των ασθενών και τη διαχείριση των πιθανών παρενεργειών. Όπως συμβαίνει με κάθε φάρμακο, η αντίδραση του οργανισμού στην θεραπεία και οι διακυμάνσεις του μεταβολισμού θα πρέπει να λαμβάνονται προσεκτικά υπόψη στη συνολική θεραπευτική προσέγγιση (Joel T. Braslow & Stephen R. Marder, 2019).

2.5. Αντικαταθλιπτικά φάρμακα

2.5.1. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs)

Οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) είναι μια κατηγορία αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που δρουν αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης, ενός νευροδιαβιβαστή που εμπλέκεται στη ρύθμιση της διάθεσης, των συναισθημάτων και του ύπνου. Εμποδίζοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης, οι SSRIs αυξάνουν τα επίπεδα σεροτονίνης που είναι διαθέσιμα στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε βελτίωση της διάθεσης και μείωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης (Sebastian A. Alvano & Luis M. Zieher, 2020).

Μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα SSRI είναι τα Fluoxetine (E.O. Prozac), Sertraline (E.O. Zoloft), Citalopram (E.O. Celexa), Escitalopram (E.O. Lexapro), Fluvoxamine (E.O. Luvox), Paroxetine (E.O. Paxil) (Sebastian A. Alvano & Luis M. Zieher, 2020).

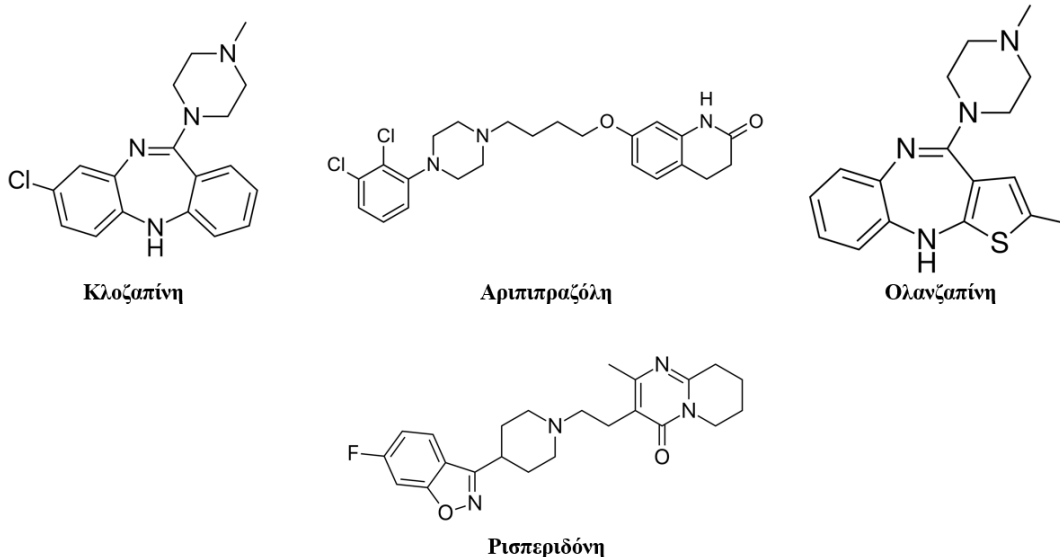
Τα (SSRIs) είναι μια κατηγορία αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που έχουν επιδείξει αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής (MDD), της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής (OCD), της διαταραχής πανικού, της γενικευμένης αγχώδους διαταραχής (GAD), της προεμμηνορροϊκής δυσφορικής διαταραχής (PMDD) και της διαταραχής κοινωνικού άγχους (SAD)(**Εικόνα 4**)(Sebastian A. Alvano & Luis M. Zieher, 2020).

Οι SSRI μπορεί να έχουν διάφορες παρενέργειες, κυρίως ναυτία, διάρροια, πονοκεφάλους, ζάλη, ξηροστομία, αϋπνία και σεξουαλική δυσλειτουργία, παρόλο που συνήθως είναι ανεκτά. Επιπλέον, οι SSRI μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα φάρμακα, απαιτούν αρκετές

εβδομάδες για να γίνουν πλήρως αποτελεσματικά και πρέπει να διακόπτονται προσεκτικά υπό ιατρική παρακολούθηση για την αποφυγή συμπτωμάτων στέρησης.

Ψυχική Διαταραχή	Φαρμακευτική Αγωγή	Κοινά Φάρμακα
Σχιζοφρένεια	Αντιψυχωτικά	Κλοζαπίνη, Ρισπεριδόνη, Ολανζαπίνη
Διπολική Διαταραχή	Καταστολείς διάθεσης, Αντιψυχωτικά, Αντικαταθλιπτικά	Λιθίουμ, Βαλπροϊκό οξύ, Καρβαμαζεπίνη
Κατάθλιψη (MDD)	Αντικαταθλιπτικά	Σερτραλίνη, Φλουοξετίνη, Εσιταλοπράμ
Γενικευμένη Αγχώδης Διαταραχή (GAD)	Αγχολυτικά, Αντικαταθλιπτικά	Παροξετίνη, Εσιταλοπράμ, Βενλαφαξίνη
Αναγκαστική Διαταραχή (OCD)	Αντικαταθλιπτικά, Σεροτονινεργικά φάρμακα	Φλουοξετίνη, Κλομιπραμίνη
Διαταραχή Πανικού	Αντικαταθλιπτικά, Αγχολυτικά	Αλπραζολάμη, Σερτραλίνη, Παροξετίνη
Κοινωνική Αγχώδης Διαταραχή	Αντικαταθλιπτικά, Βήτα-αναστολείς	Σερτραλίνη, Παροξετίνη, Προπρανολόλη

Εικόνα 2: Κοινές ψυχικές διαταραχές, φαρμακευτική αγωγή και φάρμακα (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).



Εικόνα 3: Χημικές δομές κάποιων από των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

2.5.2. Αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης-, Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors- SNRI

Οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης-νορεπινεφρίνης (SNRI) είναι μια κατηγορία αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που δρουν αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη τόσο της σεροτονίνης όσο και της νορεπινεφρίνης, δύο νευροδιαβιβαστών που εμπλέκονται στη

ρύθμιση της διάθεσης, των συναισθημάτων και των επιπέδων ενέργειας (**Εικόνα 4**). Οι SNRIs βελτιώνουν τη διάθεση, μειώνουν τα καταθλιπτικά συμπτώματα και ενισχύουν την ενέργεια εμποδίζοντας την επαναπρόσληψη αυτών των νευροδιαβιβαστών, αυξάνοντας την ποσότητα σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης που είναι διαθέσιμες στον εγκέφαλο. Αν και οι SNRI είναι γενικά βιώσιμοι για τον οργανισμό, μπορεί να προκαλέσουν ορισμένες παρενέργειες, συνήθως ναυτία, ζάλη, πονοκέφαλο, ξηροστομία, αυξημένη εφίδρωση, διαταραχές του ύπνου και σεξουαλική δυσλειτουργία (Yee-Chi Lee & Phoon-Ping Chen, 2010) (Bernardo Dell’Osso et al., 2009).

Κατηγορία Φαρμάκων	Επιλεκτικοί Αναστολείς Ανάκλησης Σεροτονίνης (SSRIs)	Αναστολείς Ανάκλησης Σεροτονίνης-Νορεπινεφρίνης (SNRIs)
Μηχανισμός Δράσης	Αυξάνουν επίπεδα σεροτονίνης με αναστολή επανάληψης.	Αυξάνουν επίπεδα σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης.
Κύριες Χρήσεις	Κατάθλιψη, Αγχώδεις Διαταραχές, OCD, PTSD, Διαταραχές Πανικού.	Κατάθλιψη, Αγχώδεις Διαταραχές, Χρόνιος Πόνος.
Κοινές Παρενέργειες	Ναυτία, Διάρροια, Αϋπνία, Σεξουαλικές Δυσλειτουργίες.	Ναυτία, Ζάλη, Αϋπνία, Εφίδρωση, Σεξουαλικές Δυσλειτουργίες.
Παραδείγματα Φαρμάκων	Φλουξετίνη, Σερτραλίνη, Παροξετίνη.	Βενλαφαξίνη, Δουλοξετίνη.

Εικόνα 4: SSRIs vs SNRIs (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

2.5.3. Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Tricyclic antidepressants- TCA) και οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (Monoamine oxidase inhibitors- MAOIs)

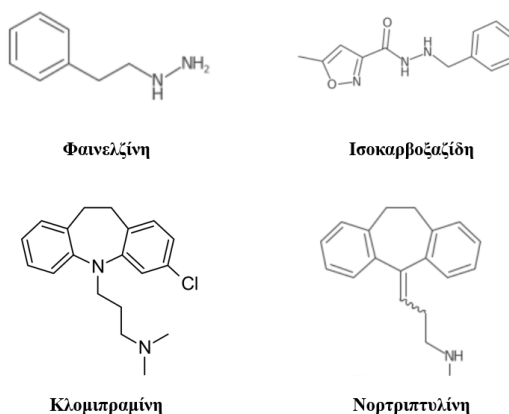
Δύο ακόμα είδη αντικαταθλιπτικών φαρμάκων: τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Tricyclic antidepressants- TCA) και οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (Monoamine oxidase inhibitors- MAOIs), καθένα με μοναδικές παρενέργειες και τρόπους δράσης (**Εικόνα 5**). Ο κύριος τρόπος με τον οποίο δρουν τα TCAs, όπως η ιμιπραμίνη, η νορτριπυλίνη και η αμιτριπυλίνη, είναι η παρεμπόδιση της επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών όπως η νορεπινεφρίνη και η σεροτονίνη (Anastasios Georgotas et al., 1996).

Οι αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης (MAOI), όπως η φαινελζίνη και η τρανυλκυπρομίνη, λειτουργούν αναστέλλοντας το ένζυμο μονοαμινοξειδάση, που είναι υπεύθυνο για τη

διάσπαση των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο (Χημικές δομές: Εικόνα 6). «Μπλοκάροντας» αυτό το ένζυμο, οι ΜΑΟΙ αυξάνουν τα επίπεδα της σεροτονίνης, της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης. Ωστόσο, η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω των σημαντικών περιορισμών και των πιθανών αλληλεπιδράσεων με άλλα φάρμακα. Επιπλέον, τα ΜΑΟΙ μπορούν να αλληλεπιδράσουν αρνητικά με διάφορα φάρμακα, υπογραμμίζοντας την ανάγκη προσεκτικής παρακολούθησης και περιορισμένης χρήσης αλλά και ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσής τους στο αίμα. Ενώ τόσο οι TCAs όσο και οι ΜΑΟΙ παραμένουν μέρος του οπλοστασίου των αντικαταθλιπτικών, οι νεότερες κατηγορίες με πιο ευνοϊκό προφίλ παρενεργειών συχνά θεωρούνται ως επιλογές πρώτης γραμμής (G Laux, 2020).

Κατηγορία Φαρμάκων	Αναστολείς Μονοαμίνης Οξειδάσης (MAOIs)	Τρικυκλικά Αντικαταθλιπτικά (TCAs)
Μηχανισμός Δράσης	Αναστέλλουν την ένζυμο μονοαμίνη οξειδάση, αυξάνοντας τα επίπεδα νευροδιαβιβαστών όπως η σεροτονίνη, η νορεπινεφρίνη και η δοπαμίνη στον εγκέφαλο.	Αναστέλλουν την επανάληψη των νευροδιαβιβαστών, κυρίως σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης, αυξάνοντας τα επίπεδά τους στον εγκέφαλο.
Κύριες Χρήσεις	Κατάθλιψη (συχνά για περιπτώσεις ανθεκτικές στη θεραπεία), διαταραχές άγχους, κοινωνική φοβία, διαταραχή πανικού.	Κατάθλιψη, διαταραχές άγχους, χρόνιος πόνος, αϋπνία, πονοκέφαλοι τύπου μиграίνας.

Εικόνα 5: MAOIs και TCAs: Βασικά χαρακτηριστικά (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

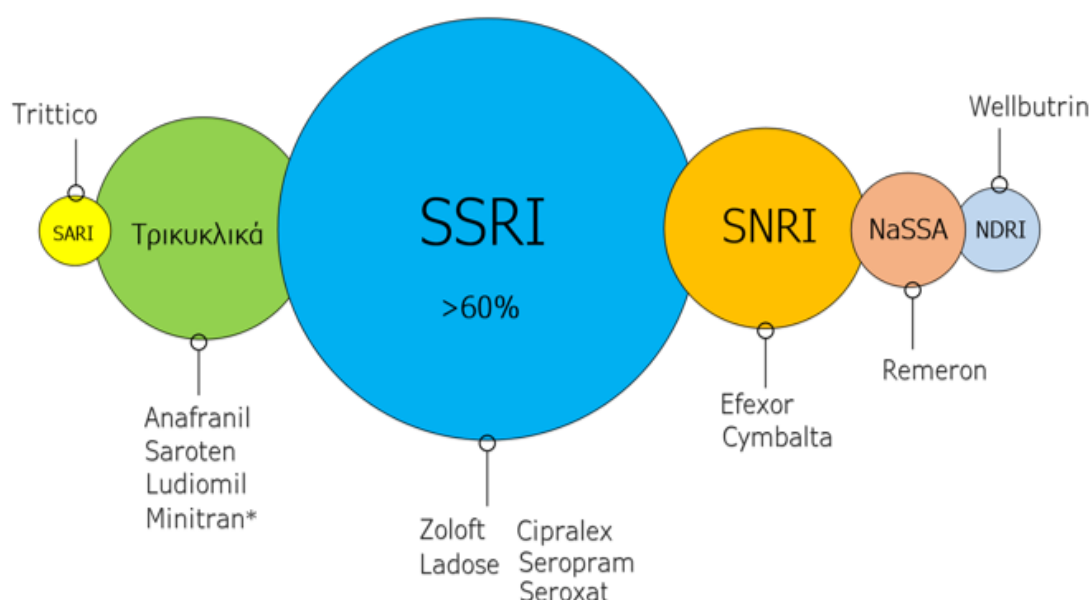


Εικόνα 6: Χημικές δομές: Φαινελζίνη και Ισοκαρβοξαζίδη (MAOIs) και Κλομιπραμίνη και Νορτριπυλίνη (TCAs) (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

2.5.4. NaSSA- NDRI- SARI

Τα νοραδρενεργικά και ειδικά σεροτονινεργικά αντικαταθλιπτικά (Noradrenergic and specific serotonergic antidepressants- NaSSAs), οι αναστολείς επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης-ντοπαμίνης (Noradrenaline and dopamine reuptake inhibitors- NDRIs) και οι ανταγωνιστές και αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Serotonin2-antagonists/serotonin reuptake

inhibitors- SARIs) είναι διαφορετικές κατηγορίες αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, η καθεμία με διακριτούς μηχανισμούς δράσης. Αναστέλλοντας ορισμένους υποδοχείς, τα NaSSAs όπως η μιρταζαπίνη αυξάνουν τα επίπεδα νορεπινεφρίνης και σεροτονίνης (**Εικόνα 7**). Οι NDRI, όπως η βουπροπιόνη, εμποδίζουν κυρίως την επαναρρόφηση της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης. Η αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης και οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων σεροτονίνης προάγονται από τα SARIs, όπως η τραζοδόνη και η νεφαζοδόνη, για να τροποποιήσουν τα επίπεδα σεροτονίνης. Η επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής γίνεται με γνώμονα τα συμπτώματα κάθε μεμονωμένου ασθενούς, το ιατρικό του ιστορικό και τις πιθανές παρενέργειες. Επίσης θα πρέπει να γίνεται συζήτηση με τους επαγγελματίες υγείας για εξατομικευμένες συμβουλές με βάση την κατάσταση του ατόμου (G Laux, 2020) (Michele Protti et al., 2020).



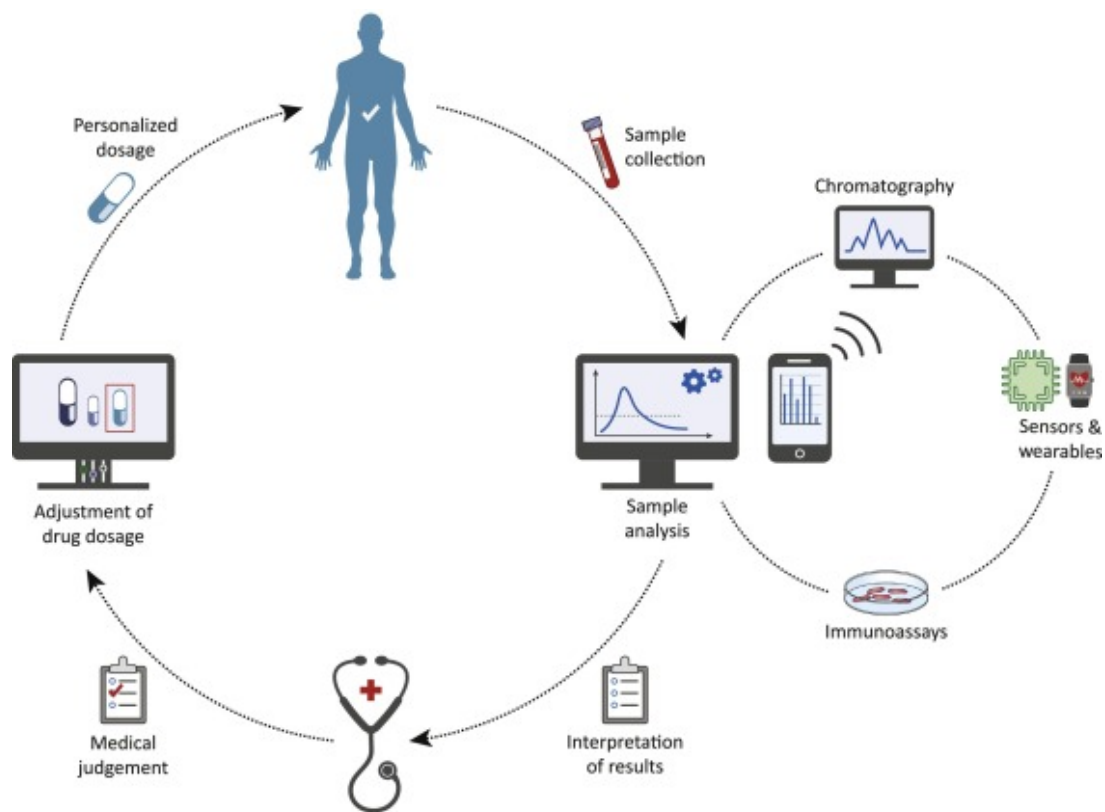
Εικόνα 7: Αντικαταθλιπτικά: Κατηγορίες και συχνότητα (Αριστοτέλης Βάθης, 2019).

3. Παρακολούθηση θεραπευτικής δόσης φαρμάκου- Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Η παρακολούθηση φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς (TDM), είναι μια κλινική πρακτική που περιλαμβάνει τη μέτρηση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων φαρμάκων στο πλάσμα αίματος ή στον ορό ενός ασθενούς σε τακτά χρονικά διαστήματα (**Εικόνα 8**). Για να διασφαλιστεί ότι οι ασθενείς λαμβάνουν επαρκή και ασφαλή δοσολογία φαρμάκων, ο κύριος στόχος του TDM είναι η βελτιστοποίηση των δοσολογικών σχημάτων των φαρμάκων. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στους επαγγελματίες του ιατρικού κλάδου να προσαρμόζουν τις δόσεις των φαρμάκων για κάθε ασθενή, λαμβάνοντας υπόψη φαρμακοκινητικές μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένης της απορρόφησης, του μεταβολισμού αλλά και άλλων παραγόντων (Ju-Seop Kang & Min-Ho Lee, 2009; Ranjan et al., 2023).

Μία από τις βασικές πτυχές της TDM είναι η εξατομικευμένη θεραπεία. Η TDM βοηθά στην προσαρμογή της φαρμακευτικής θεραπείας για τους ασθενείς με βάση τη συγκεκριμένη ανταπόκρισή τους στα φάρμακα. Αναγνωρίζει ότι τα άτομα μπορεί να μεταβολίζουν διαφορετικά τα φάρμακα, οδηγώντας σε διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των φαρμάκων στο σώμα. Ακόμα μέσα από την TDM οι γιατροί στοχεύουν στην βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του εκάστοτε φαρμάκου και στην μεγιστοποίηση του θεραπευτικού οφέλους. Η TDM βοηθά επίσης στην πρόληψη και στην ελαχιστοποίηση των παρενεργειών, και σχετίζεται είτε με μη βέλτιστες συγκεντρώσεις φαρμάκων (αναποτελεσματικότητα) είτε με υπερβολικές συγκεντρώσεις (τοξικότητα). Η προσαρμογή των δόσεων των φαρμάκων με βάση τα αποτελέσματα της TDM μπορεί να ελαχιστοποιήσει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών. Επιπρόσθετα παρακολουθείται η μεταβλητότητα: Παράγοντες όπως η ηλικία, το βάρος, η γενετική και η ταυτόχρονη φαρμακευτική αγωγή μπορούν να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο το σώμα ενός ατόμου μεταβολίζει ένα φάρμακο. Η TDM συμβάλλει στη συνεκτίμηση αυτής της μεταβλητότητας και επιτρέπει ακριβείς προσαρμογές για την επίτευξη των επιθυμητών θεραπευτικών αποτελεσμάτων (Ranjan et al., 2023). Σημαντικό να αναφερθεί είναι πως υπάρχουν πολλά φάρμακα, όπως ορισμένα αντιβιοτικά, αντιεπιληπτικά φάρμακα, ανοσοκατασταλτικά και αντιψυχωσικά τα οποία δρουν ποιοτικά σε ακριβείς συγκεντρώσεις. Μικρές αλλαγές στις συγκεντρώσεις του φαρμάκου μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια. Τέλος η TDM είναι ιδιαίτερα σημαντική σε ορισμένες κλινικές καταστάσεις, όπως η επιληψία, η μεταμόσχευση και η ψυχιατρική, όπου η διατήρηση

ακριβών επιπέδων φαρμάκων είναι ζωτικής σημασίας για τη θεραπευτική επιτυχία (Tomasz Tuzimski & Anna Petruczynik, 2020) (Ranjan et al., 2023).



Εικόνα 8: Therapeutic Drug Monitoring (TDM) (H. Ceren Ates et al., 2020).

4. Μεθοδολογίες εκχύλισης και χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού

4.1. Γενικά

Η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid extraction- LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction- SPE) είναι δύο βασικές μεθοδολογίες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση φαρμάκων στο πλάσμα αίματος. Αν και μπορεί να διαρκέσει πολύ αλλά και να απαιτήσει μεγάλους όγκους διαλύτη, η LLE λειτουργεί με βάση την αρχή της μεταφοράς μιας διαλυμένης ουσίας, με βάση τη διαφορετική διαλυτότητα μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών, συνήθως νερού και ενός οργανικού διαλύτη (A. Bokhary et al., 2021). Αυτό είναι το πρώτο βήμα για τη παραλαβή και τον καθαρισμό των υπό μελέτη ουσιών από το πλάσμα. Αντίθετα, η SPE περιλαμβάνει τη διέλευση του δείγματος πλάσματος μέσω μιας «κασέτας» ή στήλης που περιέχει ένα στερεό προσροφητικό μέσω του οποίου συγκρατεί επιλεκτικά τις εξεταζόμενες ουσίες, μέσω προσρόφησης, ενώ οι μη προσροφούμενες ουσίες διέρχονται χωρίς να δεσμευτούν (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022). Αυτή η διαδικασία αρχίζει συνήθως με καταβύθιση πρωτεϊνών. Η καταβύθιση πρωτεϊνών είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από βιολογικά υλικά όπως το πλάσμα αίματος. Περιλαμβάνει την εισαγωγή μιας χημικής ουσίας καθίζησης, όπως το ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη, η οποία επηρεάζει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών, προκαλώντας τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και τη δημιουργία ιζημάτων. Μετά από έντονη ανάμιξη και επώαση, το μείγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστούν τα πρωτεϊνικά ιζήματα και το υπερκείμενο. Το διαυγές υπερκείμενο, απαλλαγμένο πλέον από πρωτεΐνες, συλλέγεται και επεξεργάζεται με SPE για περαιτέρω ανάλυση. Αυτό το βήμα είναι κρίσιμο για την αποφυγή παρεμποδίσεων των πρωτεϊνών στη προσρόφηση SPE, με αποτέλεσμα πιο αξιόπιστα και ακριβή αναλυτικά δεδομένα. Ακολουθεί η κατακράτηση των ουσιών ενδιαφέροντος, που προσρροφούνται στη στερεά φάση και στη συνέχεια εκλύονται. Η SPE προτιμάται λόγω της αποδοτικότητας, της εκλεκτικότητας, της μειωμένης κατανάλωσης διαλυτών και των δυνατοτήτων αυτοματοποίησης. Αυτά τα χαρακτηριστικά την καθιστούν μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδο για τη συγκέντρωση και τον καθαρισμό αντικαταθλιπτικών από το πλάσμα, θέτοντας τις βάσεις για περαιτέρω χρωματογραφική διερεύνηση (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022).

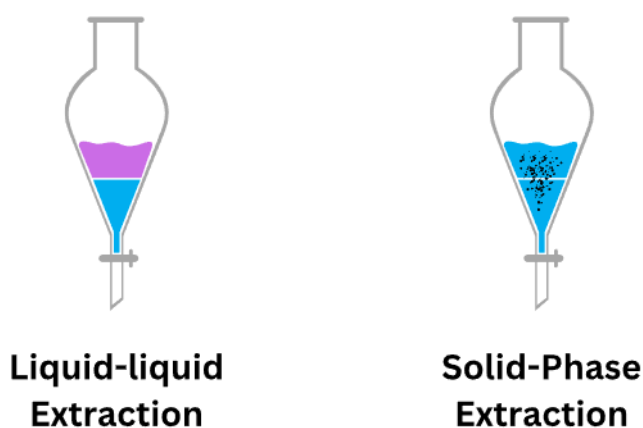
Όπως προαναφέρθηκε, η LLE είναι μια τεχνική που βασίζεται στην κατανομή μίας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών, συνήθως μιας υδατικής και μιας οργανικής φάσης,

όπου η κατανομή της διαλυμένης ουσίας καθορίζεται από τη διαλυτότητά της και τον συντελεστή κατανομής. (A. Bokhary et al., 2021)

4.1.1 Προκατεργασία δείγματος: Αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωσικά φάρμακα στο πλάσμα αίματος ασθενών

Δεδομένου ότι πρόκειται για την πιο χρονοβόρα διαδικασία, είναι σκόπιμη μια ενδεδειγμένη ανάλυση που να επικεντρώνεται στις πιθανές στρατηγικές και, ειδικότερα, στις πρόσφατες εξελίξεις στον χειρισμό των δειγμάτων για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων (Fiona Mary Antony et al., 2021; Science Unfiltered, 2022).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα αντικαταθλιπτικά βρίσκονται συνήθως σε δείγματα ούρων, ορού, πλάσματος και ολικού αίματος- επομένως, κάθε μία από αυτές τις συλλογές πρέπει να αντιμετωπίζεται διαφορετικά με βάση τις υπό εξέταση ενώσεις. Η κατεργασία είναι ένα κρίσιμο βήμα για την απομάκρυνση τυχών επιδράσεων από τα συστατικά της μήτρας του δείγματος (Matrix Effect) που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Αυτό θα βελτιώσει τα αποτελέσματα, θα μειώσει το σήμα υποβάθρου (background) και τον θόρυβο και θα καταστήσει την τεχνική πιο εφαρμόσιμη σε πιο σύνθετα βιολογικά υλικά. Ως αποτέλεσμα, η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction- LLE) είναι προκατεργασίες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τέτοιου είδους φάρμακα. Η ευρωστία των αναλυτικών διαδικασιών επηρεάζονται γενικά από την κατεργασία του δείγματος- η προσυγκέντρωση των αναλυτών ενισχύει την ευαισθησία και επιτρέπει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.



Εικόνα 9: LLE and SPE (Fiona Mary Antony et al., 2021).

4.2. Υγρή - Υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction – LLE)

Όπως προαναφέρθηκε, η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών, συνήθως μιας υδατικής και μιας οργανικής φάσης, όπου η κατανομή της διαλυμένης ουσίας καθορίζεται από τη διαλυτότητά της και τον συντελεστή κατανομής.

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, το διχλωρομεθάνιο, το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο, είναι κρίσιμη, καθώς πρέπει να είναι μη αναμίξιμος με το νερό, να έχει καλή ικανότητα εκχύλισης για την υπό ανάλυση ουσία και να είναι συμβατός με τις επακόλουθες μεθόδους ανάλυσης. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξαρτάται από παράγοντες όπως το pH της υδατικής φάσης και την φύση του διαλύτη, με τις προσαρμογές του pH να ενισχύουν συχνά την εκχύλιση των ιοντιζόμενων ενώσεων. Η LLE είναι μια απλή μέθοδος ικανή να χειριστεί μεγάλους όγκους δειγμάτων, αλλά πολλές φορές χρονοβόρα και συχνά απαιτεί τη χρήση δυνητικά επικίνδυνων διαλυτών (A. Bokhary et al., 2021).

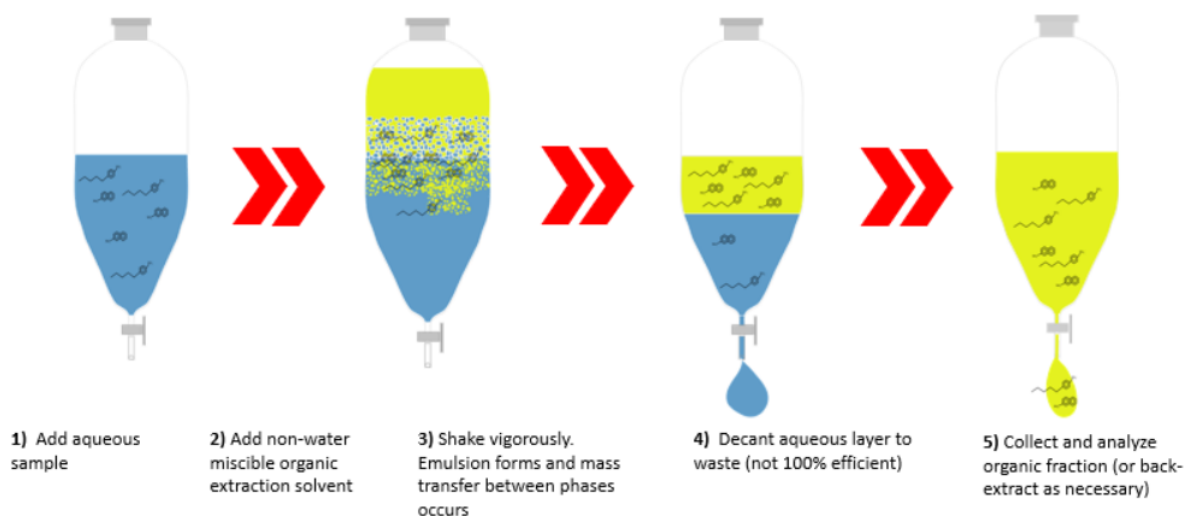
4.2.1. Πειραματική πορεία της LLE

Σε ένα τυπικό πείραμα ταυτοποίησης φαρμάκων, η διαδικασία αρχίζει με την προετοιμασία του δείγματος, όπου συλλέγεται ένας γνωστός όγκος βιολογικού υγρού (π.χ. πλάσμα αίματος). Εάν το φάρμακο είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες του πλάσματος, μπορεί να απαιτηθεί ένα στάδιο καταβύθισης πρωτεϊνών με τη χρήση ενός διαλύτη όπως το ακετονιτρίλιο ή η μεθανόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης του φαρμάκου, με βασικές συνθήκες για τα ασθενή οξέα και όξινη συνθήκες για τις ασθενείς βάσεις. Ένας οργανικός διαλύτης προστίθεται στο υδατικό δείγμα, συνήθως σε αναλογία 1:1, για να διευκολυνθεί η μεταφορά του φαρμάκου στην οργανική φάση. Ακολουθεί έντονη ανάμιξη, η οποία προάγει το διαχωρισμό φάσεων, που συχνά επιτυγχάνεται μέσω φυγοκέντρωσης ή φυσικής καθίζησης. Η οργανική φάση, που περιέχει το εκχυλισμένο φάρμακο, συλλέγεται στη συνέχεια προσεκτικά και το υδατικό στρώμα μπορεί να εκχυλιστεί εκ νέου, εάν είναι απαραίτητο, για βελτιωμένη απόδοση (R. Stock & C. B. F. Rice, 2013). Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται με χρήση αζώτου ή περιστροφικού εξατμιστήρα και το υπόλειμμα ανασυστήνεται σε κατάλληλο διαλύτη για ανάλυση (**Εικόνα 10**). Το εκχύλισμα υποβάλλεται σε ανάλυση μέσω κατάλληλης χρωματογραφικής τεχνικής, όπως HPLC ή GC-MS, με σύγκριση των αποτελεσμάτων με πρότυπα για ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση (Fiona Mary Antony et al., 2021).

Οι προφυλάξεις ασφαλείας, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης θαλάμου νηματικής ροής και προστατευτικού εξοπλισμού κατά το χειρισμό οργανικών διαλυτών, είναι απαραίτητες και η βελτιστοποίηση παραμέτρων όπως ο τύπος του διαλύτη, ο όγκος του δείγματος, ο όγκος του διαλύτη και ο χρόνος ανάμιξης είναι κρίσιμες για την επίτευξη της μέγιστης αποτελεσματικότητας της εκχύλισης (Fiona Mary Antony et al., 2021).

4.2.2. Σύγχρονες μέθοδοι βασισμένες στην LLE

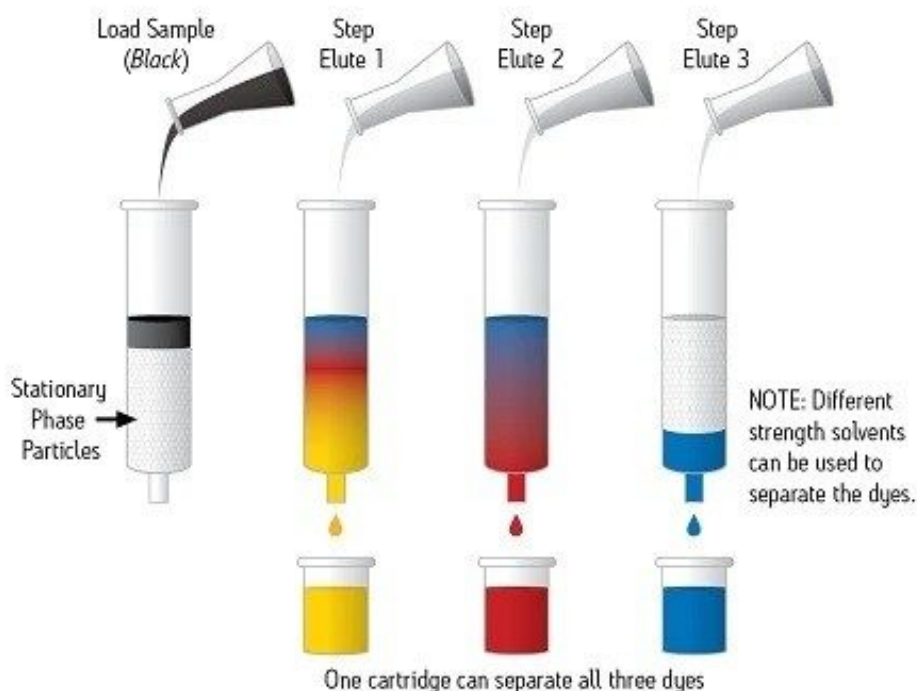
Σημαντικό να αναφερθεί είναι πως υπάρχουν νέες μέθοδοι LLE (Παράλληλη LLE σε επίπεδο Νανομέτρων-Nanoliter Scale Parallel Liquid-Liquid Extraction) είναι μία σύγχρονη μέθοδος για καθαρισμό υψηλής απόδοσης με χρήση μικροσυστοιχίας σταγονιδίων. Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε ενδεχομένως να προσφέρει πιο αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης με το χειρισμό πολύ μικρών όγκων υγρού, γεγονός που είναι ιδιαίτερα επωφελές για εφαρμογές που απαιτούν υψηλή απόδοση και ελάχιστη χρήση δείγματος (Wiedmann et al., 2023). Ακόμα, η Deep Eutectic Solvents for Liquid-Liquid Extraction περιλαμβάνει τη χρήση ευτηκτικών (eutectic) διαλυτών ως εναλλακτική λύση στους παραδοσιακούς διαλύτες για τις διαδικασίες εκχύλισης. Οι βαθιά ευτηκτικοί διαλύτες είναι ένας τύπος ιοντικού υγρού που μπορεί να είναι πιο φιλικός προς το περιβάλλον και ενδεχομένως να προσφέρει καλύτερη διαλυτότητα για ορισμένες ενώσεις, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (kanzaki, 2023). Επίσης, η Slug-Flow Nanoextraction (SFNE) βασίζεται στη μικρορευστομηχανική σταγονιδίων, επιτρέποντας την ταυτόχρονη εκτέλεση υγρής-υγρής εκχύλισης σε ένα τριχοειδή σωλήνα που λαμβάνει όγκο σε επίπεδο νανολίτρων. Η μέθοδος αυτή διευκολύνει την ανάλυση υψηλής απόδοσης με μειωμένη κατανάλωση διαλύτη και όγκο δείγματος (Wells & Kennedy, 2020).



Εικόνα 10: LLE πειραματική πορεία (Frederick F. Cantwell & Manon Losier, 2002).

4.3. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid-Phase Extraction – SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια μέθοδος που προσροφόνται τα μόρια ενδιαφέροντος, όπως φάρμακα, σε μια στερεά φάση, ακολουθούμενη από την έκλουσή τους με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη, μια διαδικασία που καθοδηγείται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υπο μελέτη μορίου, της στερεάς φάσης και του διαλύτη. Η επιλογή της στερεάς φάσης, η οποία ποικίλλει από υλικά αντίστροφης φάσης όπως το C18, έως την κανονική φάση, την ιοντοανταλλαγή και τον αποκλεισμό μεγέθους, είναι κρίσιμη και εξαρτάται από τις ιδιότητες του μορίου ενδιαφέροντος (**Εικόνα 11**). Η SPE είναι γνωστή για την υψηλή εκλεκτικότητα και αποδοτικότητά της, με τη δυνατότητα προσαρμογής των επιλογών του προσροφητικού υλικού και του διαλύτη για συγκεκριμένους στόχους, ενισχύοντας έτσι την καθαρότητα και μειώνοντας τις παρεμποδίσεις (R. Stock & C. B. F. Rice, 2013). Αυτή η τεχνική είναι ευέλικτη, εφαρμόσιμη σε διάφορους τύπους και όγκους δειγμάτων και χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό και τη συγκέντρωση ή απομόνωση ουσιών από πολύπλοκα βιολογικά υλικά, όπως το πλάσμα αίματος στην ανάλυση φαρμάκων. Επιπλέον, η συμβατότητα της SPE με την αυτοματοποίηση την καθιστά προτιμώμενη επιλογή σε πολλά εργαστήρια, προσφέροντας υψηλή απόδοση και σταθερή αναπαραγωγικότητα (Yan Peng et al., 2019).



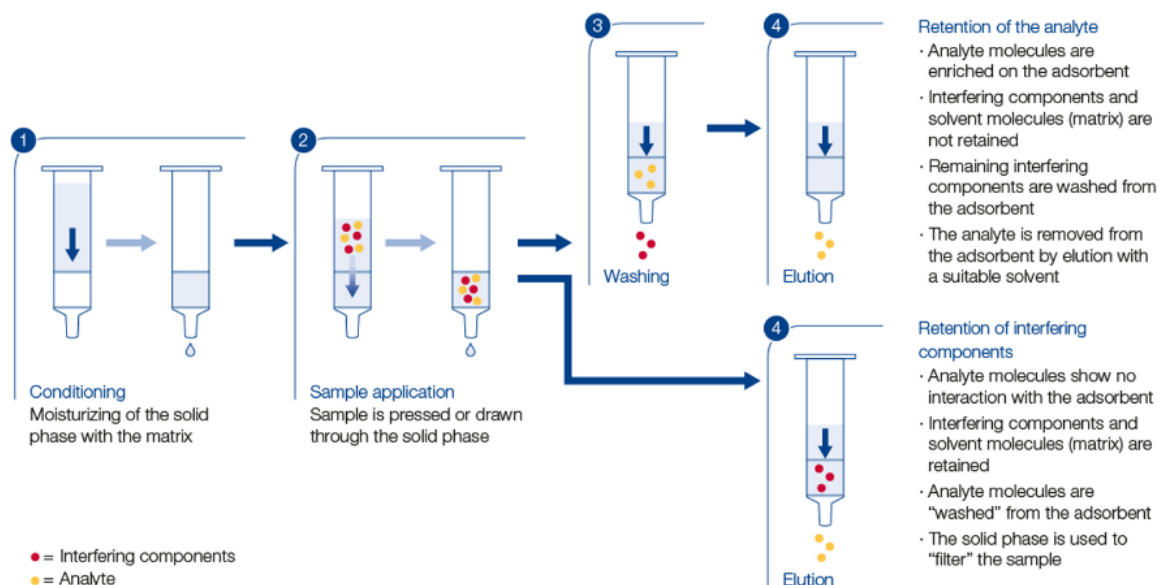
Εικόνα 11: Στερεά Φάση της SPE και διαδοχικά βήματα (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022).

4.3.1. Πειραματική πορεία SPE

Η προετοιμασία του δείγματος είναι το πρώτο. Προετοιμάζεται ένας προκαθορισμένος όγκος βιολογικού δείγματος, όπως το πλάσμα αίματος, και η καταβύθιση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο ή η μεθανόλη για την εξάλειψη των παρεμποδίζουσων πρωτεϊνών. Για την ενεργοποίηση του υλικού προσρόφησης, η επιλεγμένη στήλη SPE προετοιμάζεται στη συνέχεια με διαλύτες συμβατούς με το βιολογικό δείγμα, συνήθως μεθανόλη και στη συνέχεια νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα. Το προκατεργασμένο δείγμα τοποθετείται στη στήλη, όπου τα χημικά χαρακτηριστικά του οδηγούν στην προσρόφηση των φαρμακευτικών ενώσεων στη στερεά φάση. Τα «ανεπιθύμητα» συστατικά του δείγματος και οι προσμίξεις απομακρύνονται, με χρήση ήπιου διαλύτη ή ρυθμιστικού διαλύματος χωρίς έκλυση των αναλυτών-στόχων. Το φάρμακο-στόχος εκλύεται στη συνέχεια με τη χρήση διαλύτη στον οποίο έχει διαλυθεί το φάρμακο, μια κρίσιμη επιλογή που εξαρτάται από τη φύση του φαρμάκου (**Εικόνα 12**). Εάν είναι απαραίτητο, το διάλυμα έκλυσης που περιέχει το αναλυτή εξατμίζεται, χρησιμοποιώντας ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη για ανάλυση (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022). Τέλος, το εκχυλισμένο φάρμακο αναλύεται με τη χρήση κατάλληλης αναλυτικής τεχνικής, όπως HPLC, GC-MS ή LC-MS, με τα αποτελέσματα να συγκρίνονται με πρότυπα αναφοράς για ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση (Yan Peng et al., 2019).

4.3.1. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase Microextraction) (SPME)

Η μέθοδος SPME είναι αυτοματοποιημένη, εύκολη, αποτελείται από ένα στάδιο, και είναι γρήγορη μέθοδος εκχύλισης χωρίς διαλύτες. Η συσκευή αυτή αποτελείται από μία συντηγμένη ίνα πυριτίου επικαλυμμένη με μία κατάλληλη στατική φάση, όπου οι αναλυτές προσροφούνται. Η εξαγωγή των αναλυτών-στόχων από τη μήτρα του δείγματος στην ίνα γίνεται είτε απευθείας με την επικαλυμμένη ίνα βυθισμένη στο υγρό δείγμα (άμεσο SPME) είτε στη φάση ατμού πάνω από το υγρό δείγμα (τεχνική γνωστή και ως HSPME). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα βήματα εκχύλισης περιλαμβάνουν τον τύπο της ίνας, τον χρόνο εκχύλισης, την ιοντική ισχύ, το pH του δείγματος, τη θερμοκρασία εκχύλισης και την ανάδευση του δείγματος. Οι μεταβλητές που επηρεάζουν τα βήματα εκρόφησης περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το χρόνο εκρόφησης και τη θερμοκρασία του φούρνου εστίασης (Ghorbani et al., 2023).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση SPE (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022).

4.4. Μέθοδος QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe technique)

Η μέθοδος QuEChERS είναι μία βολική αντικατάσταση της μεθόδου εκχύλισης υγρού/υγρού και παρέχει αποτελέσματα υψηλής ποιότητας με μικρό αριθμό βημάτων και με χαμηλή κατανάλωση διαλύτη και γυάλινων σκευών. Η ονομασία της μεθόδου αυτής σημαίνει γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη εξαγωγή πολικών και μη πολικών ενώσεων με επαρκείς ανακτήσεις και έτσι γίνεται κατάλληλη για την απομόνωση μιας μεγάλης γκάμας ενώσεων. Χρησιμοποιείται κυρίως σε μη λιπαρά δείγματα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι τα υψηλά ποσοστά ανάκτησης, τα ακριβή αποτελέσματα, η υψηλή δειγματική απόδοση, το χαμηλότερο κόστος των αντιδραστηρίων και η ανθεκτικότητα. Το βασικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η συγκέντρωση των ενώσεων-στόχων στο τελικό εκχύλισμα είναι χαμηλότερη από ότι στα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με τη χρήση των παραδοσιακών διαδικασιών. Κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί η απαραίτητη ευαισθησία και τα επιθυμητά όρια ποσοτικοποίησης το τελικό εκχύλισμα πρέπει να συμπυκνωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό. Οι (Jacqueline de M. Campêlo et al., 2021) βελτιστοποίησαν την εκχύλιση μέσω QuEChERS για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 20 αντικαταθλιπτικών δειγμάτων αίματος με LC-MS/MS. Η μελέτη αυτή έδειξε μια βιώσιμη μέθοδο που μπορεί να εφαρμοστεί για αναλύσεις ρουτίνας, με γρήγορη και εύκολη προετοιμασία του δείγματος και συνολικό χρόνο εκτέλεσης 8 λεπτών για κάθε ανάλυση. Ακόμα, άλλη μία εφαρμογή, μία βελτιωμένη αναλυτική προσέγγιση με βάση το QuEChERS/UHPLC-PDA για τον ποσοτικό προσδιορισμό της

φλουοξετίνης, της κλομιπραμίνης και των ενεργών μεταβολιτών τους. Τα όρια ανίχνευσης ήταν χαμηλά, και κυμαίνονταν μεταξύ 0,060 και 0,092 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλους τους αναλυτές, ενώ το χαμηλότερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, που αντιστοιχεί στη χαμηλότερη συγκέντρωση της πρότυπης καμπύλης. Η μέθοδος έδειξε επίσης καλά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάκτηση, με τιμές που κυμαίνονταν από 91% έως 105% (Alves et al., 2017).

4.5. Εκχύλιση υγρού-υγρού- Liquid-liquid Extraction πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) είναι μια ευέλικτη τεχνική ικανή να εκχυλίσει ένα ευρύ φάσμα αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων πολικών και μη πολικών ενώσεων, από διάφορες μήτρες. Από οικονομική άποψη, ευνοείται για το χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού σε σύγκριση με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), καθιστώντας την μια «βιώσιμη» επιλογή για εργαστήρια με περιορισμένο προϋπολογισμό, και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη διαχείριση μεγάλων όγκων δειγμάτων. Ωστόσο, η LLE έχει τα μειονεκτήματά της: η διαδικασία μπορεί να είναι χρονοβόρα, ιδίως με τα χειροκίνητα βήματα χειρισμού υγρών, γεγονός που μπορεί να περιορίσει τη χρήση της σε περιβάλλοντα υψηλής απόδοσης όπου η ταχύτητα είναι απαραίτητη. Η συγκριτικά υψηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών, η οποία εγείρει ζητήματα με το περιβάλλον, παράγει απόβλητα και αυξάνει τα λειτουργικά έξοδα, είναι ένα άλλο σοβαρό μειονέκτημα (Εικόνα 13). Επιπλέον, η πολυπλοκότητα των φάσεων διαχωρισμού υγρής-υγρής φάσης καθιστά δύσκολη την αυτοματοποίηση των διεργασιών LLE, καθιστώντας την λιγότερο κατάλληλη για εργαστήρια που επιδιώκουν την πλήρη αυτοματοποίηση (Fiona Mary Antony et al., 2021).

4.6. Εκχύλιση στερεάς φάσης- Solid Phase Extraction (SPE) πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική και γρήγορη μέθοδος που είναι κατάλληλη για εφαρμογές υψηλής απόδοσης λόγω των ταχύτερων χρόνων επεξεργασίας του δείγματος. Σε σύγκριση με την εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), έχει το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιεί πολύ λιγότερο οργανικό διαλύτη, γεγονός που μειώνει το κόστος και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, ενώ παράλληλα τηρεί τις αρχές της πράσινης χημείας. Επιπλέον, η αυτοματοποίηση ταιριάζει εξαιρετικά στη μεθοδική ροή εργασίας της SPE, καθώς βελτιώνει την αναπαραγωγιμότητα, μειώνει το ανθρώπινο λάθος και ενισχύει την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας των δειγμάτων (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022).

Ωστόσο, η SPE έχει και τα μειονεκτήματά της: ενώ προσφέρει εκλεκτικότητα μέσω μιας ποικιλίας υλικών προσροφητικού υλικού, μπορεί μερικές φορές να είναι λιγότερο ευέλικτη από την LLE για ορισμένους τύπους αναλυτών, με την επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού να είναι ζωτικής σημασίας. Το κόστος που σχετίζεται με τα φυσιγγία και τα υλικά SPE μπορεί να είναι υψηλότερο από τον εξοπλισμό και τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην LLE, επηρεάζοντας τον συνολικό προϋπολογισμό του εργαστηρίου (**Εικόνα 13**). Επιπλέον, η SPE μπορεί να αντιμετωπίσει περιορισμούς κατά το χειρισμό μεγάλων όγκων δειγμάτων λόγω της πεπερασμένης χωρητικότητας των φυσιγγίων ή των δίσκων, γεγονός που αποτελεί μειονέκτημα για εφαρμογές που απαιτούν την επεξεργασία σημαντικών ποσοτήτων δειγμάτων (Mohamed E. I. Badawy et al., 2022).

Κριτήριο	Υγρή-Υγρή Εκχύλιση (LLE)	Στερεάς Φάσης Εκχύλιση (SPE)
Μηχανισμός	Χρήση δύο μη αναμίξιμων διαλυμάτων για τον διαχωρισμό των ενώσεων	Χρήση στερεού υλικού για την προσρόφηση των ενώσεων από ένα υγρό διάλυμα.
Εφαρμογή	Κατάλληλη για μεγάλους όγκους δειγμάτων.	Προτιμάται για μικρότερους όγκους δειγμάτων και πιο πολύπλοκα δείγματα.
Αποδοτικότητα	Μπορεί να είναι χρονοβόρα και λιγότερο επαναληπτική.	Υψηλότερη επαναληψιμότητα και αποδοτικότητα.
Χειρισμός	Απαιτεί προσοχή στη φάση διαχωρισμού.	Ευκολότερος χειρισμός, λιγότερο επιρρεπής σε λάθη.
Κόστος	Συνήθως φθηνότερη, αλλά απαιτεί περισσότερους διαλύτες.	Μπορεί να είναι πιο ακριβή λόγω των ειδικών στηλών

Εικόνα 13: Σύγκριση μεταξύ υγρή και στερεάς φάσης εκχύλιση (Fiona Mary Antony et al., 2021; Mohamed E. I. Badawy et al., 2022)

4.6.1. LLE και SPE και συνδυασμός με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές

Η LLE και η εκχύλιση στερεάς φάσης SPE χρησιμοποιούνται κυρίως για την προετοιμασία πολύπλοκων δειγμάτων πριν από την ανάλυση, με τεχνικές διαχωρισμού όπως η χρωματογραφία ιόντων (Ion Chromatography- IC) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), στις οποίες μπορεί να μην είναι δυνατή η ανάλυση χωρίς κατάλληλη κατεργασία. Η SPE πλεονεκτεί για την ικανότητά της να παρέχει ποσοτικά ανακτήσιμους αναλυτές, μια κρίσιμη πτυχή, για καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την LLE. Επιπλέον, η SPE ενδείκνυται για εκχύλιση υψηλής απόδοσης, προσφέροντας μια χρονικά αποδοτική εναλλακτική λύση έναντι των συνήθως πιο αργών και χειροκίνητων διαδικασιών που

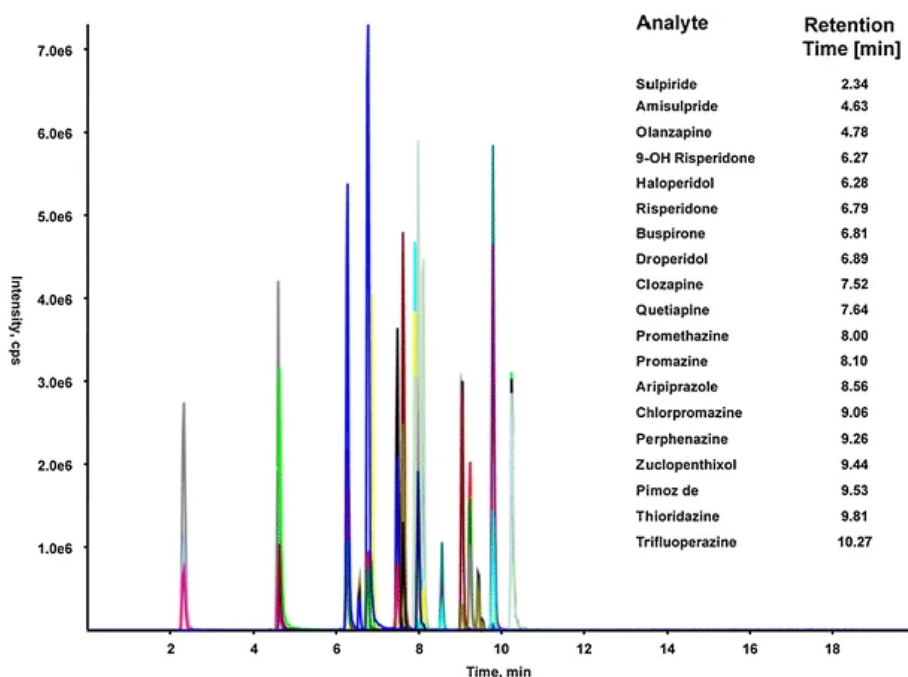
σχετίζονται με τις IC και TLC. Η ευελιξία της LLE και της SPE μπορεί να τις προσαρμόσει ως προπαρασκευαστικά βήματα για διάφορες αναλυτικές μεθόδους, και ενισχύει τη χρησιμότητά τους σε ποικίλες αναλυτικές ροές εργασίας ή μεθόδους (R. Stock & C. B. F. Rice, 2013).

4.7. Εφαρμογές των LLE και SPE στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών

Όπως προαναφέρθηκε η LLE χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φαρμάκων στο πλάσμα αίματος ασθενών που λαμβάνουν αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Πολλές φορές οι διάφορες επιστημονικές ομάδες βασίζονται στις βασικές αρχές των αναλυτικών μεθόδων, όπως η LLE, και με γνώμονα τις χημικές ιδιότητες των υπό μελέτη ουσιών, καταλήγουν στην μερική τροποποίηση (customizing) των μεθόδων, με σκοπό την αποδοτικότερη ανίχνευση. Οι βασικές τροποποιήσεις γίνονται στην επιλογή της κατάλληλης στήλης, της θερμοκρασίας και των Οι (Farajzadeh & Abbaspour, 2018) ανέπτυξαν και επικύρωσαν μια νέα μέθοδο για την εκχύλιση και τη συγκέντρωση τριών κοινών τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (αμιτριπτυλίνη, ιμιπραμίνη και κλομιπραμίνη) από το ανθρώπινο πλάσμα, πριν από την ανάλυσή τους με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. Η μέθοδος περιλάμβανε ένα σύστημα εκχύλισης τριών φάσεων με χρήση πλάσματος, ακετονιτριλίου και n-εξανίου. Η διαδικασία διαχώρισε αποτελεσματικά τα φάρμακα από άλλα συστατικά του πλάσματος, εξασφαλίζοντας υψηλή εκλεκτικότητα. Η μέθοδος αυτή αποδείχθηκε ιδιαίτερα ευαίσθητη και ακριβής, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 0,001 έως 0,003 $\mu\text{g/ml}$. Η ανάλυση των ενώσεων έγινε με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography- GC) με χρήση οργάνου Shimadzu (μοντέλο GC-2014) και του φασματογράφου μάζας. Το ήλιο επιλέχθηκε ως αέριο φορέας, ενώ εφαρμόστηκαν και συγκεκριμένες θερμοκρασίες.

Οι (Saar et al., 2009) συνέκριναν την αποδοτικότητα απομόνωσης αντιψυχωσικών φαρμάκων από πλάσμα αίματος ασθενών μέσω LLE και SPE και ανάλυση και μέτρηση των επιπέδων αυτών με LC-MS-MS. Όσον αφορά την LLE, σε γυάλινο σωλήνα, 0,5 ml αίματος αναμίχθηκαν με 50 μL διαλύματος έκλουσης A. Για σύγκριση, προστέθηκαν είτε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Trizma, είτε 1 ml κορεσμένου διαλύματος θεικού νατρίου, είτε 100 mg στερεού NaHCO_3 . Τα μείγματα αίματος-ρυθμιστικού διαλύματος εκχυλίστηκαν με 8 ml, τριών διαφορετικών διαλυτών ή μειγμάτων διαλυτών, με αποτέλεσμα εννέα διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης. Οι διαλύτες εκχύλισης ήταν οι: οξικός αιθυλεστέρας, μείγμα διαιθυλαιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα (50:50) ή 1-χλωροβουτάνιο. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν για 30 λεπτά. Μετά από μια σύντομη φυγοκέντρωση για τον διαχωρισμό των στρωμάτων, το στρώμα του διαλύτη μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα ώστε να εξατμιστεί (στους 40°C για 27

λεπτά). Το υπόλειμμα ανασυστάθηκε σε 100 μL μίγματος έκλουσης A και έκλουσης B (90:10) και μεταφέρθηκε στον αυτόματο δειγματολήπτη. Το τελικό εκχύλισμα (10 μL) εγχύθηκε στο σύστημα LC-MS-MS. Όσον αφορά την SPE, σε γυάλινο σωλήνα των 10 ml, 0,5 ml αίματος αναμίχθηκαν με 50 μL διαλύματος έκλουσης A και 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων. Το μείγμα υποβλήθηκε σε υπερήχους για 10 λεπτά πριν από τη φυγοκέντρηση (10 λεπτά στα 1800 g). Το υπερκείμενο (1 ml) προστέθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και φορτώθηκε σε φυσίγγια SPE που είχαν προηγουμένως προετοιμαστεί με 3 ml καθαρισμένου νερού, 3 ml μεθανόλης και 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Τα φορτωμένα φυσίγγια SPE υποβλήθηκαν σε διαδοχική επεξεργασία με 6 mL καθαρισμένου νερού, 1 mL οξικού οξέος και 3 mL μεθανόλης. Οι αναλυτές εκλούστηκαν με 3 mL 84% οξικού αιθυλεστέρα, 12% ισοπροπανόλης και 4% αμμωνίας. Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο σύστημα εξάτμισης στους 40°C για 27 λεπτά. Το υπόλειμμα ανασυστάθηκε σε 100 μL μίγματος έκλουσης A και έκλουσης B (90:10) και μεταφέρθηκε στον αυτόματο δειγματολήπτη. Το τελικό εκχύλισμα (10 μL) εγχύθηκε στο σύστημα LC-MS-MS. Όσον αφορά τις συνθήκες της HPLC, πραγματοποιήθηκε έκλυση σε στήλη (4,6 mm \times 150 mm, με μέγεθος σωματιδίων 5 μm). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 50 mmol L⁻¹ υδατικό μυρμηκικό αμμώνιο ρυθμισμένο σε pH 3,5 με μυρμηκικό οξύ και ακετονιτρίλιο που περιείχε 0,1% μυρμηκικό οξύ. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 60°C ενώ ο αυτόματος δειγματολήπτης λειτούργησε σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 14: Σύγκριση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης και των επιδράσεων της μήτρας LC-MS-MS με τις μεθόδους LLE και SPE για 19 αντιψυχωσικά στο ανθρώπινο αίμα (Saar et al., 2009).

Ένα από τα σημαντικά ευρήματα της έρευνας ήταν οι σημαντικές διαφορές μεταξύ προθανάτιου και μεταθανάτιου αίματος όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Αυτό μάλλον βασίζεται στην διαφορετική περιεκτικότητα σε παράγοντες του αίματος, ατόμων πριν και μετά τον θάνατο, καθώς αυτοί μπορεί να επηρεάζουν την αναλυτική ισχύ αυτών των μεθόδων.

Ακόμα, στην μελέτη των (Alizadeh Nabil et al., 2015) παρουσιάζεται μια γρήγορη και απλή μέθοδος για την εκχύλιση, την προσυγκέντρωση και τον προσδιορισμό της φλουβοξαμίνης, της νοτριπτυλίνης και της μαπροτιλίνης, με LLE ακολουθούμενη από ανίχνευση αέριας χρωματογραφίας-ιονισμού φλόγας (gas chromatography–flame ionization- GC-FID). Συγκεκριμένα, ένα μείγμα διμεθυλοφορμαμιδίου (διαλύτης διασποράς), 1,1,2,2-τετραχλωροαιθανίου (διαλύτης εκχύλισης) και οξικού ανυδρίτη (αντιδραστήριο παραγωγοποίησης) (derivatization)) εγχύθηκε ταχέως στο θερμαινόμενο δείγμα. Στη συνέχεια, ο αναλυτής ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και το θολό διάλυμα που σχηματίστηκε φυγοκεντρήθηκε. Τέλος, ένα μέρος της φάσης που καθιζάνει εγχύθηκε στο GC-FID. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, διερευνήθηκε και βελτιστοποιήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής των κατάλληλων διαλυτών εκχύλισης και των όγκων τους, του όγκου του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης, της θερμοκρασίας, της προσθήκης αλάτων, του pH και του χρόνου και της ταχύτητας φυγοκέντρωσης.

Οι LLE και SPE σε συνδυασμό με άλλες αναλυτικές μεθόδους είναι καθοριστικές για την αποτελεσματική και ακριβή ανίχνευση φαρμάκων, και αυτό το γεγονός ανάγει την σημαντικότητα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Περισσότερες εφαρμογές της LLE και της SPE για την ανίχνευση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών παρουσιάζονται στα κεφάλια 8.6 και 8.7.

5. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης- High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5.1. Γενικά

Στην αναλυτική διαδικασία προσδιορισμού των αντιψυχωσικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα αίματος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), τρία βασικά στάδια είναι καθοριστικά. Αρχικά, η "Συλλογή και προετοιμασία του δείγματος" περιλαμβάνει την προσεκτική συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων αίματος για την απομόνωση του πλάσματος και την προετοιμασία του για ανάλυση, διασφαλίζοντας ότι τα δείγματα είναι αντιπροσωπευτικά και απαλλαγμένα από προσμίξεις. Στη συνέχεια, το στάδιο της βελτιστοποίησης της HPLC, περιλαμβάνει την επιλογή των κατάλληλων στηλών και κινητών φάσεων, καθώς και την επικύρωση της μεθόδου για τη διασφάλιση της ακρίβειας στο διαχωρισμό και την ανίχνευση του υπό ανάλυση δείγματος. Το τελικό στάδιο είναι η εφαρμογή της για τον προσδιορισμό των αναλυτών και η ανάλυση των δεδομένων και η υποβολή της έκθεσης του αποτελέσματος, εφόσον αφορά και μετρήσεις «ρουτίνας». Τα δεδομένα που λαμβάνονται από τα χρωματογραφήματα αναλύονται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιψυχωσικών ενώσεων, ακολουθούμενη από μια ολοκληρωμένη και σαφή παρουσίαση των ευρημάτων. Διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη λήψη «αξιόπιστων» και κατατοπιστικών αποτελεσμάτων (Frank Steiner et al., 2019) (YV Kazakevich & R Lobrutto, 2007).

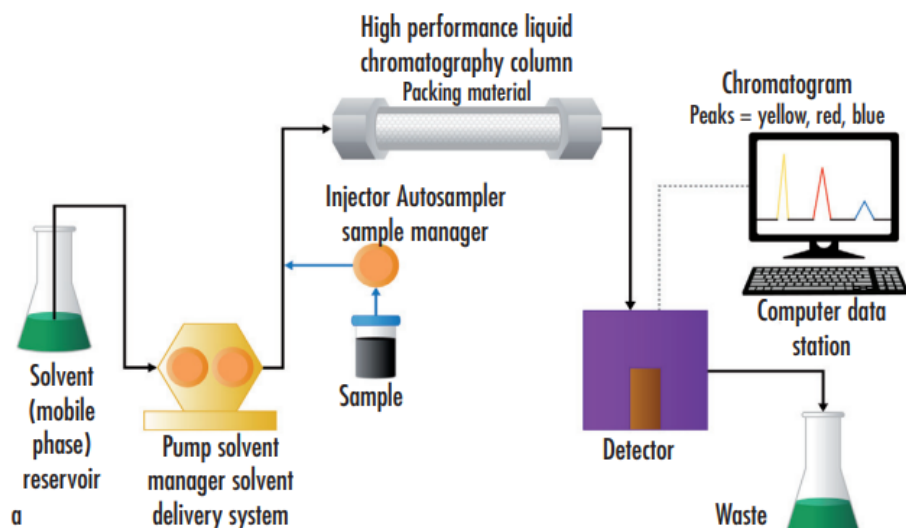
5.2. Προετοιμασία δείγματος.

Η συλλογή και η προετοιμασία του δείγματος είναι κρίσιμα αρχικά βήματα στην ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η διαδικασία αυτή αρχίζει με τη συλλογή δειγμάτων αίματος, η οποία συνήθως πραγματοποιείται μέσω φλεβοκέντησης με τη χρήση σωληναρίων που περιέχουν αντιπηκτικά για την πρόληψη της πήξης (Serban Voldoveanu & Victor David, 2022). Μόλις συλλεχθούν, τα δείγματα αίματος υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση, μια διαδικασία που διαχωρίζει το πλάσμα - το συστατικό που μας ενδιαφέρει - από τα άλλα κυτταρικά στοιχεία. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την καταβύθιση των πρωτεϊνών, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάλυση. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με την προσθήκη στο πλάσμα ενός παράγοντα καταβύθισης πρωτεϊνών, όπως το ακετονιτρίλιο ή τη μεθανόλη. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου, επιτρέποντας τον διαχωρισμό του υπερκείμενου διαλύματος, το οποίο περιέχει τα διαλυμένα μόρια ενδιαφέροντος. Ανάλογα με τις απαιτήσεις της

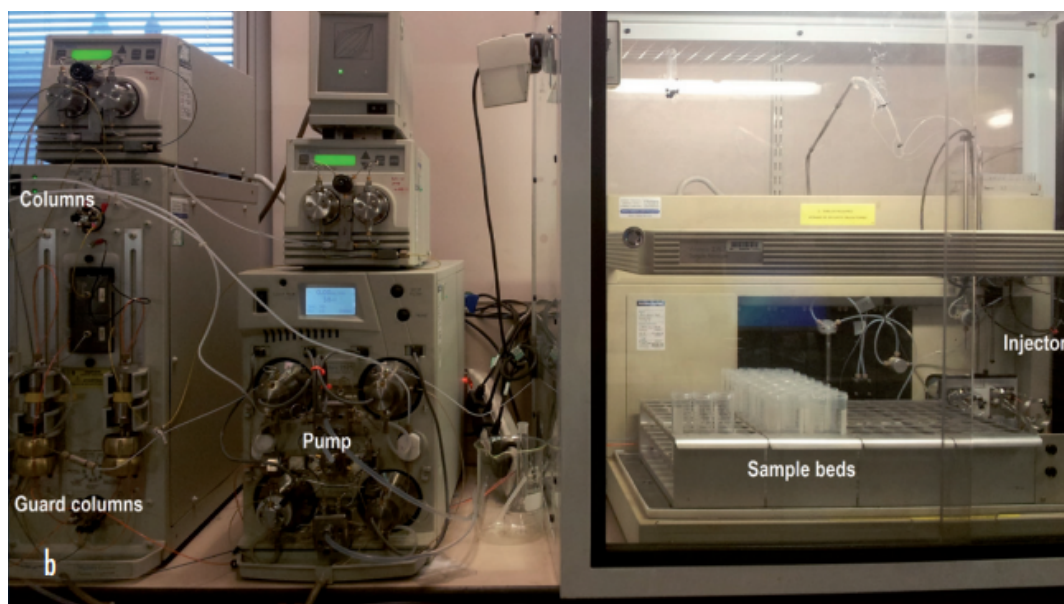
ανάλυσης, ιδίως την απαιτούμενη ευαισθησία, το υπερκείμενο αυτό μπορεί να αραιωθεί ή να συμπυκνωθεί (YV Kazakevich & R Lobrutto, 2007). Η αραιώση είναι συχνά απαραίτητη εάν η συγκέντρωση των αναλυτών είναι πολύ υψηλή, ενώ η προσυγκέντρωση απαιτείται εάν τα επίπεδα των αναλυτών είναι πολύ χαμηλά για την ανίχνευση. Αυτά τα στάδια προετοιμασίας είναι ζωτικής σημασίας για να διασφαλιστεί ότι το δείγμα είναι κατάλληλο για ανάλυση με HPLC, καθώς επηρεάζουν άμεσα την ακρίβεια και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται κατά την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό (Frank Steiner et al., 2019; Serban Voldoveanu & Victor David, 2022).

5.3. Βελτιστοποίηση HPLC

Σύμφωνα με τους (Frank Steiner et al., 2019; Serban Voldoveanu & Victor David, 2022) η ρύθμιση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή ώστε τα αποτελέσματα να είναι υψηλής ποιότητας (**Εικόνα 14-15**). Ξεκινά με την επιλογή της κατάλληλης στήλης HPLC, η οποία επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των μορίων ενδιαφέροντος. Η επιλογή της στήλης εξαρτάται από τις χημικές ιδιότητες των αντιψυχωσικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, όπως η πολικότητα, το μοριακό βάρος και η συγγένειά τους με τη στατική φάση. Μετά την επιλογή της στήλης, η προετοιμασία της κινητής φάσης είναι το επόμενο σημαντικό βήμα. Αυτό περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός μείγματος που συνήθως περιλαμβάνει νερό, οργανικούς διαλύτες όπως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη και μερικές φορές ρυθμιστικά διαλύματα. Η σύνθεση της κινητής φάσης προσαρμόζεται ώστε να επιτυγχάνεται ο βέλτιστος διαχωρισμός των αναλυτών-στόχων. Μόλις η στήλη και η κινητή φάση είναι έτοιμες, το σύστημα HPLC απαιτεί βαθμονόμηση με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων. Τα πρότυπα αυτά είναι διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων των αντιψυχωσικών φαρμάκων ή των μεταβολιτών τους, τα οποία είναι απαραίτητα για την εύρεση του χρόνου κατακράτησης και για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων στα δείγματα. Επιπλέον, η επικύρωση της μεθόδου είναι υψίστης σημασίας για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας της ανάλυσης. Αυτή η διαδικασία επικύρωσης περιλαμβάνει την αξιολόγηση διαφόρων μεθοδολογικών παραμέτρων, όπως η ακρίβεια, το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (YV Kazakevich & R Lobrutto, 2007). Αυτή η βελτιστοποίηση θέτει τα θεμέλια για τα επόμενα βήματα της έγχυσης δείγματος, του διαχωρισμού, της ανίχνευσης και της ανάλυσης με την διαδικασία HPLC.



Εικόνα 15: Μια δεξαμενή συγκρατεί την κινητή φάση. Μια αντλία υψηλής πίεσης χρησιμοποιείται για την παραγωγή και τη μέτρηση ενός καθορισμένου ρυθμού ροής της κινητής φάσης, συνήθως χιλιοστόλιτρα ανά λεπτό. Ένας εισαγωγέας δείγματος εισάγει το δείγμα στο συνεχώς ρέον ρεύμα κινητής φάσης, που μεταφέρει το δείγμα στο υγρό υψηλής απόδοσης στην χρωματογραφική στήλη. Η στήλη περιέχει το υλικό πλήρωσης (στατική φάση, που συγκρατείται από το υλικό της στήλης) που απαιτείται για την πραγματοποίηση του διαχωρισμού. Ο ανιχνευτής είναι “απαραίτητος” για να δει τις διαχωρισμένες ζώνες ενώσεων καθώς εκλύονται από τη στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Blum F, 2014).



Εικόνα 16: Μια τυπική διάταξη υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας, συμπεριλαμβανομένων των προστασιών, και των στηλών που χρησιμοποιούνται για την παγίδευση στερεών ή ανεπιθύμητων υλικών, από το να φθάσουν και να φράξουν τις κύριες στήλες (Blum F, 2014).

5.4. Ανάλυση και παρουσίαση αποτελεσμάτων

Μετά την ανάλυση HPLC, το χρωματογράφημα που προκύπτει εξετάζεται προσεκτικά για τον εντοπισμό των κορυφών (που αντιστοιχούν στα αντιψυχωσικά φάρμακα και τους μεταβολίτες

τους). Καθώς τα διαχωρισμένα συστατικά εκλούονται από τη στήλη HPLC, εισέρχονται στο φασματομέτρο μάζας. Στο MS, οι ενώσεις πρώτα ιονίζονται (μετατρέπονται σε ιόντα) και στη συνέχεια τα ιόντα αυτά διαχωρίζονται με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Κάθε κορυφή στο χρωματογράφημα αντιπροσωπεύει μια διαφορετική ένωση και η θέση της (χρόνος κατακράτησης) και το μέγεθός της (περιοχή κορυφής ή ύψος) είναι καθοριστικής σημασίας για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η ταυτοποίηση βασίζεται συνήθως στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των κορυφών στο δείγμα με εκείνους γνωστών προτύπων σε συνδιασμό με τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) κάθε ένωσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται κυρίως, με τη σύγκριση του εμβαδού ή του ύψους αυτών των κορυφών με εκείνες που λαμβάνονται από πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, γεγονός που επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε μορίου ενδιαφέροντος στο δείγμα πλάσματος (Frank Steiner et al., 2019; Serban Voldoveanu & Victor David, 2022).

Η ακρίβεια αυτής της διαδικασίας ποσοτικοποίησης είναι σημαντική, καθώς επηρεάζει άμεσα την εγκυρότητα της ανάλυσης. Περιλαμβάνει εξελεγμένο λογισμικό που επεξεργάζεται τα χρωματογραφικά δεδομένα για να παρέχει ακριβείς μετρήσεις. Αυτή η ποσοτική ανάλυση ερμηνεύεται στη συνέχεια στο πλαίσιο του κλινικού ή ερευνητικού περιβάλλοντος, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως το θεραπευτικό εύρος, πιθανές αλληλεπιδράσεις φαρμάκων και παράγοντες που αφορούν τον ασθενή (Frank Steiner et al., 2019; Serban Voldoveanu & Victor David, 2022).

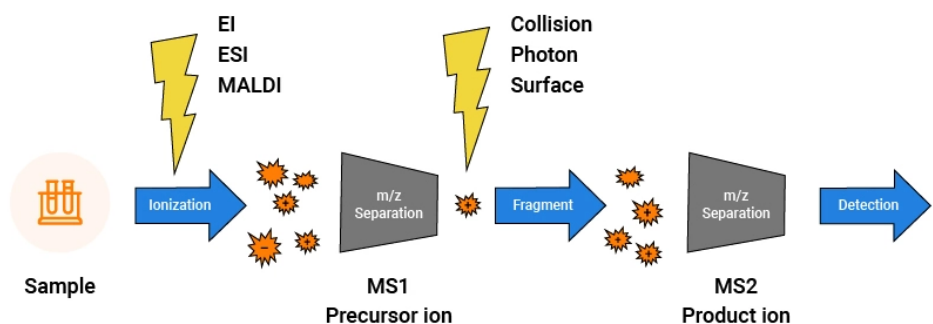
Τέλος, η αναφορά των ευρημάτων περιλαμβάνει την τεκμηρίωση της ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν, των αποτελεσμάτων που προέκυψαν και τυχόν παρατηρήσεων ή ανωμαλιών που διαπιστώθηκαν κατά τη διαδικασία. Η έκθεση πρέπει να είναι σαφής, περιεκτική και να τηρεί τις καθιερωμένες κατευθυντήριες γραμμές και κανονισμούς για την κλινική και φαρμακολογική αναφορά (Frank Steiner et al., 2019). Αυτή η τεκμηρίωση είναι απαραίτητη όχι μόνο για την άμεση ερμηνεία αλλά και για μελλοντική αναφορά, διασφαλίζοντας ότι τα δεδομένα μπορούν να επανεξεταστούν και να συγκριθούν ανάλογα με τις ανάγκες. Η διαδικασία αναφοράς ολοκληρώνει την ανάλυση HPLC, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη λήψη κλινικών αποφάσεων, φαρμακοκινητικές μελέτες ή περαιτέρω έρευνα σχετικά με τα αντιψυχωσικά φάρμακα και τις επιδράσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

5.5. Πλεονεκτήματα χρήσης HPLC για την ανάλυση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών

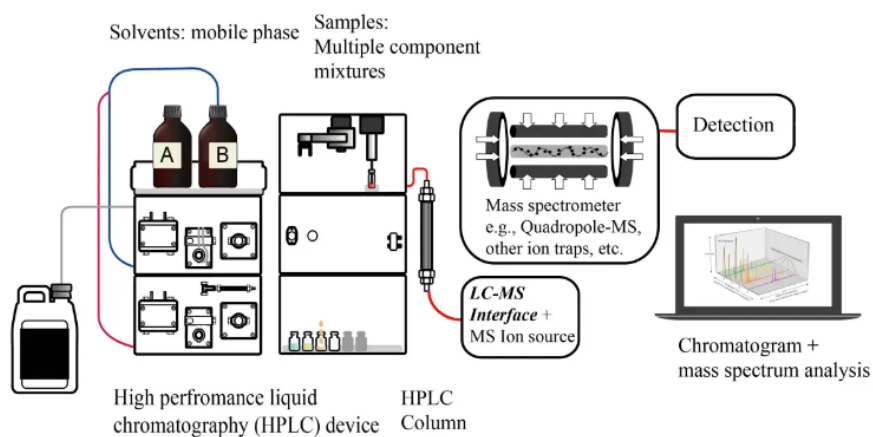
Στην ανάλυση των αντικαταθλιπτικών και των αντιψυχωσικών, HPLC ξεχωρίζει για διάφορους λόγους. Η υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία της είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων αντικαταθλιπτικών που συνήθως υπάρχουν σε βιολογικές μήτρες. Η ευελιξία της HPLC της επιτρέπει να αναλύει αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα αντικαταθλιπτικών ενώσεων, ανεξάρτητα από τις διαφορετικές χημικές ιδιότητές τους. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της ποικιλόμορφης χημικής δομής των αντικαταθλιπτικών. Επιπλέον, η συμβατότητα της HPLC με διαφορετικούς ανιχνευτές, όπως η φασματομετρία μάζας, ενισχύει την ικανότητά της να ταυτοποιεί και ανάλογα με τον ανιχνευτή να ποσοτικοποιεί με ακρίβεια. Αυτή η πτυχή είναι ιδιαίτερα πολύτιμη στη φαρμακοκινητική και τη θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων, όπου οι ακριβείς μετρήσεις είναι απαραίτητες. Επιπλέον η αναπαραγωγιμότητα της HPLC την καθιστούν προτιμώμενη μέθοδο σε κλινικές ρυθμίσεις και φαρμακευτική έρευνα, όπου τα συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα είναι υψίστης σημασίας. Η δυνατότητα αυτοματοποίησης της διαδικασίας HPLC αυξάνει περαιτέρω την αποτελεσματικότητά της, καθιστώντας την κατάλληλη για διαγνωστικές εξετάσεις ρουτίνας και έρευνα (Frank Steiner et al., 2019; YV Kazakevich & R Lobrutto, 2007).

6. High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS)

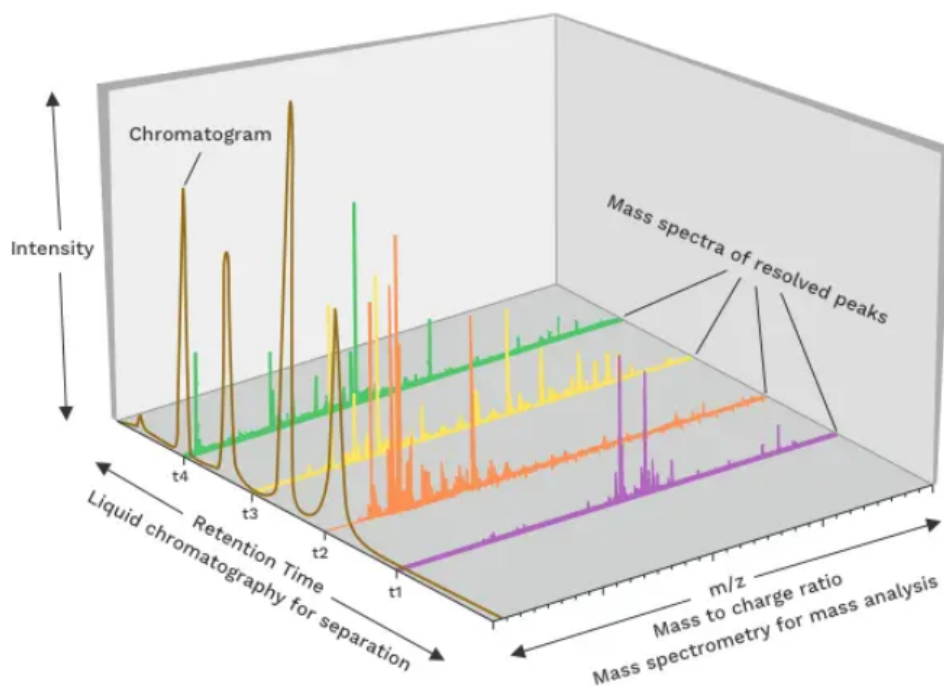
Η διάταξη υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) είναι μια εξελιγμένη συζευγμένη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των αντιψυχωσικών φαρμάκων (**Εικόνα 16-17**). Η διάταξη περιλαμβάνει υγρή χρωματογραφία με προσεκτικά επιλεγμένη στήλη και κινητή φάση, σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας σε σειρά, που περιλαμβάνει πηγή ιονισμού, (collision cell) (χώρο θραύσης) και αναλυτή μάζας (ΥV Kazakevich & R Lobrutto, 2007). Το σύστημα διευκολύνει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και την ακριβή ανίχνευση, παρέχοντας λεπτομερή φάσματα μάζας για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων (S. Hegstad et al., 2008). Η ανάλυση των δεδομένων περιλαμβάνει την ολοκλήρωση των κορυφών (**Εικόνα 18**), την ερμηνεία των φασμάτων μάζας, την ποσοτικοποίηση με χρήση εσωτερικών ή εξωτερικών προτύπων και την ολοκληρωμένη υποβολή εκθέσεων (Sebastiano Barco et al., 2020).



Εικόνα 17: Tandem Mass Spectrometry. ESI: electrospray ionization (ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό), m/z: mass-to-charge ratios (λόγος μάζα προς φορτίο) (Vipin Agarwal, 2016)).



Εικόνα 18: Παράδειγμα γραφικού διαγράμματος μιας διάταξης HPLC-MS (Vipin Agarwal, 2016).

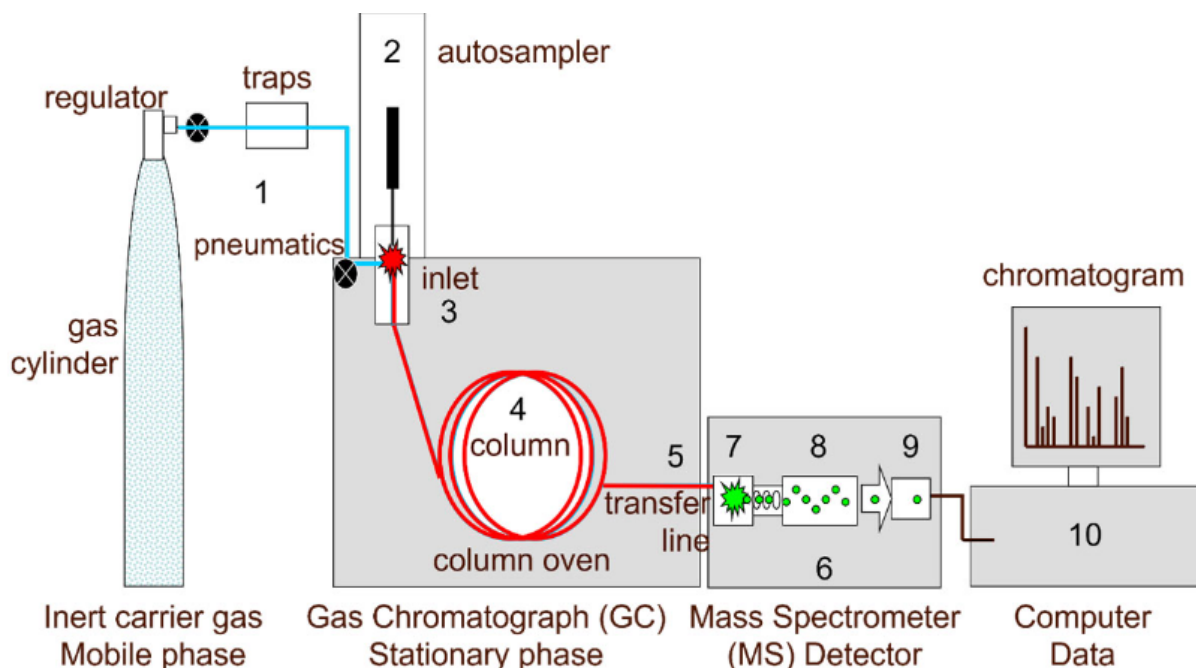


Εικόνα 19: Παράδειγμα διαγράμματος αποτελεσμάτων από την ανάλυση HPLC-MS (Vipin Agarwal, 2016).

7. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας- (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS))

7.1. Οργανολογία- Παράμετροι

Η παραμετροποίηση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) είναι μια εξελιγμένη και περίπλοκη διαδικασία σημαντική για την ακριβή ανάλυση ενώσεων, όπως των αντιψυχωσικών φαρμάκων και των μεταβολιτών (Εικόνα 20). Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αφορά διάφορα στάδια. Η επιλογή της στήλης (α) GC, του (β) φέροντος αερίου και ο (γ) προγραμματισμός της θερμοκρασίας είναι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού, με γνώμονα τις χημικές ιδιότητες των μορίων ενδιαφέροντος. Σε συνδυασμό με το φασματόμετρο μάζας (MS), η διεπαφή (interface) GC-MS μεταφέρει αποτελεσματικά τα μόρια ενδιαφέροντος (Εφεξής ME) για ανίχνευση. Η πηγή ιονισμού, ο αναλυτής μάζας και η επιλογή ανιχνευτή, όπως ο ιονισμός με σύγκρουση (collision) ηλεκτρονίων και ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας, επηρεάζουν περαιτέρω την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα. Ουσιαστικά, το σύστημα GC ακολουθείται από τη διάταξη του φασματόμετρου μάζας, όπου πραγματοποιείται ο ιονισμός και ο διαχωρισμός μάζας προς φορτίο (m/z). Στο στάδιο της φασματομετρίας μάζας, ανιχνεύονται ιόντα, δημιουργώντας φάσματα μάζας για κάθε ME. Η ανάλυση δεδομένων περιλαμβάνει την αντιστοίχιση των φασμάτων που ανιχνεύθηκαν με μία βιβλιοθήκη ώστε να γίνει η ανίχνευση του ME αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός, εξασφαλίζοντας ακριβή ταυτοποίηση και προσδιορισμό της συγκέντρωσης (Olga Kiseleva et al., 2022). Τα μέτρα ποιοτικού ελέγχου, συμπεριλαμβανομένης της τακτικής βαθμονόμησης, διατηρούν την αξιοπιστία του συστήματος GC-MS. Το σύστημα συλλογής δεδομένων του φασματογράφου μάζας καταγράφει λεπτομερή φάσματα μάζας, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τις ενώσεις που υπάρχουν (Edmond de Hoffmann & Vincent Stroobant, 2013). Η τακτική βαθμονόμηση και η επικύρωση της μεθόδου διασφαλίζουν την ακρίβεια και την αξιοπιστία ολόκληρου του συστήματος GC-MS, καθιστώντας το ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο και ακριβές αναλυτικό εργαλείο για πολύπλοκες αναλύσεις σε κλινικά και ερευνητικά περιβάλλοντα (P Gerhards et al., 2008).

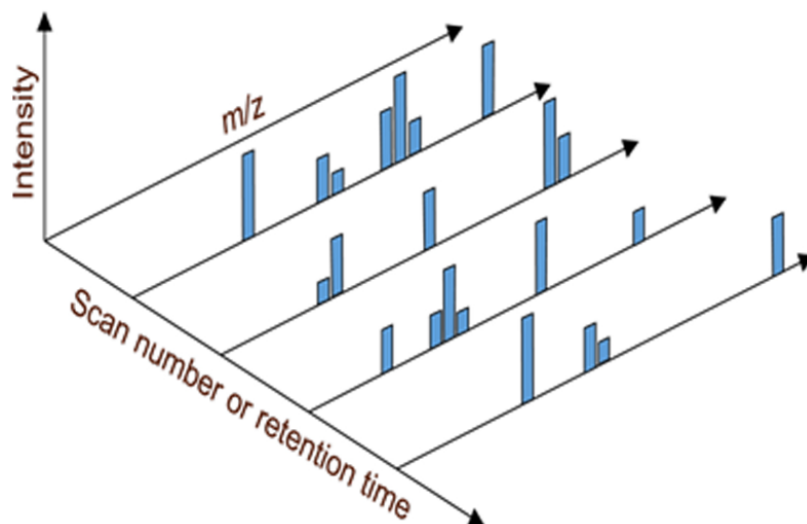


Εικόνα 20: Απλουστευμένο διάγραμμα ενός αέριου χρωματογράφου-φασματογράφου μάζας που δείχνει (1) carrier gas (φέρον αέριο), (2) autosampler(αυτόματος δειγματολήπτης), (3) είσοδος, (4) στήλη ανάλυσης, (5) διεπαφή, (6) Κενό αέρος, (7) πηγή ιόντων, (8) αναλυτής μάζας, (9) ανιχνευτής ιόντων (10) υπολογιστικό σύστημα (Diane Turner, 2022).

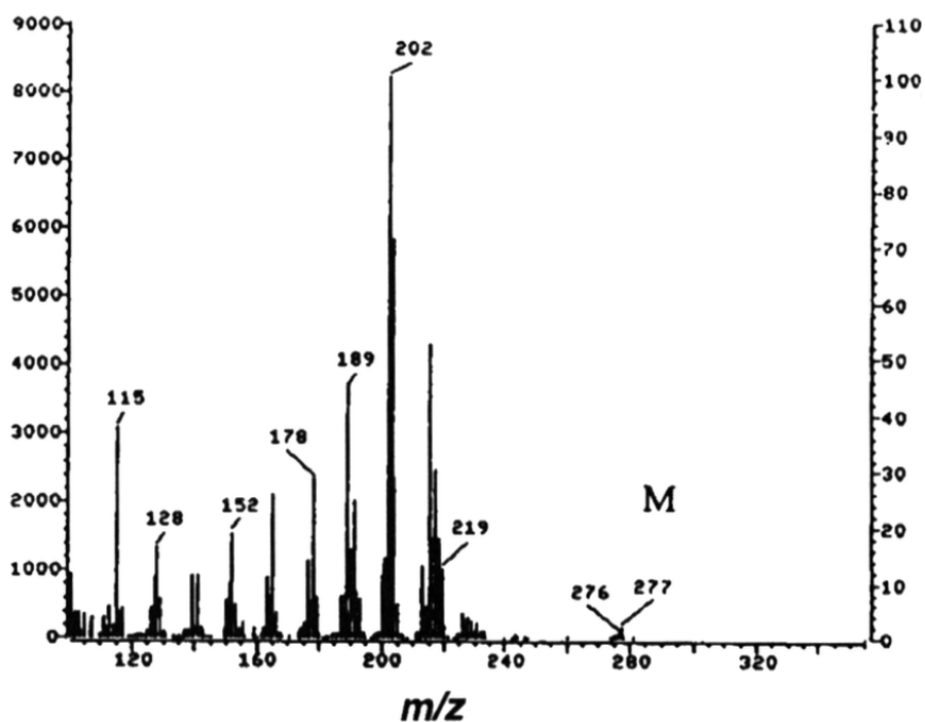
7.2. Ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του (GC-MS) είναι μια πολύπλευρη διαδικασία. Μετά τη λήψη χρωματογραφημάτων, προσδιορίζονται οι κορυφές, καθεμία από τις οποίες αντιπροσωπεύει συγκεκριμένες ενώσεις, όπως την παρουσία ενός αντιψυχωσικού φαρμάκου ή γενικός ενός μορίου ενδιαφέροντος (**Εικόνα 21-22**). Στη συνέχεια, τα φάσματα μάζας που λαμβάνονται κατά την ανίχνευση MS ερμηνεύονται σχολαστικά, διευκρινίζοντας τις μοριακές δομές μέσω του μοτίβου θραυσματοποίησης (fragmentation). Η ποσοτικοποίηση περιλαμβάνει τη σύγκριση των περιοχών ή των υψών των κορυφών με πρότυπα, παρέχοντας δεδομένα συγκέντρωσης για κάθε ΜΕ. Η αντιστοίχιση με βάση δεδομένων, ενισχύει την ταυτοποίηση ενώσεων, συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας με βιβλιοθήκες αναφοράς. Οι έλεγχοι ποιοτικού ελέγχου, συμπεριλαμβανομένης της τακτικής βαθμονόμησης και της αξιολόγησης της απόδοσης του συστήματος, διασφαλίζουν την ακρίβεια και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τα ερμηνευμένα δεδομένα είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των κλινικών επιπτώσεων, την αξιολόγηση των θεραπευτικών περιοχών και τον εντοπισμό πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών. Στην τελική φάση υποβολής εκθέσεων, δημιουργούνται ολοκληρωμένες εκθέσεις, στις οποίες περιγράφονται λεπτομερώς οι αναλυτικές μέθοδοι, τα αποτελέσματα, οι ανωμαλίες και οι σαφείς παρουσιάσεις των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζας. Η τήρηση των κατευθυντήριων γραμμών και η σχολαστική τεκμηρίωση καθ'

όλη τη διάρκεια της διαδικασίας διασφαλίζουν την αναπαραγωγιμότητα και τη συμμόρφωση με τα πρότυπα ποιότητας, συμβάλλοντας στην αξιοπιστία των αναλυτικών αποτελεσμάτων (Hari Nair et al., 2013).



Εικόνα 21: Τα δεδομένα GC-MS είναι τρισδιάστατα, δίνοντας αριθμό σάρωσης/χρόνο διατήρησης, απόκριση/ένταση και m/z (Renata Raina, 2011).



Εικόνα 22: Ένα φάσμα μάζας της ιμιπραμίνης (τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό) (Way et al., 1998).

7.3. Σύγκριση GC-MS με GC-MS/MS

Η χρωματογραφική και φασματική ανάλυση είναι απαραίτητες για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ιχνοστοιχείων σε πολύπλοκα δείγματα. Η απώλεια του αναλύτη και οι παρεμποδίσεις της μήτρας του δείγματος (matrix interference) είναι δύο κοινά προβλήματα των παραδοσιακών προσεγγίσεων. Με τον κατακερματισμό ιόντων χρησιμοποιώντας πολλαπλά στάδια αναλυτών μάζας, η φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS) μειώνει το σήμα υποβάθρου (background) από τις κορυφές που συνυπάρχουν, και αυξάνει την ευαισθησία και την ειδικότητα. Για πρόσθετο κατακερματισμό ιόντων, χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η διάσπαση που προκαλείται από σύγκρουση (collision-induced dissociation -CID). Τα τριπλού τετραπόλου (triple quadrupole-QqQ), τα Q-ToF και οι παγίδες ιόντων είναι παραδείγματα οργάνων MS/MS που χρησιμοποιούνται κυρίως για στοχευμένη ανάλυση και όχι για ανάλυση ρουτίνας. Παρέχουν μια σειρά λειτουργιών, παρακολούθηση μιας αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων (Selected reaction monitoring- SRM) και παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (MRM). Ορισμένα όργανα διαθέτουν επίσης διπλή λειτουργία λήψης, εναλλάσσοντας μεταξύ της στοχευμένης ανάλυσης στόχου και της ταυτοποίησης αγνώστων στοιχείων (Edmond de Hoffmann & Vincent Stroobant, 2013) (Renata Raina, 2011).

7.4. Σύγκριση και διαφορές HPLC-MS/MS με GC-MS

Η HPLC-MS/MS προτιμάται για θερμικά ευαίσθητες και μη πτητικές ενώσεις, προσφέροντας ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος και συμβατότητα με ευρύ φάσμα διαλυτών. Είναι γνωστή για την υψηλή ευαισθησία της, ιδιαίτερα για ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των βιομορίων. Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη λόγω της μη απαίτησης εξάτμισης του διαλύτη και είναι καταλληλότερη για πολύπλοκα μείγματα. Από την άλλη πλευρά, η GC/MS είναι ιδανική για πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις. Απαιτεί προετοιμασία του δείγματος, όταν πρόκειται για μη πτητικές ενώσεις, και είναι εξαιρετικά ευαίσθητη για μικρά οργανικά μόρια. Η GC/MS είναι γενικά απλούστερη και λιγότερο δαπανηρή από την HPLC-MS/MS, αλλά λιγότερο κατάλληλη για πολύ πολύπλοκα μείγματα. Και οι δύο μέθοδοι προσφέρουν υψηλή ακρίβεια στην ποσοτική ανάλυση (Εικόνα 19). Ωστόσο, η εφαρμοσιμότητά τους εξαρτάται από τη φύση του δείγματος και τις ειδικές απαιτήσεις της ανάλυσης (Renata Raina, 2011).

Κριτήριο	HPLC-MS/MS	GC/MS
Αρχή Διαχωρισμού	Χρησιμοποιεί υγρή κινητή φάση υπό υψηλή πίεση.	Χρησιμοποιεί αέριο ως κινητή φάση.
Τύπος Δείγματος	Ιδανικό για θερμικά ευαίσθητες και μη πτητικές ενώσεις.	Καλύτερο για πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις.
Προετοιμασία Δείγματος	Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, συμβατό με ευρεία γκάμα διαλυτών.	Απαιτεί προετοιμασία για μη πτητικές ενώσεις.
Ευαισθησία	Πολύ ευαίσθητο, ειδικά για ευρύ φάσμα ενώσεων, περιλαμβάνοντας βιομόρια.	Υψηλή ευαισθησία για μικρές οργανικές ενώσεις.
Ταχύτητα	Γρηγορότερος χρόνος ανάλυσης λόγω της μη ανάγκης εξάτμισης του διαλύτη.	Αργότερο σε σύγκριση με το HPLC-MS/MS λόγω της ανάγκης ατμοποίησης του δείγματος.

Εικόνα 23: Σύγκριση των βασικών αρχών της HPLC-MS/MS με την GC/MS (Renata Raina, 2011).

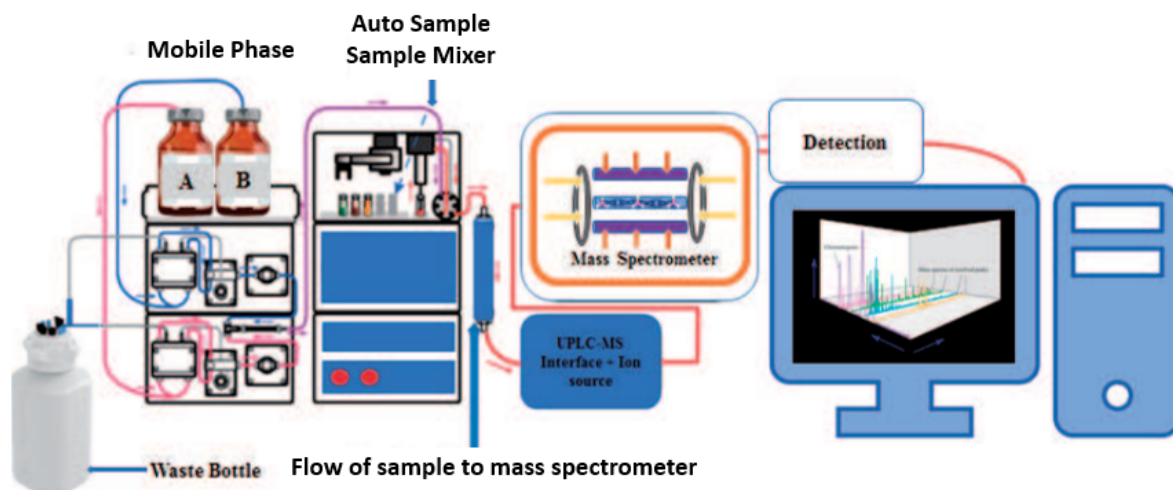
8. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC))

8.1. Γενικά και σύγκριση με την HPLC

Μια σύγχρονη μέθοδος που ονομάζεται UPLC προσφέρει στην υγρή χρωματογραφία ένα νέο σύγχρονο μονοπάτι (Michael E. Swartz, 2005). Η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης ή UPLC χαρακτηρίζεται από βελτιώσεις σε τρεις βασικούς τομείς: ευαισθησία, ταχύτητα και ανάλυση. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) δεν διαθέτει την ταχύτητα και την ευαισθησία της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UPLC), η οποία εφαρμόζεται σε στήλες με διάμετρο μικρότερη από 2 μm . Σε πιέσεις που φτάνουν τα 100 εκατομμύρια Pa, η UPLC χρησιμοποιεί ακραίες πιέσεις για να κάνει διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Σε αντίθεση με την HPLC, έχει ανακαλυφθεί ότι η υψηλή πίεση δεν έχει επιζήμια αποτελέσματα στην αναλυτική στήλη. Επιπλέον, η UPLC χρησιμοποιεί συνολικά λιγότερο χρόνο και μικρότερη ποσότητα διαλύτη.

8.2. Σημαντικές οργανολογικές παράμετροι UPLC

Στην Υγρή Χρωματογραφία Υπεραπόδοσης (UPLC), πρέπει να εργαστούμε με προσοχή κατά την έγχυση του δείγματος και απαιτούνται εξειδικευμένες βαλβίδες σχεδιασμένες να αντέχουν σε ακραίες πιέσεις (**Εικόνα 23**). Η διαδικασία έγχυσης πρέπει να είναι pulse-free (χωρίς διακύμανση) ώστε να ελαχιστοποιεί τον όγκο σάρωσης με σκοπό την προστασία της στήλης από τις έντονες διακυμάνσεις της πίεσης. Οι κύκλοι έγχυσης πρέπει να είναι ταχείς για την αξιοποίηση της μέγιστης ταχύτητας της UPLC, και απαιτούν υψηλή χωρητικότητα δείγματος. Οι προσθήκη χαμηλού όγκου με ελάχιστη μεταφορά ενισχύουν την ευαισθησία και υπάρχουν προσεγγίσεις άμεσης προσθήκης για βιολογικά δείγματα.



Εικόνα 24: Διάγραμμα ροής υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας υπερυψηλών αποδόσεων (Weiping Ma et al., 2021).

8.3. Στήλες UPLC

Ένας σημαντικός παράγοντας για τη βελτίωση της ανάλυσης είναι η χρήση στηλών UPLC. Συνήθως υπάρχουν τέσσερις συνδεδεμένες φάσεις, καθεμία από τις οποίες έχει διαφορετικό συνδυασμό υδροφοβικότητας, σταθερότητας και χημικής αλληλεπίδρασης. Διατίθεται επίσης μια στήλη απόδοσης συσκευασμένων σωματιδίων 1,7μm. Το ευρύ φάσμα pH και η εξαιρετική σταθερότητα καθιστούν τις στήλες C18 και C8 δημοφιλείς επιλογές.

8.3.1. Σύστημα Ανίχνευσης

Στο σύστημα UPLC περιλαμβάνεται ένας ανιχνευτής UV για την ανίχνευση των ME, θέση για την εισαγωγή των δειγμάτων με υποβοήθηση πίεσης και ένας διαχειριστής διαλυτών με δύο αντλίες σειριακής ροής. Ο διαχειριστής δειγμάτων διαθέτει καινοτομίες που περιλαμβάνουν δειγματοληψία με βελόνα και μετατροπείς πίεσης για αυτόματο έλεγχο, ενώ ο διαχειριστής διαλυτών παράγει παράλληλη κλίση. Η κυψέλη του ανιχνευτή διατηρεί την ευαισθησία, με μειωμένη χωρητικότητα ροής και αποτελεσματική μεταφορά φωτός, ενώ οι ανιχνευτές του συστήματος χρησιμοποιούν ανίχνευση UV/Visible με βάση την απορρόφηση (Ronald E. Majors, 2015).

8.4. Η εξέλιξη: από HPLC σε UHPLC

Η εξέλιξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC) οφείλεται στην ανάγκη για διαχωρισμούς υψηλότερης ανάλυσης κατά την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Μια βασική πρόοδος σε αυτόν τον τομέα ήταν η ανάπτυξη υλικών σταθερής φάσης, κάτω των

2 μικρομέτρων, με στενή κατανομή μεγέθους σωματιδίων. Αυτά τα σωματίδια αύξησαν δραματικά την απόδοση, διατηρώντας παράλληλα την εκλεκτικότητα, ενώ χημικά, ήταν πανομοιότυπα με εκείνα που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Σε σύγκριση με τη συμβατική HPLC, η UHPLC έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ταχύτερη διάρκεια εκτέλεσης, μεγαλύτερη ανάλυση, αυξημένη ευαισθησία και λιγότερη χρήση διαλυτών. Για την αποτελεσματική χρήση της UHPLC απαιτείται συγκεκριμένος εξειδικευμένος εξοπλισμός: ταχύτερα συστήματα συλλογής δεδομένων για τη λήψη αρκετών σημείων δεδομένων σε όλες τις κορυφές- ανιχνευτές με κυψέλες ροής μικρότερου εσωτερικού όγκου για την ανίχνευση στενότερων ζωνών έκλουσης- και αντλίες που μπορούν να αντέξουν υψηλότερες πιέσεις για τη διαχείριση της αυξημένης ανάστροφης πίεσης (anticompression) από τα μικρότερα σωματίδια (Ronald E. Majors, 2015).

8.5. Σύγκριση HPLC με UPLC

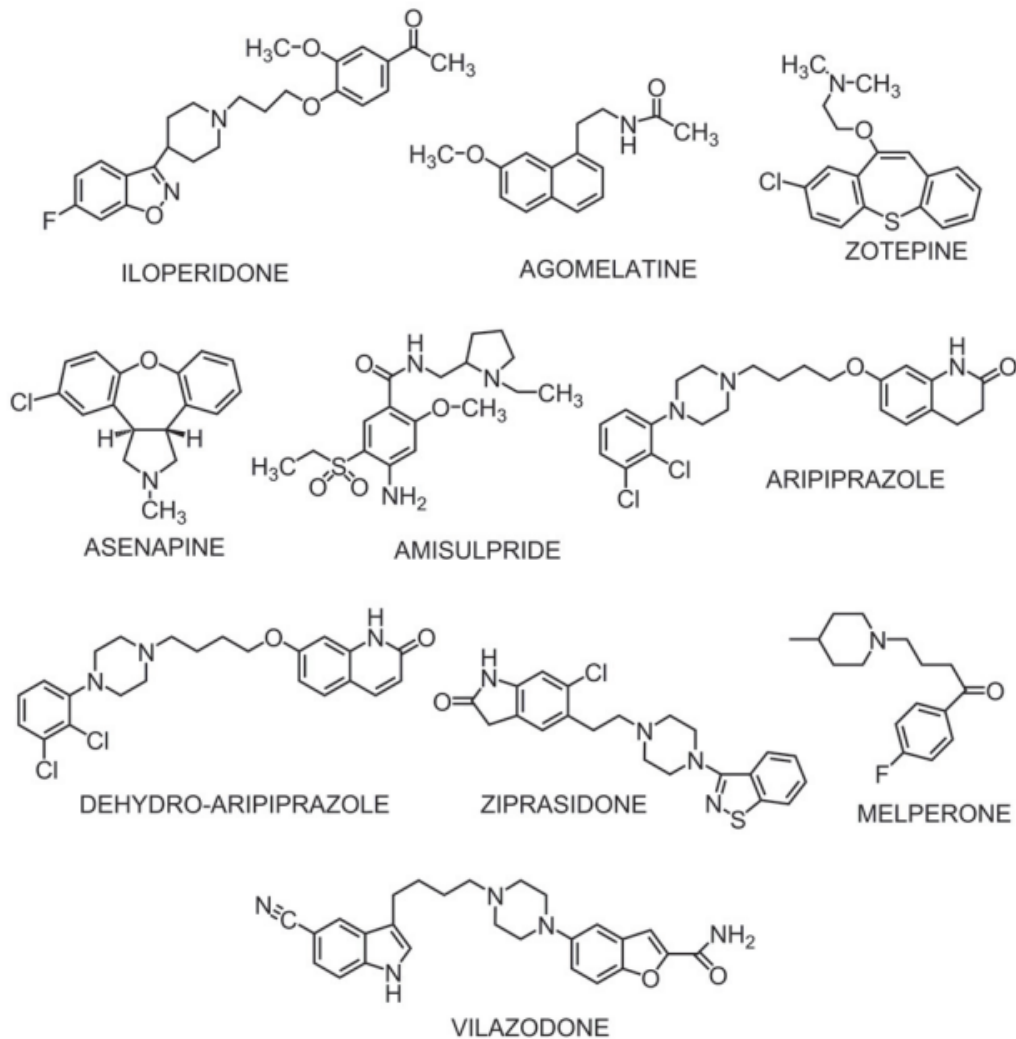
Όπως αναφέρεται και παραπάνω, οι αρχές της UPLC είναι οι ίδιες με αυτές της HPLC, η βασική διαφορά (**Εικόνα 24**) έγκειται στο σωματιδιακό μέγεθος του υλικού της στήλης, το οποίο είναι σχεδιασμένο και για σωματίδια μικρότερα από 2- μm . Αυτή η διαφορά επηρεάζει σημαντικά τις επιδόσεις και βελτιστοποιεί τα οφέλη αυτών των στηλών, με αποτέλεσμα μια ισχυρή, σταθερή και αξιόπιστη λύση. Οι στήλες ελέγχου τεσσάρων διαλυτών (Quaternary Solvent Manager-QSM) και ελέγχου δείγματος (Sample Manager-SMFTN) της κατηγορίας UPLC H, με τον γνωστό σχεδιασμό ροής-βελόνας, προσφέρουν όλη την προσαρμοστικότητα και τη χρησιμότητα της υπάρχουσας HPLC σας, ενώ παράλληλα επιτυγχάνουν τους απίστευτα αποτελεσματικούς διαχωρισμούς που μόνο η UPLC μπορεί να κάνει. Επίσης, με τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών, στην UPLC, οι οποίες μειώνουν το ιξώδες της κινητής φάσης και, τελικά, αυξάνουν τον ρυθμό ροής. Επιπλέον παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση της αντίθετης πίεσης που δρα ανασταλτικά. Οι σκελετοί και τα συνδεδεμένα διαδρομές ροής (through-pores), τα οποία υπάρχουν στις μονές στήλες και διαφοροποιούν την ανάλυση UPLC από την HPLC, αποτελούν το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της. Στα χρωματογραφήματα UPLC ανακαλύπτεται καλύτερη ανάλυση και διαχωρισμός από ό,τι στα χρωματογραφήματα HPLC, τα οποία επίσης πραγματοποιούν πιο ευαίσθητες αναλύσεις, χρησιμοποιούν λιγότερο διαλύτη και αναλύουν τα δεδομένα γρήγορα (Μικρός χρόνος ανάλυσης) (Michael E. Swartz, 2005; Serban Voldoveanu & Victor David, 2022).

	Χαρακτηριστικά	HPLC	UPLC
1	Μέγεθος σωματιδίων	3 με 5 μm	Λιγότερο από 2 μm
2	Μέγιστη πίεση	35-40 MPa	103-105 MPa
3	Κολώνα Ανάλυσης	C18	UPLC
4	Διαστάσεις κολώνας	150 x 3.2 mm	150 x 2.1 mm
5	Θερμοκρασίες	30°C	65°C
6	Όγκος εισαγωγής (injection Volume)	5mL (Std. ln100% MeOH)	2mL (Std. ln100% MeOH)

Σεικόνα 24: Σύγκριση μεταξύ UPLC και HPLC (Δημιουργήθηκε στο PowerPoint).

8.6. Εφαρμογές των αναλυτικών τεχνικών HPLC, UPLC, GC-MS και LC/MS-MS στην ανίχνευση αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε πλάσμα αίματος

Όπως προαναφέρθηκε οι ψυχιατρικές ασθένειες συμβάλλουν σημαντικά στην παγκόσμια νοσηρότητα και θνησιμότητα. Αν και η φαρμακευτική θεραπεία είναι ευεργετική για την κατάθλιψη και τη σχιζοφρένεια, το 30-50% των ατόμων δεν ανταποκρίνεται καλά στο αρχικό θεραπευτικό σχήμα. Εκτός από την ανακάλυψη νέων ενώσεων, είναι επιθυμητό να βελτιωθούν τα αποτελέσματα της θεραπείας με τη χρήση των υφιστάμενων γνωστών φαρμάκων. Η παρακολούθηση των θεραπευτικών φαρμάκων (TDM) είναι μια κατάλληλη και ευρέως αποδεκτή μέθοδος για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας. Οι (Sistik et al., 2016) συγκέντρωσαν μελέτες από την χρονική περίοδο 2006-2015 που δείχνουν την εφαρμογή των αναλυτικών τεχνικών στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο πλάσμα αίματος ασθενών. Περιγράφουν τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στον τομέα της χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS, LC-MS/MS και GC/MS) και επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών (αγκομελατίνη, vilazodone) και αντιψυχωσικών (iloperidone, asenapine, amisulpride, aripiprazole, melperone, zotepine, ziprasidone) (Χημικές δομές: **Εικόνα 25**). Η υψηλή ειδικότητα σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία καθιστά τις τεχνικές αυτές ελκυστική συμπληρωματική μέθοδο στις παραδοσιακές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στην πρακτική ρουτίνα για TDM (Sistik et al., 2016).



Εικόνα 25: Χημικές δομές επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων (Sistik et al., 2016).

Η αέρια χρωματογραφία (GC) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών της κατηγορίας αμίνης. Δεδομένου ότι οι αμίνες συχνά διατηρούνται έντονα στη στήλη GC προκαλώντας ασύμμετρες κορυφές, εφαρμόστηκε παραγωγοποίηση. Άλλα έξι τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά προσδιορίστηκαν με GC, χρησιμοποιώντας SPE για την προετοιμασία του δείγματος. Κατά την προετοιμασία το πλάσμα εκχυλίστηκε αρχικά χρησιμοποιώντας στήλη SPE και στη συνέχεια ένα μίγμα N-Μεθυλ-N-(τριμεθυλσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο και (N-τριμεθυλσιλυλμιδαζόλη). Ο χρόνος χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν περισσότερο από 15 λεπτά. Ωστόσο, τα περισσότερα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν υγρή χρωματογραφία (Sistik et al., 2016).

8.6.1. Υγρή χρωματογραφία

Αν και οι κοινές και καθιερωμένες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας (LC) για τα ψυχοτρόπα φάρμακα χρησιμοποιούσαν συμβατικές σταθερές φάσεις με σωματίδια 3-5 μm , η τελευταία δεκαετία σχετίζεται με την έλευση των υπο-2 μm σωματιδίων (UHPLC). Για τους διαχωρισμούς αντίστροφης φάσης (reversed phase separations), η έκλουση με δυαδική βαθμίδωση διαλυτών χρησιμοποιείται συνήθως. Ένα ασθενές συστατικό έκλουσης της κινητής φάσης αποτελείται από υδατικό διάλυμα ενός οξέος (π.χ. οξικό οξύ, μυρμηκικό), οξικό αμμώνιο ή ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος ρυθμισμένο σε κατάλληλο pH που κυμαίνεται από 3,0-8,1. Ακετονιτρίλιο και μεθανόλη (συχνά με μυρμηκικό και οξικό αμμώνιο). διαλυμένα σε αυτούς τους διαλύτες) αντιπροσωπεύουν σχεδόν αποκλειστικά τους διαλύτες έκλουσης. Η Ziprasidone συνήθως αναλύεται με στήλη C8 (2,0 \times 50 mm, 1,8 μm) σε 4 λεπτά με βαθμιαία έκλουση ενώ μπορεί να αναλυθεί και με διαχωρισμό αντίστροφης φάσης με UPLC. Άλλες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν μία C18 στατική φάση με εξαιρετική μηχανική σταθερότητα (σωματίδια με υβριδική δομή αιθυλοσιλοξάνης/πυριτίας) για την ανάλυση της αριπιπραζόλης στο ανθρώπινο πλάσμα. Ο χρόνος LC-MS/MS με ισοκρατική (isocratic) έκλουση ήταν μόλις 1,2 λεπτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η στήλη επιτρέπει την εργασία σε όλο σχεδόν το εύρος του pH, τυπικά από 1 έως 12. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί απλές, γρήγορες και αξιόπιστες μέθοδοι με βάση μονολιθικά υλικά στήλης (monolithic materials). Με την μέθοδο HPLC-MS/MS γίνεται ο προσδιορισμός 18 ψυχοτρόπων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της αριπιπραζόλης στο πλάσμα χρησιμοποιώντας μονολιθική αντίστροφη φάση στήλη με βάση το διοξείδιο του πυριτίου. Το συνολικό διάστημα έγχυσης ήταν μικρότερο από 5,5 λεπτά. Παρόλο που δεν διαχωρίστηκαν όλες οι ενώσεις ενδιαφέροντος με χρωματογραφία, η ακρίβεια της αναπτυχθείσας μεθόδου HPLC/MS ήταν επαρκής. Με χρήση μονολιθικής στήλης έχουν αναλυθεί πάνω από 50 αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα (Sistik et al., 2016).

8.6.2. Φασματογραφία Μάζας

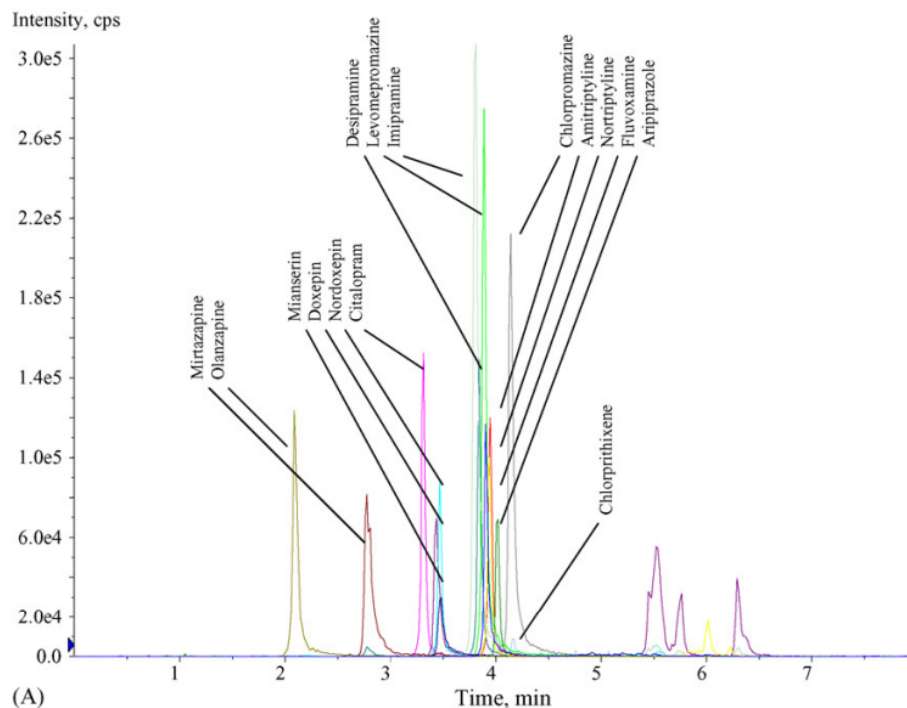
Όπως προαναφέρθηκε η HPLC-MS έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ισχυρή τεχνική στη βιοανάλυση. Διάφοροι τρόποι και συσκευές ανίχνευσης MS εφαρμόζονται για τον έλεγχο των αντικαταθλιπτικών και των αντιψυχωσικών, όπως μονό τετράπολο, τριπλό τετράπολο, παγίδα ιόντων, αναλυτής TOF, Orbitrap, FT-ICR, όργανα τομέα και υβριδικοί αναλυτές (Sistik et al., 2016).

Τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την επιλεκτικότητα και την ευαισθησία στην ανάλυση των ψυχοτρόπων φαρμάκων παρέχονται από αναλυτές μάζας τριπλού τετραπόλου. Το όριο

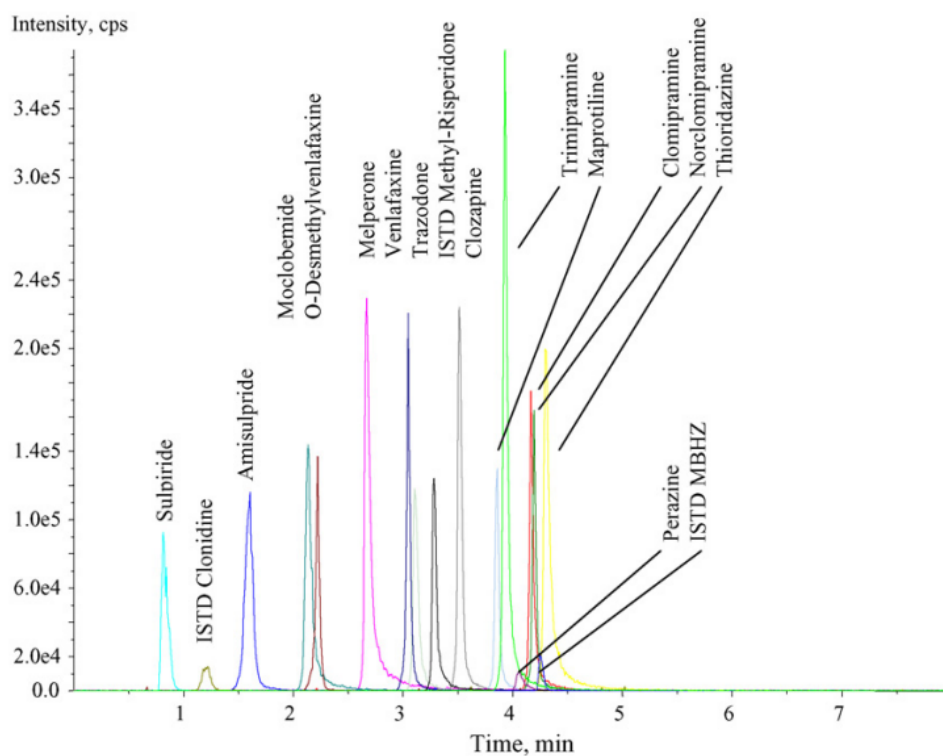
ανίχνευσης για την Ζιπρασιδόνη- 0,1 ng/mL σε πλάσμα- επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας LC/MS με τριπλό τετραπόλο και ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό σε λειτουργία θετικού ιονισμού (πηγή ιονισμού Z-spray) (Sistik et al., 2016).

8.7. Επιπρόσθετες εφαρμογές των αναλυτικών μεθόδων στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών

Σε άλλη μελέτη, οι (Kirchherr & Kühn-Velten, 2006) ανέπτυξαν μία μέθοδο για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση 48 διαφορετικών αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο πλάσμα ασθενών, συμπεριλαμβανομένων της αμισουλπρίδης, της αμιτριπτυλίνης, της αριπιπραζόλης, της βενπεριδόλης και άλλων (**Εικόνα 25**). Τα φάρμακα κατατάχθηκαν σε υποομάδες που κάλυπταν χαμηλές, μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις (συνολικό εύρος θεραπευτικών επιπέδων που πρέπει να ληφθούν υπόψη: 0,5-2000 ng/mL) με περαιτέρω αραίωση του υπερκείμενου υγρού που προέκυψε μετά την πρώτη καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν απαραίτητος και πραγματοποιήθηκε σε μονολιθική στήλη C18 (50 mm × 4,6 mm) με βαθμίδωση μεθανόλης και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού άλατος 5 mM σε pH 3,9. Το διάστημα έγχυσης ήταν 8 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο τριών εσωτερικών προτύπων για την ποσοτικοποίηση φαρμάκων με μεγάλη ποικιλία υδροφοβικότητας. Μετά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό ανιχνεύθηκαν θραύσματα θετικών ιόντων στη λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) με φασματογράφο μάζας σε σειρά. Τέτοιες μελέτες είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς δείχνουν πως γίνεται να ανιχνευθούν πολλές ενώσεις ταυτόχρονα σε λίγο χρόνο, γεγονός πολύ σημαντικό κατά την επίβλεψη της θεραπείας ασθενών με ψυχικές διαταραχές.

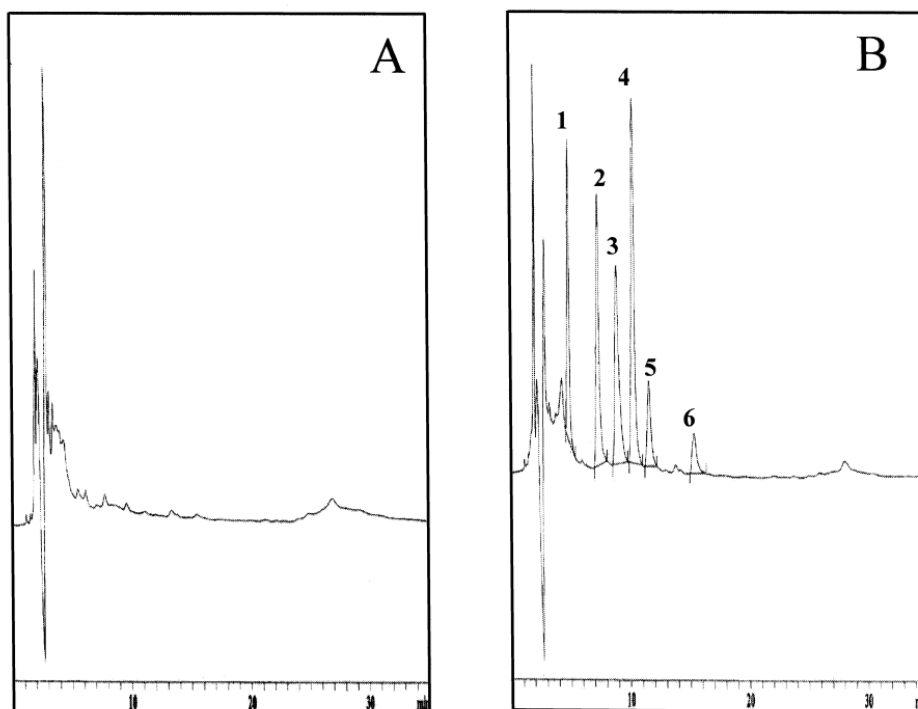


Εικόνα 25: Χρωματογραφήματα ολικού ιόντων ρεύματος- (Total ion current (TIC) φαρμάκων μεσαίας τιμής συγκέντρωσης. 100 ng/ml κάθε φαρμάκου (Kirchherr & Kühn-Velten, 2006).

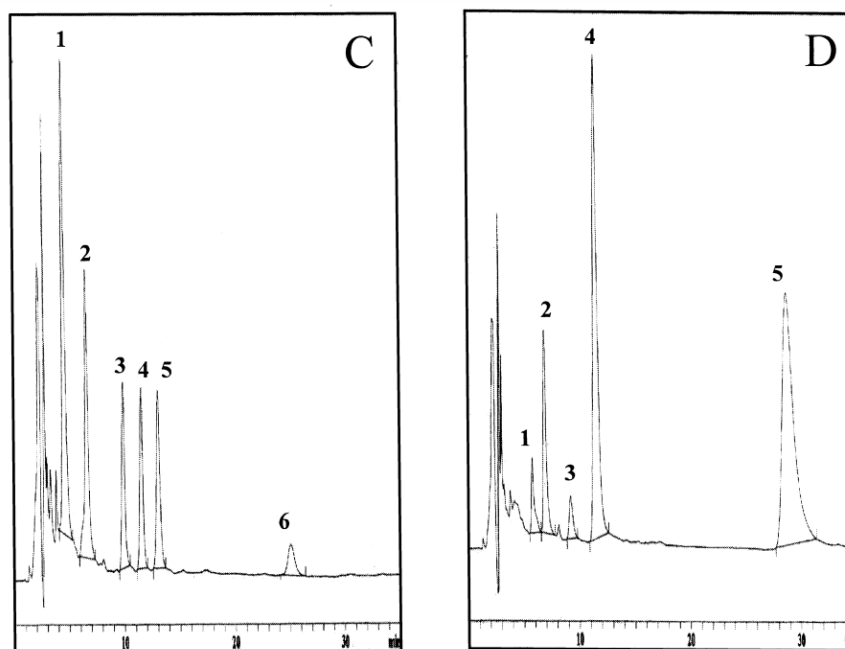


Εικόνα 26: Χρωματογραφήματα TIC φαρμάκων υψηλής συγκέντρωσης, 1000 ng/mL κάθε φαρμάκου (Kirchherr & Kühn-Velten, 2006).

Οι (Christine Frahnert et al., 2003) ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας την οποία και βελτιστοποίησαν για την ποσοτικοποίηση της μιρταζαπίνης, της ρεβοξετίνης, της μοκλοβεμίδης, της βενλαφαζίνης, και άλλων 16 φαρμάκων. Προηγήθηκε εκχύλιση στερεάς φάσης των φαρμάκων και των μεταβολιτών, και ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός μέσω στήλης Nucleosil 100-Protect 1 με ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου-διυδροφωσφορικού καλίου ως κινητή φάση. Η μέθοδος επικυρώθηκε τόσο για θεραπευτικές και για τοξικές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος αυτή είναι εφαρμόσιμη για την ταχεία και αποτελεσματική ανάλυση δειγμάτων ορού ή πλάσματος για τη θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων περίπου 30 αντικαταθλιπτικών και άτυπων αντιψυχωσικών.



Εικόνα 27: Χρωματογραφήματα (Α) τυφλού δείγματος ορού, (Β) εμβολιασμένου ορού με (1) 150 ng/ml Ο-δεσμεθυλοβενλαφαζίνη, (2) 150 ng/ml βενλαφαζίνη, (3) 300 ng/ml μελπερόνη, (4) 400 ng/ml ρεβοξετίνη, (5) 150 ng/ml φλουβοξαμίνη και (6) 150 ng/ml παροξετίνη (Christine Frahnert et al., 2003).



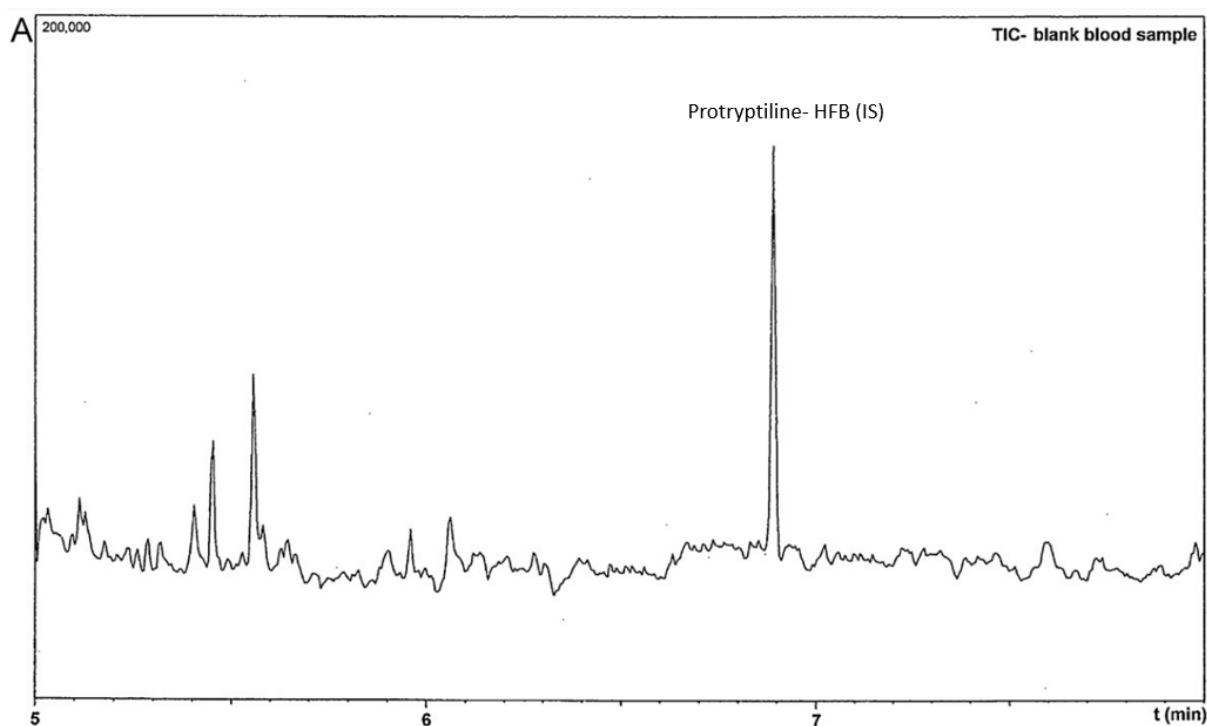
Εικόνα 28: (Γ) ορός με (1) 125ng/ml αμισουλπρίδης, (2) 300 ng/ml μελπερόνης, (3) 125 ng/ml νορφοβοξετίνης, (4) 125 ng/ml κετιαπίνης, (5) 125 ng/ml φλουοξετίνης και (6) 50 ng/ml σερτραλίνης- (Δ) εμπλουτισμένος ορός με (1) 25 ng/ml 9-hydroxyrisperidone, (2) 300 ng/ml melperone, (3) 25 ng/ml risperidone, (4) 500 ng/ml νορκλοζαπίνης, (5) 500 ng/ml κλοζαπίνης (Christine Frahnert et al., 2003).

Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιεί εκχύλιση (Supported Liquid Extraction- SLE) σε συνδυασμό με HPLC-MS/MS αναλύει εννέα ψυχοφάρμακα ταυτόχρονα. Κατά την πειραματική πορεία το δείγμα πλάσματος «φορτώθηκε» σε πλάκα SLE 96 κοιλοτήτων και έπειτα έγινε διαχωρισμός σε στήλη χρησιμοποιώντας μείγμα μεθανόλης και νερού που περιείχε και 0,1% μυρμηκικό οξύ, με βαθμιδωτή έκλυση εντός 10 λεπτών χρόνου λήψης χρωματογραφήματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση ισοτόπου, εσωτερικού προτύπου με θετικά ιόντα (positive ions) και ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο. Υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες, επιτεύχθηκε καλή απόδοση εκχύλισης με αμελητέο σήμα υποβάθρου (background) στην επακόλουθη ανάλυση HPLC-MS/MS. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία τη συγκέντρωση ψυχοφαρμάκων στο πλάσμα αίματος, να παρέχει υποστήριξη για την κλινική παρακολούθηση των ασθενών με κατάθλιψη και να προάγει τη θεραπεία της κατάθλιψης (Zheng et al., 2021).

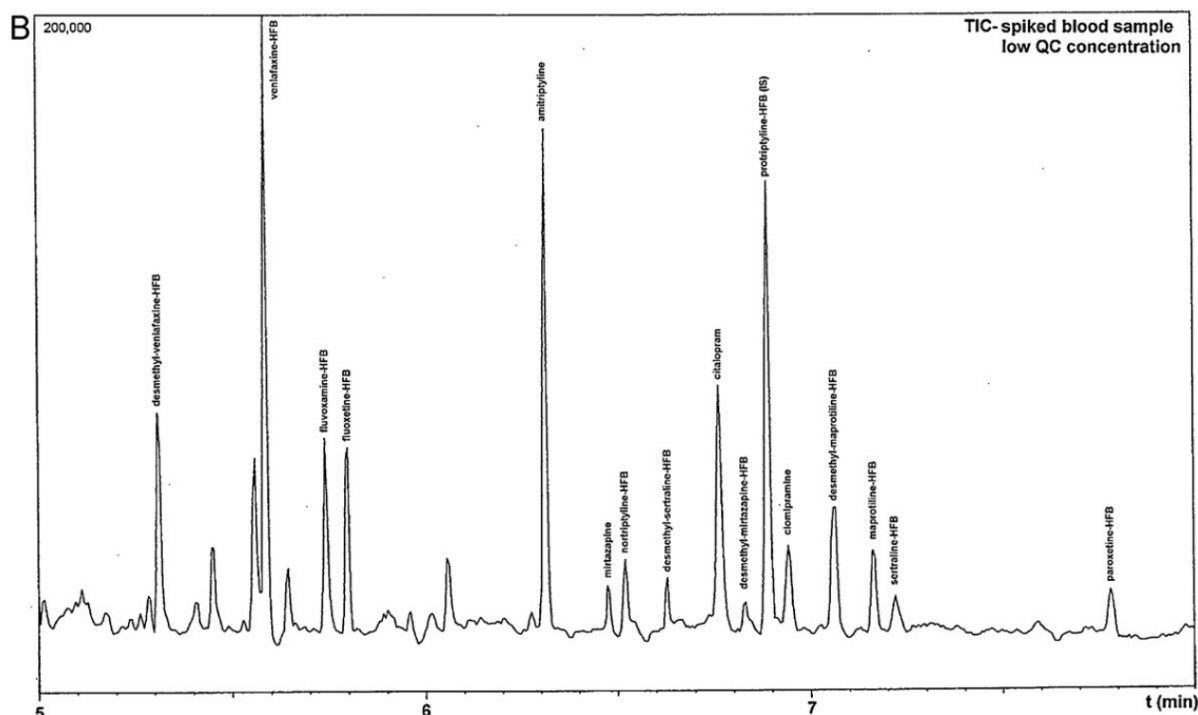
Οι (Kall MA et al., 2015) ανέπτυξαν μια μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της vortioxetine και του κύριου ανθρώπινου μεταβολίτη της (Lu AA34443) σε δείγματα πλάσματος χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθόδους ποσοτικοποίησης. Χρησιμοποιήθηκε μια ισοκρατική (isocratic) μέθοδος ανταλλαγής κατιόντων με ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-συζευγμένη με φασματομετρία μάζας μετά από

κατεργασία των δειγμάτων με SPE (C8 και 96-well plate) και, δεύτερον, χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος UPLC-MS/MS (λειτουργία θετικού ιονισμού) μετά από καταβύθιση των πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο. Επιπλέον, οι (Rosado T et al., 2017) ανέπτυξαν μια μέθοδο για τον προσδιορισμό ενός αριθμού αντικαταθλιπτικών (φλουοξετίνη, βενλαφαξίνη, αμιτριπτυλίνη, μιάνσεριν, τριμιπραμίνη, νορτριπτυλίνη, μιρταζαπίνη, σερτραλίνη, δοθιεπίνη, σιταλοπράμη και παροξετίνη) και τέσσερις από τους μεταβολίτες τους (δεσμεθυλοτριμιπραμίνη, Ο-δεσμεθυλοβενλαφαξίνη, νορφλουοξετίνη και δεσμεθυλομιρταζαπίνη) σε δείγματα ούρων και πλάσματος με ανάλυση GC-MS. Χρησιμοποιήθηκε SPE για την πραγματοποίηση της εκχύλισης.

Η ερευνητική ομάδα των (Papoutsis et al., 2012) δημιούργησε μία πλήρως επικυρωμένη μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 11 αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (**Εικόνα 29-30**).



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα TIC ενός τυφλού δείγματος αίματος (Papoutsis et al., 2012).

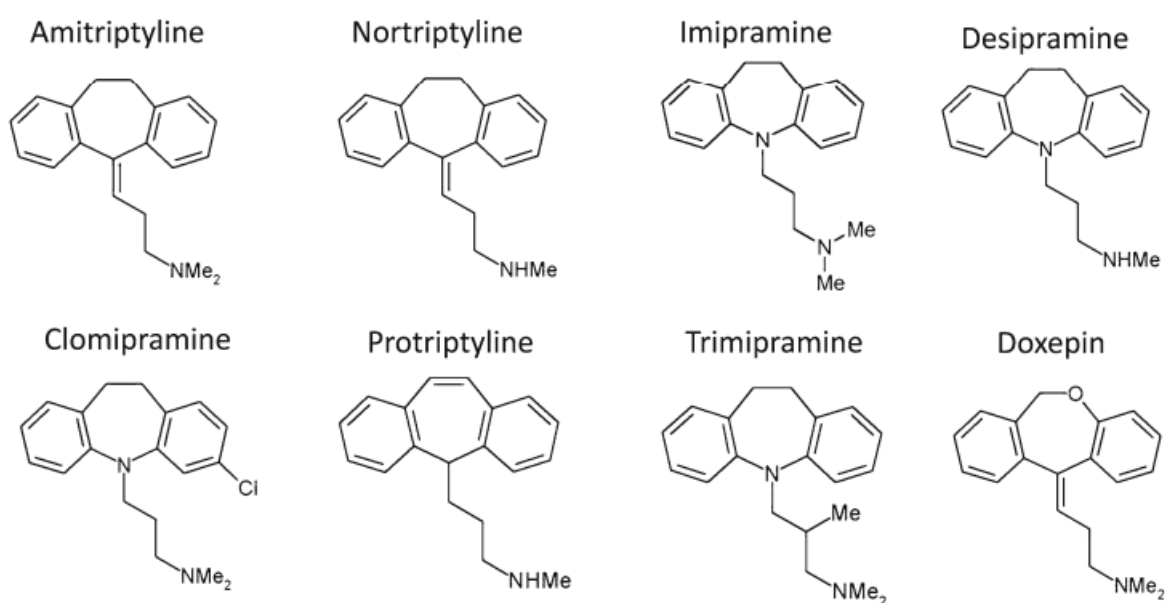


Εικόνα 30: Χρωματογράφημα TIC ενός δείγματος αίματος με 11 αντικαταθλιπτικά φάρμακα και 4 από τους μεταβολίτες τους στη χαμηλή συγκέντρωση (Papoutsis et al., 2012).

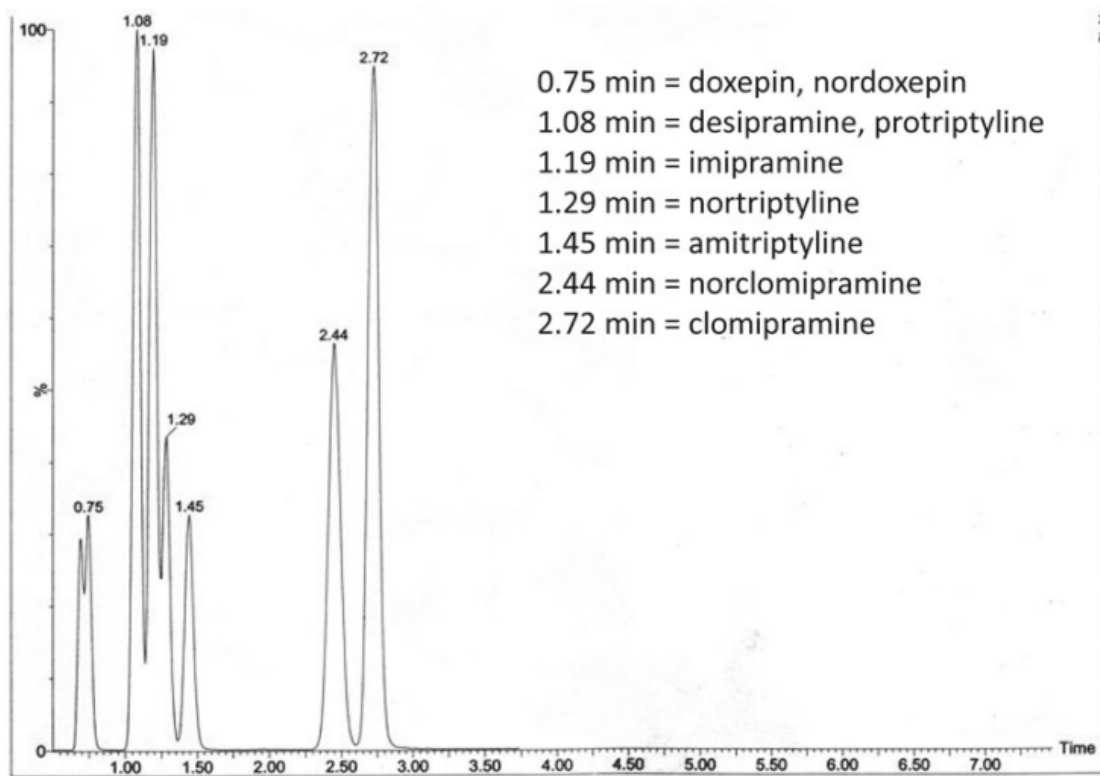
Σε μία μεγάλη έρευνα των (Sempio et al., 2014) έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μιας απλής, ευαίσθητης και ειδικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 88 ουσιών ψυχοδραστικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε ολικό αίμα με σκοπό την εφαρμογή της διαδικασίας σε μεταθανάτιες περιπτώσεις. Τα δείγματα αραιώθηκαν διαδοχικά με μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και κινητή φάση (Mobile Phase). Όλα τα μόρια διαχωρίστηκαν και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν μέσω LC-MS/MS. Η μέθοδος αποδείχθηκε ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική και όλες οι παράμετροι επικύρωσης πληρούσαν τα κριτήρια αποδοχής. Τα όργανα αποτελούνταν από έναν αποσυμπιεστή, μια δυαδική αντλία, μια ισοκρατική αντλία και έναν αυτόματο δειγματολήπτη που διατηρούνταν στους 4 °C. Μια στήλη με προδιαγραφές 100 mm × 2,1 mm, και μέγεθος σωματιδίων 3 μm διατηρήθηκε στους 25 °C κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η κινητή φάση αποτελούνταν από μυρμηκικό οξύ 0,1% και μεθανόλη. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε σταθερή ροή 0,2 ml/min για τη χρωματογραφική έκλουση. Το φασματόμετρο μάζας λειτούργησε σε ρύθμιση παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων χρησιμοποιώντας άζωτο ως αέριο πρόσκρουσης.

Τέλος, οι (Kamisha L. Johnson-Davis et al., 2012) ποσοτικοποίησαν τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά με χρήση UPLC-MS/MS. Το TDM των TCAs είναι σημαντικό λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας στη φαρμακοκινητική, της παραγωγής ενεργών μεταβολιτών και του υψηλού κινδύνου αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων (Εικόνα 32). Επιπλέον, η TDM

ορισμένων TCAs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της δόσης. Η ανάλυση επικεντρώθηκε σε εννέα TCAs (αμιτριπτυλίνη, νοτριπτυλίνη, ιμιπραμίνη, δεσιπραμίνη, δοξεπίνη, νορδοξεπίνη, πρωτριπτυλίνη, κλομιπραμίνη και νορκλομιπραμίνη (**Εικόνα 31**)) που βρίσκονται στον ορό ή το πλάσμα, χρησιμοποιώντας UPLC-MS/MS. Η προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιεί ταχεία καταβύθιση πρωτεϊνών με 50:50 MeOH: ακετονιτρίλιο, φυγοκέντρηση υψηλής ταχύτητας και έγχυση 5 μ L υπερκείμενου υγρού στο όργανο, με χρόνο χρωματογραφικού διαχωρισμού τα 5 λεπτά. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού TCA, χρειάστηκαν μικρές ποσότητες δείγματος, και μικρός χρόνος ανάλυσης.



Εικόνα 31: Δομή των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών που μελετήθηκαν (Kamisha L. Johnson-Davis et al., 2012).



Εικόνα 32: Χρωματογραφήματα TIC. Οι χρόνοι κατακράτησης καταδεικνύουν τη συνέκλωση ορισμένων ενώσεων (Kamisha L. Johnson-Davis et al., 2012).

9. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού- Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

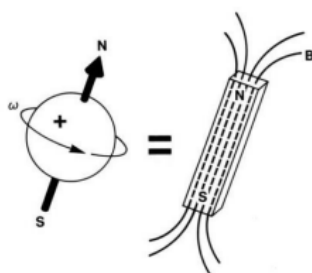
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, πιο γνωστή ως φασματοσκοπία NMR ή φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (MRS), είναι μια φασματοσκοπική τεχνική για την παρατήρηση τοπικών μαγνητικών πεδίων γύρω από ατομικούς πυρήνες. Πρόκειται για μια τεχνική φασματοσκοπίας που βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων 1 έως 1200 MHz από τους πυρήνες των ατόμων (James Keeler, 2010).

Τα τελευταία πενήντα χρόνια, το NMR έχει γίνει η κατεξοχήν τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής των οργανικών ενώσεων. Από όλες τις φασματοσκοπικές μεθόδους, είναι η μόνη για την οποία συνήθως αναμένεται πλήρης ανάλυση και ερμηνεία ολόκληρου του φάσματος. Παράλληλα, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης μιας πρωτεΐνης σε συνθήκες που προσομοιάζουν το φυσικό της περιβάλλον, δηλαδή σε υγρή κατάσταση. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται στην ανάλυση βιοδραστικών ενώσεων σε πληθώρα υποστρωμάτων, όπως τρόφιμα, βιολογικά δείγματα, φυτικά εκχυλίσματα κ.α. (James Keeler, 2010).

Ανακαλύφθηκε το 1946 από δύο Αμερικανούς επιστήμονες, οι οποίοι εργάζονταν ανεξάρτητα, τον Felix Bloch (1905-1983) και τον Edward M. Purcell (1912-1997), οι οποίοι τιμήθηκαν με το Βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1952 για το έργο τους (James Keeler, 2010).

9.1. Βασικές αρχές NMR

Όπως προαναφέρθηκε, η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στις διεγέρσεις ατομικών πυρήνων, οι οποίοι βρίσκονται σε ένα ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο. Επειδή οι ατομικοί πυρήνες φέρουν φορτίο και εκτελούν περιστροφική κίνηση γύρω από τον άξονά τους, δημιουργούν ένα μαγνητικό δίπολο, που έχει μαγνητική ροπή, μ (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: . Περιστρεφόμενος πυρήνας που δημιουργεί μαγνητικό πεδίο (Kravvariti Konstantina, 2022)
(James Keeler, 2010).

Κάθε πυρήνας με ορισμένο προσανατολισμό βρίσκεται σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση. Όταν εφαρμόζονται παλμοί ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, οι μεταβάσεις μεταξύ ενεργειακών καταστάσεων, καταγράφονται ως σήματα NMR. Συνεπώς, οι πυρήνες του δείγματος μπορούν να απορροφήσουν την ενέργεια. Η συχνότητα της ακτινοβολίας που είναι απαραίτητη για την απορρόφηση της ενέργειας εξαρτάται από δύο πράγματα, από τον τύπο του πυρήνα και από το χημικό και μαγνητικό περιβάλλον του πυρήνα. Για παράδειγμα, τα πρωτόνια της μεθυλομάδας και της υδροξυλομάδας της μεθανόλης, απορροφούν σε διαφορετικές συχνότητες και τα πρωτόνια του αμιδίου, δύο διαφορετικών κατάλοιπων τρυπτοφάνης (Trp) σε μια αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, απορροφούν επίσης σε διαφορετικές συχνότητες, καθώς βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό (χημικοί δεσμοί, γειτονικές ομάδες) ή/και μαγνητικό περιβάλλον. Μετά την απορρόφηση της ενέργειας από τους πυρήνες, το χρονικό διάστημα και ο τρόπος με τον οποίο οι πυρήνες διαχέουν αυτή την ενέργεια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να αποκαλύψουν πληροφορίες σχετικά με μια ποικιλία δυναμικών διεργασιών, π.χ. ευκινησίας, ανταλλαγής ανάμεσα σε δυο διαμορφωτικές καταστάσεις, χημικούς μετασχηματισμούς, κλπ (James Keeler, 2010).

9.2. Τύποι φασμάτων NMR

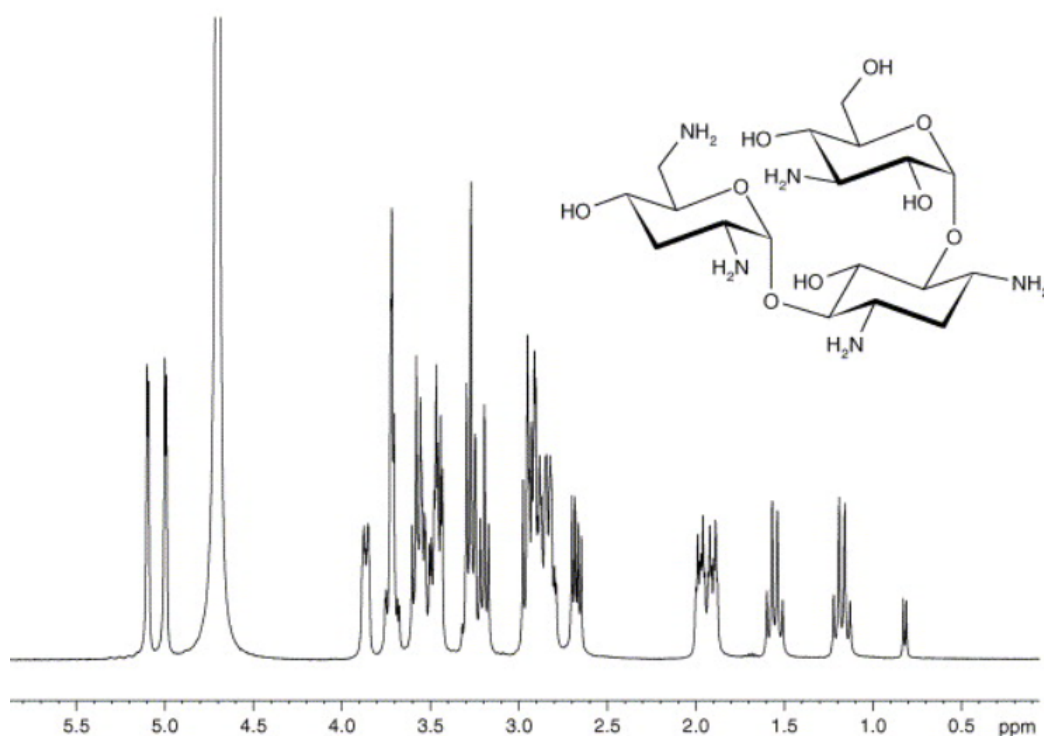
Ένα φάσμα NMR αποτελείται από πληθώρα κορυφών, οι οποίες έχουν προκύψει από το συντονισμό των πυρήνων σε διάφορες συχνότητες. Δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα και ευαίσθητα φάσματα NMR είναι το φάσμα 1D (μονοδιάστατο- one dimension) ^1H -NMR, το οποίο εμφανίζει σήματα για κάθε ένα από τα πρωτόνια (π.χ. υδρογόνου) ενός μορίου, και το φάσμα 2D (δισδιάστατο) $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence), το οποίο εμφανίζει ένα σήμα για κάθε ομοιοπολικά επισημασμένη $^1\text{H}^{15}\text{N}$ ομάδα. Το τελευταίο φάσμα έχει μια κορυφή η οποία χαρακτηρίζεται από δύο χημικές μετατοπίσεις (μία για τον πυρήνα ^1H και μία για τον πυρήνα ^{15}N)(Κορυφή διαστάυρωσης). Ευρεία εφαρμογή έχει η ετεροπυρηνική δισδιάστατη NMR που χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανάλυση χημικών δομών σε μείγματα.

Η πολύτιμη πληροφορία που λαμβάνεται από ένα φάσμα 1D ^1H -NMR είναι, ο αριθμός των σημάτων, ο οποίος υποδεικνύει τον αριθμό των διαφόρων ειδών πρωτονίων (πρωτόνια σε διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον) (Kravvariti Konstantina, 2022) (James Keeler, 2010).

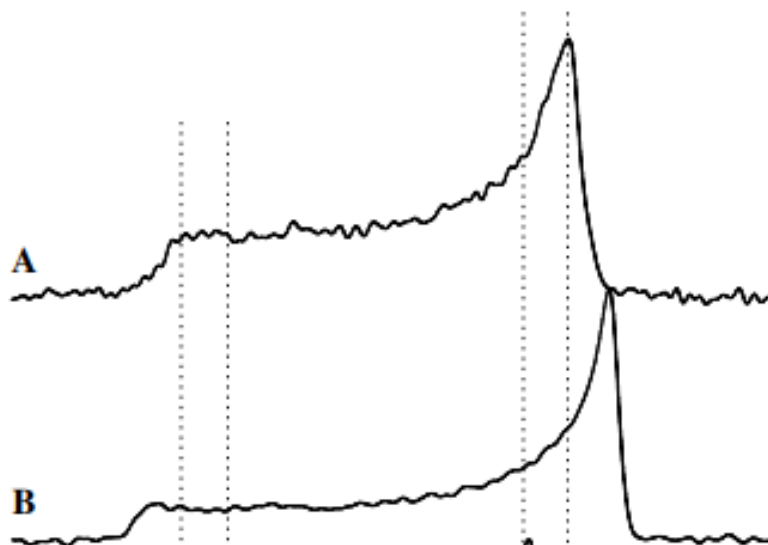
9.3. Ποσοτική φασματοσκοπία qNMR: Πλεονεκτήματα

Τα ακόλουθα περιγράφουν συνοπτικά τα πλεονεκτήματα της ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR έναντι των μεθόδων HPLC: α) είναι διαθέσιμες πρόσθετες δομικές πληροφορίες σχετικά με προσμίξεις, ισομερή κ.λπ. β) συνήθως δεν απαιτείται απομόνωση προσμίξεων γ) δεν απαιτούνται δαπανηρές χημικές ουσίες αναφοράς και δ) η φασματοσκοπία NMR μπορεί να είναι λιγότερο χρονοβόρα (δεν υπάρχει χρόνος εξισορρόπησης στήλης), και οδηγεί σε υψηλή αναπαραγωγιμότητα. Αυτά είναι μερικά μόνο από τα πλεονεκτήματα της χρήσης της ανάλυσης qNMR έναντι των τυπικών μεθόδων HPLC.

Οι προαναφερθείσες περιπτώσεις καταδεικνύουν περίτρανα πόσο κατάλληλη είναι η φασματοσκοπία NMR για τις ανάγκες ανάλυσης φαρμάκων. Ως αποτέλεσμα, σύντομα θα πρέπει να αναμένονται πρόσθετες εφαρμογές στις Εθνικές Ευρωπαϊκές Φαρμακοποιίες. Ωστόσο, η φασματοσκοπία NMR, ιδίως στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, πρέπει να επικαιροποιηθεί, ώστε να αντικατοπτρίζει τις σύγχρονες μεθόδους, προκειμένου να χρησιμοποιείται συχνότερα (U. Holzgrabe et al., 2005).



Σχήμα 31: Χημική δομή και φάσμα ^1H NMR (400 MHz, D_2O) της τομπραμυκίνης (U. Holzgrabe et al., 2005).



Σχήμα 32: Ανίχνευση με στερεάς κατάστασης NMR A) Δεσιπραμίνης B) ιμιπραμίνης (Αντικαταθλιπτικά φάρμακα) x'x (p.p.m) (U. Holzgrabe et al., 2005).

9.4. Διαφορετικοί Τύποι NMR

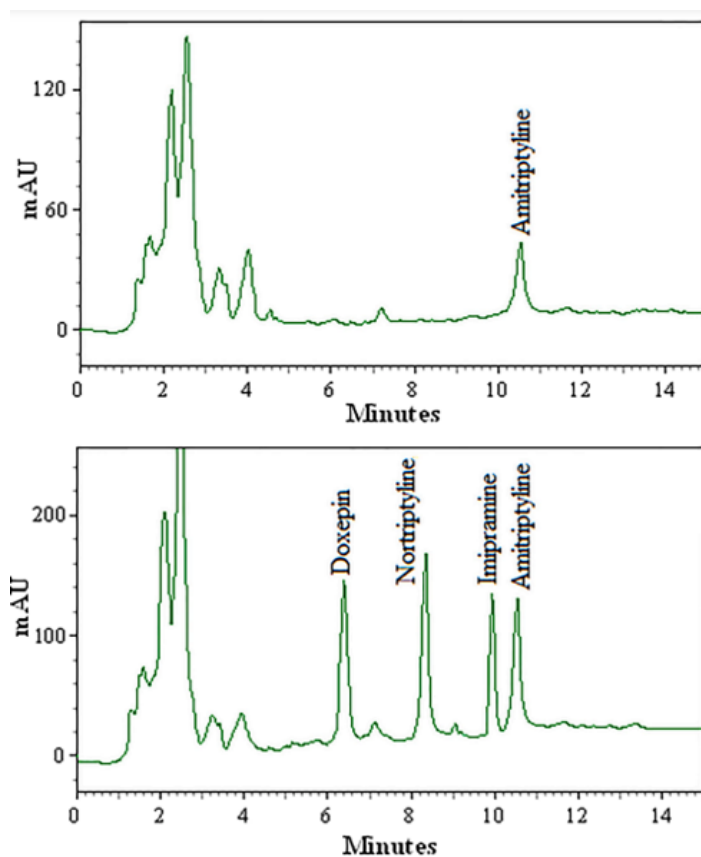
Η φασματοσκοπία NMR περιλαμβάνει διάφορους τύπους, προσαρμοσμένους για συγκεκριμένες εφαρμογές: Προσφέρει λεπτομερείς γνώσεις για τη δομή, τη δυναμική και τις αλληλεπιδράσεις των μορίων και είναι ιδανικό για την οργανική χημεία, τη βιοχημεία και τη φαρμακευτική έρευνα. Η δομή, η δυναμική και το χημικό περιβάλλον των στερεών δειγμάτων μπορούν να αποκαλυφθούν με το NMR στερεάς κατάστασης, το οποίο είναι χρήσιμο στην επιστήμη των υλικών και τη βιολογία. Επιπλέον, ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των υπό μελέτη ουσιών είναι ο κύριος στόχος του ποσοτικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (qNMR), ο οποίος είναι χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση φαρμάκων in vivo.

Άλλοι τύποι NMR είναι το Magic Angle Spinning (MAS) NMR και Nuclear Overhauser Effect Streptoscopy (NOESY) (U. Holzgrabe et al., 2005).

9.5. Εφαρμογή της NMR στην ανίχνευση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων

Στην πρόσφατη μελέτη των (Fattahi et al., 2024) έχει πραγματοποιηθεί τυποποίηση μιας αναλυτικής διαδικασίας για την εκχύλιση και τη μέτρηση των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος αίματος. Έγινε χρωματογραφική ανάλυση των φαρμάκων μέσω HPLC με διπλές αντλίες και ανιχνευτή UV, προγραμματισμένο για ανίχνευση μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Ο διαχωρισμός έγινε σε στήλη 25 cm × 4,6 mm, με μέγεθος σωματιδίων 5 μm). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 42 % ακετονιτρίλιο και 58 % φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM) με pH 4. Ο χαρακτηρισμός των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

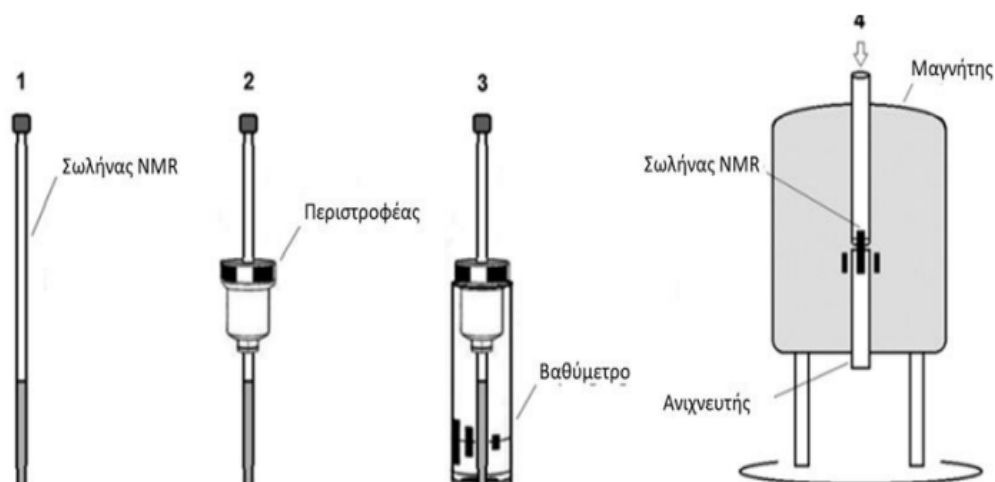
(deep eutectic solvent) DES έγινε με τη χρήση NMR και ανάλυση με θερμοζυγό (thermogravimetric analysis) TGA ανάλυση. Η αποτελεσματικότητα της προτεινόμενης διαδικασίας αποδείχθηκε με το διαχωρισμό των TCAs (**Εικόνα 34**). Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετική για την εκχύλιση και το διαχωρισμό άλλων φαρμάκων από βιολογικά δείγματα και μπορεί να παράσχει ενδιαφέρουσες προοπτικές και για τη μέτρηση ιχνοστοιχείων σε άλλα περιβαλλοντικά δείγματα.



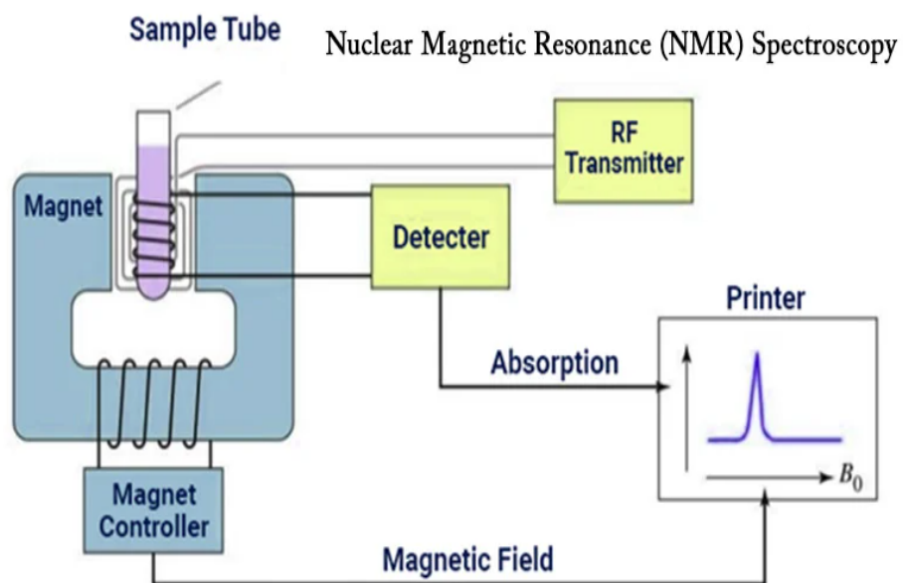
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα (1) control, (2) και των αντίστοιχων δειγμάτων με συγκέντρωση 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τα TCA.



Εικόνα 35: Φασματογράφος NMR 700 MHz Bruker Avance III HD. (Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών).



Εικόνα 36: Προετοιμασία δείγματος για λήψη φάσματος με NMR (U. Holzgrabe et al., 2005).

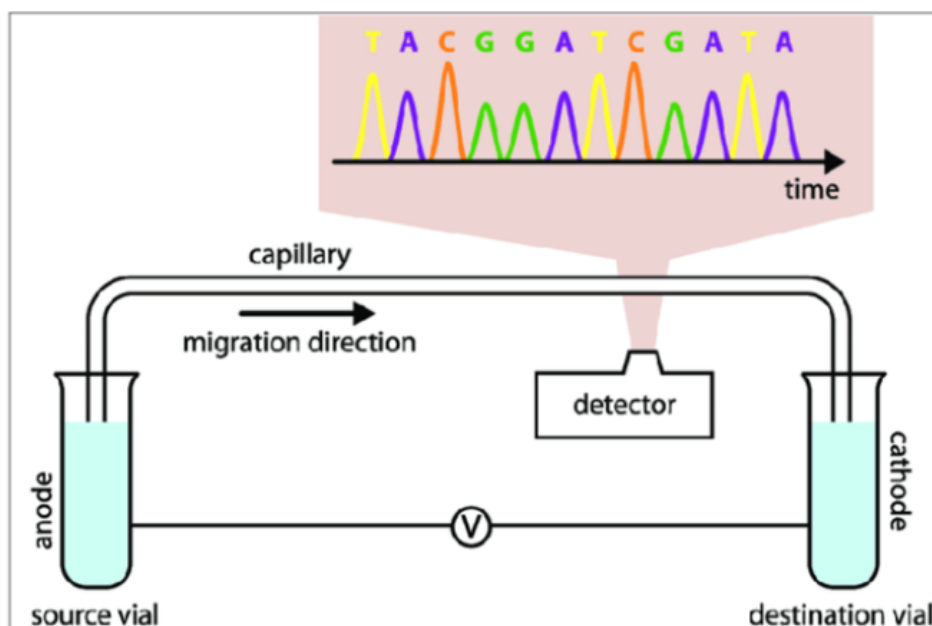


Εικόνα 37: Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. Απλό διάγραμμα. (U. Holzgrabe et al., 2005).

10. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση-(Capillary Electrophoresis (CE))

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE) είναι ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο για την ταυτοποίηση φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα, λόγω της υψηλής ευαισθησίας, ακρίβειας και ευελιξίας της (**Εικόνα 37**). Χρησιμοποιείται κατά κόρον, στην ανίχνευση φαρμάκων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που την καθιστά ιδανική για την ανάλυση δειγμάτων όπως αίμα, ούρα ή εκχυλίσματα ιστών. Η CE διαχωρίζει αποτελεσματικά τους πολύπλοκους συνδυασμούς, εξασφαλίζοντας ότι τα φάρμακα και άλλα βιολογικά συστατικά διαχωρίζονται ποιοτικά. Η ευελιξία του αποδεικνύεται από την ικανότητά του να διαχωρίζει φαρμακευτικά προϊόντα με διαφορετικά φορτία και πολικότητα, σε μια ποικιλία μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης, της μικροκυτταρικής ηλεκτροκινητικής χρωματογραφίας (microcellular electromotive chromatography) και της τριχοειδούς ισοηλεκτρικής εστίασης (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020). Η άμεση εξέταση αραιωμένων δειγμάτων καθίσταται δυνατή με την CE, η οποία συνήθως απαιτεί πολύ μικρή προετοιμασία του δείγματος. Παρέχει γρήγορους χρόνους ανάλυσης, οι οποίοι είναι χρήσιμοι σε εγκληματολογικά αλλά και κλινικά πλαίσια. Η θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων εξαρτάται από την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της CE. Οι δυνατότητές της αυξάνονται περαιτέρω όταν συζεύγνεται με τη φασματομετρία μάζας (CE-MS), η οποία βελτιώνει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμάκων καθώς και των μεταβολιτών τους. Η μέθοδος λειτουργεί καλά όταν απαιτείται η διατήρηση του δείγματος, επειδή χρειάζεται μόνο μια μικρή, συχνά μη καταστρεπτική, ποσότητα δείγματος (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).

Με το ευρύ φάσμα εφαρμογών της στη φαρμακευτική ανάλυση, την κλινική τοξικολογία, την εγκληματολογική επιστήμη και τον έλεγχο του ντόπινγκ, η CE είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην ταυτοποίηση ενός ευρέος φάσματος φαρμάκων, από παράνομες ουσίες έως φαρμακευτικές ενώσεις και τους μεταβολίτες τους, υπογραμμίζοντας την ολοκληρωμένη χρησιμότητά της στην ανάλυση φαρμάκων σε βιολογικές υλικά (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).



Εικόνα 38: Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).

10.1. Capillary Electrophoresis για ανίχνευση ενώσεων σε πλάσμα ασθενών

Η CE είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για την ανάλυση φαρμάκων στο πλάσμα αίματος λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας, ευαισθησίας και ικανότητάς της να χειρίζεται πολύπλοκα βιολογικά υλικά (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).

Η προετοιμασία του δείγματος είναι απαραίτητη, προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες από το πλάσμα αίματος, και άλλα υλικά που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Η αραιώση του αρχικού δείγματος, η εκχύλιση στερεάς φάσης και η καταβύθιση πρωτεϊνών είναι τυπικές τεχνικές που ακολουθούνται. Στόχος είναι ο διαχωρισμός των φαρμακευτικών ουσιών από το πλάσμα, διατηρώντας παράλληλα τη δομική τους ακεραιότητα για την ανάλυση.

Ανάλογα με τον τύπο του φαρμάκου που εξετάζεται, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τρόποι διαχωρισμού στην CE: Τα φάρμακα με συγκεκριμένα ισοηλεκτρικά σημεία μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), ενώ τα φάρμακα που είναι φορτισμένα ή πολικά μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας τη μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC), η οποία χρησιμοποιεί μικκύλια όπως το θεϊκό δωδεκυλικό νάτριο (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).

Για την ανίχνευση, η CE ενσωματώνει τεχνικές όπως η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού, κατάλληλη για φάρμακα που απορροφούν υπεριώδες ή ορατό φως, ο φθορισμός

επαγόμενος από λέιζερ για υψηλότερη ευαισθησία με φθορίζοντα ή παράγωγα φάρμακα και η φασματομετρία μάζας (CE-MS) για αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Το CE διευκολύνει τόσο τις ποιοτικές όσο και τις ποσοτικές αναλύσεις- ο χρόνος μετανάστευσης των κορυφών σε ένα ηλεκτροφοριογράφημα βοηθά στην ταυτοποίηση των φαρμάκων, ενώ η περιοχή κορυφής παρέχει ποσοτικά δεδομένα, με τη χρήση εσωτερικών προτύπων για την ενίσχυση της ακρίβειας και της ακρίβειας στον ποσοτικό προσδιορισμό.

10.2. CE: Εφαρμογές και προκλήσεις

Η CE αντιμετωπίζει προκλήσεις, όπως το γεγονός ότι πρέπει το βιολογικό υλικό να καθαριστεί προσεκτικά, κατά την προετοιμασία του δείγματος, με στόχο την μείωση των παρεμποδίσεων και την αύξηση της απόδοσης της ανάλυσης. Η αποτελεσματικότητα και η ταχύτητά της υπερβαίνουν εκείνες των κλασικών χρωματογραφικών τεχνικών, γεγονός που την καθιστά ιδανική για τομείς όπου χρειάζονται αποτελέσματα υψηλής απόδοσης, όπως στον τομέα της τοξικολογίας.

Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές περιλαμβάνουν την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων που καλύπτουν πτυχές όπως η ειδικότητα, και η ακρίβεια, την τήρηση της ορθής εργαστηριακής πρακτικής, τη συμμόρφωση με τα πρότυπα της Διεθνούς Διάσκεψης για την Εναρμόνιση, για τα φαρμακευτικά προϊόντα και την τήρηση των τροποποιήσεων για τη βελτίωση των κλινικών εργαστηρίων στις Η.Π.Α. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων παρέχουν ειδικές κατευθυντήριες γραμμές για την επικύρωση μεθόδων σε κλινικά περιβάλλοντα. Είναι επιτακτική ανάγκη να διασφαλίζεται η ακεραιότητα των δεδομένων, η ολοκληρωμένη τεκμηρίωση και η τήρηση κανονιστικών πλαισίων. Για να διατηρηθεί η διαπίστευση και να αποδειχθεί η συνεχής συμμόρφωση με αυτά τα εκτεταμένα κριτήρια, απαιτούνται περιοδικοί έλεγχοι και επιθεωρήσεις από τους σχετικούς ρυθμιστικούς οργανισμούς (Aemi Syazwani Abdul Keyon et al., 2020).

10.3. Εφαρμογή της CE στην ανάλυση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, δεδομένου ότι η μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος και διαλυτών, η ευκολία στη λειτουργία και η ταχύτητα. Οι (Abdul Keyon et al., 2019) συνοψίζουν περισσότερες από 30 εργασίες σχετικά με την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που δημοσιεύθηκαν περίπου από το 1999 έως το 2018. Η έρευνα επικεντρώνεται στις

αναφερόμενες τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και στις εφαρμογές τους και προκλήσεις για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

Διάφοροι τρόποι CE, συμπεριλαμβανομένης της CZE (τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης ζώνης), χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαφόρων αντικαταθλιπτικών (AntiDepressants- ADs), όπως η αμιτριπυλίνη (AMI), η νορτριπυλίνη (NOR), η μιρταζαπίνη (MRT) και τα παράγωγά τους. Οι συνθήκες CE ποικίλλουν, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και επίπεδα pH για τη βελτιστοποίηση της ανίχνευσης αυτών των φαρμάκων. Για παράδειγμα, ορισμένες μέθοδοι χρησιμοποιούν β-κυκλοδεξτρίνη ή καρβοξυμεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris ή φωσφορικών, ενώ άλλες χρησιμοποιούν πιο σύνθετα συστήματα όπως β-κυκλοδεξτρίνη ή μαλτοδεξτρίνη, για ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων περιλαμβάνουν την LLE, και την SPE. Τα όρια ανίχνευσης για αυτές τις μεθόδους κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα ng/mL έως μg/mL. Η ανασκόπηση καταδεικνύει την ευελιξία και την προσαρμοστικότητα της CE στην ανάλυση αντικαταθλιπτικών σε διάφορους τύπους δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου πλάσματος, των ούρων και των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1 και 2) υπάρχει αναλυτικότερα η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ανάλογα με το υπό μελέτη φάρμακο (Abdul Keyon et al., 2019).

Στον **πίνακα 1** παρακάτω παρουσιάζονται διαφορετικοί τρόποι τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαφόρων αναλυτών, τις αντίστοιχες συνθήκες CE, τις μεθόδους προετοιμασίας δειγμάτων, τα όρια ανίχνευσης (limits of detection-LOD) και τους τύπους των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων (πλάσμα αίματος). Για παράδειγμα, ο πίνακας παραθέτει τρόπους CE όπως η capillary zone electrophoresis-CZE, η οποία αναλύει την αμιλορίδη (AMI) και τη νορφλοξασίνη (NOR) χρησιμοποιώντας συνθήκες όπως 0,2 mM β-CD σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 20 mM με pH 3,0, χρησιμοποιώντας υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) για την προετοιμασία του δείγματος και έχει LODs 60-70 ng/mL σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Άλλοι αναλύτες όπως η μιρταζαπίνη και η Ν-δεσμεθυλομιρταζαπίνη εκτελούνται υπό διαφορετικές συνθήκες που περιλαμβάνουν καρβοξυμεθυλο-β-CD σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM με διαφορετικό επίπεδο pH και χρησιμοποιούν εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ως μέθοδο προετοιμασίας του δείγματος. Παρόμοιες λεπτομέρειες παρατίθενται για τη σερτραλίνη (SER), τη φλουοξετίνη (FLX) και άλλα φάρμακα, το καθένα με συγκεκριμένες συνθήκες CE, μεθόδους προετοιμασίας δειγμάτων και LOD, όπου εφαρμόζεται, με τα περισσότερα δείγματα να είναι ανθρώπινο πλάσμα. Σε ορισμένες καταχωρίσεις δεν παρέχονται δεδομένα, τα οποία υποδεικνύονται με *NA.

Πίνακας 1: Ανάλυση αντικαταθλιπτικών με διαφορετικές μεθόδους CE (Abdul Keyon et al., 2019).

CE Modes	Analytes	CE conditions	Sample preparation	LODs	Samples
CZE	AMI and NOR	0.2 mM β -CD in 20 mM Tris buffer (pH 3.0), UV detector.	LLE	60–70 ng/mL	Human plasma
	MRT and N-desmethylnortazapine	Carboxymethyl- β -CD in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5), UV detector.	SPE	*NA	Human plasma
	SER, FLX and fluvoxamine	200 mM acetate buffer (pH 3.5) containing ACN (10:90, v/v%), DAD system.	Polymeric monolithic SPE	Low ng/mL	*NA
	DES, NOR, IMI, doxepin and AMI	Potassium borate (56 mM, pH 9.5); potassium phosphate (56 mM, pH 9.5); TMBD phosphate (100 mM, pH 9.5), UV detector.	*NA	*NA	*NA
	FLX	80 mM guanidine and 3% sulfated- β -CD in 25 mM phosphate buffer, UV detector.	*NA	*NA	*NA
	FLX and other basic drugs	50 mM phosphate (pH 3.0) containing 2% w/v sulfated maltodextrin, UV detector.	*NA	*NA	*NA
	IMI, CLO, DES and norclomipramine	30 mM ammonium acetate (pH 3.0), TOF-MS detector.	Strong cation exchange SPE column	1.0 ng/mL	Human plasma

11. Συζήτηση

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων ασθενών που λαμβάνουν τέτοιες θεραπείες είναι ύψιστης σημασίας. Ο ακριβής προσδιορισμός τέτοιων ουσιών είναι ζωτικής σημασίας, καθώς με γνώμονα αυτό, οι ειδικοί προσαρμόζουν τον τρόπο θεραπείας του ασθενούς, καθώς όπως είναι γνωστό, ασθένειες που θεραπεύονται με τέτοιου είδους φάρμακα χρήζουν μίας δυναμικής θεραπείας.

Για τον βέλτιστο προσδιορισμό των φαρμάκων ακολουθούνται διάφορες μέθοδοι. Η επιλογή κάθε τεχνικής γίνεται με γνώμονα, την βιοχημική σύσταση του φαρμάκου, την κατάσταση του ασθενούς, την διαθεσιμότητα σε επιστημονικά μηχανήματα του εκάστοτε νοσοκομείου, ή ιατρικού κέντρου αλλά και την τεχνογνωσία των ιατρών και επιστημόνων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το κόστος της διαγνωστικής εξέτασης είναι επίσης σημαντικός παράγοντας καθώς επηρεάζει άμεσα το κόστος της πρωτοβάθμιας περίθαλψης.

Η εκχύλιση υγρών φάσεων (LLE) και η εκχύλιση υγρής-στερεάς φάσης (SPE), ως μέθοδοι προκατεργασίας «προσφέρουν» αντίθετες προσεγγίσεις για την ανίχνευση φαρμάκων. Η LLE είναι μια παραδοσιακή και χαμηλού κόστους μέθοδος γνωστή για την απλότητά της, αλλά στερείται αποτελεσματικότητας και ταχύτητας, ειδικά με πολύπλοκα δείγματα όπως το πλάσμα αίματος. Αντίθετα, η SPE είναι πιο προηγμένη, παρέχοντας καλύτερη επιλεκτικότητα και ευαισθησία, και είναι ταχύτερη από την LLE, ενώ απαιτεί μικρότερους όγκους δείγματος, αν και συνοδεύεται από υψηλότερο κόστος λόγω των εξειδικευμένων εργαλείων. Με γνώμονα αυτές τις δύο παραδοσιακές μεθόδους, διάφορες ερευνητικές ομάδες δημιουργούν νέες μεθόδους ή βελτιστοποιούν τις είδη υπάρχουσες με σκοπό την αποτελεσματικότερη ανάλυση των αναλυτών.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ξεχωρίζει ως καθιερωμένη μέθοδος με υψηλό κόστος για τον εξοπλισμό, αλλά προσφέρει και υψηλή ανάλυση, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για κλινικές αναλύσεις ρουτίνας και ιδιαίτερα αξιόλογη στην έρευνα τόσο για ποσοτικές όσο και για ποιοτικές αναλύσεις. Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (HPLC-MS/MS) και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), αν και πιο ακριβές λόγω του εξελιγμένου εξοπλισμού τους, προσφέρουν απαράμιλλη ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ η ταχύτητά τους σε σχέση με την παραδοσιακή HPLC τις καθιστά ζωτικής σημασίας σε κλινικές εφαρμογές και ιδανικές για πολύπλοκες ερευνητικές αναλύσεις, ιδίως σε φαρμακοκινητικές μελέτες και στην ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων φαρμάκων. Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (UPLC) παρέχει

αυξημένη ταχύτητα και ανάλυση σε σύγκριση με την HPLC, αλλά με υψηλότερο κόστος, καθιστώντας την κατάλληλη για εργαστήρια υψηλής απόδοσης, ενώ ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι εξαιρετικά υψηλού κόστους, έχοντας όμως πολλά πλεονεκτήματα ως τεχνική και χρησιμοποιείται συνήθως στην έρευνα για δομική ανάλυση και όχι για συνήθεις μετρήσεις συγκέντρωσης φαρμάκων. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) συζευγμένη με MS αναδεικνύεται ως μια οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση της HPLC-MS φασματομετρίας μάζας, χρησιμοποιώντας ελάχιστα αντιδραστήρια και προσφέροντας χαμηλό λειτουργικό κόστος, γρήγορη μεθοδολογία και ιδιαίτερη χρησιμότητα στην έρευνα για το διαχωρισμό ενώσεων.

Η πρόοδος των μεθόδων για την ανίχνευση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο πλάσμα αίματος επικεντρώνεται στην ενίσχυση της ευαισθησίας και της ειδικότητας για ακριβή δοσολογία και παρακολούθηση, στην επιτάχυνση της ανάλυσης για έγκαιρη φροντίδα των ασθενών και στην αύξηση της απόδοσης για την εξυπηρέτηση περισσότερων ασθενών. Η μείωση του κόστους είναι το κλειδί για να καταστούν οι τεχνολογίες αυτές πιο προσιτές, ιδίως σε περιβάλλοντα περιορισμένων πόρων. Η ανάπτυξη μικρών φορητών συσκευών θα επιτρέψει τη διενέργεια εξετάσεων σε πολλά σημεία περίθαλψης, διευρύνοντας την πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη. Η αυτοματοποίηση και η ενσωμάτωση με τα συστήματα πληροφοριών υγείας είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και τη μείωση του ανθρώπινου σφάλματος, ενώ παράλληλα ευθυγραμμίζονται με τις προσεγγίσεις εξατομικευμένης ιατρικής για την προσαρμογή των θεραπειών στα ατομικά προφίλ των ασθενών. Επιπλέον, η μείωση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου αυτών των μεθόδων αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία, με στόχο πιο πράσινες εργαστηριακές πρακτικές. Αυτές οι βελτιώσεις είναι απαραίτητες για την προώθηση της ιατρικής ακριβείας, τη βελτιστοποίηση της φροντίδας με επίκεντρο τον ασθενή και τη διασφάλιση της βιωσιμότητας και της προσβασιμότητας στην υγειονομική περίθαλψη.

12. Συμπεράσματα

Σε μία εποχή που τα ψυχολογικά προβλήματα υγείας αυξάνονται, και που θα συνεχίσουν να αυξάνονται, η έρευνα στον τομέα των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι κάτι περισσότερο από απαραίτητη. Πέρα από την δημιουργία νέων φαρμάκων αλλά και την βελτίωση της ποιότητας των είδη υπάρχων, είναι εξαιρετικής σημασίας η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, που σκοπό θα έχουν την ανίχνευσή τους στους ασθενείς. Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο πλάσμα του αίματος ασθενών είναι ζωτικής σημασίας, αφού με γνώμονα αυτόν, γίνεται η εμπεριστατωμένη πρόγνωση, διάγνωση και τροποποίηση της θεραπείας. Οι ψυχικές διαταραχές χαρακτηρίζονται από μεγάλη πολυπλοκότητα, γεγονός που καθιστά και την θεραπεία πολύπλοκη. Είναι πολύ σημαντικό, το προσωπικό υγείας να γνωρίζει ανά πάσα στιγμή, γρήγορα, αποδοτικά, ποιοτικά και με ακρίβεια, τις ποσότητες των φαρμάκων στον οργανισμό του ασθενή, και σε συνδυασμό με την συμπτωματολογία, να παίρνει αποφάσεις για το μέλλον της θεραπείας του.

Μερικές από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους- τεχνικές, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο αίμα είναι οι LLE, SPE, σε συνδυασμό με HPLC, UPLC, LC-MS/MS, GC-MS, CE, καθώς και η NMR. Όλες παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ωστόσο κοινή γραμμή για όλες τις μεθόδους είναι η βελτίωσή τους, με σκοπό την αύξηση της ταχύτητας, την βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ακρίβειας, αλλά και την μείωση του κόστους.

13. Βιβλιογραφία

- A. Bokhary, M. Leitch, & B.Q. Liao. (2021). Liquid–liquid extraction technology for resource recovery: Applications, potential, and perspectives. *Journal of Water Process Engineering*.
- Abdul Keyon, A. S., Miskam, M., Ishak, N. S., Mahat, N. A., Mohamed Huri, M. A., Abdul Wahab, R., Chandren, S., Abdul Razak, F. I., Ng, N. T., & Ali, T. G. (2019). Capillary electrophoresis for the analysis of antidepressant drugs: A review. In *Journal of Separation Science* (Vol. 42, Issue 4, pp. 906–924). Wiley-VCH Verlag.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201800859>
- Aemi Syazwani Abdul Keyon, Mazidatulakmam Miskam, Nur Syazwani Ishak, Naji Arafat Mahat, Mohamad Afiq Mohamed Huri, Roswanira Abdul Wahab, Sheela Chandren, Fazira Ilyana Abdul Razak, Nyuk-Ting Ng, & Timothy Gandu Ali. (2020). Capillary electrophoresis for the analysis of antidepressant drugs: A review. *Journal of Separation Science*.
- Alizadeh Nabil, A. A., Nouri, N., & Farajzadeh, M. A. (2015). Determination of three antidepressants in urine using simultaneous derivatization and temperature-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Biomedical Chromatography*, 29(7), 1094–1102.
<https://doi.org/10.1002/bmc.3396>
- Alves, V., Conceição, C., Gonçalves, J., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. (2017). Improved analytical approach based on QuEChERS/UHPLC-PDA for quantification of fluoxetine, clomipramine, and their active metabolites in human urine samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(1), 45–53. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw077>
- Anastasios Georgotas, Robert E. McCue, William Hap worth, Eitan Friedman, O.Mary Kim, Joan Welkowitz, Irene Chang, & Thomas B. Cooper. (1996). Comparative efficacy and safety of MAOIs versus TCAs in treating depression in the elderly. *Biological Psychiatry*.
- Bernardo Dell’Osso, Massimiliano Buoli, David S. Baldwin, & A. Carlo Altamura. (2009). Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. *Human Psychopharmacology*.
- Blum F. (2014). High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*.
- Borwin Bandelow, & Sophie Michaelis. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*.
- Chaitra T. Ramachandrai, Narayana Subramanyam, Kral Jurgen Bar, Glen Baker, & Vikram K. Yeragani. (2011). Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. *Indian J Psychiatry*.
- Christine Frahnert, Marie Luise Rao, & Katja Grasmader. (2003). A Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid

- chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*.
- Diane Turner. (2022). GC-MS Principle, Instrument and Analyses and GC-MS/MS. *Technology Networks Analysis and Separations*.
- E. Stengel. (1959). Classification of mental disorders. *Bull World Health Organ*.
- Edmond de Hoffmann, & Vincent Stroobant. (2013). *Mass Spectrometry Principles and Applications*.
- Farajzadeh, M. A., & Abbaspour, M. (2018). Development of new extraction method based on liquid–liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples. *Biomedical Chromatography*, 32(8). <https://doi.org/10.1002/bmc.4251>
- Fattahi, N., Heidari, R., Ghazanfaripour, B., Masoudipour, E., Gharehdaghi, J., & Nejad, K. S. (2024). Standardization of the analytical procedure based on deep eutectic solvent for the extraction and measurement of tricyclic antidepressants drugs in post-mortem blood samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115811>
- Fiona Mary Antony, Dharm Pal, & Kailas Wasewar. (2021). Separation of bio-products by liquid–liquid extraction. *Physical Sciences Reviews*.
- Frank Steiner, Carsten Paul, & Michael W. Dong. (2019). HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*.
- Frederick F. Cantwell, & Manon Losier. (2002). Liquid—liquid extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*.
- G Laux. (2020). Antidepressants: Definition, Classification, Guidelines. *NeuroPsychopharmacotherapy*.
- Ghorbani, M., Mohammadi, P., Keshavarzi, M., Ziroohi, A., Mohammadi, M., Aghamohammadhasan, M., & Pakseresht, M. (2023). Developments of Microextraction (Extraction) Procedures for Sample Preparation of Antidepressants in Biological and Water Samples, a Review. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 53, Issue 6, pp. 1285–1312). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.2018648>
- H. Ceren Ates, Jason A. Roberts, Jeffrey Lipman, Anthony E.G. Cass, Gerald A. Urban, & Can Dincer. (2020). On-Site Therapeutic Drug Monitoring. *Trends in Biotechnology*.
- Hari Nair, Fred Woo, Andrew N. Hoofnagle, & Geoffrey S. Baird. (2013). Clinical Validation of a Highly Sensitive GC-MS Platform for Routine Urine Drug Screening and Real-Time Reporting of up to 212 Drugs. *Journal of Toxicology*.
- JA Lieberman. (2003). History of the use of antidepressants in primary care. *J Clin Psychiatry*.
- Jacqueline de M. Campêlo, Taís B. Rodrigues, Jose L. Costa, & Jandyson M. Santos. (2021). Optimization of QuEChERS extraction for detection and quantification of 20

- antidepressants in postmortem blood samples by LC-MS/MS. *Forensic Science International*.
- James Keeler. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy*. WILEY & Sons.
- Joel T. Braslow, & Stephen R. Marder. (2019). History of Psychopharmacology. *Annual Review of Clinical Psychology*.
- Joseph P McEvoy, Daniel Zigman, & Howard C Margolese. (2010). First- and Second-Generation Antipsychotics. *The Canadian Journal of Psychiatry*.
- Ju-Seop Kang, & Min-Ho Lee. (2009). Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med*.
- Kall MA, Rohde M, & Jørgensen M. (2015). Quantitative determination of the antidepressant vortioxetine and its major human metabolite in plasma. *Bioanalysis*.
- Kamisha L. Johnson-Davis, JoEtta M. Juenke, Rebecka Davis, & Gwendolyn A. McMillin. (2012). Quantification of Tricyclic Antidepressants Using UPLC-MS/MS. *Methods in Molecular Biology*.
- kanzaki, R. (2023). Deep eutectic solvents for liquid–liquid extraction. In *Analytical Sciences* (Vol. 39, Issue 7, pp. 1021–1022). Springer. <https://doi.org/10.1007/s44211-023-00362-0>
- Kirchherr, H., & Kühn-Velten, W. N. (2006). Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 843(1), 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.031>
- Kravvariti Konstantina. (2022). «Έκφραση, απομόνωση και δομικός χαρακτηρισμός της macro επικράτειας 2 της ανθρώπινης πρωτεΐνης PARP14, μέσω φασματοσκοπίας NMR». University Of Patras.
- Lopez-Munoz, & Francisco Alamo Cecilio. (2009). Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. . *Current Pharmaceutical Design*.
- M. K. Christensen, C. C. W. Lim, S. Saha, O. Plana-Ripoll, D. Cannon, F. Presley, N. Weye, N. C. Momen, H. A. Whiteford, K. M. Iburg, & J. J. McGrath. (2020). The cost of mental disorders: a systematic review. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*.
- Mahbub Hossain, Samia Tasnim, Abida Sultana, Farah Faizah, Hoimonty Mazumder, Liye Zou, Helal Uddin Ahmed, & Ping Ma. (2020). Epidemiology of mental health problems in COVID-19: a review. *F1000Res*.
- Michael E. Swartz. (2005). UPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*.
- Michele Protti, R. M., Camilla Marasca, Andrea Cavalli, Alessandro Serretti, & Laura Mercolini. (2020). New-generation, non-SSRI antidepressants: Drug-drug interactions and therapeutic drug monitoring. Part 2: NaSSAs, NRIs, SNDRI, MASSAs, NDRI, and others. *Medicinal Research Reviews*.

- Mohamed E. I. Badawy, Mahmoud A. M. El-Nouby, Paul K. Kimani, Lee W. Lim, & Entsar I. Rabea. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences* .
- Olga Kiseleva, Ilya Kurbatov, Ekaterina Ilgisonis, & Ekaterina Poverennaya. (2022). Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites*.
- P Gerhards, U Bons, J Sawazki, J Szigan, & A Wertmann. (2008). *GC/MS in Clinical Chemistry*.
- Papoutsis, I., Khraiweh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., & Athanaselis, S. (2012). A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 557–562.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.007>
- R. Stock, & C. B. F. Rice. (2013). *Chromatographic Methods* (Vol. 3). Science Paperbacks.
- Ranjan, G., Jamal, F., Das, S., & Gupta, V. (2023). Therapeutic Drug Monitoring: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 13(10), 134–136.
<https://doi.org/10.22270/jddt.v13i10.6251>
- Renata Raina. (2011). Chemical analysis of Pesticides using GC-MS , GC-MS/MS and LC-MS/MS. In *Pesticides: Strategies for Pesticides Analysis* .
- Ronald E. Majors. (2015). Historical Developments in HPLC and UHPLC Column Technology: The Past 25 Years. *LCGC North America*.
- Rosado T, Gonçalves A, Martinho A, Alves G, Duarte AP, & Domingues F. (2017). Simultaneous Quantification of Antidepressants and Metabolites in Urine and Plasma Samples by GC-MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Chromatographia*.
- S. Hegstad, H.Z. Khiabani, L. Kristoffersen, N. Kunøe, & P.P. Lobmaier. (2008). Drug Screening of Hair by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*.
- Saar, E., Gerostamoulos, D., Drummer, O. H., & Beyer, J. (2009). Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 727–734. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2498-6>
- Science Unfiltered. (2022). *SPE vs LLE vs SLE*. Science Unfiltered.
- Sebastian A. Alvano, & Luis M. Zieher. (2020). An updated classification of antidepressants: A proposal to simplify treatment. *Personalized Medicine in Psychiatry*.
- Sebastiano Barco, Alessio Mesini, Laura Barbagallo, Angelo Maffia, Gino Tripodi, Federico Pea, Carolina Saffioti, Elio Castagnola, & Giuliana Cangemi. (2020). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: Application to critically ill pediatric patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* .

- Seiya Miyamoto, David B. Merrill, L. Fredrik Jarskog, W. Wolfgang Fleishhacker, Stephen R. Marder, & Jeffrey A. Lieberman. (2015). Antipsychotic Drugs. *Wiley Online Library*.
- Sempio, C., Morini, L., Vignali, C., & Groppi, A. (2014). Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 970, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.039>
- Serban Voldoveanu, & Victor David. (2022). *Essential in Modern HPLC Separations*.
- Sistik, P., Turjap, M., Iordache, A. M., Saldanha, H. M. E. B., Lemr, K., & Bednar, P. (2016). Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015). In *Biomedical Papers* (Vol. 160, Issue 1, pp. 39–53). PALACKY UNIV.
<https://doi.org/10.5507/bp.2015.065>
- Tomasz Tuzimski, & Anna Petruczynik. (2020). Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM). *Molecules*.
- U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer, & B. Waibel. (2005). Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Vihang N. Vahia. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5: A quick glance. *Indian J Psychiatry*.
- Vipin Agarwal. (2016). Fundamentals Of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *North East Biolab*.
- Way, B. A., Stickle, D., Mitchell, M. E., Koenig, J. W., & Turk, J. (1998). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric measurement of tricyclic antidepressant drugs. Utility of the 4-carbethoxyhexafluorobutyl derivatives of secondary amines. *Journal of Analytical Toxicology*, 22(5), 374–382. <https://doi.org/10.1093/jat/22.5.374>
- Weiping Ma, Xue Gao, Hao Guo, & Weiming Chen. (2021). Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment. *Journal of Chromatography B*.
- Wells, S. S., & Kennedy, R. T. (2020). High-Throughput Liquid-Liquid Extractions with Nanoliter Volumes. *Analytical Chemistry*, 92(4), 3189–3197.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04915>
- Wiedmann, J. J., Demirdögen, Y. N., Schmidt, S., Kuzina, M. A., Wu, Y., Wang, F., Nestler, B., Hopf, C., & Levkin, P. A. (2023). Nanoliter Scale Parallel Liquid–Liquid Extraction for High-Throughput Purification on a Droplet Microarray. *Small*, 19(9).
<https://doi.org/10.1002/sml.202204512>
- Yan Peng, Lata Gautam, & Sarah W. Hall. (2019). The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*.

- Yee-Chi Lee, & Phoon-Ping Chen. (2010). A review of SSRIs and SNRIs in neuropathic pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*.
- YV Kazakevich, & R Lofbrutto. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. JOHN WILY & Sons.
- Zheng, M., Zhang, C., Wang, L., Wang, K., Kang, W., Lian, K., & Li, H. (2021). Determination of nine mental drugs in human plasma using solid-phase supported liquid-liquid extraction and HPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105647>
- Αριστοτέλης Βάθης. (2019). *Αντικαταθλιπτικά: Κατηγορίες και συχνότητα*. Therapia.