



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού  
αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων  
σε νεκροτομικό υλικό και βιολογικά υγρά ασθενών»**

**Γεώργιος Ν. Ράλλης**  
Χημικός M.Sc.

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού  
αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων  
σε νεκροτομικό υλικό και βιολογικά υγρά ασθενών»**

**Γεώργιος Ν. Ράλλης**

Χημικός M.Sc.

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Ράλλη Γεωργίου:** 11-6-2013

**Ημερομηνία όρισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 753<sup>α</sup>/18-6-2013

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Βουγιουκλάκης Θεόδωρος, Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μπούμπα Βασιλική, Λέκτορας Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Σακκάς Βασίλειος, Λέκτορας Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 5-7-2013

*«Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών και αντιμυχωσικών φαρμάκων σε νεκροτομικό υλικό και βιολογικά υγρά ασθενών»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** 757<sup>α</sup>/19-12-2013

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Μπούμπα Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Βουγιουκλάκης Θεόδωρος, Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Σακκάς Βασίλειος, Λέκτορας Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 846<sup>α</sup>/27-3-2018

<b>Βουγιουκλάκης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μαυρέας Βενετσάνος</b>	Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπαϊρακτάρη Ελένη</b>	Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μητσέλου Αντιγόνη</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπούμπα Βασιλική</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας με έμφαση στη Δικαστική Τοξικολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πετρικής Πέτρος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σακκάς Βασίλειος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-3-2018

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



*Με αγάπη*  
*στους γονείς μου Νίκο και Δωροθέα*



*Με σεβασμό*  
*στην Επιβλέπουσα Καθηγήτρια*  
*κ. Βασιλική Μπούμπα*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Βασικός σκοπός της διατριβής αυτής, ήταν η ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων καθώς και συγκεκριμένων μεταβολιτών τους, σε βιολογικά δείγματα ψυχιατρικά ασθενών και σε νεκροτομικό υλικό.

Επιβλέπουσα Καθηγήτριας της διατριβής ήταν η Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Μπούμπα. Την κ. Μπούμπα ευχαριστώ θερμά και ιδιαίτερα, για την απεριόριστη εμπιστοσύνη και αμείωτη συμπαράσταση σε όλη τη μεταπτυχιακή μου πορεία. Χωρίς την καθοδήγηση και υποστήριξη της θα ήταν αδύνατη η επίτευξη του στόχου μου για την πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Καθηγητή κ. Θεόδωρο Βουγιουκλάκη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα να εργαστώ στο Εργαστήριο αυτό, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του στη συγκεκριμένη μελέτη. Επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πέτρο Πετρίκη και τον Διευθυντή της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων Καθηγητή κ. Βενετσάνο Μαυρέα για τη συμβολή τους στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ για τη συνεργασία τους, τον υπεύθυνο Καθηγητή Δρ. Kristof Maudens και τη Δρ. Lisbeth Patteet του Εργαστηρίου Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας (Antwerp), στο Βέλγιο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαρία Μπάου, για την άριστη συνεργασία, συγκεκριμένα, τη συνεισφορά της στην καταγραφή και αρχειοθέτηση των κλινικών δειγμάτων, όπως επίσης και στη συγγραφή ερευνητικών εργασιών. Απευθύνω επίσης τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, και ιδιαίτερα στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αντιγόνη Μητσέλου.

Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στη χημικό μηχανικό κ. Βασιλική Τόλη, για την ακούραστη διάθεσή της να μου παρέχει κάθε στήριξη και βοήθεια κατά τη διάρκεια της συγγραφής.

Ευχαριστώ τις φαρμακευτικές εταιρίες Pfizer και Lundbeck για την ευγενική προσφορά των μεταβολιτών N-desmethylsertraline και N-desmethylicitalopram, αντίστοιχα.

Ακόμη, οφείλω να αναφέρω ότι μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ενισχύθηκε με χρηματοδότηση από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερικής Ανάπτυξης και από το Εταιρικό Σύμφωνο για το Πλαίσιο Ανάπτυξης (ΕΣΠΑ) 2007 – 2013, στα πλαίσια της ερευνητικής πράξης με τίτλο: «Παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων αντιψυχωτικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στο αίμα ψυχιατρικών ασθενών και συσχέτιση τους με παράγοντες της νόσου», και κωδικό MIS: 380379.

Τέλος, η οικογένειά μου είναι ο θεμέλιος λίθος στον οποίον στηρίζομαι όλα αυτά τα χρόνια. Επομένως, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες, μαζί με την ευγνωμοσύνη μου, οφείλω στους γονείς μου, Νίκο και Δωροθέα και στον αδερφό μου Μιχάλη.

*Γεώργιος Ν. Ράλλης*

*Ιωάννινα, Μάρτιος 2018*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ.....	xix
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	xxiii
ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ABBREVIATIONS .....	xxix
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Εισαγωγή στη Δικαστική Τοξικολογία – Ψυχιατρικές διαταραχές – Αντιψυχωσικά και Αντικαταθλιπτικά Φάρμακα.....	1
1.1.1 Εισαγωγή στη Δικαστική Τοξικολογία.....	1
1.1.1.1 Δηλητήρια και κατάταξη αυτών.....	5
1.1.2 Ψυχιατρικές διαταραχές .....	6
1.1.2.1 Ιστορική αναδρομή .....	6
1.1.2.2 Ταξινόμηση ψυχιατρικών διαταραχών .....	7
1.1.2.3 Σχιζοφρένεια .....	8
1.1.2.4 Κατάθλιψη.....	10
1.1.3 Φαρμακολογία του νευρικού συστήματος.....	11
1.1.4 Αντιψυχωσικά φάρμακα .....	13
1.1.5 Αντικαταθλιπτικά φάρμακα .....	19
1.1.6 Προσδιοριζόμενα αντιψυχωσικά.....	23
1.1.7 Προσδιοριζόμενα αντικαταθλιπτικά.....	32
1.2 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε κλινικά δείγματα και νεκροτομικό υλικό.....	43
1.2.1 Προσδιορισμός επιπέδων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε κλινικά δείγματα.....	43
1.2.2 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε νεκροτομικό υλικό.....	57
1.2.2.1 Μεταθανάτια ανακατανομή .....	65
1.3 Μεθοδολογίες εκχύλισης και χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού.....	71
1.3.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης.....	71
1.3.1.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction – LLE).....	72
1.3.1.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid-Phase Extraction – SPE).....	76
1.3.2 Παραγωγοποίηση.....	79
1.3.3 Χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού .....	85
1.3.3.1 Αέρια χρωματογραφία .....	85
1.3.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	93



1.3.3.3 Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης .....	108
1.4 Σκοπός .....	110
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	111
2.1 Υλικά – Όργανα – Συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία δειγμάτων .....	111
2.1.1 Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα αυτών .....	111
2.2.2 Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά .....	113
2.2.3 Ενόργανες διατάξεις και εργαστηριακός εξοπλισμός.....	114
2.2.4 Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων .....	121
2.2.5 Επεξεργασία δειγμάτων .....	124
2.2.5.1 Επεξεργασία δειγμάτων και ανάλυση με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών (GC-MS) .....	124
2.2.5.2 Επεξεργασία δειγμάτων για ανάλυση με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού συστοιχίας διόδων (UHPLC- UV/DAD) .....	126
2.2.5.3 Επεξεργασία δειγμάτων για ανάλυση με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών σε σειρά (UHPLC-MS/MS) .	127
2.2.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας .....	128
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	133
3.1 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με αέρια χρωματογραφία. 133	
3.1.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών.....	133
3.1.2 Βελτιστοποίηση αντιδράσεων παραγωγοποίησης .....	139
3.1.3 Βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης βιολογικών δειγμάτων .....	142
3.1.4 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας SPE-GC-MS .....	147
3.2 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με υγρή χρωματογραφία .. 161	
3.2.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών υγρής χρωματογραφία υπερ-υψηλής αποδόσεως με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων.....	161
3.2.2 Βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης βιολογικών δειγμάτων .....	168
3.2.3 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD.....	177
3.3 Εφαρμογή σε κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά .....	201
3.3.1 Κλινικά περιστατικά .....	201
3.3.2 Περιστατικό ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος.....	207
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	209
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	221
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	223

SUMMARY .....	227
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	229
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	251
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	257



## ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1** Συχνότητα εμφάνισης της σχιζοφρένειας ως νόσου σε παγκόσμια κλίμακα
- Σχήμα 2** Συχνότητα εμφάνισης της κατάθλιψης ως νόσου σε παγκόσμια κλίμακα
- Σχήμα 3** Σχηματική απεικόνιση της πραγματικής επίδρασης στους D<sub>2</sub> υποδοχείς (αλοπεριδόλη και αριπιπραζόλη)
- Σχήμα 4** Σχηματική απεικόνιση του ντοπαμινεργικού ανταγωνισμού που οδηγεί σε θετικά συμπτώματα
- Σχήμα 5** Σχηματική απεικόνιση του ντοπαμινεργικού ανταγωνισμού που οδηγεί σε αρνητικά συμπτώματα
- Σχήμα 6** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών με δέσμευση των υποδοχέων 5-HT
- Σχήμα 7** Κατανομή των υποδοχέων στους οποίους δρουν ανταγωνιστικά συγκεκριμένα άτυπα αντιψυχωσικά
- Σχήμα 8** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των SSRIs στους υποδοχείς 5-HT και NA
- Σχήμα 9** Συστατικά αίματος και πλάσματος
- Σχήμα 10** Ανατομία ήπατος
- Σχήμα 11** Ανατομία εγκεφάλου
- Σχήμα 12** (α) Κατά μέτωπο όψη του θώρακα και της κοιλιακής χώρας διαμέσου της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταθανάτιας ανακατανομής από το στομάχι στα διάφορα όργανα  
(β) Κάθετη τομή διαμέσου του όγδοου θωρακικού σπονδύλου. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταθανάτιας ανακατανομής από τους πνεύμονες στα διάφορα όργανα.
- Σχήμα 13** Μεταβολή συγκέντρωσης στο αίμα από τη χρονική στιγμή του θανάτου έως διάστημα εννέα ημερών
- Σχήμα 14** Σχηματική απεικόνιση υγρής-στερεής εκχύλισης

- Σχήμα 15** Σχηματική απεικόνιση επιλογής πρωτοκόλλου υγρής-στερεής εκχύλισης
- Σχήμα 16** Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου
- Σχήμα 17** Σχηματική απεικόνιση συστήματος εισαγωγής δείγματος σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας
- Σχήμα 18** Τριχοειδής στήλη σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας
- Σχήμα 19** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με απλό τετράπολο
- Σχήμα 20** Σχηματική απεικόνιση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης
- Σχήμα 21** Σχηματική απεικόνιση συστήματος εισαγωγής δείγματος σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας
- Σχήμα 22** Χρωματογραφικές στήλες για διάταξη HPLC
- Σχήμα 23** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή συστοιχίας διόδων
- Σχήμα 24** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης με ηλεκτροψεκασμό
- Σχήμα 25** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης με χημικό ιονισμό
- Σχήμα 26** Σύγκριση των τεχνικών ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης ESI, APCI και APPI
- Σχήμα 27** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο
- Σχήμα 28** Αριθμός δημοσιεύσεων για UHPLC και UHPLC-MS από το 2004 έως το 2013
- Σχήμα 29** Σωληνάρια Vacutainer® παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων
- Σχήμα 30** Σωληνάρια Vacutainer® SST II
- Σχήμα 31** Έντυπο δειγματοληψίας πλάσματος-ορού από ψυχιατρικούς ασθενείς

- Σχήμα 32** Επάνω εικόνα: Χρωματογράφημα SPE-GC-MS, εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με (α) βουπροπιόνη (m/z 44) 200 ng/mL, (β) κυκλοβενζαπρίνη (m/z 58) 100 ng/mL και μιρταζαπίνη (m/z 195) 200 ng/mL, (γ) σερτραλίνη (m/z 274), σιταλοπράμη (m/z 58), κλομιπραμίνη (m/z 58) 200 ng/mL και (δ) κλοζαπίνη (m/z 243) 200 ng/mL, Κάτω εικόνα: Χρωματογράφημα SPE-GC-MS τυφλού δείγματος πλάσματος και τα αντίστοιχα για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία στο επίπεδο του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)
- Σχήμα 33** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη (β) ολανζαπίνη-TMS και (γ) αλοπεριδόλη-TMS
- Σχήμα 34** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη (β) απουσία ολανζαπίνης και (γ) απουσία αλοπεριδόλης (τυφλό δείγμα)
- Σχήμα 35** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) βενλαφαξίνη-HFB και (β) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη
- Σχήμα 36** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS δείγματος πλάσματος – ορού (α) απουσία βενλαφαξίνης-HFB (η παρατηρούμενη χρωματογραφική κορυφή οφείλεται στο υπόστρωμα) και (β) με προσθήκη κυκλοβενζαπρίνης ως εσωτερικό πρότυπο
- Σχήμα 37** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος
- Σχήμα 38** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ολικού αίματος με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος
- Σχήμα 39** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ούρων με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος
- Σχήμα 40** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος

- Σχήμα 41** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ολικού αίματος με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος
- Σχήμα 42** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ούρων με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος
- Σχήμα 43** Συχνότητα παρουσίας των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών φαρμάκων και των μεταβολιτών αυτών στα εξεταζόμενα δείγματα πλάσματος και στους ασθενείς
- Σχήμα 44** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD, σε δύο μήκη κύματος 230 και 245 nm για τα δείγματα πλάσματος των ασθενών με συγκέντρωση αγομελατίνης (α) <LOQ και (β) 213,0 ng/mL. Κάθε δείγμα πλάσματος είναι εμβολιασμένο με 100 ng/mL χαρμίνης (IS)

## ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 1** Ένζυμα τα οποία συμβάλουν στον μεταβολισμό των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων
- Πίνακας 2** Εύρη τιμών του λόγου συγκέντρωσης μεταβολίτη προς μητρική ένωση των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων
- Πίνακας 3** Εύρη θεραπευτικών συγκεντρώσεων, χρόνοι ημιζωής, επίπεδα συναγερμού και αναγκαιότητας εφαρμογής συστηματικής παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών
- Πίνακας 4** Εύρη θεραπευτικών συγκεντρώσεων, χρόνοι ημιζωής, επίπεδα συναγερμού και αναγκαιότητας εφαρμογής συστηματικής παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών
- Πίνακας 5** Προτεινόμενα νεκροτομικά υλικά για τοξικολογική ανάλυση
- Πίνακας 6** Φυσικοχημικές ιδιότητες οργανικών διαλυτών
- Πίνακας 7** Πρόδρομα και παραγόμενα ιόντα, ο λόγος αυτών, ο χρόνος κατακράτησης και τα δυναμικά CE και FV της διάταξης UHPLC-MS/MS
- Πίνακας 8** Δοκιμές θερμοκρασιακών προγραμμάτων χρωματογραφικής στήλης σε GC-MS
- Πίνακας 9** Χρόνοι κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε διάταξη GC-MS χωρίς παραγωγοποίησης
- Πίνακας 10** Χρόνοι κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε διάταξη GC-MS ως TMS παράγωγα
- Πίνακας 11** Χρόνος κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα της βενλαφαξίνης σε διάταξη GC-MS ως HFB παράγωγο
- Πίνακας 12** Βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης για ολανζαπίνη, αλοπεριδόλη και βενλαφαξίνη



- Πίνακας 13** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα
- Πίνακας 14** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό
- Πίνακας 15** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 16** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 17** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα
- Πίνακας 18** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό
- Πίνακας 19** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 20** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 21** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα
- Πίνακας 22** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό
- Πίνακας 23** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

- Πίνακας 24** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 25** Δοκιμές εκλουστικών προγραμμάτων κινητής φάσης σε UHPLC-UV/DAD
- Πίνακας 26** Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών σε διάταξη UHPLC-UV/DAD
- Πίνακας 27** Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών σε διάταξη UHPLC-UV/DAD
- Πίνακας 28** Επιλογή μηκών κύματος του ανιχνευτή UV/DAD
- Πίνακας 29** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 30** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 31** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα
- Πίνακας 32** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 33** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 34** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 35** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 36** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα

- Πίνακας 37** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα
- Πίνακας 38** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 39** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 40** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 41** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 42** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 43** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα
- Πίνακας 44** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό
- Πίνακας 45** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα
- Πίνακας 46** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα
- Πίνακας 47** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ιστό ήπατος από νεκροτομικό υλικό

- Πίνακας 48** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ιστό ήπατος από νεκροτομικό υλικό
- Πίνακας 59** Εύρος συγκεντρώσεων των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών και μεταβολιτών από ψυχιατρικά ασθενείς
- Πίνακας 50** Συχνότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος ψυχιατρικά ασθενών με υπο-, υπερ- και θεραπευτικές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών
- Πίνακας 51** Συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών σε νεκροτομικό υλικό



## ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ABBREVIATIONS

5-HT	5-Hydroxytryptamine (serotonin)
a.m.u.	Atomic mass unit
ADs	Antidepressants
AGNP	Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
APA	American Psychiatric Association
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionisation
APs	Antipsychotics
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamide
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CAD	Collision Activated Dissociation
CAS	Chemical Abstract Service
CID	Collision Induced Dissociation
CNL	Constant Neutral Loss Scan
CYPs	Cytochromes P450
DAD	Diode Array Detector
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EC	Electrochemical Detector
ECD	Electron Capture Detector
EME	Electro Membrane Extraction
EP	European Pharmacopoeia
ESI	Electrospray Ionization
EI	Electron Impact
FAB	Fast Atom Bombardment

FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector
FPD	Flame Photometric Detector
FTIRD	Fourier Transform Infrared Detector
GC	Gas Chromatography
GLC	Gas-Liquid Chromatography
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSC	Gas-Solid Chromatography
HFB	Heptafluorobutryl
HFBA	Heptafluorobutyric anhydride
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HMDB	The Human Metabolome Database
HMDS	Hexamethyldisilane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICD	International Classification of Diseases
IS	Internal Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KGaA	Kommanditgesellschaft Auf Aktien
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limits Of Quantification
mAChRs	Muscarinic Acetylcholine Receptors
MAE	Microwave-Assisted Extraction
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MAOIs	Monoamine Oxidase Inhibitors
MBTFA	N-methyl-bis-(trifluoroacetamide)

MEPS	Micro Extraction by Packed Sorbent
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry Detector
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MSPD	Matrix Solid-Phase Dispersion
MSTFA	N-methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide
MTBE	Methyl tert-butyl ether
MTBSTFA	N-methyl-N-t-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide
NA	Noradrenaline
nAChRs	Nicotinic Acetylcholine Receptors
NIMH	National Institute of Mental Health
NPD	Nitrogen-Phosphorus Detector
OFAT	One Factor At a Time
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFBBBr	Pentafluorobenzyl bromide
PFBCl	Pentafluorobenzoyl chloride
PFPOH	Pentafluoropropanol
PMI	Post-Mortem time Interval
PMR	Postmortem Redistribution
PP	Protein Precipitation
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
RF	Fluorescence Detector
RID	Refractive Index Detector
RSD	Relative Standard Deviation
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction



SIM	Selected-Ion Monitoring
SPE	Solid-Phase Extraction
SPME	Solid-Phase Micro Extraction
SRM	Single Reaction Monitoring
SSNRIs	Selective Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitors
SSRIs	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
SWGTOX	Scientific Working Group for Forensic Toxicology
t-BDMCS	Tert-butyldimethylchlorosilane
TBH	Tetrabutylammonium hydroxide
TCAs	Tricyclic Antidepressants
TCD	Thermal Conductivity Detector
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TFA	Trifluoroacetic Acid
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	11-Carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol
TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologists
TIC	Total Ion Chromatogram
TMCS	Trimethylchlorosilane
TMS	Trimethylsilyl
TMS-DEA	Trimethylsilyldiethylamine
TMSI	Trimethylsilylimidazole
TOF	Ionisation-Time Of Flight
UHPLC	Ultra High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organization
N-N	Νεκροψία – Νεκροτομή
ΥΙΘΠ	Ύψος Ισοδύναμο με μία Θεωρητική Πλάκα

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Εισαγωγή στη Δικαστική Τοξικολογία – Ψυχιατρικές διαταραχές – Αντιψυχωσικά και Αντικαταθλιπτικά Φάρμακα

### 1.1.1 Εισαγωγή στη Δικαστική Τοξικολογία

Το αντικείμενο της Δικαστικής Τοξικολογίας είναι η διερεύνηση της δράσης ενός δηλητηρίου στον ανθρώπινο οργανισμό ως αιτία εμφάνισης μίας νόσου ή βίαιου θανάτου και πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση της πιθανότητας ύπαρξης αιτιώδους σχέσης μεταξύ της λήψης του δηλητηρίου και του οποιουδήποτε ανεπιθύμητου αποτελέσματος.

Η επιστήμη της Δικαστικής Τοξικολογίας, έχει αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια των χρόνων και πλέον αποτελεί διεπιστημονικό και υψηλής εξειδίκευσης κλάδο με μεγάλο εύρος εφαρμογής στην επίπτωση των ξενοβιοτικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Ιστορικά, στην ανάπτυξη της Δικαστικής Τοξικολογίας σπουδαίο ρόλο είχε ο Παράκελσος (1493 – 1541), όπου πρώτος καθόρισε και διατύπωσε τον ορισμό του δηλητηρίου και συγκεκριμένα με τη φράση: *“Alle Ding' sind Gift, und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist.”* (γερμ.), δηλαδή «Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια, δεν υπάρχει καμία που να μην είναι δηλητήριο. Η σωστή δόση διαφοροποιεί το δηλητήριο από το φάρμακο». Σήμερα, γνωρίζουμε πως ο ορισμός μίας ουσίας ως δηλητήριο είναι πιο περίπλοκος, παρόλα αυτά η προσέγγιση του Παράκελσου ήταν σωστή.

Με το πέρασμα των χρόνων, πολλοί χημικοί ερεύνησαν και ασχολήθηκαν με τις ιδιότητες των δηλητηρίων οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη των πρώτων δικαστικών αναλυτικών δοκιμών. Για παράδειγμα, στα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα, ο γερμανός χημικός Carl Wilhem Scheele (1742 – 1786) μετέτρεψε το τριοξείδιο του αρσενικού σε αέριο αρσενικό με χρήση νιτρικού οξέος παρουσία ψευδαργύρου. Το 1836, ο άγγλος χημικός James Marsh (1794 – 1846) τροποποίησε και τελειοποίησε την παραπάνω μετατροπή, αναπτύσσοντας τη δοκιμή ανίχνευσης του αρσενικού σε βιολογικά δείγματα (arsenic mirror test).

Η πρώτη ολοκληρωμένη εργασία στο αντικείμενο και μάλιστα διεθνούς αναγνώρισης πραγματοποιήθηκε από τον Mathieu J. B. Orfila το 1813 (*“Traité des poisons tires des règnes minéral végétal et animal, ou, Toxicologie générale, considérée sous les rapports de la physiologie, de la pathologie et de la médecine légale”* Orfila 1818), όπου αναγνωρίστηκε ως ο πατέρας της Τοξικολογίας. Πρώτος αναγνώρισε τη σημασία στην αναγκαιότητα για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων κάθε αναλυτικής δοκιμής, αυτό που ως σήμερα είναι γνωστό ως διασφάλιση ποιότητας, σε οποιαδήποτε εφαρμογή της Τοξικολογίας. Το 1850, ο

βέλγος αναλυτικός χημικός Jean Stas και ο γερμανός επιστήμονας Friedrich Otto ανέπτυξαν μία σύνθετη μεθοδολογία για την εκχύλιση άγνωστων δηλητηρίων από βιολογικά δείγματα. Ο συγκεκριμένος διαχωρισμός των ουσιών βασιζόταν στις χημικές τους ιδιότητες. Η παραπάνω διαδικασία εκχύλισης εφαρμόζεται μέχρι και σήμερα, με κάποιες τροποποιήσεις, για την απομόνωση διάφορων αλκαλοειδών.

Η εφαρμογή της Δικαστικής Τοξικολογίας απαιτεί αφενός τη γνώση της τοξικής δράσης των διαφόρων ουσιών και αφετέρου την απομόνωση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διάφορα βιολογικά υλικά. Το τελευταίο στοιχείο είναι απαραίτητο για την τελική εκτίμηση της συμμετοχής της χημικής ουσίας στην εμφάνιση της ανεπιθύμητη ενέργειας ή του θανάτου, και στη διερεύνηση του τρίπτυχου «έγκλημα – αυτοκτονία – τυχαίο γεγονός» που απαιτείται σε κάθε βίαιο θάνατο.

Η τοξικότητα μίας ουσίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με την ίδια την ουσία, με τις συνθήκες έκθεσης, με την ιδιοσυγκρασία του εκτιθέμενου ατόμου κλπ. Πρωταρχικής σημασίας θεωρούνται οι παράγοντες που συσχετίζονται με τις συνθήκες λήψης και ειδικότερα η δόση, η οδός και η ταχύτητα χορήγησης όπως επιπλέον η διάρκεια και η συχνότητα της έκθεσης. Άλλωστε είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε ουσία μπορεί να καταστεί τοξική για τον οργανισμό αν η δόση που λαμβάνεται ξεπερνά τα επίπεδα ασφαλείας που είναι χαρακτηριστικά για την κάθε χημική ένωση.

Οι τοξικολογικές αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων για την ανίχνευση και προσδιορισμό τοξικών ουσιών πραγματοποιούνται:

- i. Σε νεκροτομικό υλικό προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή τους στο μηχανισμό και στην αιτία θανάτου. Διενεργούνται κατόπιν παραγγελίας του υπεύθυνου ιατροδικαστή ή άλλης εντολοδότιδας αρχής, κατά τη διερεύνηση περιστατικών δηλητηρίασης, αιφνιδίων και βίαιων θανάτων.
- ii. Σε δείγματα κλινικών περιστατικών για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Κατά τη διερεύνηση, κλινικών περιστατικών δηλητηρίασης, για έλεγχο παρουσίας απαγορευμένων ουσιών ή για τον έλεγχο της πορείας αποτοξίνωσης, κατόπιν παραγγελίας του θεράποντος ιατρού ή της εντολοδότιδας αρχής καθώς και για την παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων (therapeutic drug monitoring – TDM).

Γενικά η πιθανότητα δηλητηρίασης πρέπει να ελέγχεται, από το τοξικολογικό εργαστήριο:

- i. Όταν δεν υπάρχει σαφής αιτία θανάτου
- ii. Όταν ο ασθενής είναι αναίσθητος σε κώμα
- iii. Όταν ο ασθενής εμφανίζει διαταραχές σε διάφορα ζωτικά συστήματα
- iv. Σε κάθε αιφνίδια ασθένεια μικρών παιδιών
- v. Σε συγχυτικούς ασθενείς που αδυνατούν να δώσουν σαφές ιστορικό
- vi. Σε ταυτόχρονη ασθένεια περισσότερων του ενός ατόμων
- vii. Όταν αναφέρεται στο ιστορικό λήψη ή έκθεση σε κάποια χημική ουσία
- viii. Όταν εμφανίζονται συμπτώματα που προσομοιάζουν με συμπτώματα συγκεκριμένης δηλητηρίασης
- ix. Όταν άτομα που έχουν εκτεθεί σε καπνό ή φωτιά εμφανίζουν συμπτώματα
- x. Σε περιπτώσεις επαγγελματικής έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες.

Κατά τη διενέργεια της τοξικολογικής ανάλυσης εφαρμόζονται διάφορες μεθοδολογίες εκχύλισης οι οποίες πρέπει να είναι γρήγορες, ακριβείς και να έχουν μεγάλη αξιοπιστία. Επιπλέον, πρέπει να τηρούνται οι αρχές της δικαστικής τοξικολογίας, οι οποίες συνοπτικά διατυπώνονται ως εξής:

- i. Ο αναλυτής πρέπει να είναι έμπειρος στη διενέργεια τοξικολογικών αναλύσεων
- ii. Στον αναλυτή πρέπει να παρέχονται όλες οι πληροφορίες που αφορούν το κάθε εξεταζόμενο περιστατικό
- iii. Τα βιολογικά υλικά και πειστήρια που αφορούν το περιστατικό πρέπει να αποστέλλονται για ανάλυση κατάλληλα συσκευασμένα και σημασμένα
- iv. Η απομόνωση και ο προσδιορισμός των ουσιών πρέπει να γίνεται με επικυρωμένες μεθόδους
- v. Σε όλη τη διάρκεια επεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων πρέπει να τηρούνται λεπτομερή αρχεία
- vi. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης να πραγματοποιείται έλεγχος καθαρότητας αυτών
- vii. Η ανάλυση κάθε δείγματος πρέπει να γίνεται εις διπλούν καθώς και σύγκριση των εξαγόμενων αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την ανάλυση των αντίστοιχων προτύπων ουσιών με το ίδιο αναλυτικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για το δείγμα.

Η τυπική διαδικασία της διενέργειας των τοξικολογικών αναλύσεων από το τοξικολογικό εργαστήριο πρέπει να εξασφαλίζει την αξιόπιστη ανίχνευση των

προσδιοριζόμενων ξενοβιοτικών ενώσεων. Αρχικά, πραγματοποιείται προσανατολιστικός έλεγχος για την παρουσία κάποιας προσδιοριζόμενης ουσίας στο εξεταζόμενο δείγμα (screening test). Στο στάδιο αυτό γίνεται η επιλογή των δυνητικά θετικών δειγμάτων. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο επιβεβαιωτικός έλεγχος για την παρουσία της ουσίας ή των ουσιών σε δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως θετικά.

Ο επιβεβαιωτικός έλεγχος πρέπει να γίνεται με διαφορετική μέθοδο από αυτή που εφαρμόστηκε κατά τον προσανατολιστικό έλεγχο. Τέλος, γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός στο βιολογικό υλικό προκειμένου να διευκρινιστεί αν η ποσότητα της ουσίας που ανιχνεύτηκε συνηγορεί υπέρ της θανατηφόρου δηλητηρίασης ή αν πρόκειται για λήψη θεραπευτικής δόσης.

Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της τοξικολογικής ανάλυσης λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράμετροι όπως:

- i. Το βάρος
- ii. Η ηλικία
- iii. Οι υπάρχουσες νόσοι
- iv. Η υπερευαισθησία – ιδιοσυγκρασία
- v. Ο μεταβολισμός
- vi. Η ανοχή
- vii. Η ενζυμική επαγωγή
- viii. Η συνέργεια
- ix. Η κατάσταση των βιολογικών υλικών.

Γενικά, η συμβολή των Εργαστηρίων Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας είναι σημαντική στη διερεύνηση περιστατικών:

- i. Νοσηλείας με συμπτώματα δηλητηριάσεων
- ii. Αιφνιδίων θανάτων
- iii. Μη αναμενόμενων θανάτων ασθενών στο νοσοκομείο
- iv. Θανάτων ή ανεπιθύμητων ενεργειών σε ασθενείς υπό θεραπεία
- v. Ατυχημάτων σε μέσα μαζικής μεταφοράς
- vi. Εγκληματικών ενεργειών
- vii. Θανάτων από χρήση ναρκωτικών ουσιών.

### 1.1.1.1 Δηλητήρια και κατάταξη αυτών

Η κατάταξη των φαρμάκων και των δηλητηρίων γίνεται με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους με βάση: τη συστηματική ή εμπορική ονομασία τους, τη φαρμακολογική τους δράση, ή τη χημική τους δομή. Από την οπτική της Αναλυτικής Χημείας εξυπηρετεί καλύτερα η κατάταξή τους με βάση τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την απομόνωσή τους από το βιολογικό υλικό. Η κατάταξη των φαρμάκων και των δηλητηρίων με αυτό τον τρόπο οδηγεί στη δημιουργία πέντε κυρίων ομάδων:

- i. Αέριες και πτητικές ενώσεις, που απομονώνονται με διάχυση ή απόσταξη
- ii. Οργανικές, μη πτητικές ενώσεις που απομονώνονται με εκχύλιση με κατάλληλους διαλύτες
- iii. Μέταλλα που απομονώνονται από το βιολογικό υλικό μετά από υγρή καύση
- iv. Ανιόντα
- v. Διάφορα δηλητήρια που απομονώνονται με ειδικές τεχνικές, όπως ιοντανταλλακτικές στήλες, με σχηματισμό παραγώγων, με εξάχνωση κ.α.

Η χρησιμοποίηση διαφορετικών τρόπων απομόνωσης των διάφορων δηλητηρίων οδήγησε στην περαιτέρω υποδιαίρεση κάποιων από τις προηγούμενες ομάδες, και τελικά προέκυψε η πιο πρακτική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατάταξή τους σε επτά ομάδες:

- i. Αέρια δηλητήρια
- ii. Πτητικές ενώσεις
- iii. Φάρμακα
- iv. Μέταλλα
- v. Παρασιτοκτόνα
- vi. Ανιόντα
- vii. Διάφορα δηλητήρια.

## 1.1.2 Ψυχιατρικές διαταραχές

### 1.1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η Ψυχιατρική είναι η επιστήμη – ιατρική ειδικότητα που ασχολείται με τη μελέτη, τη διάγνωση και τη θεραπεία των ψυχικών διαταραχών. Αυτές περιλαμβάνουν ποικίλες διαταραχές που σχετίζονται με το συναίσθημα, τη συμπεριφορά, τη νόηση και την αντίληψη.

Η Ψυχιατρική δημιουργήθηκε ως ειδικότητα πριν από δύο περίπου αιώνες. Στην αρχαία Ελλάδα τρεις ήταν οι επικρατέστερες απόψεις περί της ψυχικής ασθένειας, η λαϊκή άποψη, η φιλοσοφική αντίληψη και η ιατρική γνώση. Το πρώτο ψυχιατρικό νοσοκομείο θεωρείται ότι ιδρύθηκε στη Βαλένθια το 1409. Στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα ο Πινέλ γίνεται ο ιδρυτής της Ψυχιατρικής, προτάσσοντας το ιάσιμο της ψυχικής νόσου μέσα από την «ηθική θεραπεία», μία πρώτη μορφή ψυχοθεραπείας που θα εφαρμοζόταν σε ειδικούς χώρους, τα Άσυλα. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> - αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα παρουσιάζονται σημαντικές μορφές της Ψυχιατρικής, όπως είναι ο Kraepelin (διάκριση της πρωίμου άνιανς – μετέπειτα σχιζοφρένειας από τη μανιοκαταθλιπτική ψύχωση), ο Freud (πατέρας της ψυχανάλυσης) και ο Bleuler (ο εισηγητής του όρου «σχιζοφρένεια» και της ψυχοπαθολογικής θεώρησης). Στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα έως και σήμερα ιδιαίτερη σπουδαιότητα και συνεισφορά στη θεραπεία των ψυχιατρικά ασθενών έχει συντελέσει η ψυχοφαρμακολογία. Η χλωροπρομαζίνη, το πρώτο αντιψυχωσικό φάρμακο, ανακαλύφθηκε από Γάλλους ερευνητές το 1952.

Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη της κοινωνικής ψυχιατρικής όπως και των Ιατροδικαστικών και Ηθικών ζητημάτων μεταφέρει τους ασθενείς από τα ψυχιατρεία στην κοινότητα με τη βοήθεια συγκεκριμένων δομών υγείας (κέντρα ψυχικής υγείας, κλινικές νοσοκομείων, υπηρεσίες αποκατάστασης), με σεβασμό στον ίδιο τον άρρωστο όπως και στο οικείο περιβάλλον αυτού.

Όσον αφορά την Ελλάδα τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, εγκαταστάθηκε η ασυλική ψυχιατρική όπως και στις άλλες χώρες. Αντίθετα, οι νέες διαστάσεις της ψυχιατρικής (ψυχανάλυση, ψυχοθεραπεία, ψυχιατρικά τμήματα γενικών νοσοκομείων, κέντρα ψυχικής υγείας) αναπτύχθηκαν πολύ αργότερα σε σχέση με διάφορες χώρες της Ευρώπης και της Αμερικής και συγκεκριμένα μόλις τη δεκαετία του 1980 το ελληνικό νομικό πλαίσιο επέτρεψε τη δημιουργία ψυχιατρικών τομέων στα γενικά νοσοκομεία, κέντρα υγείας, κλπ. (άρθρο 21 του νόμου 1397 για το ΕΣΥ, 1983) (APA, Wikipedia, Μεντή 2014, Mora, Μάνου 1997, Χαρτοκόλλης 1986).

### 1.1.2.2 Ταξινόμηση ψυχιατρικών διαταραχών

Γενικά ως ψυχική διαταραχή θεωρείται μία νόσος με ψυχολογικές ή συμπεριφοριολογικές εκδηλώσεις, που συσχετίζονται με σημαντική δυσφορία και ελλειμματική λειτουργικότητα, οφειλόμενη σε μία βιολογική, κοινωνική, ψυχολογική, γενετική, σωματική ή χημική διαταραχή.

Το Διαγνωστικό και Στατιστικό Εγχειρίδιο των Ψυχιατρικών Διαταραχών, τέταρτη έκδοση (APA, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-IV 2000) όπως δημοσιεύτηκε το 1994 από την Αμερικανική Ψυχιατρική Εταιρία, θεωρείται το επίσημο εργαλείο ταξινόμησης των ψυχιατρικών διαταραχών, το 2000 παρουσιάστηκε η αναθεωρημένη έκδοση αυτού (DSM-IV-TR). Το DSM περιλαμβάνει κριτήρια διάγνωσης για 17 κατηγορίες ψυχικών διαταραχών, αποτελούμενες από 375 διαφορετικές νόσους (APA, Sadock B and Sadock V 2007).

Ταξινομήσεις κατά DSM-IV-TR:

- i. Διαταραχές που συνήθως διαγιγνώσκονται για πρώτη φορά κατά τη βρεφική, παιδική ή εφηβική ηλικία
- ii. Παραλήρημα, άνοια, αμνησιακές και άλλες γνωσιακές διαταραχές
- iii. Ψυχικές διαταραχές οφειλόμενες σε γενική σωματική κατάσταση
- iv. Διαταραχές συνδεόμενες με ουσίες
- v. Σχιζοφρένεια και άλλες ψυχωτικές διαταραχές
- vi. Διαταραχές διάθεσης
- vii. Αγχώδης διαταραχές
- viii. Σωματόμορφες διαταραχές
- ix. Προσποιοητές διαταραχές
- x. Αποσυνδετικές διαταραχές
- xi. Σεξουαλικές διαταραχές και διαταραχές ταυτότητας φύλου
- xii. Διαταραχές πρόσληψης τροφής
- xiii. Διαταραχές ύπνου
- xiv. Διαταραχές ελέγχου των παρορμήσεων μη ταξινομούμενες αλλού
- xv. Διαταραχές προσαρμογής
- xvi. Διαταραχές προσωπικότητας
- xvii. Άλλες καταστάσεις που μπορούν να αποτελέσουν σημείο κλινικής προσοχής (APA, Sadock B and Sadock V 2007, WHO).



Ένα παρόμοιο σύστημα χρησιμοποιείται και στην Ευρώπη, όπου καλείται Διεθνής Στατιστική Ταξινόμηση των Παθήσεων και των Σχετικών Προβλημάτων Υγείας (International Classification of Diseases – ICD) (ICD-10, Sadock B and Sadock V 2007, WHO).

### **1.1.2.3 Σχιζοφρένεια**

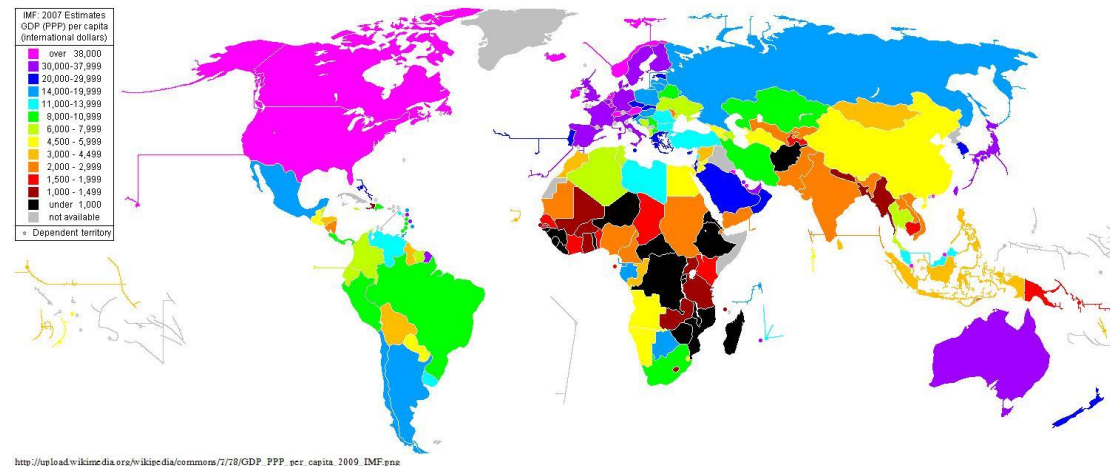
Η σχιζοφρένεια είναι μία ψυχωτική διαταραχή αγνώστου αιτιολογίας, με διαταραχές στη σκέψη, στο συναίσθημα και στην αντίληψη. Η διαταραχή της σκέψης εκδηλώνεται μέσω διαστρέβλωσης της πραγματικότητας, με παραληρητικές ιδέες και ψευδαισθήσεις καθώς και διαταραχή του λόγου. Η διαταραχή του συναισθήματος εκφράζεται με αμφιθυμία και απρόσφορες ή αμβλυμμένες συναισθηματικές απαντήσεις. Η διαταραχή της αντίληψης εκδηλώνεται κυρίως με ακουστικές ψευδαισθήσεις.

Τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας χαρακτηρίζονται ως θετικά και αρνητικά. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ψευδαισθήσεις, παραληρητικές ιδέες και αποδιοργάνωση συμπεριφοράς, ενώ η δεύτερη την επιπέδωση του συναισθήματος, την αλογία, την αβουλία όπως και την ανηδονία.

Η σχιζοφρένεια συχνά επιφέρει γνωσιακές διαταραχές, όπως διαταραχές στην προσοχή, στη συγκέντρωση και στην ταχύτητα επεξεργασίας των πληροφοριών. Η πάθηση αυτή είναι συνήθως χρόνια με πορεία που περιλαμβάνει πρόδρομη, ενεργό και υπολειμματική φάση. Η υπολειμματική φάση χαρακτηρίζεται από άμβλυση των θετικών συμπτωμάτων και επικράτηση των αρνητικών. Η σχιζοφρένεια αποδεδειγμένα αποτελεί εγκεφαλική διαταραχή, με ανατομικές και λειτουργικές βλάβες. Από τη δεκαετία του '70, ο αριθμός των ασθενών με σχιζοφρένεια στα νοσοκομεία έχει μειωθεί δραστικά και συγκεκριμένα περισσότερο από 50%, με αποτέλεσμα από τους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία περισσότεροι του 80% να παρακολουθούνται ως εξωτερικοί ασθενείς.

Όσον αφορά την αιτιολογία της σχιζοφρένειας λόγω του γεγονότος της ετερογένειας της συμπτωματικής και προγνωστικής εικόνας της, δεν υπάρχει κάποιος συγκεκριμένος αιτιολογικός παράγοντας. Ένα εξηγητικό μοντέλο αποτελεί η λεγόμενη στρεσογόνος προδιάθεση, σύμφωνα με την οποία το άτομο που εκδηλώνει τη νόσο χαρακτηρίζεται από μία ειδική προδιάθεση που ενεργοποιείται από το άγχος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των σχιζοφρενικών συμπτωμάτων. Το στρες μπορεί να πηγάζει από διάφορους παράγοντες όπως γενετικούς, βιολογικούς, ψυχολογικούς, κοινωνικούς και περιβαλλοντικούς. Κατά προσέγγιση 7 – 8 άτομα στα 1000 θα παρουσιάσουν τη νόσο έστω μία φορά στη διάρκεια της ζωής τους.

Η σύγχρονη φαρμακευτική αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας αρχίζει περί τα μέσα της δεκαετίας του '50. Τα αντιψυχωσικά παλαιότερου τύπου καλούνται συμβατικά ή τυπικά (typical antipsychotics), ενώ από το 1990 λαμβάνει χώρα η εμφάνιση νέων φαρμάκων τα οποία καλούνται δεύτερης γενιάς ή αλλιώς άτυπα αντιψυχωσικά (atypical antipsychotics).

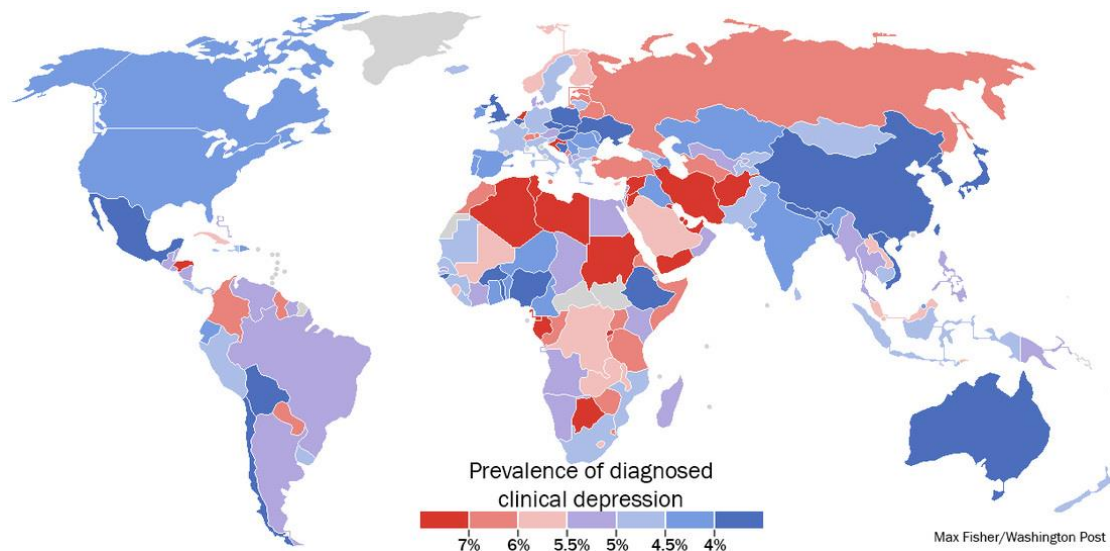


**Σχήμα 1:** Συχνότητα εμφάνισης της σχιζοφρένειας ως νόσου σε παγκόσμια κλίμακα (Wikipedia)

#### 1.1.2.4 Κατάθλιψη

Η κατάθλιψη καλούμενη και ως κλινική κατάθλιψη (clinical depression) ή καταθλιπτική διαταραχή (depressive disorder) εντάσσεται στο γενικότερο σύνολο των διαταραχών διάθεσης. Είναι μια συνηθισμένη νόσο σε παγκόσμια κλίμακα που επηρεάζει τη ζωή 300 και πλέον εκατομμυρίων ανθρώπων. Υπάρχουν διάφοροι τύποι της νόσου όπως:

- i. Η μείζονα καταθλιπτική διαταραχή
- ii. Η χρόνια καταθλιπτική διαταραχή
- iii. Η επιλόχεια κατάθλιψη
- iv. Η εποχιακή κατάθλιψη
- v. Η ψυχωσική κατάθλιψη.



**Σχήμα 2:** Συχνότητα εμφάνισης της κατάθλιψης ως νόσου σε παγκόσμια κλίμακα (Fisher 2013)

Όσον αφορά την αιτιολογία της νόσου, οι ερευνητές προτείνουν ότι είναι αποτέλεσμα συνδυασμού βιολογικών, γενετικών, περιβαλλοντικών και ψυχολογικών παραγόντων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατάθλιψη μπορεί να εμφανιστεί παράλληλα και με άλλες σοβαρές ασθένειες όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και η νόσος του Parkinson.

Η συμπτωματολογία της κατάθλιψης πέραν του επώδυνου καταθλιπτικού συναισθήματος περιλαμβάνει:

- i. Απώλεια ενδιαφέροντος
- ii. Αίσθημα αναξιότητας

- iii. Απώλεια ενεργητικότητας
- iv. Διαταραχές στον ύπνο
- v. Επανερχόμενες σκέψεις θανάτου
- vi. Σημαντική απώλεια βάρους
- vii. Ελαττωμένη ικανότητα συγκέντρωσης
- viii. Ψυχοκινητική διέγερση ή επιβράδυνση.

Τα μείζονα καταθλιπτικά επεισόδια γενικώς είναι ιάσιμα στο 70 – 80% των ασθενών. Η αποτελεσματικότερη προσέγγιση είναι ο συνδυασμός της φαρμακοθεραπείας (αντικαταθλιπτικά φάρμακα) με ψυχοθεραπευτικές παρεμβάσεις (NIMH, Sadock B and Sadock V 2007, WHO).

### **1.1.3 Φαρμακολογία του νευρικού συστήματος**

Το ανθρώπινο νευρικό σύστημα περιέχει περισσότερους από δέκα δισεκατομμύρια νευρώνες, που επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω χημικών μεταβιβαστών μέσω των οποίων επηρεάζονται και τα κύτταρα των διαφόρων ιστών.

Η ακετυλοχολίνη και η νοραδρεναλίνη παίζουν βασικό ρόλο στα περιφερικά τμήματα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Αυτές οι χημικές ουσίες μεταβάλουν τη διακίνηση ιόντων μέσω μεμβρανών προκαλώντας έτσι εκπόλωση ή υπερπόλωση που επιφέρει διέγερση ή αναστολή, αντίστοιχα.

Οι βασικοί νευροδιαβιβαστές του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι η ακετυλοχολίνη, η νοραδρεναλίνη, η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη. Εκτός από τους παραπάνω νευροδιαβιβαστές, στον εγκέφαλο είναι επίσης το L-γλουταμινικό οξύ, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, η γλυκίνη, το L-ασπαργινικό οξύ, η ισταμίνη, καθώς και διάφορα νευροπεπτίδια. Η δράση των νευροδιαβιβαστών, πραγματοποιείται μετά από σύνδεσή τους με ειδικούς υποδοχείς. Μελέτες έχουν υποδείξει την ύπαρξη των παρακάτω υποδοχέων:

A. Για τη δράση της ακετυλοχολίνης υπάρχουν μουσκαρινικοί (Muscarinic acetylcholine receptors – mAChRs) και νικοτινικοί (Nicotinic acetylcholine receptors – nAChRs) υποδοχείς. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε λείες μυϊκές ίνες, στο μυοκάρδιο και σε εξωκρινείς αδένες. Ο όρος μουσκαρινικός υποδοχέας οφείλεται στη μουσκαρίνη, ένα αλκαλοειδές που επιδρά στους υποδοχείς αυτούς, όπως και η ακετυλοχολίνη. Η ατροπίνη και οι συγγενείς με αυτή ουσίες ασκούν συναγωνιστικό ανταγωνισμό στους συγκεκριμένους υποδοχείς. Οι νικοτινικοί υποδοχείς εντοπίζονται στα αυτόνομα γάγγλια και στις νευρομυϊκές συνάψεις. Το όνομά τους

- οφείλεται στο γεγονός ότι και η νικοτίνη δρα μέσω αυτών. Οι νικοτινικοί υποδοχείς δεν είναι ταυτόσημοι στα γάγγλια και στους σκελετικούς μύες. Η δράση της ακετυλοχολίνης στα γάγγλια αναστέλλεται με το εξαμεθώνιο, ενώ στους μύες με τα παράγωγα του κουραρίου (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).
- Β. Οι υποδοχείς της νοραδρεναλίνης διακρίνονται σε άλφα και βήτα αδρενεργικούς υποδοχείς, με αρκετούς υποτύπους, ανάλογα με τη λειτουργία τους σε διάφορα κύτταρα. Οι ανταγωνιστές αυτών των υποδοχέων ονομάζονται α- και β-αναστολείς (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).
- Γ. Η ντοπαμίνη δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω των ντοπαμινεργικών υποδοχέων ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ , και  $D_5$ ) και πιθανώς στα αυτόνομα γάγγλια. Ορισμένοι από τους υποδοχείς της ντοπαμίνης αναστέλλονται ειδικά από τα αντιψυχωσικά φάρμακα (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).
- Δ. Η σεροτονίνη δρα μέσω σεροτονινεργικών υποδοχέων (5-hydroxytryptamine receptors ή 5-HT receptors) στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην περιφέρεια με μεγάλη ποικιλία υποτύπων ( $5-HT_1$ ,  $5-HT_2$ ,  $5-HT_3$ ,  $5-HT_4$ ,  $5-HT_5$ ,  $5-HT_6$  και  $5-HT_7$ ). Η δράση της σεροτονίνης αναστέλλεται από διάφορα αντισεροτονινεργικά φάρμακα (ανταγωνιστές), καθώς και από φάρμακα που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό της σεροτονίνης (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).
- Ε. Η ισταμίνη δρα μέσω ισταμινεργικών υποδοχέων (histamine receptors) που διακρίνονται σε  $H_1$ ,  $H_2$  και  $H_3$ . Τα κοινά αντιισταμινικά φάρμακα αναστέλλουν τους υποδοχείς  $H_1$ , υπάρχουν και αναστολείς για τους υποδοχείς  $H_2$ , ενώ ο ακριβής ρόλος των  $H_3$  δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).

#### 1.1.4 Αντιψυχωσικά φάρμακα

Η αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας βασίζεται στον επιδέξιο συνδυασμό φαρμακοθεραπείας και ψυχοκοινωνικών παρεμβάσεων. Παραδοσιακά η θεραπεία στόχευε στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, καθώς αυτά ανιχνεύονται εύκολα. Τα κλασικά νευροληπτικά έχουν την ικανότητα να βελτιώσουν την κλινική εικόνα στη μεγάλη πλειοψηφία των ψυχιατρικά ασθενών (Meltzer, Fatemi 1998, Κυζιρίδης). Η εισαγωγή του φαρμάκου χλωροπρομαζίνη στην Ψυχιατρική αποτέλεσε ένα κομβικό σημείο με θετικά αποτελέσματα που καμία άλλη θεραπεία μέχρι τότε δεν είχε επιφέρει.

Η επιστημονική βάση των συμπεριφορικών επιδράσεων των φαρμάκων σε πειραματόζωα ξεκίνησε από τον Macht το 1915. Τα πρώτα φάρμακα στην Ψυχιατρική που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα βρωμιούχα, τα βαρβιτουρικά, τα οπιούχα και η ένυδρο χλωράλη (Meltzer, Fatemi 1998, Κυζιρίδης). Το 1926, αναγνωρίζεται η ακετυλοχολίνη ως νευροδιαβιβαστής, το 1937 ανακαλύπτονται τα αντισταμινικά και το 1943 το LSD.

Η ανάπτυξη των αντιψυχωσικών φαρμάκων στη δεκαετία του 1950 σηματοδότησε την έναρξη της ψυχοφαρμακολογίας. Σύντομα, τα αντιψυχωσικά αποτέλεσαν τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση των ψυχιατρικών νοσημάτων. Σε μικρό όμως χρονικό διάστημα στην επιστημονική κοινότητα αναπτύχθηκαν και προβληματισμοί σχετικά με τους περιορισμούς στη χρήση των συγκεκριμένων φαρμάκων (Meltzer, Fatemi 1998, Κυζιρίδης).

Μετά τον 2<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Πόλεμο, ο Charpentier και οι συνεργάτες του συνέθεσαν μία σειρά φαινοθειαζινικών αμινών όπου παρουσίαζαν σημαντικές αντισταμινικές ιδιότητες με ισχυρότερο την προμεθαζίνη. Η θεραπευτική και εμπορική επιτυχία της προμεθαζίνης οδήγησε στη σύνθεση πολλών υποκατάστατων φαινοθειαζινών. Τα βασικά φαρμακολογικά χαρακτηριστικά της χλωροπρομαζίνης μελετήθηκαν αρχικά από τη Courvoisier και τους συναδέλφους της (Domino 1999, Κυζιρίδης). Το 1951, μόλις τρεις μήνες μετά τη σύνθεση της χλωροπρομαζίνης η ομάδα της Courvoisier απέδειξε ότι το συγκεκριμένο φάρμακο είχε ένα ευρύτατο φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων (Courvoisier 1956, Κυζιρίδης). Η κατάσταση στη ψυχιατρική θεραπευτική θα αλλάξει το 1952 με την εισαγωγή της χλωροπρομαζίνης, αρχικά ως αντισταμινικό το οποίο όμως προκαλούσε έντονη υπνηλία (Cunningham 1996, Κυζιρίδης). Ο γάλλος χειρουργός Henri Laborit ξεκίνησε να πειραματίζεται με τα αντισταμινικά το 1949 ως υποβοηθητικά στην αναισθησία στρατιωτών, παρατηρώντας ότι πολλοί ασθενείς γίνονταν αρκετά ήρεμοι. Χρησιμοποίησε ένα μίγμα πεθιδίνης, προμεθαζόνης και χλωροπρομαζίνης όπου ο ασθενής οδηγούνταν σε μία κατάσταση «αδιαφορίας» και θεώρησε ότι κάτι τέτοιο θα βοηθούσε στην Ψυχιατρική

(Laborit et al. 1952, Κυζιρίδης). Ο Laborit παρατήρησε ότι αυτό το φάρμακο είχε τέτοια φαρμακολογικά αποτελέσματα που τα χαρακτήρισε ως μία «χημική λοβοτομή» (Lehmann et al. 1997, Κυζιρίδης). Στις αρχές του 1952, η χλωροπρομαζίνη χορηγήθηκε για πρώτη φορά παρεντερικά σε άντρα 24 χρονών που έπασχε από μανία, ενώ λίγο αργότερα οι Delay και Deniker αντιμετώπισαν 38 ψυχωτικούς ασθενείς στο νοσοκομείο της Αγίας Άννας στο Παρίσι (Turner 2007, Κυζιρίδης). Από άλλες πηγές αναφέρεται ότι ήδη τον Δεκέμβριο του 1951 ο Sigwald είχε χορηγήσει τη χλωροπρομαζίνη ως μονοθεραπεία σε μία 57χρονη ψυχωσική γυναίκα και έτσι τα γεγονότα αυτά σηματοδότησαν την έναρξη της σύγχρονης εποχής της ψυχοφαρμακοθεραπείας (Turner 2007, Κυζιρίδης).

Οι Delay και Deniker έκαναν τη σημαντική παρατήρηση ότι με αυξανόμενες δόσεις εμφανίζονται εκτός της αντιψυχωσικής δράσης και ανεπιθύμητες ενέργειες που έμοιαζαν με την κλινική εικόνα της νόσου Parkinson. Χρησιμοποίησαν τον όρο νευροληπτικά για να δείξουν ότι η αντιψυχωσική δράση συσχετιζόταν με κάποια μορφή επηρεασμού του νευρικού συστήματος (Turner 2007, Κυζιρίδης). Η χλωροπρομαζίνη έτυχε γρήγορης αποδοχής λόγω της έλλειψης άλλων αποτελεσματικών θεραπειών για την ψύχωση.

Μετά από το συγκεκριμένο αντιψυχωσικό ακολούθησε και η δημιουργία πολλών άλλων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το 1989 ο F.D.A. (Food and Drug Administration) ενέκρινε την κλοζαπίνη, το πρώτο από μία σειρά νέων αντιψυχωσικών φαρμάκων αυτών της δεύτερης γενιάς, τα οποία διέφεραν κυρίως στη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (Casey 1995, Κυζιρίδης). Ένα άλλο σημαντικό γεγονός στην αρχή της ανάπτυξης των αντιψυχωσικών φαρμάκων ήταν η ανακάλυψη της αλοπεριδόλης. Το 1957 ανακαλύφθηκε ένα βουτυροφενονικό παράγωγο της νορμεπεριδίνης. Διαδοχικές μοριακές τροποποιήσεις οδήγησαν όπως αναφέρθηκε στην ανάπτυξη του ισχυρού αντιψυχωσικού αλοπεριδόλη και του οπιοειδούς αναλγητικού φαιντανύλη. Μετά την αρχική χρήση της αλοπεριδόλης παρατηρήθηκαν οι σημαντικές εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειές της. Η υψηλή συχνότητα εξωπυραμιδικών παρενεργειών σε συνδυασμό με την κλινική επιτυχία της κλοζαπίνης έδωσαν το έναυσμα για την έρευνα μίας νέας γενιάς άτυπων αντιψυχωσικών φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες (Domino 1999, Κυζιρίδης).

Η κατηγοριοποίηση των αντιψυχωσικών σε διάφορες ομάδες γίνεται με βάση συγκεκριμένα κριτήρια. Παρόλα αυτά, είναι αρκετά δύσκολη μια γενική ταξινόμηση λόγω της πληθώρας διαφοροποιήσεων που παρουσιάζουν, ακόμη και ενώσεις που αρχικά θα εντάσσονταν στην ίδια κατηγορία.

Ένα κριτήριο διαχωρισμού, είναι η δυναμική (potency) που παρουσιάζουν τα αντιψυχωσικά φάρμακα, χαρακτηρίζοντάς τα ως χαμηλής, μεσαίας και υψηλής δυναμικής. Βάση της χρονολογίας ανακάλυψής τους, τα αντιψυχωσικά χαρακτηρίζονται ως τυπικά (typical) ή πρώτης γενιάς, όπως η αλοπεριδόλη, και άτυπα (atypical) ή δεύτερης γενιάς φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες. Ένας άλλος τρόπος ομαδοποίησης είναι βάση της χημικής τους δομής.

#### A. Τυπικά αντιψυχωσικά

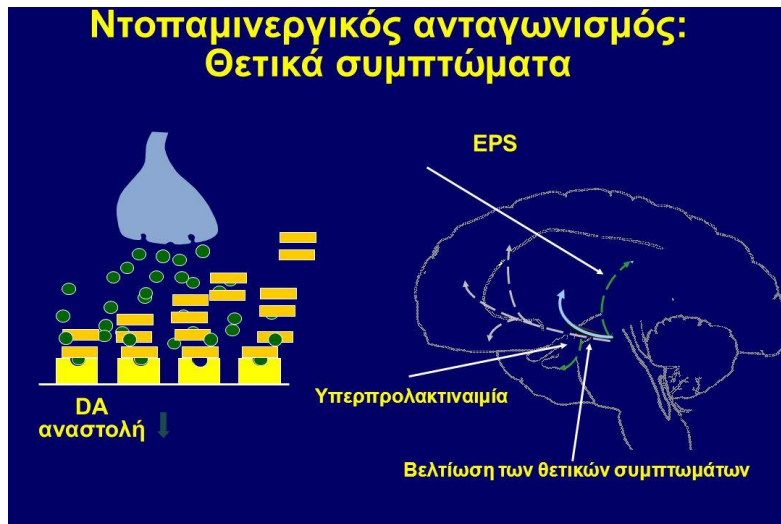
Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των αντιψυχωσικών βασίζεται στην αναστολή των ντοπαμινεργικών υποδοχέων και κυρίως του τύπου  $D_2$ . Αυτή η αναστολή των συγκεκριμένων υποδοχέων οδηγεί στα επιθυμητά θεραπευτικά αποτελέσματα αλλά επίσης και στις παρενέργειες των συγκεκριμένων φαρμάκων όπως το εξωπυραμιδικό σύνδρομο. Η αναστολή σε άλλους υποδοχείς όπως  $D_1$ ,  $H_1$  και  $5-HT_2$ , πιθανόν συμβάλει στα θετικά αποτελέσματα, ενώ στην περίπτωση αυτή οι παρενέργειες οφείλονται στην αναστολή των  $\alpha$ -αδρενεργικών υποδοχέων και των μускаρινικών υποδοχέων.



**Σχήμα 3:** Σχηματική απεικόνιση της πραγματικής επίδρασης στους  $D_2$  υποδοχείς (Αλεβιζόπουλος 2018)

Το βασικό μειονέκτημα των τυπικών ή αλλιώς πρώτης γενιάς αντιψυχωσικών είναι οι παρενέργειες που προκαλούν τόσο σε αριθμό όσο και στη έντασή τους. Παρουσιάζονται αρνητικές επιπτώσεις σε διάφορα συστήματα του οργανισμού με βασικότερες την εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων, ξηροστομία, υπερπρολακτιναιμία, μείωση σεξουαλικής διάθεσης κ.α.





**Σχήμα 4:** Σχηματική απεικόνιση του ντοπαμινεργικού ανταγωνισμού που οδηγεί σε θετικά συμπτώματα (Αλεβιζόπουλος 2018)



**Σχήμα 5:** Σχηματική απεικόνιση του ντοπαμινεργικού ανταγωνισμού που οδηγεί σε αρνητικά συμπτώματα (Αλεβιζόπουλος 2018)

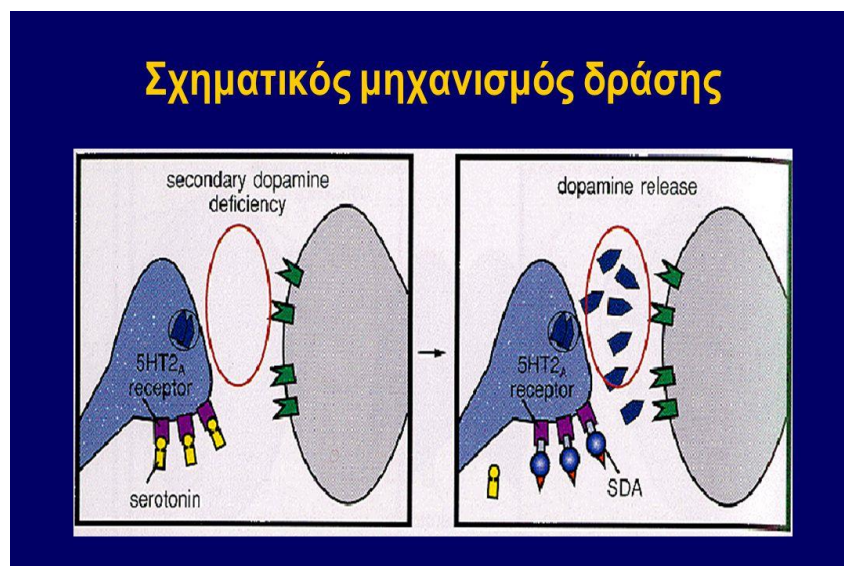
Η αλοπεριδόλη είναι ένα από τα τυπικά αντιψυχωσικά, που παρουσιάζει υψηλή δυναμική. Χημικά εντάσσεται στην κατηγορία των βουτυροφαινών και χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα κατά τη δεκαετία του 1970. Παρότι διαφέρει στη χημική δομή σε σχέση με τα άλλα αντιψυχωσικά εμφανίζει παρόμοιες παρενέργειες και αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην ολοκληρωτική αναστολή των D<sub>2</sub> υποδοχέων, δρώντας ευεργετικά σε ψυχωσικούς ασθενείς αλλά με την εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων σε σημαντικό βαθμό.

#### B. Άτυπα αντιψυχωσικά

Η παρουσία όλων των παραπάνω αρνητικών επιπτώσεων στη χορήγηση των τυπικών αντιψυχωσικών οδήγησε στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων δεύτερης γενιάς ή άτυπων αντιψυχωσικών. Τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα στη θεραπεία των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας σε σχέση με τα παλαιότερα και μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης εξωπυραμιδικού συνδρόμου, όψιμης δυσκινησίας, κακοήθους νευροληπτικού συνδρόμου ή δυστονίας.

Τα άτυπα αντιψυχωσικά παρουσιάζουν και αυτά σημαντικές παρενέργειες όπως, αύξηση του ηλεκτρο-καρδιογραφικού διαστήματος QT, μεταβολές στην ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού και αύξηση βάρους (Rummel-Kluge et al. 2012). Για την κατηγορία αυτών των φαρμάκων είναι αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί μία γενική ταξινόμηση γιατί το κάθε ένα παρουσιάζει διαφορετικές παρενέργειες, παραδείγματος χάρη η κλοζαπίνη και η ολανζαπίνη είναι πολύ πιθανό να επιφέρουν υπεργλυκαιμία και αύξηση βάρους. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως τα άτυπα αντιψυχωσικά είναι σχετικά νέα φάρμακα ως εκ τούτου η αποτελεσματικότητά τους για τα παιδιά και οι επιπτώσεις που επιφέρουν στην εγκυμοσύνη και κατά τον θηλασμό δεν έχουν καθοριστεί ακόμη λεπτομερώς (Hartling et al. 2012).

Σχετικά με τον μηχανισμό δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών, η αριπιπραζόλη, ένα από τα ασφαλέστερα φάρμακα αυτής της κατηγορίας, δρα ως μερικός «συναγωνιστής» των υποδοχέων  $D_2$ ,  $5-HT_1$  και ανταγωνιστής του  $5-HT_2$ .



**Σχήμα 6:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των άτυπων αντιψυχωσικών με δέσμευση των υποδοχέων 5-HT (Αλεβιζόπουλος 2018)

Η κλοζαπίνη, το πρώτο άτυπο αντιψυχωσικό (1968), διαφέρει από τα άλλα νευροληπτικά φάρμακα, δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς  $D_1$ ,  $D_2$  και  $D_4$ , με μικρότερη συγγένεια για τον  $D_2$ , έτσι είναι λιγότερο πιθανό να επιφέρει εξωπυραμιδικά σύνδρομα και επίσης αποτελεί ανταγωνιστή των  $5-HT_2$ ,  $\alpha_1$ -αδρενικών και  $H_1$  υποδοχέων. Θεωρείτε ίσως το αποτελεσματικότερο αντιψυχωσικό κατά των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, παρόλα αυτά προκαλεί σοβαρές παρενέργειες όπως ουδετεροπενία, ακοκκιοκυτταραιμία, επιληπτικές κρίσεις και μυοκαρδιοπάθεια. Για τους λόγους αυτούς οι ασθενείς που βρίσκονται σε θεραπεία με κλοζαπίνη πρέπει να υποβάλλονται σε συχνό, πρωτίστως, αιματολογικό και καρδιολογικό έλεγχο.

Η ολανζαπίνη και η ρισπεριδόνη δρουν ομοίως, αναστέλλοντας τους υποδοχείς  $5-HT_2$  και  $D_2$ . Σε σύγκριση με την κλοζαπίνη, παρουσιάζουν μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης ακοκκιοκυτταραιμίας και λιγότερα αντιχολινεργικά συμπτώματα. Συγκεκριμένα, η ρισπεριδόνη είναι αποτελεσματική σε μικρές δόσεις, δεν έχει αντιχολινεργική δράση με

αποτέλεσμα να είναι ασφαλέστερη για άτομα μεγάλης ηλικίας και τέλος αυξάνει σημαντικά την προλακτίνη (Αλεβιζόπουλος 2018).

Η κουετιαπίνη δρα ανταγωνιστικά σε πολλούς υποδοχείς του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως τους 5-HT, ντοπαμίνης (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>), ισταμίνης (H<sub>1</sub>) και στους αδρενικούς (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>). Το συγκεκριμένο άτυπο αντιψυχωσικό παρουσιάζει χαμηλή δυναμικότητα και μικρό χρόνο ημιζωής.



**Σχήμα 7:** Κατανομή των υποδοχέων στους οποίους δρουν ανταγωνιστικά συγκεκριμένα άτυπα αντιψυχωσικά (Αλεβιζόπουλος 2018)

### 1.1.5 Αντικαταθλιπτικά φάρμακα

Η σύγχρονη ιστορία των αντικαταθλιπτικών άρχισε να γράφεται τη δεκαετία του '50, όταν έκαναν την πρώτη τους εμφάνιση φάρμακα τα οποία ανήκαν στην κατηγορία των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών - (ιμιπραμίνη) και των αναστολέων της μονοαμινοξειδάσης (ιπροναζίδη). Αν και αυτά αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικά, έκρυβαν πολλές σοβαρές παρενέργειες οι οποίες ήταν και ιδιαίτερα δυσάρεστες αλλά και δυνητικά επικίνδυνες.

Οι παρενέργειες αυτές οδήγησαν σε νέες έρευνες με σκοπό την ανακάλυψη ενός πιο ασφαλούς και αποτελεσματικού αντικαταθλιπτικού. Η έρευνα καρποφόρησε στις αρχές της δεκαετίας του '70, όταν η εταιρία Astra με κεντρικό ερευνητή τον σουηδό νομπελίστα Arvid Carlsson ανακάλυψε τον πρώτο ειδικό αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης, την ζιμελιδίνη. Το συγκεκριμένο όμως φάρμακο αποσύρθηκε από την αγορά λόγω σοβαρών

παρενεργειών στο ήπαρ και στο νευρικό σύστημα. Παρά την ατυχή της πορεία, η ζιμελιδίνη αποτέλεσε το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα που οδήγησε στην ανακάλυψη φαρμάκων της ίδιας κατηγορίας χωρίς τη συγκεκριμένη παρενέργεια, τα οποία κυκλοφόρησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Η έρευνα φυσικά συνεχίζεται και από τότε έχουν αναπτυχθεί ακόμη πιο καινούργια φάρμακα, για παράδειγμα αυτά που εκτός από τη σεροτονίνη επηρεάζουν και την νοραδρεναλίνη. Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα ταξινομούνται με βάση κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας όπως τη χημική δομή και τον μηχανισμό δράσης τους.

#### A. Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Tricyclic antidepressants – TCAs)

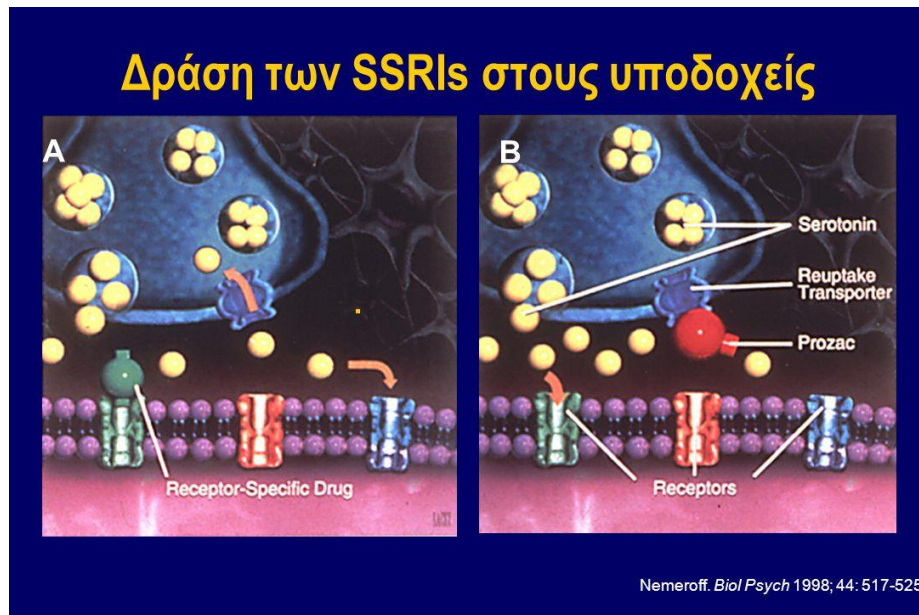
Τα κλασικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι τα καλούμενα τρικυκλικά από τη χαρακτηριστική χημική τους δομή που περιλαμβάνει τρεις δακτυλίους, συγκεκριμένα τείνουν να έχουν ονομασίες με την κατάληξη -μιπραμίνη ή -τριπτυλίνη. Όλα τα TCAs έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης και παρουσιάζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα. Παρότι ήταν τα πρώτα φάρμακα που παρουσίασαν επιτυχία στη θεραπεία της κατάθλιψης, εμφανίζουν αρκετές και σοβαρές παρενέργειες. Η υψηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν εκδηλώνεται με μυδρίαση, εξωπυραμδικά συμπτώματα, αρρυθμίες, υπέρμετρη διέγερση καθώς και με επιληπτικές κρίσεις. Τα φάρμακα της συγκεκριμένης ομάδας, σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας (overdose) είναι καρδιοτοξικά και μπορούν να οδηγήσουν στον θάνατο.

Ο μηχανισμός της φαρμακολογικής δράσης των TCAs, βασίζεται στην αναστολή της αντλίας επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης ή της 5-HT, οι οποίες αυξάνουν τη δράση των μονοαμινών νευροδιαβιβαστών.

Εξαιτίας των σημαντικών αρνητικών επιπτώσεων που επιφέρει η χρήση των συγκεκριμένων αντικαταθλιπτικών, τα τελευταία χρόνια έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από ασφαλέστερα φάρμακα δεύτερης γενιάς όπως τους ειδικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης.

#### B. Ειδικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective serotonin reuptake inhibitors – SSRIs)

Τα αντικαταθλιπτικά που χαρακτηρίζονται ως SSRIs, είναι το ίδιο αποτελεσματικά όσο τα τρικυκλικά αλλά πιο ασφαλή. Η μειωμένη τοξικότητά τους αποδίδεται στην εκλεκτική τους δράση, αναστέλλοντας σε μεγάλο βαθμό την αντλία επαναπρόσληψης σεροτονίνης (5-HT) και λιγότερο της νοραδρεναλίνης (NA).



**Σχήμα 8:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των SSRIs στους υποδοχείς 5-HT και NA (Nemeroff 1998)

Η φλουοξετίνη αποτέλεσε το πρώτο φάρμακο της ομάδας των SSRIs, και χαρακτηρίστηκε από μεγάλη αποτελεσματικότητα κατά της κατάθλιψης. Μετά τη φλουοξετίνη ανακαλύφθηκαν και άλλα αντικαταθλιπτικά με τον ίδιο μηχανισμό δράσης όπως η σερτραλίνη, η παροξετίνη και η σιταλοπράμη, με την τελευταία να επιφέρει αύξηση του QT διαστήματος στο ηλεκτροκαρδιογράφημα σε ορισμένους ασθενείς. Αποτέλεσμα αυτού ήταν οι οδηγίες για μείωση των χορηγούμενων δόσεων.

Γ. Αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης (Selective serotonin – norepinephrine reuptake inhibitors – SSNRIs)

Οι σχετικά νέοι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης, εμφανίζουν μηχανισμό φαρμακολογικής δράσης παρόμοιο με των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων αλλά περισσότερο εκλεκτικό. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η ντουλοξετίνη και η βενλαφαξίνη, που ενδείκνυνται κυρίως για τη θεραπεία της μείζονος κατάθλιψης.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης παρουσιάζει διαφορές και ποικιλομορφία, επιδρώντας σε διάφορους νευροδιαβιβαστές, λιγότερο σε σχέση με τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Ναυτία, κεφαλαλγία, επίταση των συμπτωμάτων άγχους και σεξουαλική

δυσλειτουργία αποτελούν συχνές παρενέργειες των SSNRIs, ενώ μπορούν επίσης να προκαλέσουν και μανιακά επεισόδια.

#### Δ. Αναστολείς μονοαμινοξειδάσης (Monoamine oxidase inhibitors – MAOIs)

Στην ομάδα αυτή ανήκουν ουσίες όπως η ισοκαρβοξαζίδα, τρανυλκυπρομίνη, φαιελζίνη κ.ά. Γενικώς έχουν περιορισμένη εφαρμογή στην κλινική πράξη λόγω των πολλών και επικίνδυνων αλληλεπιδράσεών τους. Έχουν δομή αμίνης και λειτουργούν ως «ψευδοϋπόστρωμα» για τη MAO. Η αναστολή είναι μη αναστρέψιμη με διάρκεια περίπου δύο εβδομάδων μετά από μία απλή χορήγηση. Παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως κεντρική καταστολή ή διέγερση, ναυτία, ζάλη και κεφαλαλγία (Μαρσέλος, Μάλαμας 2004).

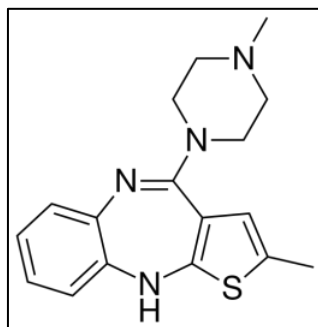
#### Ε. Άλλα αντικαταθλιπτικά

Η αγομελατίνη είναι ένα νέο φάρμακο όπου ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι ίδιος με κανένα άλλο αντικαταθλιπτικό, αποτελώντας έναν μελατονινεργικό αγωνιστή των υποδοχέων MT<sub>1</sub> και MT<sub>2</sub> και ανταγωνιστής των υποδοχέων 5-HT<sub>2C</sub>. Ενδείκνυται για τη θεραπεία της μείζονος κατάθλιψης αν και πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητά του είναι ελάχιστα καλύτερη από αυτή του placebo. Η ηπατική δυσλειτουργία είναι μία από τις σοβαρές παρενέργειες που μπορεί να επιφέρει το συγκεκριμένο φάρμακο.

### 1.1.6 Προσδιοριζόμενα αντιψυχωσικά

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αντιψυχωσικά φάρμακα που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής:

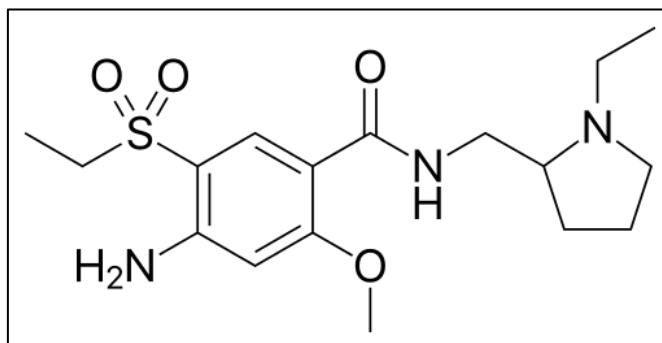
#### A. Ολανζαπίνη



- Μοριακός τύπος:  $C_{17}H_{20}N_4S$
- Μοριακό βάρος: 312,4
- Όνομα κατά IUPAC: 2-Methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-thieno[3,2-c][1,5]benzodiazepine
- Συνώνυμες ονομασίες: LY-170053, 2-Methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine
- Εμπορική ονομασία: Zyprexa
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κίτρινο κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως  $195^{\circ}\text{C}$ , πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, ελαφρώς διαλυτή σε μεθανόλη, αιθανόλη και ακετονιτρίλιο,  $pK_{a1}$  5,0,  $pK_{a2}$  7,4
- Τοξικότητα: Η ελάχιστη τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,1 mg/L
- Χρόνος ημιζωής: Μέσος όρος 33,8 h (εύρος, 30–60) για νέα και υγιή άτομα και 51,8 h για τους ηλικιωμένους. Οι γυναίκες, συνήθως παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από τους άντρες
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~ 80%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: ~ 1150 L (660–1790 L), 22 L/Kg, και εύρους 10–20 L/Kg
- Κάθαρση: Η κάθαρση στο πλάσμα κυμαίνεται από 12–47 L/h με μέσο όρο 25 L/h. Τυχόν υπατικές βλάβες μειώνουν την τιμή αυτή. Γενικώς οι γυναίκες παρουσιάζουν 30% χαμηλότερη κάθαρση σε σχέση με εκείνη των αντρών, ενώ οι καπνιστές 40% υψηλότερη από τους μη καπνιστές
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 93% κυρίως με αλβουμίνη και α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη

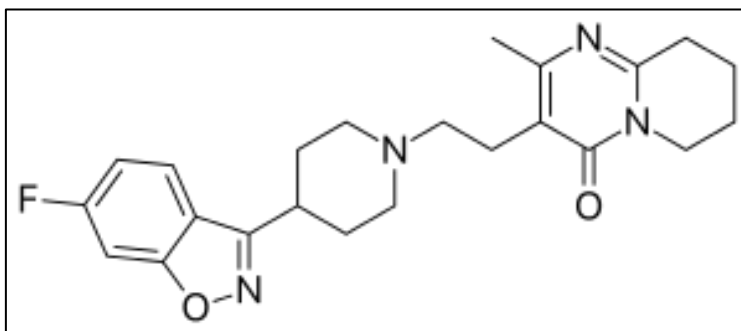


## B. Αμισουλπρίδη



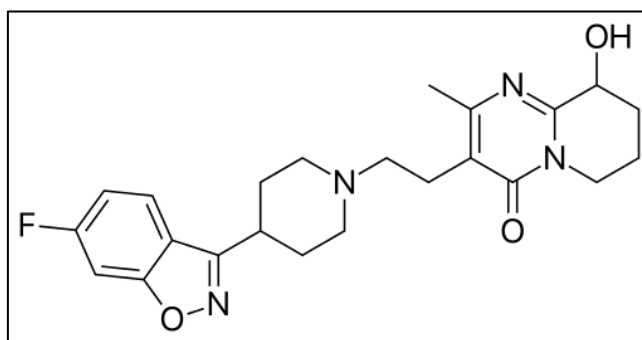
- Μοριακός τύπος:  $C_{17}H_{27}N_3O_4S$
- Μοριακό βάρος: 369,5
- Όνομα κατά IUPAC: 4-Amino-N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-5-ethylsulfonyl-2-methoxybenzamide
- Συνώνυμες ονομασίες: Aminosultopride, 4-amino-N-[(1-ethyl-2 pyrrolidinyl)methyl]-5-(ethylsulfonyl)-2-methoxybenzamide, DAN-2163
- Εμπορική ονομασία: Isofredil
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 126–127°C, pKa 9,37, logP (οκτανόλη/νερο) 1,10
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 9,63 mg/L (case report) (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: 12 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: 48% (Wikipedia)
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 5,8 L/Kg
- Κάθαρση: 20 L/h
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 16%

## Γ. Ρισπεριδόνη



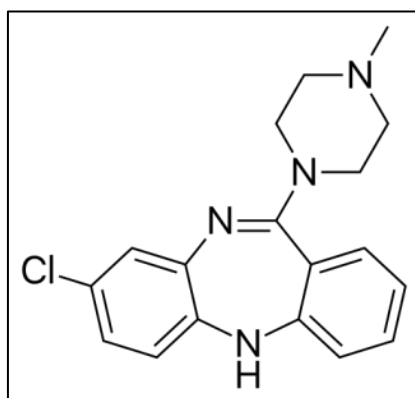
- Μοριακός τύπος:  $C_{23}H_{27}FN_4O_2$
- Μοριακό βάρος: 410,5
- Όνομα κατά IUPAC: 3-[2-[4-(6-Fluoro-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydropyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one
- Συνώνυμες ονομασίες: 3-[2-[4-(6-Fluoro-1,2-benzisoxazol-3-yl)-1-piperidinyl]ethyl]-6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one, R-64766
- Εμπορική ονομασία: Rispelen
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 170°C, πρακτικά αδιάλυτη στο νερό,  $pK_{a1}$  8,24,  $pK_{a2}$  3,11, logP (οκτανόλη/νερο) 3,04
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 1,8 mg/L (case report) (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: ~ 19 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: 66–82%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 1,1–2,1 L/Kg
- Κάθαρση: 54–394 L/h
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 88–90%

## Δ. Παλιπεριδόνη



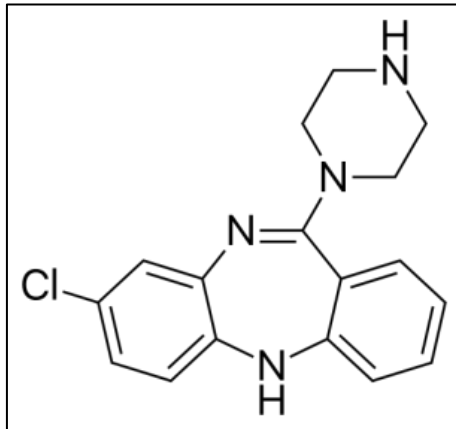
- Μοριακός τύπος:  $C_{23}H_{27}FN_4O_3$
- Μοριακό βάρος: 426,5
- Όνομα κατά IUPAC: 3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl]-9-hydroxy-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydropyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one
- Συνώνυμες ονομασίες: 9-OH-ρισπεριδόνη, 3-(2-(4-(6-fluoro-3-(1,2-benzisoxazolyl))-1-piperidinyl)ethyl)-6,7,8,9-tetrahydro-9-hydroxy-2-methyl-4H-pyrido(1,2-a)pyrimidin-4-one
- Εμπορική ονομασία: Invega
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Πρακτικά αδιάλυτη στο νερό,  $pK_{a1}$  13,74,  $pK_{a2}$  8,76,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 1,8
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,08 mg/L (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: ~ 20,5 h
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 487 L
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 77%

## Ε. Κλοζαπίνη



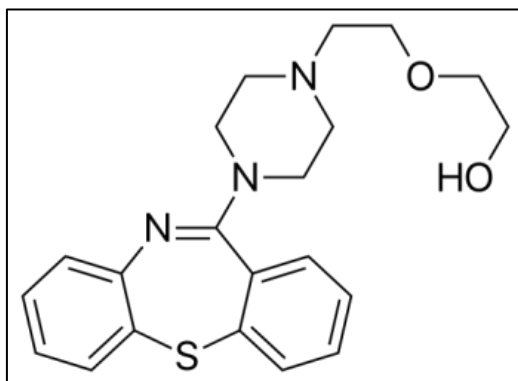
- Μοριακός τύπος:  $C_{18}H_{19}ClN_4$
- Μοριακό βάρος: 326,8
- Όνομα κατά IUPAC: 3-Chloro-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-benzo[c][1,5]benzodiazepine
- Συνώνυμες ονομασίες: 8-Chloro-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine, clozapina, clozapinum, HF-1854
- Εμπορική ονομασία: Leponex
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κίτρινο κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 183–184°C, πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, ελαφρώς διαλυτή σε ακετονιτρίλιο, ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα και αιθανόλη, διαλυτή σε χλωροφόρμιο  $pK_{a1}$  3,70,  $pK_{a2}$  7,60,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,23
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,8–1,3 mg/L (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: 6–17 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~ 50–60%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 2–7 L/Kg
- Κάθαρση: 6,1 mL/min/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: ~ 95%

## ΣΤ. N-Desmethylozapine



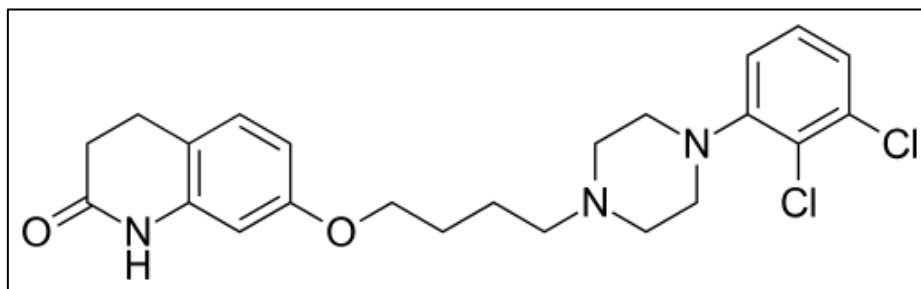
- Μοριακός τύπος:  $C_{17}H_{17}ClN_4$
- Μοριακό βάρος: 326,8
- Όνομα κατά IUPAC: Norclozapine, 3-chloro-6-piperazin-1-yl-5H-benzo[b][1,4]benzodiazepine
- Συνώνυμες ονομασίες: 8-chloro-11-piperazin-1-yl-5H-dibenzo(B,E)(1,4)diazepine
- Φυσικοχημικές ιδιότητες:  $pK_{a1}$  19,9,  $pK_{a2}$  8,83,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,25
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,7 mg/L (TIAFT)

## Z. Κουετιαπίνη



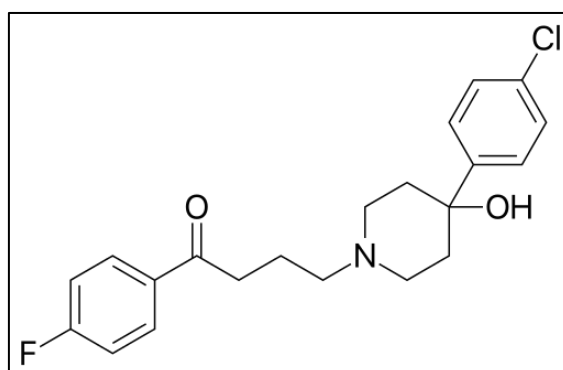
- Μοριακός τύπος:  $C_{21}H_{25}N_3O_2S$
- Μοριακό βάρος: 383,5
- Όνομα κατά IUPAC: 2-[2-(4-Benzol[b][p1,5]benzothiazepin-6-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethanol
- Συνώνυμες ονομασίες: 2-[2-(4-Dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11-yl-1-piperazinyl)ethoxy]ethanol
- Εμπορική ονομασία: Seroquel
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Λευκή κρυσταλλική σκόνη, σημείο τήξεως 172–173°C,  $pK_{a1}$  3,3,  $pK_{a2}$  6,8
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 1,8 mg/L (case report) (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: 6–7 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: 100%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 10 L/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 83%

## Η. Αριπιπραζόλη



- Μοριακός τύπος:  $C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$
- Μοριακό βάρος: 448,4
- Όνομα κατά IUPAC: 7-[4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)piperazin-1-yl]butoxy]-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one
- Συνώνυμες ονομασίες: 7-[4-[4-(2,3-dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butoxy]-3,4-dihydrocarbostyryl
- Εμπορική ονομασία: Abilify
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Άχρωμη κρυσταλλική ουσία, σημείο τήξεως 139–139,5°C,  $pK_{a1}$  13,51,  $pK_{a2}$  7,46, logP (οκτανόλη/νερό) 4,5
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι τα 1000 ng/mL (Hiemke et al. 2011)
- Χρόνος ημιζωής: 47–68 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~ 87%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: ~ 4,9 L/Kg
- Κάθαρση: 3,3–4,0 L/h
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 88–99%, κυρίως με την αλβουμίνη

## Θ. Αλοπεριδόλη



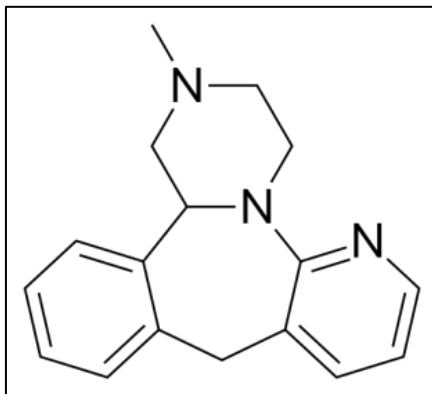
- Μοριακός τύπος:  $C_{21}H_{23}ClFNO_2$
- Μοριακό βάρος: 375,9
- Όνομα κατά IUPAC: 4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]-1-(4-fluorophenyl)butan-1-one
- Συνώνυμες ονομασίες: 4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidinyl]-1-(4-fluorophenyl)-1-butanone
- Εμπορική ονομασία: Aloperidin
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κρυσταλλική ουσία, σημείο τήξεως 148,0–149,4°C, pKa 8,3, logP (οκτανόλη/νερό) 3,23
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,05 mg/L (TIAFT)
- Χρόνος ημιζωής: 10–40 h
- Βιοδιαθεσιμότητα: 38–86 %
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 10–30 L/Kg
- Κάθαρση: 8–17 mL/min/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: ~ 92%



### 1.1.7 Προσδιοριζόμενα αντικαταθλιπτικά

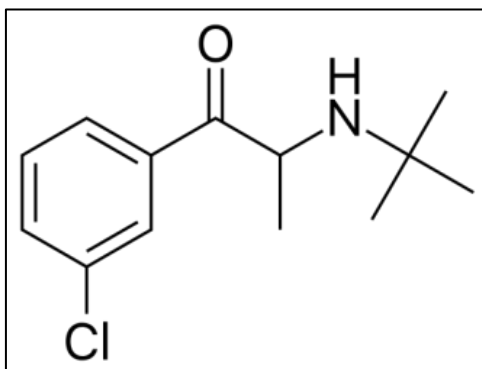
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής:

#### A. Μιρταζαπίνη (TeCA)



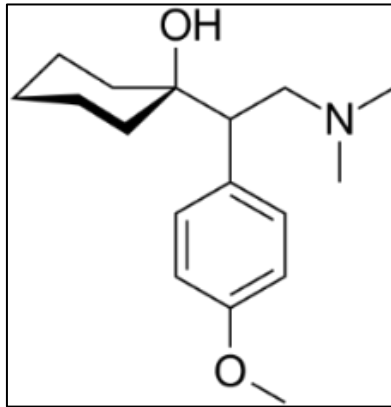
- Μοριακός τύπος:  $C_{17}H_{19}N_3$
- Μοριακό βάρος: 265,4
- Όνομα κατά IUPAC: 1,2,3,4,10,14b-Hexahydro-2-methylpyrazino[2,1-a]pyrido[2,3-c][2]benzazepine
- Συνώνυμες ονομασίες: 6-Azamianserin
- Εμπορική ονομασία: Azarin
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Λευκή κρυσταλλική σκόνη, σημείο τήξεως 114–116°C, ελαφρώς διαλυτή στο νερό,  $pK_a$  7,1,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,3
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι τα 1 mg/L (άθροισμα μητρικής ένωσης και μεταβολίτη)
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~ 50%
- Πρωτεϊνική σύνδεση: ~ 85%

## B. Βουπροπιόνη (NDRI)



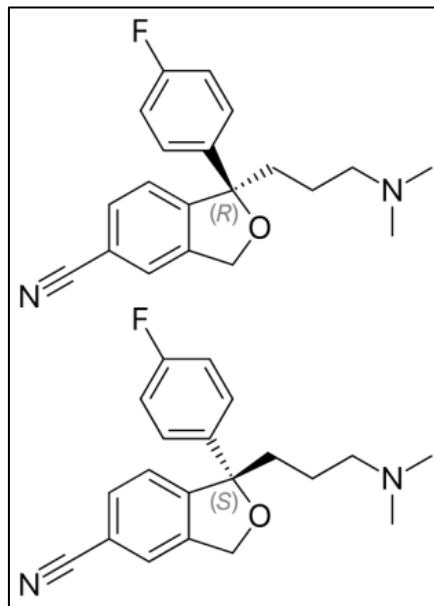
- Μοριακός τύπος:  $C_{13}H_{18}ClNO$
- Μοριακό βάρος: 239,7
- Όνομα κατά IUPAC: 2-(tert-Butylamino)-1-(3-chlorophenyl)propan-1-one
- Συνώνυμες ονομασίες: Amfebutamone
- Εμπορική ονομασία: Wellbutrin XR
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Λευκή κρυσταλλική σκόνη, σημείο τήξεως 233–234°C, διαλυτή στο νερό, στην αιθανόλη και στο υδροχλωρικό οξύ,  $pK_a$  18,29,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,6
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,17 mg/L (TIAFT)
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 27–63 L/Kg
- Κάθαρση: 2 L/h/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: ~ 84%

## Γ. Βενλαφαξίνη (SSNRI)



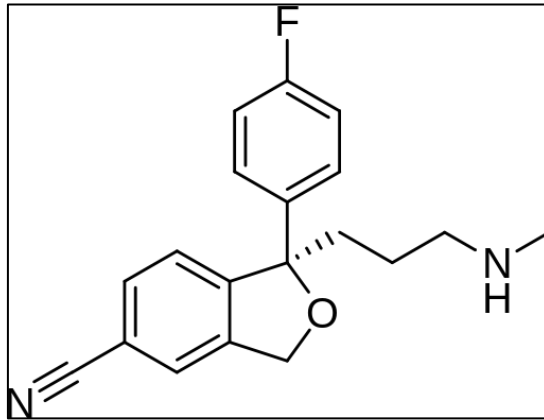
- Μοριακός τύπος: C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub>
- Μοριακό βάρος: 277,4
- Όνομα κατά IUPAC: 1-[2-(Dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]cyclohexan-1ol
- Εμπορική ονομασία: Effexor XR
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Λευκό κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 102–104°C, logP (οκτανόλη/νερό) 3,28
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 1,0–1,5 mg/L
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 8 L/Kg
- Κάθαρση: 1,2–1,7 L/h/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 27%

## Δ. Σιταλοπράμη (SSRI)



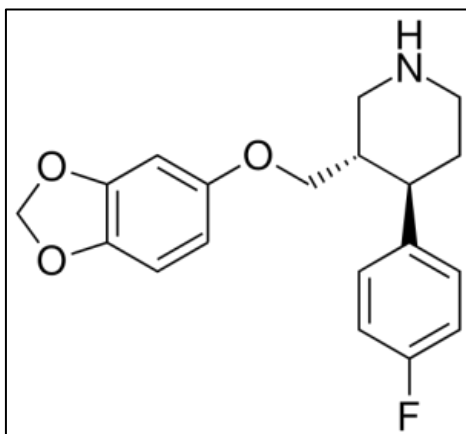
- Μοριακός τύπος: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>O
- Μοριακό βάρος: 324,4
- Όνομα κατά IUPAC: 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarbonitrile
- Συνώνυμες ονομασίες: Nitalapram
- Εμπορική ονομασία: Pramital
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Λευκό κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 186°C, logP (οκτανόλη/νερό) 3,74
- Τοξικότητα: Θανατηφόρος συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 500 μg/L
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~ 80%
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 12–16 L/Kg
- Κάθαρση: 0,33 L/min για νεαρά άτομα και 0,08 L/min για ηλικιωμένα
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 50%

## E. N-Desmethylcitalopram (SSRI)



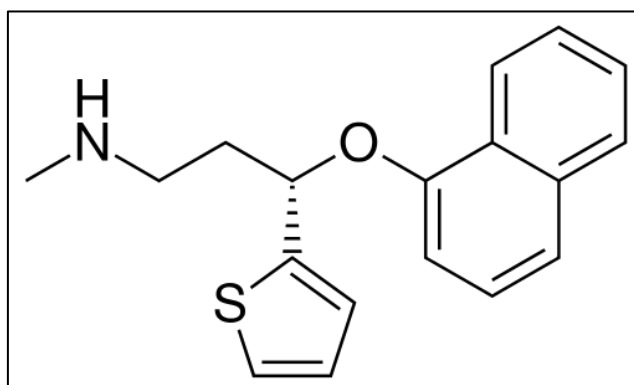
- Μοριακός τύπος:  $C_{19}H_{19}FN_2O$
- Μοριακό βάρος: 310,4
- Όνομα κατά IUPAC: 1-(4-fluorophenyl)-1-[3-(methylamino)propyl]-3H-2-benzofuran-5-carbonitrile
- Συνώνυμες ονομασίες: Desmethylcitalopram
- Φυσικοχημικές ιδιότητες:  $pK_a$  10,54,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,24

## ΣΤ. Παροξετίνη (SSRI)



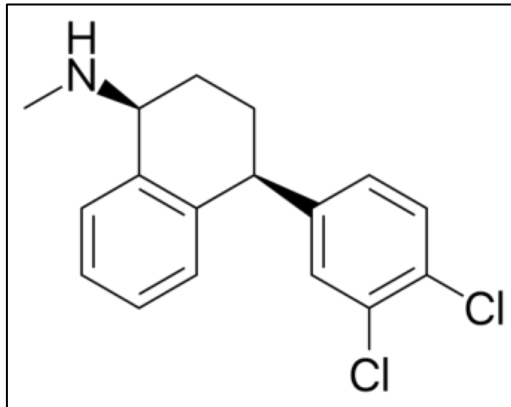
- Μοριακός τύπος:  $C_{19}H_{20}FNO_3$
- Μοριακό βάρος: 329,4
- Όνομα κατά IUPAC: (3S,4R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-ylomethyl)-4-(4-fluorophenyl) piperidine
- Συνώνυμες ονομασίες: (3S-trans)-3-[(1,3-Benzodioxol-5-ylomethyl)-4-(4-fluorophenyl) piperidine, BRL-29060, FG-7051
- Εμπορική ονομασία: Seroxat
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως 129–131°C,  $pK_s$  9,9,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 3,95
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στον ορό είναι τα 350–400  $\mu\text{g/L}$
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 3–28 L/Kg
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 95%

## Z. Ντουλοξετίνη (SSNRI)



- Μοριακός τύπος:  $C_{18}H_{19}NOS$
- Μοριακό βάρος: 297,4
- Όνομα κατά IUPAC: (3S)-N-Methyl-3-naphthalen-1-yloxy-3-thiophen-2-ylpropan-1-amine
- Συνώνυμες ονομασίες: (+)-N-methyl-3-(1-naphthalenyloxy)-3-(2thienyl)propanamine
- Εμπορική ονομασία: Cymbalta
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Στερεό λευκού χρώματος,  $pK_a$  10,02,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 4,23
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι τα 240 ng/mL (Hiemke et al. 2011)
- Βιοδιαθεσιμότητα: ~50% (εύρος 30–80%)
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: ~ 1943 L (εύρος 803–3065 L)
- Κάθαρση: ~ 114 L/h (εύρος 44–214 L/h)
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 96%, κυρίως με αλβουμίνη και  $\alpha 1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη

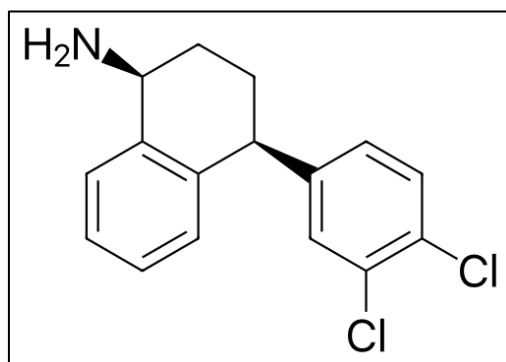
H. Σερτραλίνη (SSRI)



- Μοριακός τύπος:  $C_{17}H_{17}Cl_2N$
- Μοριακό βάρος: 306,2
- Όνομα κατά IUPAC: (1S,4S)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-N-methyl-1-naphthalenamine
- Συνώνυμες ονομασίες: CP-51974
- Εμπορική ονομασία: Zoloft
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Κρυσταλλικό στερεό, σημείο τήξεως  $207^{\circ}C$ ,  $pK_a$  9,48,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 5,29
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο αίμα είναι τα 0,29 mg/L (case report) (TIAFT)
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 98%

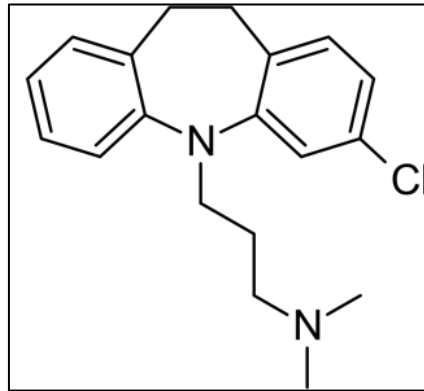


## Θ. N-Desmethysertraline (SSRI)



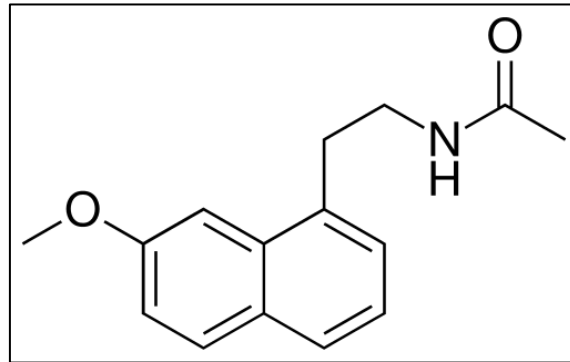
- Μοριακός τύπος: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N
- Μοριακό βάρος: 292,2
- Όνομα κατά IUPAC: (1S,4S)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine
- Συνώνυμες ονομασίες: Nosertraline
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: pK<sub>a</sub> 9,73, logP (οκτανόλη/νερό) 4,92 (PubChem, HMDB)

## I. Κλομιπραμίνη (TCA)



- Μοριακός τύπος:  $C_{19}H_{23}ClN_2$
- Μοριακό βάρος: 314,9
- Όνομα κατά IUPAC: 3-(9-Chloro-5,6-dihydrobenzo[b][1]benzazepin-11-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine
- Συνώνυμες ονομασίες: Chlorimipramine, 3-chloro-10,11-dihydro-N,N-dimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propanamine
- Εμπορική ονομασία: Anafranil
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Σκόνη λευκού ή ελαφρώς κίτρινου χρώματος, σημείο τήξεως  $\sim 207^\circ\text{C}$ ,  $pK_a$  9,2,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 5,19
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι τα 450 ng/mL (μαζί με τον μεταβολίτη) (Hiemke et al. 2011)
- Φαινομενικός όγκος κατανομής: 12–17 L/Kg
- Κάθαρση: 73 L/h
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 90–95%

## IA. Αγομελατίνη (MRA)



- Μοριακός τύπος:  $C_{15}H_{17}NO_2$
- Μοριακό βάρος: 243,3
- Όνομα κατά IUPAC: N-[2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethyl]acetamide
- Εμπορική ονομασία: Valdoxan
- Φυσικοχημικές ιδιότητες: Σημείο τήξεως 107–109°C,  $pK_a$  15,96,  $\log P$  (οκτανόλη/νερό) 2,83
- Τοξικότητα: Τοξική συγκέντρωση στο πλάσμα είναι τα 600 ng/mL (Hiemke et al. 2011)
- Βιοδιαθεσιμότητα: 1%
- Πρωτεϊνική σύνδεση: 95%

## **1.2 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε κλινικά δείγματα και νεκροτομικό υλικό**

### **1.2.1 Προσδιορισμός επιπέδων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε κλινικά δείγματα**

Ο επιστημονικός κλάδος της αναλυτικής τοξικολογίας περιλαμβάνει όλες τις πτυχές διάγνωσης και θεραπείας περιστατικών δηλητηριάσεων μέσω της εξέτασης του ασθενή και της εκτίμησης των συμπτωμάτων που αυτός παρουσιάζει, όπως επίσης και της ανάλυσης βιολογικών υλικών με σκοπό τον προσδιορισμό τοξικών – ξενοβιοτικών ουσιών (Negrusz, Cooper 2013).

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα βιολογικά δείγματα λαμβανόμενα από ασθενείς είναι το αίμα-πλάσμα και τα ούρα, τα οποία είναι δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο (συνήθως) τις τελευταίες δύο ημέρες πρόσληψής του. Τα περισσότερα τοξικολογικά εργαστήρια προτιμούν τα προαναφερόμενα δείγματα, λόγω της εμφάνισης υψηλής συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους, αλλά και της εύκολης λήψης τους. Ωστόσο, έχουν το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και της αντικατάστασής τους. Για τον λόγο αυτό και άλλα υποστρώματα μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες. Τα βιολογικά δείγματα ταξινομούνται σε συμβατικά (αίμα, ούρα) και μη συμβατικά-εναλλακτικά (τρίχες) (Σαμανίδου).

#### **A. Αίμα**

Το αίμα χαρακτηρίζεται ως το βιολογικό υλικό που προσφέρει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου και της ληφθείσας δόσης. Ο όρος ολικό αίμα αναφέρεται στο αίμα εκείνο, το οποίο συνδυάζεται με έναν αντιπηκτικό παράγοντα κατά τη διαδικασία συλλογής και θεωρείται ένα ειδικά τυποποιημένο προϊόν για μετάγγιση ή για περαιτέρω επεξεργασία για αναλυτικούς σκοπούς. Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα, μέσα στο οποίο περιέχονται τρεις τύποι κυττάρων: τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα και τα θραύσματα κυττάρων ή αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα. Η σύστασή του αποτελείται κατά 22% από στερεά και κατά 78% από νερό (Σαμανίδου).

Το πλάσμα αίματος είναι υποκίτρινο υγρό το οποίο αποτελεί τη βάση του συνδετικού ιστού του κυκλοφορικού συστήματος, ως άμορφο συστατικό, "υδαρές υπόστρωμα", του αίματος. Το πλάσμα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες πλάσματος και νερό (κατά 90% περίπου). Τα αιμοσφαίρια αποτελούν το 45% του συνολικού όγκου του αίματος. Στο πλάσμα αίματος

περιλαμβάνεται και το ινωδογόνο με προσθήκη αντιπηκτικών παραγόντων, όπως ηπαρίνη, EDTA, οξαλικά άλατα κλπ. (Σαμανίδου).

Ο ορός μοιάζει με το πλάσμα στη σύνθεση, αλλά στερείται τους θρομβωτικούς παράγοντες πήξης. Προτιμάται σε πολλές δοκιμές, δεδομένου ότι τα αντιπηκτικά στο πλάσμα, ενδεχομένως, παρεμποδίζουν τα αποτελέσματα (Σαμανίδου).

#### B. Ούρα

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων δημιουργεί πολλά υποπροϊόντα τα οποία απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος και αποβάλλονται με τα ούρα. Ως ούρα ορίζεται το σύνολο των υδατοδιαλυτών ουσιών οι οποίες αποβάλλονται από τους νεφρούς και διαμέσου των υπολοίπων οργάνων του ουροποιητικού συστήματος αποβάλλονται από το σώμα. Τα ούρα δεν έχουν σταθερή σύσταση, αλλά αποτελούν ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται κατά 95% από νερό. Το υπόλοιπο ποσοστό είναι διαλυμένα ανόργανα ιόντα και οργανικές ενώσεις (Σαμανίδου).

Η δειγματοληψία είναι εύκολη και μη παρεμβατική. Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι υψηλότερες από ότι στο αίμα. Τα ούρα είναι υδατικό διάλυμα χωρίς πρωτεΐνες. Κατά την ανάλυσή τους ανιχνεύονται τόσο οι μητρικές ουσίες, όσο και οι μεταβολίτες τους. Τα ούρα είναι δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο τις τελευταίες δύο μέρες (συνήθως). Την εξέταση ούρων την προτιμούν τα περισσότερα τοξικολογικά εργαστήρια, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους και της εύκολης λήψης τους. Έχουν, όμως, το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και αντικατάστασής τους, καθώς και της βακτηριακής μόλυνσης, εάν δε συντηρηθούν σε χαμηλή θερμοκρασία. Επίσης, σε περίπτωση πρόσφατης λήψης του φαρμάκου, αυτό δεν θα έχει προλάβει να απεκκριθεί με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή του στα ούρα (Σαμανίδου).

#### Γ. Τρίχες

Οι τρίχες αποτελούν ένα μη συμβατικό εναλλακτικό βιολογικό υπόστρωμα. Το συγκεκριμένο υλικό δίνει τη δυνατότητα για πληροφορίες που αφορούν σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, π.χ. εβδομάδες ή μήνες. Επειδή τα φάρμακα είναι εγκλωβισμένα στο εσωτερικό της τρίχας, δεν απομακρύνονται με τις συνήθεις διαδικασίες υγιεινής και για αυτόν τον λόγο θεωρούνται και ως ημερολόγια της έκθεσης σε φάρμακα. Μειονέκτημα του συγκεκριμένου βιολογικού υλικού είναι τα πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω

επιμόλυνσης από το περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό συνίσταται η πλύση τους πριν την ανάλυση (Σαμανίδου).

Στον ελλαδικό χώρο, ο προσδιορισμός και η ανίχνευση φαρμάκων από δείγματα ασθενών εκτελείται από τα Εργαστήρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας. Έτσι, μέρος της τοξικολογίας αποτελεί ο προσδιορισμός των θεραπευτικών επιπέδων σε θεραπείες με συγκεκριμένες ομάδες φαρμάκων. Η συστηματική παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων (TDM) μπορεί να οριστεί ως ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φαρμάκου ή του μεταβολίτη σε βιολογικά υλικά (ορός, πλάσμα) με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παρεχόμενης δόσης (Hiemke et al. 2011) και του θεραπευτικού αποτελέσματος για τον ασθενή.

Τον βασικό λόγο παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων στο πεδίο της ψυχοφαρμακοθεραπείας αποτελεί η σχετικά μεγάλη ποικιλομορφία της φαρμακοκινητικής των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που παρουσιάζεται μεταξύ των ασθενών (Hiemke et al. 2011, Preskorn 2008, Preskorn et al. 1993). Χαρακτηριστικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι για την ίδια δόση, εμφανίζονται περισσότερα από 20 διαφορετικά εύρη συγκεντρώσεων του φαρμάκου, σε κατάσταση ισορροπίας (αξίωμα πλατό), καθώς οι ασθενείς διαφέρουν στην ικανότητα απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης των φαρμάκων, λόγω ιδιοσυγκρασίας (κατάσταση υγείας, ηλικία, μη σωστή θεραπεία, γενετικοί παράγοντες) (Bengtsson 2004, Brøsen 1996, Hiemke 2008, Jaquenoud Sirot et al. 2009, Jaquenoud Sirot et al. 2006, Klotz 2009, Hiemke et al. 2011).

Μέσω της προσδιοριζόμενης τιμής της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος, ρυθμίζεται και η δοσολογία ώστε ο κάθε ασθενής να παρουσιάζει τη μέγιστη θεραπευτική απόκριση και τις ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες, καθώς επίσης και τη μείωση του κόστους της εκάστοτε ψυχοφαρμακοθεραπείας (Preskorn et al. 1991, Touw et al. 2005, Hiemke et al. 2011).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων σε αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα επιφέρει βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (Baumann et al. 2004, Müller et al. 2003, Perry 2001) με βασική προϋπόθεση να εφαρμόζεται σύμφωνα με την ορθή κλινική πράξη.

Τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά έχουν κάποια κοινά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά:

- i. Καλή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα με τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα να επιτυγχάνεται σε διάστημα 1–6 h
- ii. Συστηματική βιοδιαθεσιμότητα από 5–90%
- iii. Γρήγορη κατανομή από το πλάσμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα με 2–40 φορές υψηλότερα επίπεδα στον εγκέφαλο σε σχέση με το αίμα
- iv. Υψηλούς φαινομενικούς όγκους κατανομής (10–50 L/Kg)
- v. Αργή απομάκρυνση από το πλάσμα (χρόνος ημιζωής 12–36 h), κυρίως μέσω του ηπατικού μεταβολισμού
- vi. Γραμμική φαρμακοκινητική απόκριση
- vii. Χαμηλή νεφρική απέκκριση
- viii. Κύρια μεταβολικά ένζυμα είναι το κυτόχρωμα P450 (CYP) και UDP-γλυκουρονική τρανσφεράση.

Σε σχέση με τα παραπάνω γενικά χαρακτηριστικά υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις. Από τα φάρμακα που θα μελετηθούν στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας, η βενλαφαξίνη και η κουετιαπίνη έχουν μικρούς χρόνους ημιζωής σε αντίθεση με την αριπιπραζόλη. Η αμισουλπρίδη μεταβολίζεται ελάχιστα ή καθόλου στο ήπαρ, αλλά απεκκρίνεται κυρίως από τα νεφρά, ενώ η παροξετίνη δεν παρουσιάζει γραμμικό μοντέλο φαρμακοκινητικής (Bertelsen et al. 2003).

Τα περισσότερα από τα APs και ADs φάρμακα υφίστανται μεταβολισμό φάσης I με αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου κατά κύριο λόγο καταλύονται από το κυτόχρωμα P450 (CYP) που αποτελείται από περισσότερα των 200 ισοενζύμων, με σημαντικότερα τα CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 και CYP3A4/5 (Zhou 2009a, Zhou 2009b, Zhou et al. 2009). Ο μεταβολισμός λαμβάνει κυρίως χώρα στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς όπως στον εντερικό βλεννογόνο και στον εγκέφαλο (Benedetti et al. 2009, Gervasini et al. 2004, Meyer et al. 2007). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα συγκεκριμένα ένζυμα που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των μελετημένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.

Οι μεταβολίτες κάποιων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών είναι φαρμακολογικά δραστικές ενώσεις, για τον λόγο αυτό πρέπει να περιλαμβάνονται σε μελέτες παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων. Χαρακτηριστικό παραδείγματα είναι ο μεταβολίτης της ρισπεριδόνης (9-hydroxyrisperidone ή παλιπεριδόνη). Η φαρμακολογική δράση των μεταβολιτών της σετραλίνης (N-desmethylertraline) και της κλοζαπίνης (N-desmethyloclozapine) παραμένει ακόμη ένα θέμα αμφισβήτησης και έρευνας.

Ο προσδιορισμός των φαρμακολογικά μη ενεργών μεταβολιτών είναι επίσης σημαντικός, γιατί μπορεί να δώσει ουσιαστικές πληροφορίες για τον μεταβολισμό του φαρμάκου καθώς και για τη συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπευτική αγωγή (Caccia et al. 1992, Canal-Raffin et al. 2005). Ο Πίνακας 2 δείχνει το «φυσιολογικό» εύρος τιμών του λόγου συγκέντρωσης του μεταβολίτη ως προς τη μητρική ένωση.



**Πίνακας 1:** Ένζυμα τα οποία συμβάλουν στον μεταβολισμό των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Hiemke et al. 2011)

<b>Φάρμακο</b>	<b>Ένζυμο</b>	<b>Αναφορά</b>
Αγομελατίνη	CYP1A2,CYP2C19	Bogaards et al. 2000
Αμισουλπρίδη	> 90% απεκκρίνεται χωρίς μεταβολισμό	Rosenzweig et al. 2002
Αριπιπραζόλη	CYP2D6, CYP3A4	Waade et al. 2009
Βουπροπιόνη	CYP2B6	Hesse et al. 2004
Σιταλοπράμη	CYP2C19,CYP2D6, CYP3A4	Brøsen et al. 2001
Κλομιπραμίνη	CYP1A2, CYP219, CYP2D6, CYP3A4	Gillman 2007
Κλοζαπίνη	CYP1A2,CYP2C19, CYP3A4	Olesen et al. 2001
Ντουλοξετίνη	CYP1A2, CYP2D6	Lobo et al. 2008
Αλοπεριδόλη	CYP2D6, CYP3A4	Brockmöller et al. 2002
Μιρταζαπίνη	CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6	Störmer et al. 2000
Ολανζαπίνη	CYP1A2, CYP2D6	Callaghan et al. 1999
Παλιπεριδόνη	60% απεκκρίνεται χωρίς μεταβολισμό	Leon et al. 2010
Παροξετίνη	CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4	Ververs et al. 2009
Κουετιαπίνη	CYP3A4, CYP2D6	Bakken et al. 2009
Ρισπεριδόνη	CYP2D6, CYP3A4	Xiang et al. 2010
Σερτραλίνη	CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6	Wang et al. 2001
Βενλαφαξίνη	CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4	McAlpine et al. 2011

**Πίνακας 2:** Εύρη τιμών του λόγου συγκέντρωσης μεταβολίτη προς μητρική ένωση των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Hiemke et al. 2011)

Μητρική ένωση	Μεταβολίτης	[Μεταβολίτης] / [Μητρική ένωση]	Αναφορά
Αριπιπραζόλη	Dehydroaripiprazole	0,3 – 0,5	Hendset et al. 2007
Βουπροπιόνη	Hydroxybupropion	5 – 47	Jefferson et al. 2005
Σιταλοπράμη	N-Desmethylcitalopram	0,31 – 0,60	Reis et al. 2003
Κλομιπραμίνη	Desmethylclomipramine	0,8 – 2,6	Reis et al. 2009
Κλοζαπίνη	N-Desmethylclozapine	0,5 – 0,6	Paz et al. 2008
Αλοπεριδόλη	Reduced haloperidol	0,6	Ulrich et al. 2005
Μιρταζαπίνη	N-Desmethylmirtazapine	0,2 – 1,2	Shams et al. 2004
Ολανζαπίνη	N-Desmethylolanzapine	0,1 – 0,3	Skogh et al. 2002
Κουετιαπίνη	Norquetiapine	0,1 – 3,8	Winter et al. 2008
Ρισπεριδόνη	9-Hydroxyrisperidone	1,5 – 10,0	Van der Weide et al. 2005
Σερτραλίνη	N-Desmethylsertraline	1,7 – 3,4	Reis et al. 2004
Βενλαφαξίνη	O-Desmethylvenlafaxine	0,3 – 5,2	Shams et al. 2006
	N-Desmethylvenlafaxine	0,46 – 1,48	Shams et al. 2006

Η φαρμακολογική δράση των αντιψυχωσικών και των αντικαταθλιπτικών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά τους στο όργανο στόχος που είναι ο εγκέφαλος. Ωστόσο ο εγκέφαλος διαχωρίζεται από το υπόλοιπο σώμα με δύο φράγματα, το φράγμα αίματος-εγκεφάλου (blood-brain barrier) και αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού (blood cerebrospinal fluid barrier) που σκοπό έχουν να παρεμποδίζουν τη δίοδο πολλών φαρμάκων και τοξικών ουσιών στον νευρικό ιστό (Lange 2004). Πολλά από τα APs και τα ADs, εισέρχονται στον εγκέφαλο διαπερνώντας τα παραπάνω φράγματα μέσω παθητικής διάχυσης, λόγω της λιποδιαλυτότητάς τους.

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο λόγος της συγκέντρωσης των φαρμάκων στον εγκέφαλο προς τη συγκέντρωση στο πλάσμα να παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα ακόμη και για προσδιοριζόμενες ουσίες με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι οι τιμές αυτές μπορούν να κυμαίνονται από 0,22 (ρισπεριδόνη) (Aravagiri et al. 1998) έως 34 (φλουφенаζίνη) (Aravagiri et al. 1995).

Η χρησιμότητα προσδιορισμού αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων ποικίλει ανάλογα με την κλινική κατάσταση του ασθενούς και του επιλεγμένου συνταγογραφικού σχήματος. Σε περιπτώσεις μη συμμόρφωσης του ασθενούς στη θεραπεία ή παρουσία τοξικών επιπτώσεων, ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα θεωρείται γενικά ένα αποδεκτό εργαλείο για όλα τα φαρμακευτικά σχήματα και για κάθε ομάδα ασθενών. Βάση εμπειρικών στοιχείων ορίζονται τέσσερα επίπεδα σύστασης στην αναγκαιότητα – χρησιμότητα της παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων των αντιψυχωσικών και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων:

- i. Επίπεδο 1: Ισχυρά συνιστώμενο (Strongly recommended)
- ii. Επίπεδο 2: Συνιστώμενο (Recommended)
- iii. Επίπεδο 3: Χρήσιμο (Useful)
- iv. Επίπεδο 4: Πιθανά χρήσιμο (Potentially useful).

Η συστηματική παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων, είναι ισχυρά συνιστώμενη για τα περισσότερα από τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, γιατί μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας (Burke et al. 1999, Krska et al. 1992, Müller et al. 2003, Perry et al. 1994, Preskorn 1986), και επιπλέον για τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά υπάρχει καλή συσχέτιση συγκέντρωσης στο πλάσμα με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Αντίθετα, για τους αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης ο έλεγχος θεραπευτικών επιπέδων δεν παρουσιάζει μεγάλη σπουδαιότητα στην κλινική πράξη (Adli et

al. 2005, Rasmussen et al. 2000, Tasker et al. 1989) και αυτό γιατί η τοξικότητα των SSRIs είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη των παλαιότερων αντικαταθλιπτικών (Baumann 1996, Degner et al. 2004, Hiemke et al. 2000, Taylor 2008, White et al. 2008). Συγκεκριμένα για τη σιταλοπράμη, μια σχετικά πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε ότι η μέτρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα κατά την έβδομη ημέρα θεραπείας αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τη μετέπειτα μη απόκριση στη θεραπεία (Ostad Haji et al. 2011). Ασθενείς με συγκεντρώσεις σιταλοπράμης στο πλάσμα μικρότερη των 50 ng/mL παρουσιάζουν σημαντική μείωση στη βελτίωση της κατάστασής τους. Όσον αφορά το αντικαταθλιπτικό μιρταζαπίνη, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ συγκεντρώσεων στο πλάσμα και θεραπευτικού αποτελέσματος.

**Πίνακας 3:** Εύρη θεραπευτικών συγκεντρώσεων, χρόνοι ημιζωής, επίπεδα συναγερμού και αναγκαιότητας εφαρμογής συστηματικής παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών (Hiemke et al. 2011)

Αντιψυχωσικά	Εύρος θεραπευτικών συγκεντρώσεων (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	Επίπεδο συγκέντρωσης συναγερμού (ng/mL)	Επίπεδο αναγκαιότητας ελέγχου	Αναφορά
Αμισουλπρίδη	100 – 320	12 – 20	640	1	Bergemann et al. 2004
Αριπιπραζόλη	150 – 500	60 – 80	1000	2	Molden et al. 2006
Κλοζαπίνη	350 – 600	12 – 16	1000	1	Perry et al. 1991
Αλοπεριδόλη	1 – 10	12 – 36	15	1	Perry et al. 1993
Ολανζαπίνη	20 – 80	30 – 60	150	1	Gex-Fabry et al. 2003
Παλιπεριδόνη	20 – 60	23	120	2	Nazirizadeh et al. 2010
Κουετιαπίνη	100 – 500	7	1000	2	Vernaleken et al. 2010
Ρισπεριδόνη και μεταβολίτης	20 – 60	3 24	120	2	Riedel et al. 2005

**Πίνακας 4:** Εύρη θεραπευτικών συγκεντρώσεων, χρόνοι ημιζωής, επίπεδα συναγερμού και αναγκαιότητας εφαρμογής συστηματικής παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών (Hiemke et al. 2011)

Αντικαταθλιπτικά	Εύρος θεραπευτικών συγκεντρώσεων (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	Επίπεδο συγκέντρωσης συναγερμού (ng/mL)	Επίπεδο αναγκαιότητας ελέγχου	Αναφορά
Αγομελατίνη	7 – 300, 1 – 2 h μετά από λήψη 50 mg	1 – 2	600	4	Bogaards et al. 2000
Βουπροπιόνη και μεταβολίτης	225 – 1500	8 – 26 17 – 47	2000	3	Sweet et al. 1995
Σιταλοπράμη	50 – 110	33	220	2	Carlsson et al. 2001
Κλομιπραμίνη και μεταβολίτης	230 – 450	16 – 60 36	450	1	Gex-Fabry et al. 1999
Ντουλοξετίνη	30 – 120	9 – 19	240	2	Takano et al. 2006
Μιρταζαπίνη	30 – 80	20 – 40	160	2	Lind et al. 2009
Παροξετίνη	30 – 120	12 – 44	240	3	Meyer et al. 2004
Σερτραλίνη	10 – 150	26	300	2	Voineskos et al. 2007
Βενλαφαξίνη και μεταβολίτες	100 – 400	5 11	800	2	Bosse et al. 2008

Η παρακολούθηση θεραπευτικών επίπεδων στα τυπικά αντιψυχωσικά, όπως η αλοπεριδόλη θεωρείται ισχυρά συνιστώμενη αλλά και για τα άτυπα αντιψυχωσικά και συγκεκριμένα, για την αμισουλπρίδη, κλοζαπίνη, ολανζαπίνη και ρισπεριδόνη, όπου η υπερδοσολογία μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων. Στην περίπτωση της κλοζαπίνης, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα και της εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων. Αποτέλεσμα της παρακολούθησης των θεραπευτικών επιπέδων στη θεραπεία με αντιψυχωσικά είναι η αποφυγή της υπερδοσολογίας, γεγονός που για την πλειονότητα των ασθενών συμβάλει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους (Cooper 1978).

Παρακάτω παρουσιάζονται οι τυπικές ενδείξεις που συνηγορούν στην ανάγκη προσδιορισμού των αντιψυχωσικών και των αντικαταθλιπτικών στο πλάσμα του ασθενούς.

- i. Βελτιστοποίηση της δόσης μετά από την αρχική συνταγογράφηση ή μετά από αλλαγή της δόσης
- ii. Φάρμακα στα οποία η εφαρμογή της συστηματικής παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων είναι υποχρεωτική για την υγεία του ασθενούς
- iii. Υποψία μερικής ή ολικής μη συμμόρφωσης του πάσχοντα στη θεραπευτική αγωγή
- iv. Έλλειψη βελτίωσης της κλινικής εικόνας μετά τη λήψη των προτεινόμενων δόσεων
- v. Παρουσία παρενεργειών ή αντίθετα βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς μετά από προτεινόμενες δόσεις
- vi. Θεραπευτικό σχήμα με συνδυασμό φαρμάκων με γνωστές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα
- vii. Πρόληψη υποτροπών σε θεραπεία συντήρησης
- viii. Επανεμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου υπό επαρκείς δόσεις
- ix. Παρουσία γενετικών ιδιομορφιών που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των ADs και των APs
- x. Ασθενείς κατά την εγκυμοσύνη ή τον θηλασμό
- xi. Παιδιά και έφηβοι ασθενείς
- xii. Ηλικιωμένοι ασθενείς (>65 γ)
- xiii. Άτομα με νοητική αναπηρία
- xiv. Άτομα με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια ή με καρδιοαγγειακά νοσήματα
- xv. Ασθενείς με επιθετική και επικίνδυνη συμπεριφορά
- xvi. Εμφάνιση παρενεργειών μετά από αλλαγή του φαρμάκου από το πρωτότυπο σε γενόσημο ή αντίθετα.

Η εγκυρότητα των παραπάνω ενδείξεων για την εφαρμογή της παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων πρέπει να εξετάζεται για κάθε περίπτωση ασθενούς ξεχωριστά. Όπως κάθε διαγνωστικό τεστ στην κλινική πράξη, έτσι και η παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων για αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα πρέπει να διενεργείται μόνο όταν υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία ότι θα παρέχει απαντήσεις σε συγκεκριμένα ερωτήματα για τη θεραπεία του κάθε ασθενή.

Για τα APs και ADs με καλά ορισμένο ή με στενό θεραπευτικό εύρος έχει σημασία η μέτρηση των επιπέδων τους στο πλάσμα για τον καθορισμό της δοσολογίας κατά την αρχική συνταγογράφηση ή μετά από τροποποίηση αυτής. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος επιπέδων για τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά προτείνεται ακόμη και με απουσία παρενεργειών κατά τη θεραπεία του ασθενούς. Μια άλλη ένδειξη για την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων, είναι η ραγδαία αύξηση διαθεσιμότητας μη εγκεκριμένων φαρμάκων από το διαδίκτυο (Siva 2010). Ο WHO το 2006 με σκοπό την καταπολέμηση αυτής της παράνομης βιομηχανίας εξέδωσε ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα. Τα μη εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα μπορεί να μην έχουν την κατάλληλη καθαρότητα με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης τοξικών επιδράσεων από τη χρήση τους.

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, μελέτες προσδιορισμού θεραπευτικών επιπέδων έχουν νόημα να λαμβάνουν χώρα όταν υπάρχουν στοιχεία ότι τα αποτελέσματα τέτοιων ερευνών θα παρέχουν απαντήσεις σε συγκεκριμένα ερωτήματα. Μία και μοναδική μέτρηση ενός δείγματος δεν μπορεί να αποτελέσει λύση και να παρέχει βελτίωση στο θεραπευτικό σχήμα του ψυχιατρικά ασθενούς, αντίθετα πρέπει να γίνονται μια σειρά από μετρήσεις.

Μια συνηθισμένη τακτική είναι η δημιουργία πίνακα – ερωτηματολογίου όπου θα καταγράφονται οι σημαντικές πληροφορίες για τον εκάστοτε ασθενή. Τέτοια στοιχεία μπορεί να είναι το όνομα, το επώνυμο, ο κωδικός, διάφορα δημογραφικά στοιχεία, το φύλλο, η νόσος, τα χορηγούμενα φάρμακα, η δοσολογία και η ημερομηνία λήψης δείγματος. Η σωστή καταγραφή όλων των παραπάνω στοιχείων είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την ερμηνεία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων.

Ο γενικός κανόνας, είναι ότι η συστηματική παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων πραγματοποιείται στο πλάσμα ή στον ορό του ασθενή. Αναφέρεται ότι ο προσδιορισμός αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα έχει πλέον εγκαταλειφτεί. Για τα δύο



πρώτα βιολογικά υλικά δεν υπάρχουν οδηγίες που να καθορίζουν ποιο να χρησιμοποιείται ανά περίπτωση, επιπλέον δεν υπάρχουν πολλά πειραματικά δεδομένα όπου να δείχνουν διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ του πλάσματος και του ορού.

Ο προσδιορισμός θεραπευτικών επιπέδων APs και ADs σε άλλα βιολογικά υποστρώματα όπως είναι τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα δάκρια, οι τρίχες ή το μητρικό γάλα δεν μπορεί να γίνει για μελέτες συστηματικής παρακολούθησης, ενώ απουσιάζουν και επικυρωμένα ερευνητικά δεδομένα. Το σάλιο σαν εξεταζόμενο υλικό παρέχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να ληφθεί με μη επεμβατική μέθοδο (Hiemke et al. 2011, Aman et al. 2007, Aps et al. 2005, Kaufman et al. 2002). Ωστόσο, η συγκέντρωση του φαρμάκου στο σάλιο αντιπροσωπεύει μόνο το ελεύθερο κλάσμα αυτού (μη συνδεδεμένο με πρωτεΐνες) που για τα περισσότερα ψυχιατρικά φάρμακα είναι το 10% ή ακόμη λιγότερο της ολικής ποσότητας του φαρμάκου. Αποτέλεσμα αυτού είναι να παρουσιάζονται προβλήματα ανίχνευσης όταν γίνεται χρήση του σάλιου σαν εξεταζόμενο υπόστρωμα αντί του πλάσματος ή του ορού.

Με ελάχιστες εξαιρέσεις ο προσδιορισμός θεραπευτικών επιπέδων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων βασίζεται στη συγκέντρωσή τους στην κατάσταση ισορροπίας (πλατό), για τον λόγο αυτόν η δειγματοληψία πρέπει να πραγματοποιείται τουλάχιστον μετά από διάστημα τεσσάρων χρόνων ημιζωής από την έναρξη ή την τροποποίηση της δοσολογίας. Μεταξύ των φαρμάκων που εξετάζονται στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής εξαίρεση αποτελεί η κουετιαπίνη και η βενλαφαξίνη με χρόνους ημιζωής περίπου έξι ώρες. Αντίθετα η αριπιπραζόλη εμφανίζει μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής.

Στην κλινική πράξη ο καταλληλότερος χρόνος δειγματοληψίας για τον προσδιορισμό των APs και των ADs είναι μετά το πέρας μίας εβδομάδας, με σταθερή δόση ημερησίως και αμέσως πριν τη λήψη της πρωινής δόσης, όπου συνήθως είναι 12 με 16 ώρες μετά την τελευταία λαμβανόμενη δόση. Σε εξωτερικούς ασθενείς που η αγωγή δεν γίνεται μέσα στην κλινική είναι σημαντικό να δηλώνεται με ακρίβεια πότε λήφθηκε η τελευταία δόση του φαρμάκου, φυσικά όλα τα παραπάνω ισχύουν για λήψη της αγωγής δια στόματος. Σε περίπτωση που γίνεται εισαγωγή του φαρμάκου με ένεση τότε η λήψη του αίματος γίνεται ακριβώς πριν την εισαγωγή.

Οι διαφορετικές μοριακές φόρμουλες οδηγούν γενικά σε αύξηση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα, ενώ δεν φαίνεται

να αλλάζουν σημαντικά τους χρόνους ημιζωής. Για παράδειγμα, τα μακράς δράσης ενέσιμα αντιψυχωσικά, που είναι εστεροποιημένες μορφές αντιψυχωσικών, χορηγούνται ενδομυϊκώς (συνήθως ανά μήνα) με σκοπό να εξασφαλίσουν την τήρηση της φαρμακευτικής αγωγής εκ μέρους των ασθενών με σχιζοφρένεια. Αυτές οι μορφές φαρμάκων έχουν διαφορετική φαρμακοκινητική και πιθανόν διαφορετικές θεραπευτικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με τα από του στόματος χορηγούμενα (Lindenmayer et al. 2010, Hiemke et al. 2011).

Κατά τη σωστή εργαστηριακή πρακτική, τα δείγματα πλάσματος ή ορού πρέπει να αποθηκεύονται και να καταψύχονται. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, τα συγκεκριμένα βιολογικά υλικά μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C απουσία φωτός τουλάχιστον για 24 h (Heller et al. 2004, Hiemke et al. 2011). Ιδιαίτερη πρόνοια πρέπει να λαμβάνεται για φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν ευαισθησία στην παρουσία φωτός και οξυγόνου. Σε περίπτωση που προσδιορίζεται η βουπροπιόνη, είναι αναγκαία η άμεση κατάψυξη ή εκχύλιση του δείγματος ενώ η ολανζαπίνη αν δεν προσδιοριστεί εντός 72 h διασπάται σε περίπτωση αποθήκευσης του δείγματος σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από -20°C (Hiemke et al. 2011).

### **1.2.2 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε νεκροτομικό υλικό**

Στις περισσότερες χώρες και κυρίως σε αυτές με ανεπτυγμένες οικονομίες και συστήματα υγείας, η δηλητηρίαση από ψυχιατρικά φάρμακα είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο, είτε οφείλεται σε αυτοκτονία είτε σε ατύχημα. Εκτός από τις δηλητηριάσεις τα ADs και τα APs παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες όπου μπορούν να οδηγήσουν και στον θάνατο καθώς επίσης και σημαντική αύξηση των αυτοκτονικών τάσεων του ψυχιατρικού ασθενή. Σύμφωνα με τον WHO, τα αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωσικά συσχετίζονται με μία αυτοκτονία η οποία λαμβάνει χώρα κάθε τέσσερα δευτερόλεπτα καθώς επίσης αποτελούν τη βασική αιτία βίαιων θανάτων σε παγκόσμια κλίμακα.

Για όλους τους παραπάνω λόγους καθίσταται αναγκαία και σημαντική η προσπάθεια για ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού των συγκεντρώσεων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε νεκροτομικό υλικό.

Η τοξικολογική ανάλυση, σε θάνατο οφειλόμενο από αντικαταθλιπτικά ή αντιψυχωσικά καθίσταται μία αρκετά δύσκολη διαδικασία για τους παρακάτω λόγους:

- i. Άγνωστη η αβέβαιη η δραστική ουσία που χρειάζεται να προσδιοριστεί

- ii. Ύπαρξη περισσότερων του ενός αντικαταθλιπτικού – αντιψυχωσικού ή και συνδυασμού αυτών
- iii. Άγνωστο χρονικό διάστημα μεταξύ της λήξης του φαρμάκου και της στιγμής του θανάτου
- iv. Έλλειψη νεκροτομικών ευρημάτων
- v. Μεταθανάτιες αλλαγές
- vi. Ταχύς μεταβολισμός της μητρικής ουσίας
- vii. Συχνά έλλειψη κατάλληλων εργαστηριακών υποδομών και ενόργανων διατάξεων.

Κατά τη διενέργεια της νεκροψίας–νεκροτομής (N-N) υπάρχει η δυνατότητα δειγματοληψίας διάφορων βιολογικών υλικών. Η επιλογή των φαρμάκων που μας ενδιαφέρουν για ανάλυση είναι καθοριστικής σημασίας, αφού δεν είναι όλα τα βιολογικά υλικά κατάλληλα για την ανίχνευση όλων των δραστικών ουσιών (Μπούμπα 2006).

Όπως προαναφέρθηκε, στην κλινική τοξικολογία τα βιολογικά υλικά που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται είναι ο ορός ή το πλάσμα και σπανιότερα τα ούρα. Στην περίπτωση όμως των νεκροτομικών δειγμάτων ο αριθμός τους είναι δυνητικά μεγάλος και περιλαμβάνουν συνήθως μεταθανάτιο αίμα από περιφερικές θέσεις ή/και από την καρδιά, ούρα, ήπαρ, πνεύμονα, χολή, γαστρικό περιεχόμενο ενώ σπανιότερα λαμβάνονται υλικά όπως υαλοειδές υγρό, εγκέφαλος, μυϊκός ιστός, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, λιπώδης ιστός, οστίτης ιστός και ενδοθωρακικό υγρό. Υπάρχει και η δυνατότητα ανάλυσης εναλλακτικών βιολογικών υλικών όπως οι τρίχες και τα νύχια (κερατινοποιημένοι ιστοί) (Flanagan, Taylor, Watson, Whelpton, 2007, Skopp 2004).

Η δειγματοληψία των βιολογικών υλικών απαιτείται να πραγματοποιείται το ταχύτερο δυνατό μετά τον θάνατο κατά τη διάρκεια της νεκροτομής και το κάθε δείγμα πρέπει να τοποθετείται σε διαφορετικό περιέκτη (Skopp 2004).

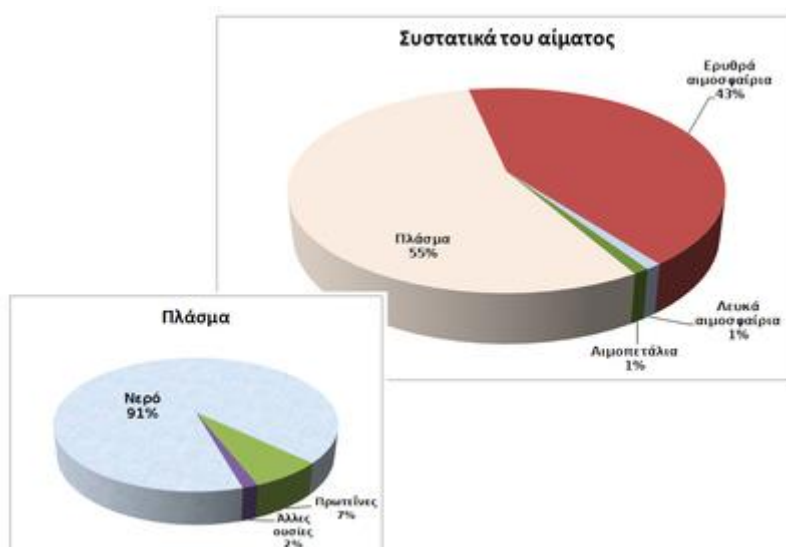
Σε όλους τους περιέκτες πρέπει να αναγράφεται το πλήρες όνομα του θανόντος, η ημερομηνία δειγματοληψίας και ο αριθμός πρωτοκόλλου του περιστατικού (Flanagan, Taylor, Watson, Whelpton, 2007, Skopp 2004), ενώ στα δείγματα αίματος πρέπει να διευκρινίζεται και η θέση συλλογής τους. Κάθε περιέκτης πρέπει να κλείνεται καλά και να τοποθετείται σε πλαστική σακούλα, ξεχωριστά μεταξύ τους προς αποφυγή ανάμειξης των δειγμάτων σε περίπτωση διαρροής. Για τη συντήρηση των βιολογικών δειγμάτων μέχρι την ανάλυσή τους χρησιμοποιείται συνήθως το νατραζίδιο (NaH 0,1% w/v) ή το φθοριούχο νάτριο (NaF 1% w/v) ως συντηρητικό (Μπούμπα 2006).

**Πίνακας 5:** Προτεινόμενα νεκροτομικά υλικά για τοξικολογική ανάλυση (Negrusz, Cooper 2013)

<b>Νεκροτομικό υλικό</b>	<b>Ποσότητα</b>
Αίμα από καρδιακή κοιλότητα	25 mL
Αίμα από περιφερικές θέσεις	10 mL
Εγκέφαλος	100 g
Ήπαρ	100 g
Υαλοειδές υγρό	Όσο είναι διαθέσιμο
Χολή	Όσο είναι διαθέσιμο
Ούρα	Μέχρι 100 mL
Γαστρικό περιεχόμενο	Όσο είναι διαθέσιμο

## A. Αίμα

Αποτελεί το υπόστρωμα επιλογής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των περισσότερων φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Οι συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο αίμα μπορούν να αξιολογηθούν ανάλογα ως θεραπευτικές, τοξικές ή θανατηφόρες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός εκτελείται συνήθως σε αίμα που λαμβάνεται από περιφερικές θέσεις. Σε περιστατικά όπου υπάρχει σοβαρό τραύμα, το αίμα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για ποιοτικό προσδιορισμό ουσιών, επειδή μπορεί να έχει επιμολυνθεί από άλλα σωματικά υγρά ή ιστούς (Μπούμπα 2006). Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις το μεταθανάτιο (ολικό αίμα) παρουσιάζει αρκετούς μικρούς θρόμβους. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή γιατί η συγκέντρωση των αναλυτών μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη θέση της δειγματοληψίας.



**Σχήμα 9:** Συστατικά αίματος και πλάσματος (Vasiliadis)

Για την τοξικολογική ανάλυση θα πρέπει να συλλέγονται το λιγότερο δύο δείγματα αίματος, σε αποστειρωμένους περιέκτες παρουσία αντιπηκτικού παράγοντα. Το πρώτο δείγμα, όγκου περίπου 30 mL, πρέπει να συλλέγεται από μία περιφερική θέση χωρίς συντηρητικό, ενώ στο δεύτερο δείγμα όγκου 2–5 mL, πρέπει να προστίθεται συντηρητικό για να ανασταλεί η περαιτέρω δράση μικροοργανισμών που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα, έτσι παραμένει σταθερή η συγκέντρωση της αιθανόλης (Μπούμπα 2006, Skorr 2004).

## Β. Ούρα

Τα ούρα είναι ένα χρήσιμο υλικό για τοξικολογική ανάλυση, καθότι αποτελείται σε ποσοστό 99% από νερό και περιέχει σχετικά μικρό αριθμό παρεμποδίζουσων ουσιών όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, παρόλα αυτά τα ούρα σαν υλικό εξέτασης στην αναλυτική δικαστική τοξικολογία παρουσιάζει και συγκεκριμένα μειονεκτήματα.

Αρχικά, τα ούρα σαν βιολογικό υλικό είναι διαθέσιμα στο 50% των περιστατικών του νεκροτομείου. Κατά τη διαδικασία του θανάτου είναι αρκετά συχνό το φαινόμενο της απώλειας ούρων, λόγω χάλασης των σφιγκτήρων της ουροδόχου κύστης (Κουτσελίνης 2002). Για τον λόγο αυτόν δεν είναι αρκετά χρήσιμη η διαδικασία ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθοδολογίας με μοναδικό υπόστρωμα τα ούρα.

Δεύτερον, πολλά φάρμακα όπως τα αντικαταθλιπτικά και τα αντιψυχωσικά μεταβολίζονται σε αρκετά μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα η μητρική ένωση να μην μπορεί να προσδιοριστεί στα ούρα ή να ανιχνεύεται μόνο σε ίχνη. Στις περιπτώσεις όμως που μπορεί να γίνει προσδιορισμός μεταβολιτών, όταν είναι μάλιστα φαρμακολογικά δραστικοί, τα ούρα αποτελούν ένα σημαντικό βιολογικό υλικό.

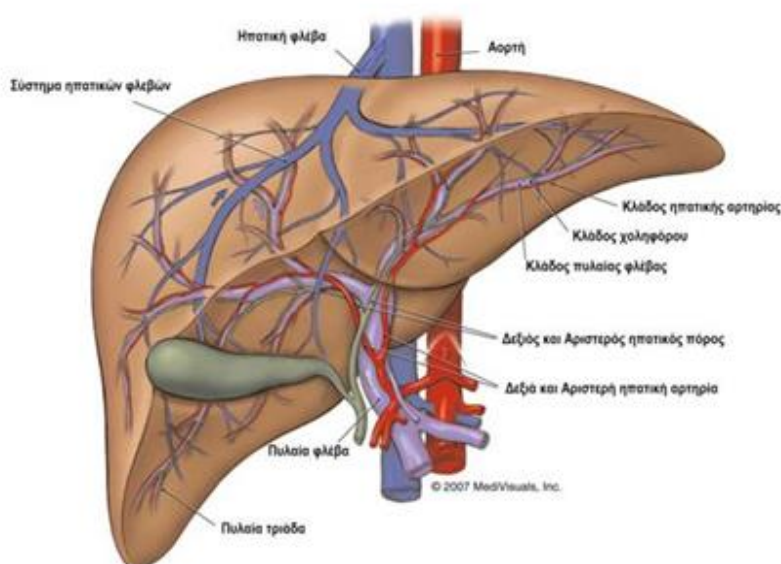
Το τρίτο μειονέκτημα που παρουσιάζουν τα ούρα είναι πως η προσδιοριζόμενη τιμή συγκέντρωσης των ADs ή των APs, πολύ δύσκολα μπορεί να ερμηνευτεί και να συσχετιστεί με αυτή του αίματος, ο κύριος λόγος είναι ότι τα ούρα δεν αποτελούν βιολογικό υγρό το οποίο βρίσκεται στη βασική κυκλοφορία του οργανισμού αλλά προϊόν απέκκρισης που συλλέγεται από την ουροδόχο κύστη. Η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων φαρμάκων εξαρτάται από τον χρόνο σχηματισμού των ούρων σε σχέση με τον χρόνο δειγματοληψίας και με την εισαγωγή του φαρμάκου στον οργανισμό, βέβαια σε αντίθεση με το αίμα τα ούρα παρουσιάζουν το πλεονέκτημα του μεγαλύτερου χρονικού εύρους ανίχνευσης (detection window) των προσδιοριζόμενων αναλυτών (Negrusz, Cooper 2013). Κατά τη δειγματοληψία συλλέγεται όλο το περιεχόμενο της ουροδόχου κύστης, σε αποστειρωμένο περιέκτη και συνήθως με προσθήκη συντηρητικού παράγοντα (Μπούμπα 2006).

## Γ. Ήπαρ

Κατά τη διάρκεια της νεκροψίας – νεκροτομής υπάρχει η δυνατότητα συλλογής δειγμάτων από διάφορους ιστούς, παρόλα αυτά ο πιο σημαντικός για την αναλυτική δικαστική τοξικολογία είναι το ήπαρ. Οι βασικοί λόγοι που το καθιστούν τον πιο σημαντικό από τους ιστούς για προσδιορισμό διαφόρων φαρμάκων όπως αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών είναι η μεγάλη διαθέσιμη ποσότητα δείγματος, η ευκολία στη συλλογή και

στην επεξεργασία του συγκεκριμένου ιστού σε σχέση με άλλους, όπως και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα στη βιβλιογραφία. Οι συγκεντρώσεις πολλών φαρμάκων είναι πολύ υψηλότερες στο ήπαρ σε σχέση με αυτές του αίματος, στοιχείο που κάνει την ανίχνευσή τους ευκολότερη, για παράδειγμα, τα επίπεδα των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών στο ήπαρ είναι 10 με 50 φορές μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά του αίματος (Negrusz, Cooper 2013).

Σήμερα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας και των πολύ ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών η πλειοψηφία των αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών προσδιορίζεται στο αίμα και δεν απαιτείται η ανάλυση του ήπατος. Παρόλα αυτά, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βιολογικό υλικό για εξέταση και αυτό γιατί φάρμακα τα οποία υφίστανται μεταθανάτια ανακατανομή, οι συγκεντρώσεις τους στο ήπαρ παραμένουν σχετικά σταθερές μετά τον θάνατο, έτσι τα εξαγόμενα επίπεδα συγκεντρώσεων μετά την ανάλυση είναι κατάλληλα για ερμηνεία και συσχέτιση στον μηχανισμό θανάτου. Επίσης έχει παρατηρηθεί σε μερικά σημεία του ήπατος αύξηση των συγκεντρώσεων, φαινόμενο το οποίο αποδίδεται στη μεταθανάτια διάχυση των ADs και APs από το στομάχι. Το βασικό μειονέκτημα του ήπατος ως δείγμα στην αναλυτική τοξικολογία είναι η μεγάλη περιεκτικότητά του σε λίπος με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ταχύτερη σήψη σε σχέση με το αίμα, ως εκ τούτου απαιτούνται μεθοδολογίες εκχύλισης που να περιλαμβάνουν και στάδια καθαρισμού του εκχυλίσματος (clean-up) (Negrusz, Cooper 2013).

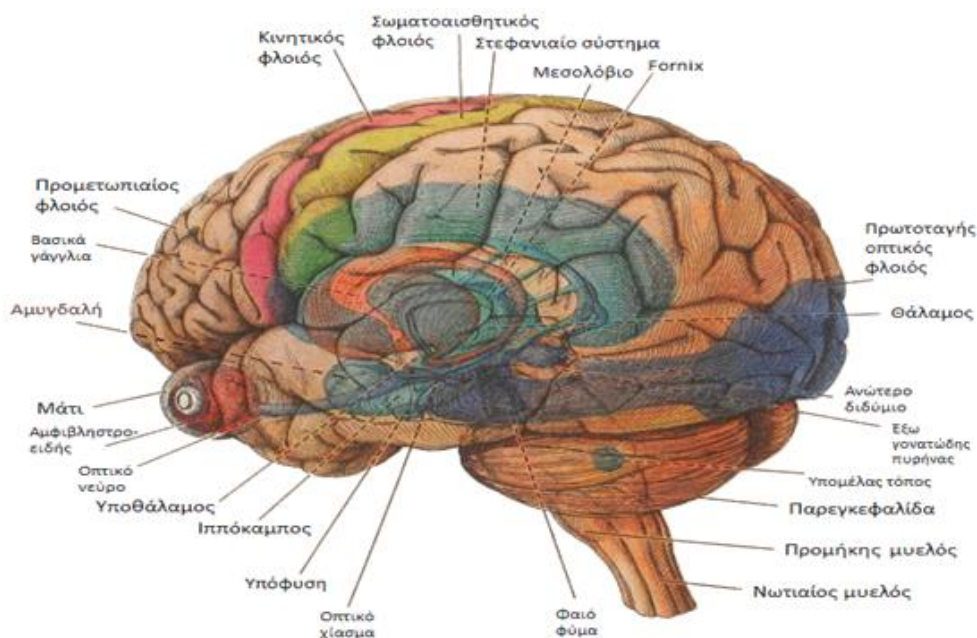


**Σχήμα 10:** Ανατομία ήπατος

Ποσότητα δείγματος ίση με 100–250 g (Μπούμπα 2006), πρέπει να λαμβάνεται από το εσωτερικό του δεξιού λοβού του ήπατος για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης από τη χολή και λόγω του ότι η διάχυση των τοξικών ενώσεων από το στομάχι είναι λιγότερο πιθανή σε σχέση με τη λήψη δείγματος από τον αριστερό λοβό (Flanagan, Taylor, Watson, Whelpton 2007, Skorrp 2004). Μετά τη δειγματοληψία ο ιστός πρέπει να τοποθετείται σε πλαστικό περιέκτη.

#### Δ. Εγκέφαλος

Αποτελεί το όργανο στόχο φαρμάκων όπως τα αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωσικά. Σαν ιστός προς ανάλυση ο εγκέφαλος παρουσιάζει το πλεονέκτημα της σχετικής απομόνωσής του ως όργανο και της δυσκολίας να επηρεαστεί από τραυματισμούς σε άλλα μέρη του σώματος όπως ο θώρακας ή η κοιλιακή χώρα (Negrusz, Cooper 2013). Αντίθετα βασικό μειονέκτημα στην ανάλυση αυτού του ιστού είναι η ανομοιογενή κατανομή των ουσιών στα διάφορα τμήματα του εγκεφάλου με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Συνήθως, η λαμβανόμενη ποσότητα δείγματος είναι 100 g και τοποθετείται σε γυάλινους περιέκτες ή σε νάιλον σακούλες (Μπούμπα 2006, Skorrp 2004).



**Σχήμα 11:** Ανατομία εγκεφάλου



Οι προδιαγραφές που ισχύουν για τα προαναλυτικά στάδια στην κλινική χημεία πρέπει να εφαρμόζονται και στην αναλυτική τοξικολογία. Τα νεκροτομικά υλικά εμφανίζουν πολλές ιδιαιτερότητες με αποτέλεσμα να τηρούνται επιπλέον προδιαγραφές ασφαλείας (Μπούμπα 2006, Ράλλης 2012).

Παρακάτω παρουσιάζονται οι παράγοντες οι οποίοι δυσχεραίνουν την εκτέλεση μιας τοξικολογικής ανάλυσης:

#### A. Έλλειψη πληροφοριών

Η πλήρη συλλογή πληροφοριών που αφορούν το κάθε περιστατικό είναι βασικής σημασίας για τον σχεδιασμό κάθε τοξικολογικής ανάλυσης, ώστε να καταστεί δυνατή η αξιόπιστη και ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Μπούμπα 2006, Skorrp 2004, (Negrusz, Cooper 2013).

#### B. Δειγματοληψία

Αποτελεί το πιο σημαντικό βήμα για μία ακριβή και αξιόπιστη τοξικολογική ανάλυση. Η δειγματοληψία αποσκοπεί στη λήψη ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος σε σχέση με το σύνολο, κατάλληλο για ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το στάδιο η συνεργασία ιατροδικαστή και χημικού-τοξικολόγου είναι καθοριστική, ώστε να ληφθούν με κατάλληλο τρόπο τα απαιτούμενα νεκροτομικά δείγματα (Μπούμπα 2006).

#### Γ. Αποσύνθεση

Η αποσύνθεση ενός πτώματος περιλαμβάνει τις διεργασίες της αυτόλυσης και της σήψης. Τα ένζυμα που φυσιολογικά υπάρχουν στο σώμα επιφέρουν αυτολυτικές αλλαγές, ενώ η σήψη επέρχεται από τη μικροβιακή δραστηριότητα (Skorrp 2004). Η ανάλυση βιολογικών υγρών και ιστών σε σεσηπτότα περιστατικά είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω των παρεμποδίζουσων ουσιών που ενδογενώς παράγονται αλλά και από τη μεταθανάτια αποικοδόμηση της προσδιοριζόμενης ουσίας (Stevens 1984).

#### Δ. Συντήρηση ιστών σε φορμαλδεΐδη

Σε περιπτώσεις που ο ιστός συντηρείται σε υγρό μονιμοποίησης μπορεί να έχουμε μερική ή ολική απώλεια του αναλύτη, λόγω διάχυσης από τον ιστό προς το υγρό συντήρησης (Winek et al. 1993).

## Ε. Σταθερότητα δειγμάτων κατά την αποθήκευση

Κατά την αποθήκευση ενός νεκροτομικού υλικού μπορεί να λάβει χώρα αποικοδόμηση του αναλύτη λόγω βιολογικών και χημικών παραγόντων. Η σταθερότητα ενός βιολογικού υλικού καθορίζει τον μέγιστο χρόνο αποθήκευσης του δείγματος κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, έτσι ώστε η ποσότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας να παραμείνει αναλλοίωτη μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης (Μπούμπα 2006, Skorrp 2004).

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντες που επηρεάζει την ερμηνεία στον προσδιορισμό συγκεντρώσεων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε νεκροτομικά υλικά είναι το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής (postmortem redistribution – PMR). Λόγω της σπουδαιότητας που παρουσιάζει αναπτύσσεται ξεχωριστά παρακάτω.

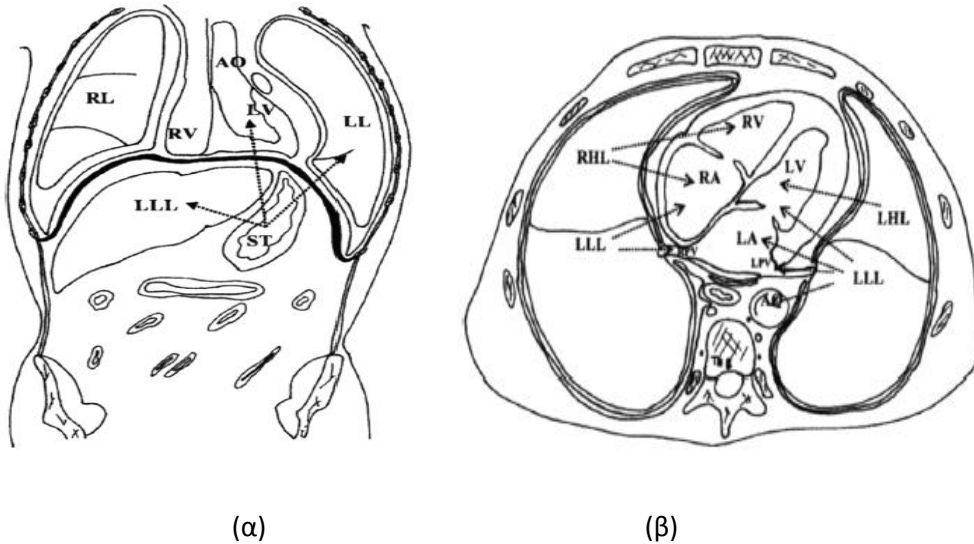
### 1.2.2.1 Μεταθανάτια ανακατανομή

Ο συγκεκριμένος όρος έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την κίνηση των φαρμάκων μέσα στο σώμα μετά τη στιγμή του θανάτου. Αποτέλεσμα του φαινομένου της PMR είναι οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στο αίμα να είναι σημαντικά μεγαλύτερες κατά τη Ν-Ν σε σχέση μετά τη στιγμή του θανάτου. Η μεταθανάτια ανακατανομή είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις βασικούς μηχανισμούς που ο καθένας επηρεάζει σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό.

Ο πρώτος και βασικότερος μηχανισμός στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι η απελευθέρωση και διάχυση των φαρμάκων μετά τον θάνατο από ιστούς ή όργανα που παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών όπως είναι το ήπαρ σε κοντινά αιμοφόρα αγγεία. Ο ακριβής μηχανισμός σε μοριακό επίπεδο δεν έχει γίνει ακόμη πλήρως κατανοητός, αλλά είναι γνωστό ότι μετά τον θάνατο λαμβάνουν χώρα αλλαγές στις τιμές του pH όπως και στη δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων. Βέβαια πρέπει να τονιστεί πως όλα τα ADs και APs δεν παρουσιάζουν τον ίδιο βαθμό μεταθανάτιας ανακατανομής γιατί άλλα βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ιστούς και άλλα στο αίμα (Negrusz, Cooper 2013).

Ο δεύτερος μηχανισμός που έχει προταθεί είναι η απλή διάχυση των προσδιοριζόμενων ουσιών από περιοχές του σώματος που υπάρχει περίσσεια του εκάστοτε φαρμάκου όπως στο γαστρικό περιεχόμενο. Ο μηχανισμός αυτός δεν πρέπει να συσχετίζεται με τον προηγούμενο. Οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες στη διάχυση λόγω

τραυματισμού του στομάχου και στην εισρόφηση στομαχικού περιεχόμενου στους πνεύμονες λόγω εμέτου κατά τη στιγμή του θανάτου ή χειρισμού του πτώματος. Η έκταση του φαινομένου είναι σαφώς ανάλογη της συγκέντρωσης των φαρμάκων στη στομαχική κοιλότητα.



**Σχήμα 12:** (α) Κατά μέτωπο όψη του θώρακα και της κοιλιακής χώρας διαμέσου της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταθανάτιας ανακατανομής από το στομάχι στα διάφορα όργανα (RL: δεξιός πνεύμονας, LL: αριστερός πνεύμονας, AO: αορτή, RV: δεξιά κοιλία καρδιάς, LV: αριστερή κοιλία καρδιάς, ST: στομαχική κοιλότητα και LLL: αριστερός λοβός ήπατος). (β) Κάθετη τομή διαμέσου του όγδοου θωρακικού σπονδύλου. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταθανάτιας ανακατανομής από τους πνεύμονες στα διάφορα όργανα. Η διάχυση λαμβάνει χώρα από τις πνευμονικές φλέβες (LPV: αριστερή πνευμονική φλέβα, RPV: δεξιά πνευμονική φλέβα, LA: αριστερός κόλπος, LV: αριστερή κοιλία καρδιάς, AO: αορτή, LHL: πάνω αριστερός λοβός πνεύμονα, LLL: κάτω αριστερός λοβός πνεύμονα, RHL: πάνω δεξιός λοβός πνεύμονα, RLL: κάτω δεξιός λοβός πνεύμονα, RA: δεξιός κόλπος, RV: δεξιά κοιλία καρδιάς) (Pélissier-Alicot et al. 2003)

Έχει παρατηρηθεί ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μία και μόνο θεραπευτική δόση μπορεί να οδηγήσει 10 με 100 φορές σε λανθασμένη τιμή συγκέντρωσης σε δείγμα αίματος από τη θωρακική κοιλότητα (Negrusz, Cooper 2013).

Ο τρίτος μηχανισμός περιλαμβάνει την ατελή κατανομή των φαρμάκων τη στιγμή του θανάτου. Το γεγονός αυτό, παρατηρείται και σε φάρμακα που παρουσιάζουν το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής σε μικρό βαθμό ή και καθόλου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τυχόν διαφορετικές συγκεντρώσεις αντικαταθλιπτικών ή αντιψυχωσικών σε διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας να μην υποδηλώνουν απαραίτητα ένδειξη PMR (Negrusz, Cooper 2013).

Έχει παρατηρηθεί πως το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στα βασικά, μη πολικά φάρμακα που χαρακτηρίζονται από μεγάλο όγκο κατανομής  $V_d > 3 \text{ L/Kg}$  (Saar et al. 2012, Prouty et al. 1990, Pounder 1993, Pounder et al. 1990, Leikin et al. 2003, Hilberg et al. 1999). Κατά τη διαδικασία λύσης των κυττάρων τα φάρμακα βασικού χαρακτήρα διαχέονται με μεγαλύτερη ευκολία στα βιολογικά υγρά, φαινόμενο που οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης αυτών στο αίμα (Saar et al. 2012, Yarema et al. 2005). Τα περισσότερα αντιψυχωσικά φάρμακα εμφανίζουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα να υπόκεινται στο φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής, κάτι το οποίο μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς.

Τα πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν ληφθεί από μελέτες σε πειραματόζωα στοχεύοντας μόνο σε ένα ή σε ελάχιστα αντιψυχωσικά (Saar et al. 2012, Flanagan et al. 2003, Castaing et al. 2006, Aravagiri et al. 1999) και σε ανθρώπινους ιστούς λαμβανόμενους κατά τη διαδικασία νεκροψίας – νεκροτομής (Saar et al. 2012, Jenkins et al. 1998, Horak et al. 2005, Hoppenwasser et al. 2004, Cooper et al. 1981, Meeker et al. 1992, Merrick et al. 2001, Anderson et al. 2000, Rodda et al. 2006). Αυτές οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί περισσότερο στη δειγματοληψία και στο σημείο αυτής, παρά στην επίδραση του χρονικού διαστήματος μετά τη στιγμή του θανάτου (Post-Mortem time Interval – PMI). Μέτρο εκτίμησης της μεταθανάτιας ανακατανομής είναι ο λόγος της συγκέντρωσης του αναλύτη από αίμα λαμβανόμενο από την καρδιακή κοιλότητα προς αίμα από τη μηριαία αρτηρία.

Η συσχέτιση της μεταθανάτιας ανακατανομής των APs και του χρόνου παρέλευσης μετά τον θάνατο μελετήθηκε από τον Drummer και την ομάδα του (Saar et al. 2012). Σύμφωνα με την παραπάνω ερευνητική εργασία η πλειονότητα των φαρμάκων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.01$ ) στη συγκέντρωση από τη στιγμή εισαγωγής στο

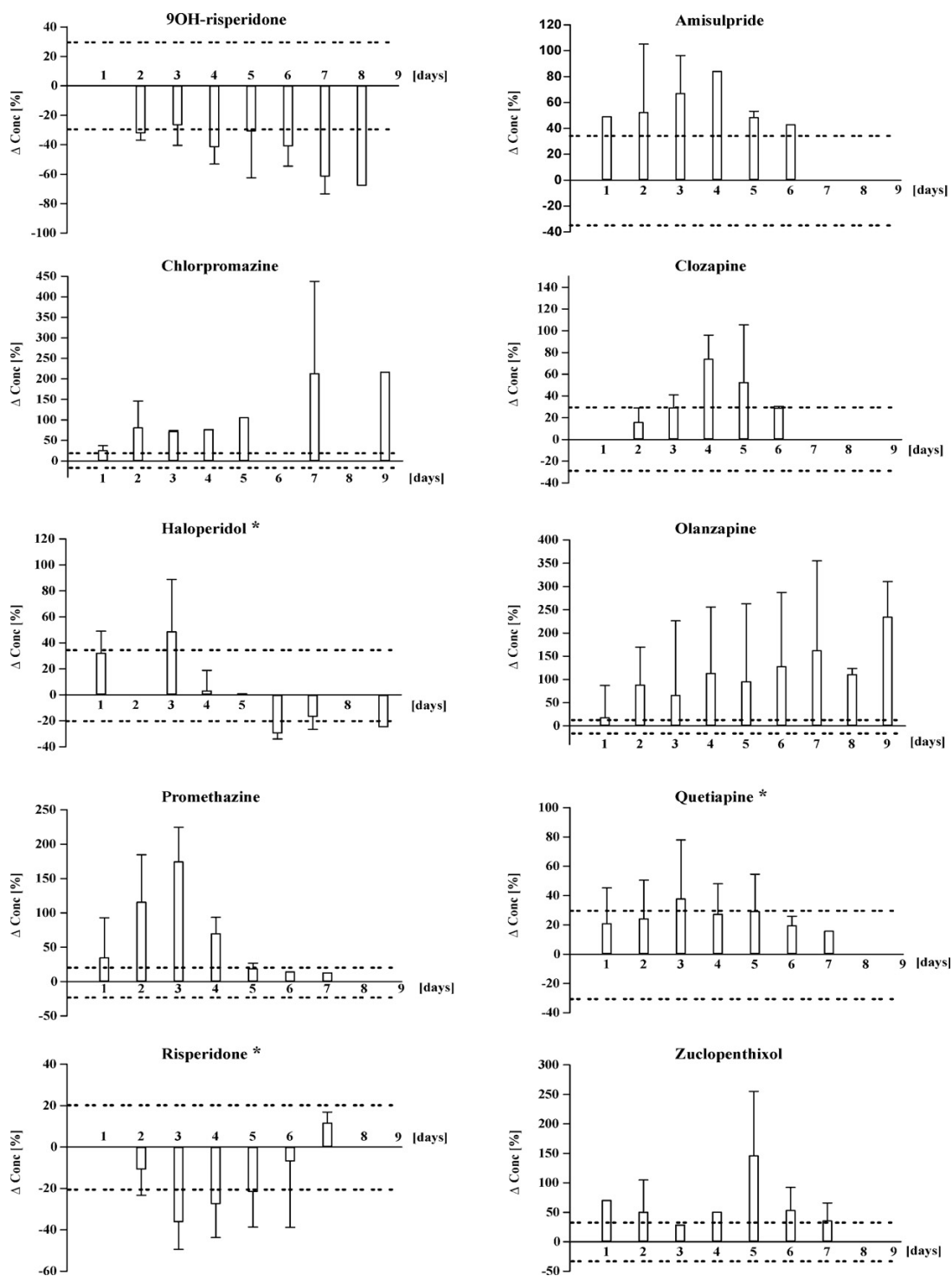
νεκροτομείο μέχρι τη διενέργεια της νεκροψίας – νεκροτομής και συγκεκριμένα με μέσο όρο μεγαλύτερο του 40%. Η συγκέντρωση της ολανζαπίνης στο αίμα αυξάνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 112%, αντίθετα μείωση κατά 43% παρατηρείται στην περίπτωση της παλιπεριδόνης (9-OH-ρισπεριδόνης) σε χρονικό διάστημα από μία έως οκτώ ημέρες.

Η παλιπεριδόνη είναι ο φαρμακολογικά δραστικός μεταβολίτης της ρισπεριδόνης με βαθμό πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα περίπου 77% και συντελεστή κατανομής (log P) 2,3. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι λιγότερο πιθανό σε σχέση με τη ρισπεριδόνη μία κατανομή στους ιστούς μετά τη στιγμή του θανάτου (Saar et al. 2012). Σχετικά με τη ρισπεριδόνη, είναι ο μόνος αναλύτης που η συγκέντρωσης στο αίμα παρουσιάζει μείωση κατά 15% με μία χαρακτηριστική όμως αύξηση την έβδομη ημέρα από την εισαγωγή στο νεκροτομείο. Επίσης, το συγκεκριμένο φάρμακο έχει μικρό όγκο κατανομής (0,7 – 2,1 L/Kg) με αποτέλεσμα να μην υπόκειται στο φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον θάνατο (Saar et al. 2012).

Η ολανζαπίνη επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής, οι συγκεντρώσεις της οποίας παρουσιάζουν αύξηση σε ποσοστό ~ 112% σε διάστημα εννέα ημερών από τη στιγμή του θανάτου (>100% στις πρώτες τέσσερις ημέρες). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος αναλύτης χαρακτηρίζεται από μικρή σταθερότητα (Saar et al. 2010). Αντίθετα, άλλες μελέτες όπως του Horak και Jenkins (Jenkins et al. 1998, Horak et al. 2005) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός μεταθανάτιας ανακατανομής της ολανζαπίνης είναι μικρός. Ο παρατηρούμενος βαθμός διακύμανσης των συγκεντρώσεων ολανζαπίνης οφείλεται στη μεγάλη αβεβαιότητα των εξαγόμενων αποτελεσμάτων από μελέτες βασιζόμενες σε ένα μόνο περιστατικό (Saar et al. 2012).

Οι συγκεντρώσεις της κλοζαπίνης εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αύξηση στις πρώτες τρεις ημέρες από τη χρονική στιγμή του θανάτου, εύρημα το οποίο έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε έρευνες από νεκροτομικό υλικό (Saar et al. 2012) όσο και από πειραματόζωα (Flanagan et al. 2003). Σχετικά με τη μεταθανάτια ανακατανομή της αμισουλπρίδης, έχει παρατηρηθεί μικρή αύξηση της συγκέντρωσής της, με μέγιστη τιμή μετά από χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών (>80%) (Saar et al. 2012). Η συγκέντρωση της κουετιαπίνης σε διάστημα επτά ημερών αυξάνεται κατά 25% (Saar et al. 2012). Παρόλα αυτά υπάρχουν και ερευνητικές εργασίες με αντικρουόμενα συμπεράσματα από την παραπάνω παρατήρηση (Merrick et al. 2001, Parker et al. 2005), γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στο χρονικό διάστημα από τη στιγμή του θανάτου. Η αλοπεριδόλη, είναι το μόνο αντιψυχωσικό όπου οι μεταβολές της

συγκέντρωσής της κατά το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής δεν είναι στατιστικά σημαντικές (Saar et al. 2012).



**Σχήμα 13:** Μεταβολή συγκέντρωσης στο αίμα από τη χρονική στιγμή του θανάτου έως διάστημα εννέα ημερών (Saar et al. 2012)

Το φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων έχει μελετηθεί σε αρκετά μικρό βαθμό με αποτέλεσμα η διαθέσιμη βιβλιογραφία να είναι περιορισμένη. Όπως και στην περίπτωση των αντιψυχωσικών, μέτρο εκτίμησης αποτελεί ο λόγος της συγκέντρωσης του αναλύτη σε αίμα λαμβανόμενο από την καρδιακή κοιλότητα προς αίμα από τη μηριαία αρτηρία. Δημοσιευμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η μιρταζαπίνη πιθανόν να υπόκειται σε μεταθανάτια ανακατανομή, η βενλαφαξίνη σε μικρό βαθμό, ενώ αντίθετα η σερτραλίνη παρουσιάζει έντονα το φαινόμενο (Han et al. 2012, McIntyre et al. 2012).

Γενικά, η επίδραση της μεταθανάτιας ανακατανομής στις συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων φαρμάκων είναι τόσο απρόβλεπτη που έχει χαρακτηριστεί και ως «τοξικολογικός εφιάλτης» (Pounder et al. 1990).

### 1.3 Μεθοδολογίες εκχύλισης και χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού

Στην αναλυτική τοξικολογία για την πραγματοποίηση ευαίσθητων και αξιόπιστων ποσοτικών προσδιορισμών αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων – και γενικότερα κάθε αναλύτη – δύο παράγοντες είναι μέγιστης σημασίας. Ο πρώτος είναι η επεξεργασία του δείγματος, η ανάπτυξη δηλαδή και εφαρμογή μεθοδολογιών εκχύλισης – προσυγκέντρωσης με σκοπό την απομόνωση των αναλυτών και κατόπιν αυτού ο προσδιορισμός των συστατικών του εκχυλίσματος με σύγχρονες τεχνικές διαχωρισμού αέριας και υγρής χρωματογραφίας.

#### 1.3.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης

Η διαδικασία της εκχύλισης αποτελεί το πρώτο βήμα στην ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών σε βιολογικά υποστρώματα. Η μεγάλη ποικιλία αναλυτών, που αφορούν την τοξικολογία, χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες στοιχείο που αποτελεί πρόκληση για την ανάλυσή τους. Επιπλέον, πολλά από τα προσδιοριζόμενα φάρμακα ή τοξικές ουσίες βρίσκονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις στο προς εξέταση δείγμα. Για τον λόγο αυτό η επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου εκχύλισης βασίζεται τόσο στον διαχωρισμό και απομόνωση των προσδιοριζόμενων ουσιών από τις παρεμποδίζουσες ουσίες (purification), όσο και στη δυνατότητα αύξησης της συγκέντρωσης αυτών στο τελικό εκχύλισμα (enrichment). Πολλές φορές τα στάδια της επεξεργασίας του δείγματος είναι ιδιαίτερα επίπονα και χρονοβόρα, παρόλα αυτά όμως, αποτελούν προϋπόθεση για την επίτευξη επιτυχημένων χρωματογραφικών προσδιορισμών (Negrusz, Cooper 2013).

Κατά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών εκχύλισης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών, τα επίπεδα συγκέντρωσης αυτών στα προς εξέταση βιολογικά υποστρώματα, η φύση των δειγμάτων και φυσικά οι ενόργανες διατάξεις που διαθέτει το εκάστοτε εργαστήριο αναλυτικής τοξικολογίας (Negrusz, Cooper 2013).

Για τον προσδιορισμό αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά έχουν εφαρμοστεί διάφορες μεθοδολογίες εκχύλισης όπως:

- i. Υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) (Wohlfarth et al. 2011, Llerena et al. 2001, Paterson et al. 2004, Amundsen et al. 2013, Kirchherr et al. 2006, Malfar et al. 2007, Josefsson et al. 2010)



- ii. Υγρή-στερεή εκχύλιση (SPE) (Proença et al. 2013, Meulder et al. 2008, Frahnert et al. 2003, Vardakou et al. 2010, Choong et al. 2009, Papoutsis et al. 2012, Wille et al. 2005, Wille et al. 2007 Castro et al. 2008, Ohman et al. 2001, Bhatt et al. 2005)
- iii. Υγρή-στερεή μικροεκχύλιση (SPME) (Chaves et al. 2009, Silva et al. 2008)
- iv. Εκχύλιση μέσω διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) (Li et al. 2016, Samanidou et al. 2011)
- v. Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση μέσω διασποράς διαλύτη (DLLME) (Xiong et al. 2009)
- vi. Εκχύλιση μέσω προσροφητικού αναδευτήρα (SBSE) (Unceta et al. 2010, Melo et al. 2009, Fernandes et al. 2008, Chaves et al. 2007, Bazhdanzadeh et al. 2011)
- vii. Μικροεκχύλιση μέσω πακτωμένου προσροφητικού (MEPS) (Mandrioli et al. 2011, Chaves et al. 2010)
- viii. Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE) (Woźniakiewicz et al. 2008)
- ix. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE) (Li et al. 2013)
- x. Εκχύλιση με ηλεκτρομεμβράνη (EME) (Eibak et al. 2014a, Eibak et al. 2014b)
- xi. Καθίζηση πρωτεϊνών (PP) (Ansermot et al. 2013, Uřinová et al. 2012, Kousoulos et al. 2007)
- xii. Εκχύλιση QuEChERS (Alves et al. 2017, Licata et al. 2016).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή για τον προσδιορισμό των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υποστρώματα μελετήθηκαν η υγρή-στερεή εκχύλιση και η υγρή-υγρή εκχύλιση, και αυτό γιατί χρησιμοποιούνται ευρέως για αναλυτικούς σκοπούς κυριαρχώντας στο πεδίο των βιοαναλυτικών εφαρμογών.

### **1.3.1.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction – LLE)**

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιείται διαλύτης μη αναμίξιμος με το δείγμα. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Αφού διαχωριστούν τα μη-αναμίξιμα υγρά, η οργανική στιβάδα που περιέχει τις εκχυλισμένες ουσίες απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα (Σαμανίδου).

Η LLE ακόμη και σήμερα παραμένει μία βασική μέθοδος εκχύλισης σε πολλά εργαστήρια και κυρίως εφαρμόζεται σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιπίδια όπως είναι τα ούρα, ο ορός και το πλάσμα γιατί χαρακτηρίζεται από ταχύτητα, χαμηλό κόστος και σχετικά καλή απόδοση – ανάκτηση. Η LLE καθορίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες όπως είναι:

- i. Η ισορροπία κατανομής (διαλυτότητα)
- ii. Η ισορροπία διάστασης των ηλεκτρολυτών (η τιμή του pH)
- iii. Η αναλογία οργανικής και υδατικής φάσης
- iv. Οι κύκλοι εκχύλισης.

Σε πρακτικό επίπεδο σημαντική παράμετρος για μία επιτυχημένη LLE αποτελεί το είδος του βιολογικού υλικού. Με περίσσεια χρήσης οργανικού διαλύτη ή/και επαναλαμβανόμενοι κύκλοι εκχύλισης θα έχουν ως αποτέλεσμα την παραλαβή ενός αρκετά επιβαρυσμένου εκχυλίσματος με πλήθος παρεμποδίζουσων ουσιών όπου συνεκλούστηκαν. Για τον λόγο αυτόν η πλέον συνιστώμενη αναλογία οργανικής και υδατικής φάσης είναι 1 : 2, ενώ στην περίπτωση αναλυτών που παρουσιάζουν χαμηλές ανακτήσεις προτείνεται η χρήση άλλων διαλυτών σε σχέση με την αύξηση του οργανικού κλάσματος και των κύκλων εκχύλισης. Η πρακτική εμπειρία εφαρμογής της μεθόδου έχει δείξει ότι δύο ενώσεις διαχωρίζονται επαρκώς όταν οι τιμές του  $pK_a$  τους, διαφέρουν τουλάχιστον τέσσερις μονάδες, επίσης αυτές που εμφανίζουν ουδέτερο χαρακτήρα διαχωρίζονται στο πρώτο κύκλο, και σε κάθε επανάληψη κύκλου εκχύλισης αναπόφευκτα το εκχύλισμα περιέχει ένα ποσοστό ουσιών που συνεκλούνται από το υπόστρωμα. Όταν απαιτείται ρύθμιση του pH, οξέα ή βάσεις, αντίστοιχα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, στην περίπτωση όμως αυτή πρέπει να ελέγχεται και η σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών καθώς και το ενδεχόμενο της πρωτεϊνικής καθίζησης για τον λόγο αυτόν είναι προτιμότερη η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα των αναλυτών που πρέπει να απομονωθούν σύμφωνα με τον γενικό κανόνα «τα όμοια διαλύουν όμοια». Παρόλα αυτά παρεμποδίζουσες ουσίες με γνωστή διαλυτότητα όπως λιπίδια, λιπαρά οξέα και χοληστερόλη έχουν αρνητική επίδραση στην απομόνωση των αναλυτών και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή του διαλύτη. Το βασικό κριτήριο για τη διαλυτότητα μίας χημικής ένωσης είναι η πολικότητα του διαλυτικού μέσου αλλά και άλλες παράμετροι όπως η ικανότητα ή μη σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, το σημείο ζέσεως, η σταθερότητα σε μεταβολές της τιμής του pH και η αναμειξιμότητα με το νερό.

Επίσης, πρέπει να εξετάζεται η τοξικότητα του διαλύτη, το πόσο εύφλεκτος είναι και ο κίνδυνος εκρήξεων με πιθανή χρήση του. Πολλές φορές κατά την LLE εμφανίζεται σχηματισμός γαλακτώματος μεταξύ της οργανικής και της υδατικής φάσης, για την εξάλειψη αυτού προτείνεται φυγοκέντρηση, προσθήκη ουδέτερων αλάτων ή μικρής ποσότητας μεθανόλης. Σε περίπτωση που το γαλάκτωμα παραμένει προτείνεται η αλλαγή

του οργανικού μέσου. Τέλος, σημαντική παράμετρος αποτελεί και η τεχνική διαχωρισμού που θα χρησιμοποιηθεί. Για παράδειγμα, στην περίπτωση χρήσης αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή εκλεκτικό σε αλογόνα όπως είναι ο ECD, η χρήση αλογονομένων διαλυτών καθίσταται αδύνατη, αλλιώς απαιτείται εξάτμιση και επαναδιαλύση του εκχυλίσματος.

Ο ιδανικός διαλύτης εκχύλισης πρέπει να έχει την ικανότητα απομόνωσης των αναλυτών και αποκλεισμού των παρεμποδίζουσων ουσιών από το υπόστρωμα. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι: ο οξικός αιθυλεστέρας, το 1-χλωροβουτάνιο, το εξάνιο, το διχλωροβουτάνιο και ο διαιθυλαιθέρας. Το διχλωρομεθάνιο (χλωροφόρμιο) χρησιμοποιούνταν κυρίως στο παρελθόν, σήμερα η χρήση του έχει αντικατασταθεί λόγω τοξικότητας. Τέλος, και το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται συχνά στην LLE, ενώ άλλοι διαλύτες όπως το τολουόλιο, η μεθανόλη, το πεντάνιο, η ακετόνη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση μόνο.

Στην περίπτωση ανάπτυξης μίας μεθοδολογίας υγρής – υγρής εκχύλισης όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα στη βιβλιογραφία οι οργανικοί διαλύτες όπου εξετάζονται συνήθως κατά σειρά είναι οι:

- i. Εξάνιο
- ii. 1-Χλωροβουτάνιο
- iii. Μεθυλ-t-βουτυλ-αιθέρας
- iv. Διχλωρομεθάνιο
- v. 1-Βουτανόλη
- vi. Οξικός αιθελεστέρας
- vii. Ακετονιτρίλιο (Negrusz, Cooper 2013).

Οι βασικές ιδιότητες των παραπάνω οργανικών διαλυτών φαίνονται στον Πίνακα 6. Σε περίπτωση μειωμένων αποδόσεων της εκχύλισης γίνεται χρήση μιγμάτων διαλυτών όπως: αιθανόλη – εξάνιο – ακετόνη, διχλωρομεθάνιο – προπανόλη – οξικός αιθελεστέρας κ.α., η εφαρμογή όμως τέτοιων συστημάτων αυξάνει και το ποσοστό των παρεμποδίζουσων ουσιών που εκχυλίζονται μαζί με τους αναλύτες.

**Πίνακας 6:** Φυσικοχημικές ιδιότητες οργανικών διαλυτών (Negrusz, Cooper 2013)

Διαλύτης	Πυκνότητα (g/mL)	Σημείο ζέσεως (°C)	Διαλυτότητα (g/100mL ύδατος σε 20°C)	Πολικότητα (ύδατος=10,2)	Δέκτης υδρογόνου	Δότης υδρογόνου
Εξάνιο	0,66	69	0,01	0,1	Όχι	Όχι
1-Χλωροβουτάνιο	0,89	78	0,07	1,0	Όχι	Όχι
Μεθυλ-t-βουτυλ-αιθέρας	0,74	55	0,50	2,5	Ναι	Όχι
Διχλωρομεθάνιο	1,34	40	2,00	3,1	Όχι	Όχι
1-Βουτανόλη	0,81	118	7,90	3,9	Ναι	Ναι
Οξικός αιθελεστέρας	0,90	77	8,90	4,4	Όχι	Ναι
Ακετονιτρίλιο	0,78	82	Αναμείξιμο	5,8	Όχι	Ναι

Εκτός από την κατάλληλη επιλογή διαλυτή εκχύλισης ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για μία επιτυχημένη LLE είναι το pH του δείγματος, ανάλογα με το οποίο θα γίνει η παραλαβή των προσδιοριζόμενων ουσιών, όξινου, ουδέτερου ή βασικού χαρακτήρα. Η προσθήκη βασικών ρυθμιστικών διαλυμάτων ευνοεί την εκχύλιση ουδέτερων ή βασικών χημικών ουσιών και αντίστοιχα η χρήση όξινων αναλύτες όξινου χαρακτήρα. Οι περισσότερες από τις προσδιοριζόμενες ουσίες στα κλινικά δείγματα και σε νεκροτομικά υλικά παρουσιάζουν βασικό χαρακτήρα και τα επίπεδα συγκεντρώσεών τους στο αίμα είναι σχετικά χαμηλά.

Παρά την ευρεία εφαρμογή της στο πεδίο της αναλυτικής τοξικολογίας, η LLE παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως:

- i. Οι μεγάλες ποσότητες δείγματος που απαιτούνται
- ii. Η κατανάλωση μεγάλου όγκου οργανικού διαλύτη, πολλές φορές υψηλής τοξικότητας για τον αναλυτή και το περιβάλλον
- iii. Η πιθανότητα δημιουργίας γαλακτωμάτων
- iv. Ο μεγάλος χρόνος επεξεργασίας που απαιτείται μερικές φορές
- v. Η μη ποσοτική και μη επαναλήψιμη παραλαβή των αναλυτών
- vi. Οι μη εκλεκτικοί διαλύτες, με αποτέλεσμα να συνεκχυλίζονται παρεμποδίζουσες ουσίες και συνεπώς την παραλαβή επιβαρυσμένων εκχυλισμάτων.

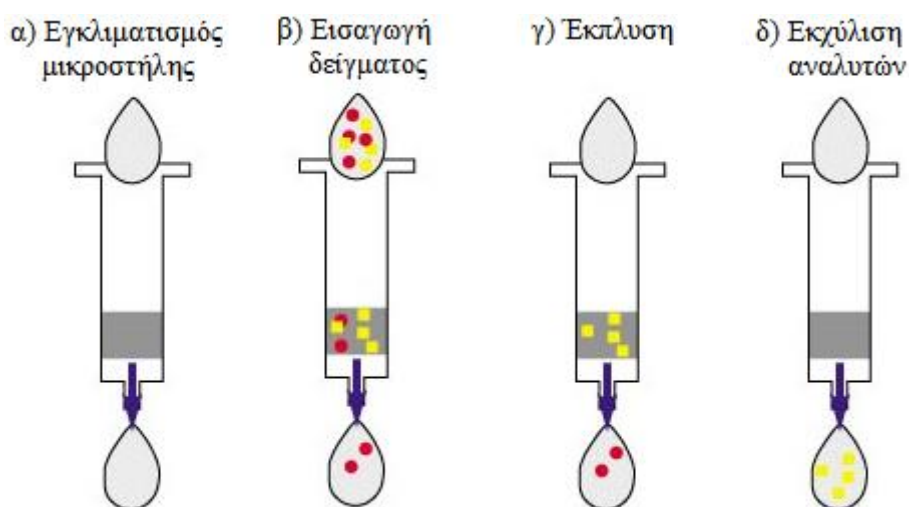
Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάπτυξη της υγρής-στερεής εκχύλισης, η πλέον επικρατέστερη μεθοδολογία επεξεργασίας δειγμάτων σε κάθε τοξικολογικό εργαστήριο.

### **1.3.1.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid-Phase Extraction – SPE)**

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις: τη στερεά φάση, που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεάς φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των αναλυτών από το προσροφητικό υλικό γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των αναλυτών (Σαμανίδου).

Τα στάδια της SPE είναι:

- i. Η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού
- ii. Η εισαγωγή του δείγματος
- iii. Η έκπλυση, στάδιο καθαρισμού, για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος
- iv. Η έκλυση των αναλυτών με κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών
- v. Η εξάτμιση του διαλύτη και η επαναδιάλυση του εκχυλίσματος.



**Σχήμα 14:** Σχηματική απεικόνιση υγρής-στερεής εκχύλισης

Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι ότι:

- i. Απαιτείται σχετικά μικρός χρόνος εκτέλεσης
- ii. Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών
- iii. Είναι κατάλληλη τεχνική για συνδυασμό με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας
- iv. Μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων
- v. Επιτυγχάνεται ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος
- vi. Επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των συστατικών με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση
- vii. Έχει καλή επαναληψιμότητα
- viii. Παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία. Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν την SPE αντίστροφης φάσης, για μη πολικές ενώσεις με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού π.χ. κυκλοεξυλο, οκτυλο-, δεκαοκτυλο-σιλάνιο. Ο διαχωρισμός στην SPE αντίστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη.

Η SPE κανονικής φάσης, εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις και βασίζεται στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το προσροφητικό υλικό πηκτής πυριτίου με ομάδες, όπως CN-, NH<sub>2</sub>-, -NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-.

Η SPE με ιοντοανταλλαγή, χρησιμοποιείται για ενώσεις, που σε υδατικό διάλυμα είναι σε ιονισμένη μορφή. Ο κύριος μηχανισμός συγκράτησης των προσδιοριζόμενων ενώσεων βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού προς τις φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες στη πηκτή πυριτίου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο- και τριμεθυλαμινο- ομάδες.

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

Η επιλογή του κατάλληλου μηχανισμού εξαρτάται μεταξύ άλλων από το υπόστρωμα και τις ιδιότητες των συστατικών του. Στην SPE, εκτός από τα πυριτικά υλικά, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο πολυμερή υλικά, τα οποία πλεονεκτούν έναντι των πυριτικών προσροφητικών επειδή παραμένουν σταθερά σε μεγάλο εύρος pH. Τα υλικά αυτά, επίσης χαρακτηρίζονται από τις μικτές τους ιδιότητες, καθώς περιέχουν ομάδες με υδρόφιλο και ομάδες με λιπόφιλο χαρακτήρα. Τέτοια υλικά είναι τα OASIS® HLB της Waters, τα ABSELUT NEXUS της Varian, τα Strata-X της Phenomenex κ.ά. (Σαμανίδου).



**Σχήμα 15:** Σχηματική απεικόνιση επιλογής πρωτοκόλλου υγρής-στερεής εκχύλισης (Σαμανίδου)

Οι μικροστήλες εκχύλισης OASIS® HLB, περιέχουν πολυμερικό προσροφητικό υλικό αντίστροφης φάσης, το οποίο αποτελείται από δύο μονομερή: την υδρόφιλη Ν – βινυλοπυρολιδόνη και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο, με αποτέλεσμα να είναι υδατικά διαβρέξιμο. Έτσι μπορεί να αποφευχθεί το στάδιο της ενεργοποίησης, με την απλοποίηση του πρωτοκόλλου, χωρίς να υποβαθμιστεί η αποτελεσματικότητα του υλικού (Σαμανίδου).

Ακόμη και οι πλέον ευαίσθητες και σύγχρονες ενόργανες αναλυτικές διατάξεις δεν μπορούν να παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα όταν δεν έχει προηγηθεί η κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος. Δυστυχώς δεν είναι δυνατόν να υπάρχει μία καθολική μεθοδολογία εκχύλισης για όλες τις προσδιοριζόμενες ουσίες σε κάθε βιολογικό υπόστρωμα. Η τελική επιλογή ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου εκχύλισης εξαρτάται πάντα από τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, από το υπόστρωμα, από τις ουσίες που ενδιαφέρουν και γενικώς το σκοπό της κάθε ανάλυσης είτε στην κλινική είτε στη δικαστική τοξικολογία.

### 1.3.2 Παραγωγοποίηση

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για τους αεριοχρωματογραφικούς προσδιορισμούς συγκεκριμένων αναλυτών έγινε και εφαρμογή αντιδράσεων παραγωγοποίησης.



Η παραγωγοποίηση (derivatization) είναι μία τεχνική, όπου ο αναλύτης, μέσω χημικής αντίδρασης μετατρέπεται σε μορφή ώστε να καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του με χρωματογραφικές τεχνικές και κυρίως με διαχωρισμούς αέριας χρωματογραφίας. Στις περιπτώσεις αυτές οι προσδιοριζόμενες ουσίες είναι τα προϊόντα της αντίδρασης γνωστά ως παράγωγα (derivatives), όπου παρουσιάζουν παρόμοια χημική δομή, όχι όμως ίδια, με την αρχική ένωση (Francis 2012).

Ο διαχωρισμός μιγμάτων με αέρια χρωματογραφία βασίζεται στην πτητικότητα των συστατικών του μίγματος. Με την τεχνική της παραγωγοποίησης, ενώσεις υψηλής πολικότητας αποκτούν την απαιτούμενη πτητικότητα χωρίς να υφίστανται θερμική διάσπαση, με αποτέλεσμα να μπορούν να διαχωριστούν (Knapp 1979). Χημικές ενώσεις που περιέχουν ομάδες οι οποίες σχηματίζουν εύκολα δεσμούς υδρογόνου, όπως -SH, -OH, -NH και -COOH, είναι πιο δύσκολο να διαχωριστούν αεριο-χρωματογραφικά (Zaikin et al. 2003). Οι διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου επηρεάζουν την πτητικότητα των αναλυτών, την τάση τους να αλληλεπιδρούν με το πληρωτικό υλικό της στήλης καθώς και τη θερμική σταθερότητα αυτών (Sobolevsky et al. 2003). Με μία αντίδραση παραγωγοποίησης μπορεί είτε να αυξηθεί, είτε να μειωθεί η πτητικότητα των αναλυτών, όπως και η ικανότητα προσρόφησής τους στη στήλη, να βελτιωθεί η απόκριση του ανιχνευτή, η διαχωριστικότητα και η μορφή - συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής.

Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση των αναλυτών ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός τους, καλούνται αντιδραστήρια παραγωγοποίησης. Συγκεκριμένα για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

- i. Να σχηματίζει παράγωγο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95%
- ii. Κατά τον σχηματισμό του παραγώγου δεν πρέπει να λαμβάνουν χώρα αλλαγές στη δομή αυτού
- iii. Να μην συμβάλει στην απώλεια του δείγματος κατά την αντίδραση
- iv. Να σχηματίζει παράγωγο που δεν αλληλεπιδρά με τη στήλη
- v. Να σχηματίζει παράγωγο σταθερό με το πέρασμα του χρόνου (Francis 2012).

Με κατάλληλη αντίδραση παραγωγοποίησης επιτυγχάνεται:

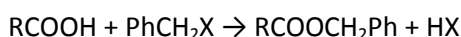
- i. Βελτίωση της διαχωριστικότητας και της συμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής, για πολικές κυρίως ουσίες που στο μόριό τους έχουν λειτουργικές ομάδες όπως, OH, -COOH, =NH, -NH<sub>2</sub>, -SH και άλλες

- ii. Ανάλυση σχετικά μη πτητικών ουσιών
- iii. Μείωση της πτητικότητας των προσδιοριζόμενων ουσιών πριν τον αεριο-χρωματογραφικό προσδιορισμό τους
- iv. Βελτίωση της απόδοσης της αναλυτικής τεχνικής και αύξηση της ευαισθησίας
- v. Σταθεροποίηση των χημικών ενώσεων πριν την ανάλυσή τους.

Για τους προσδιορισμούς με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας τρεις είναι οι βασικοί τύποι αντιδράσεων παραγωγοποίησης: η αλκυλίωση, η ακυλίωση και η σιλανοποίηση. Μέσω των αντιδράσεων αυτών επιτυγχάνεται αύξηση της πτητικότητας πολικών χημικών ουσιών, όπως οργανικών οξέων, αμινοξέων, αμιδίων κ.α., με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός τους (Francis 2012).

#### A. Αλκυλίωση

Η αλκυλίωση αποτελεί το πρώτο βήμα σε περίπτωση περαιτέρω αντιδράσεων παραγωγοποίησης ή ως μέθοδο προστασίας όξινων υδρογόνων σε μόρια του δείγματος. Η γενική χημική εξίσωση μίας αντίδρασης αλκυλίωσης είναι:



όπου, X είναι αλογόνο, R άλκυλο και Ph φαίνυλο ομάδα.

Η βασική χρωματογραφική εφαρμογή της παραπάνω αντίδρασης είναι η μετατροπή των οργανικών οξέων σε εστέρες, κυρίως μεθυλεστέρες, που δίνουν καλύτερα χρωματογραφήματα σε σχέση με τα οξέα. Επίσης, η αλκυλίωση εφαρμόζεται και για αιθέρες, αμίδια και σουλφοναμίδες (Danielson, Gallagher, Bao 2000). Τα σχηματιζόμενα παράγωγα είναι λιγότερο πολικά σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις και αυτό διότι τα όξινα υδρογόνα έχουν αντικατασταθεί από άλκυλο ομάδες. Επίσης, τα παράγωγα παρουσιάζουν εξαιρετική σταθερότητα χωρίς να διασπώνται με το πέρασμα του χρόνου.

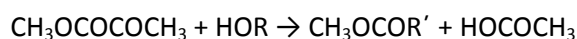
Τα πιο συνηθισμένα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης για αλκυλίωσεις είναι τα:

- i. Dialkylacetals
- ii. Diazoalkanes
- iii. Pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr)
- iv. Benzylbromide
- v. Boron trifluoride (BF<sub>3</sub>) σε διάλυμα μεθανόλης ή βουτανόλης
- vi. Tetrabutylammonium hydroxide (TBH) (Francis 2012).

Οι συνθήκες αντίδρασης ποικίλουν ανάλογα τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, από ισχυρά όξινα μέχρι βασικά.

#### B. Ακυλίωση

Κατά την αντίδραση ακυλίωσης μια άκυλο ομάδα εισάγεται στην οργανική ένωση, συγκεκριμένα στην περίπτωση των καρβοξυλικών οξέων η άκυλο ομάδα αντικαθιστά το υδροξύλιο. Χημικές ενώσεις που στο μόριό τους περιέχουν α-υδρογόνα όπως -OH, -SH και -NH, μπορούν να μετατραπούν σε εστέρες, θειοεστέρες και αμίδια, αντίστοιχα (Zenkevich 2009). Η παραγωγοποίηση αυτή εφαρμόζεται και για τον σχηματισμό πτητικών παραγώγων από πολικές ενώσεις (Zaikin et al. 2003) και αυξάνει τη θερμική σταθερότητα αυτών. Η παρακάτω χημική εξίσωση παρουσιάζει την αντίδραση ακυλίωσης μεταξύ του οξικού ανυδρίτη και μίας αλκοόλης, με σχηματισμό οξικού εστέρα και οξικού οξέος (Blau, King, 1979).



Για τους προσδιορισμούς με αέρια χρωματογραφία, αυτού του τύπου η παραγωγοποίηση έχει ως αποτέλεσμα να:

- i. Βελτιώνει τη σταθερότητα των αναλυτών προστατεύοντας ασταθείς χημικές ομάδες
- ii. Επιφέρει αύξηση της πτητικότητας και της θερμικής σταθερότητας πολικών ουσιών
- iii. Καθιστά δυνατούς διαχωρισμούς ενώσεως που θα ήταν αδύνατοι διαφορετικά
- iv. Αυξάνει την ευαισθησία σε πολύ χαμηλά επίπεδα κυρίως με τον ανιχνευτή συλλήψεως ηλεκτρονίων.

Ένα άλλο πλεονέκτημα που παρουσιάζουν τα άκυλο παράγωγα είναι ότι σε αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών εμφανίζουν συγκεκριμένα μοριακά θραύσματα εύκολα ερμηνεύσιμα και έτσι λαμβάνουμε σημαντικές πληροφορίες για τη δομή χημικών ενώσεων που ενδιαφέρουν την ανάλυση (Francis 2012).

Τα πιο κοινά αντιδραστήρια ακυλίωσης είναι τα:

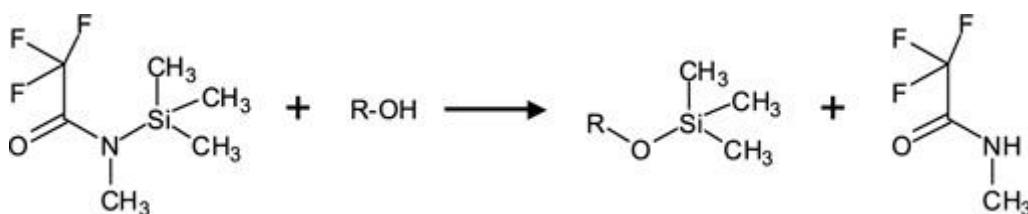
- i. Fluoracylimidazoles
- ii. Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)
- iii. N-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (MBTFA)
- iv. Pentafluorobenzoyl chloride (PFBCl)
- v. Pentafluoropropanol (PFPOH).

### Γ. Σιλανοποίηση

Η σιλανοποίηση είναι η πλέον βασική ομάδα αντιδράσεων παραγωγοποίησης, καθώς μη πτητικές ενώσεις, δύναται να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία, αυξάνοντας την πτητικότητά τους. Κατά τις αντιδράσεις σιλανοποίησης λαμβάνει χώρα υποκατάσταση ενός α-υδρογόνου από σιλανολικές ομάδες όπως  $[\text{SiH}(\text{CH}_3)_2]$ ,  $t\text{-}[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]$  και  $[\text{SiCH}_2\text{Cl}(\text{CH}_3)_2]$ . Η προσθήκη αυτών των ομάδων στα μόρια του αναλύτη μειώνει τη πολικότητα και την τάση σχηματισμών δεσμών υδρογόνου (Pierce 1968). Πολλές ουσίες που στη χημική τους δομή περιέχουν αμινομάδες ή υδροξυλομάδες, μη πτητικές και θερμικά ασταθείς σε θερμοκρασίες από 200 – 300°C, έχουν αναλυθεί αεριοχρωματογραφικά μετά από παραγωγοποίηση μέσω σιλανοποίησης (Lin et al. 2008, Chen et al. 2007). Τα σιλανοποιημένα παράγωγα χαρακτηρίζονται από πτητικότητα, σταθερότητα και απόδοση συμμετρικών χρωματογραφικών κορυφών (Kataoka 2005).

Οι αντιδράσεις σιλανοποίησης οφείλονται στην παρουσία μίας καλής αποχωρούσας ομάδας στο μόριο της ένωσης. Αυτές οι ομάδες χαρακτηρίζονται από ασθενή βασικό χαρακτήρα, τη δυνατότητα σταθεροποίησης του αρνητικού φορτίου στη μεταβατική κατάσταση και της μη τάσης σχηματισμού δεσμού με το άτομο του πυριτίου (Knapp 1979). Συγκεκριμένα οι αντιδράσεις σιλανοποίησης πραγματοποιούνται μέσω μηχανισμού διμοριακής πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_{\text{N}}2$  όπου τα α-υδρογόνα των ομάδων -OH, -COOH, -NH, -NH<sub>2</sub>, και -SH, υποκαθίστανται από τριμέθυλο σιλανολικές ομάδες, οδηγώντας σε μία μεταβατική κατάσταση ως ενδιάμεσο βήμα του μηχανισμού αντίδρασης (Köhnel et al. 2007).

Η αντίδραση σχηματισμού τριάλκυλο σιλανοποιημένων παραγώγων φαίνεται στην παρακάτω χημική εξίσωση. Εκτός από αλκοόλη, ο ίδιος μηχανισμός αντίδραση εφαρμόζεται και για  $\text{R-COOH}$ ,  $\text{R-NH}$ ,  $\text{R-NH}_2$ ,  $\text{R-SH}$ .



Κατά την παραγωγοποίηση με αντιδράσεις σιλανοποίησης ιδιαίτερη μέριμνα πρέπει να δίνεται στο ότι το εκχύλισμα και ο διαλύτης που χρησιμοποιείται δεν πρέπει έχουν ίχνη ύδατος. Επιπλέον, τα αντιδραστήρια σιλανοποίησης είναι αρκετά ευαίσθητα στην υγρασία οπότε φυλάσσονται σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες (Sobolevsky et al. 2003). Στη

σιλανοποίηση ο πλέον χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης είναι η πυριδίνη. Μειονέκτημα του συγκεκριμένου διαλύτη είναι ότι οδηγεί στον σχηματισμό χρωματογραφικών κορυφών με «ουρά», βέβαια πολλά αντιδραστήρια αυτής της κατηγορίας δεν απαιτούν τη χρήση επιπλέον διαλύτη. Μακροσκοπικά η ολοκλήρωση της αντίδρασης παραγωγοποίησης σηματοδοτείται με τη διάλυση του εκχυλίσματος – δείγματος στο αντιδραστήριο σιλανοποίησης.

Η ευκολία της αντίδρασης σιλανοποίησης των λειτουργικών ομάδων ακολουθεί την εξής σειρά: αλκοόλη > φαινόλη > καρβοξυλικό οξύ > αμίνη > αμίδια/υδροξύλιο και συγκεκριμένα για τις αλκοόλες, πρωτοταγής > δευτεροταγής > τριτοταγής. Σχετικά με τις συνθήκες της αντίδρασης συνήθως απαιτείται θέρμανση μέχρι τους 60°C και όχι παραπάνω, ώστε να μην επέλθει θερμική διάσπαση του παραγώγου, για χρονικό διάστημα 10 – 15 min (Francis 2012).

Τα αντιδραστήρια που συναντώνται συχνότερα στην παραγωγοποίηση με σιλανοποίηση είναι τα παρακάτω:

- i. Hexamethyldisilane (HMDS)
- ii. Trimethylchlorosilane (TMCS)
- iii. Trimethylsilylimidazole (TMSI)
- iv. Bistrimethylsilylacetamide (BSA)
- v. Bistrimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA)
- vi. N-methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)
- vii. Trimethylsilyldiethylamine (TMS-DEA)
- viii. N-methyl-N-t-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA)
- ix. Halo-methylsilyl (Francis 2012).

Τα παραπάνω αντιδραστήρια αντιδρούν με αλκοόλες και οξέα σχηματίζοντας τριμέθυλο-σίλανο αιθέρες και εστέρες, αντίστοιχα. Τα σχηματιζόμενα παράγωγα είναι αρκετά πτητικά και εύκολα διαχωριζόμενα με αέρια χρωματογραφία (Scott 2003). Οι παραπάνω ουσίες είναι συμβατές με την πλειονότητα των ανιχνευτών, παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση περίσσεια αυτών δημιουργεί δυσκολίες στους προσδιορισμούς με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Sobolevsky et al. 2003).

Έχουν αναπτυχθεί αντιδραστήρια με τη δυνατότητα εισαγωγής μίας t-βούτυλο-διμέθυλο-σίλανο ομάδας αντί της τριμέθυλο-σίλανο, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σχηματιζόμενα παράγωγα να εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα έναντι της πιθανότητας

υδρόλυσης και επιπλέον παρουσιάζουν χαρακτηριστικό τρόπο θραυσματοποίησης στην αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών. Τέλος, τα σχηματιζόμενα προϊόντα σιλιανοποίησης εμφανίζουν εξαιρετική θερμική σταθερότητα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανάλυσή τους σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών τόσο του εισαγωγέα όσο και της στήλης (Francis 2012).

### **1.3.3 Χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού**

#### **1.3.3.1 Αέρια χρωματογραφία**

Η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography – GC) είναι μία αναλυτική τεχνική διαχωρισμού με ευρύτατο φάσμα εφαρμογής σε πολλούς τομείς τόσο στην έρευνα όσο και στη βιομηχανία. Ιστορικά η GC προσρόφησης αναπτύχθηκε από τον γερμανό επιστήμονα Fritz Prior, στα τέλη της δεκαετίας του 1940. Στις αρχές του 1950 οι Archer J. P. Martin και Richard L. M. Synge, δύο ερευνητές από το Ηνωμένο Βασίλειο εφεύραν τη χρωματογραφία διαχωρισμού, όπου για την ανακάλυψή τους αυτή τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1952.

Στην αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση με υγρή (gas- liquid chromatography – GLC) ή στερεή (gas-solid chromatography – GSC) στατική φάση. Στην GSC ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση ή στον μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του εξεταζόμενου υλικού στη στατική φάση.

Στην αέρια υγρή χρωματογραφία ή απλουστέρα στην αέρια χρωματογραφία ο διαχωρισμός των συστατικών του εκχυλίσματος λαμβάνει χώρα λόγω της κατανομής τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση) και ενός φέροντος αερίου (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός των επί μέρους συστατικών οφείλεται στην κίνηση αυτών με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη χρωματογραφική στήλη, που εξαρτώνται από την τάση ατμών αυτών και από τις δυνάμεις αλληλεπίδρασής τους με το πληρωτικό υλικό της στήλης (Χατζηιωάννου, Κουμπάρης 2005).

Ένα αέριο για να αποτελέσει κινητή φάση σε ένα χρωματογραφικό σύστημα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- i. Το χαμηλό ιξώδες των αερίων παρέχει τη δυνατότητα χρήσης στηλών μεγάλου μοριακού μήκους με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα της στήλης και επιπλέον εφαρμογή μεγάλων ταχυτήτων ροής παρέχοντας διαχωρισμούς σε μικρό χρονικό διάστημα.

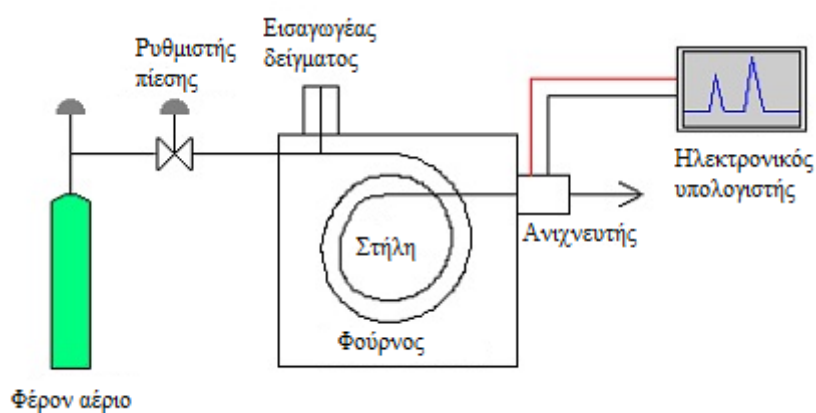
- ii. Η αδρανής φύση των αερίων σε σχέση με την αλληλεπίδρασή τους με τις προσδιοριζόμενες ουσίες, κάνει την ισορροπία κατανομής μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης να είναι ανεξάρτητη του φέροντος αερίου. Αποτέλεσμα αυτής της αδράνειας είναι η αέρια χρωματογραφία να περιορίζεται μόνο για τον προσδιορισμό σχετικά πτητικών ουσιών.
- iii. Η ανάπτυξη και η εφαρμογή πολλών, απλών, ευαίσθητων και ταχείας απόκρισης ανιχνευτών ικανών να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των αναλυτών στην αέρια φάση.

Η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων όπως:

- i. Μεγάλη ευαισθησία
- ii. Ταχύτητα
- iii. Απλότητα
- iv. Επιτυχία σε δύσκολους διαχωρισμούς
- v. Επιτυχής εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

Όλα τα παραπάνω οδήγησαν την αέρια χρωματογραφία μετά την εισαγωγή της ως αναλυτική τεχνική να παρουσιάσει ραγδαία ανάπτυξη και έγινε μία από τις αποτελεσματικότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού και ανάλυσης (Χατζηιωάννου, Κουπάρης 2005).

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας μελετήθηκε διεξοδικά και με βάση αυτή αναπτύχθηκε η θεωρία ταχύτητας των χρωματογραφικών διαχωρισμών.



**Σχήμα 16:** Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου

### A. Φέρον αέριο

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι χημικά αδρανές σε σχέση με το υλικό κατασκευής της χρωματογραφικής διάταξης και των προσδιοριζόμενων ουσιών. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα αέρια είναι τα ήλιο (He), το άζωτο (N<sub>2</sub>) και το αργό (Ar), ενώ πιο σπάνια το υδρογόνο (H<sub>2</sub>) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Η επιλογή του φέροντος αερίου βασίζεται κυρίως στον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή, γιατί πρέπει να διαφέρει σε σημαντικό βαθμό από τις προσδιοριζόμενες ουσίες ως προς μία φυσικοχημική ιδιότητα, στην οποία βασίζεται και η αρχή λειτουργίας του εκάστοτε ανιχνευτή. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο αέριο είναι το ήλιο, παρά το κόστος που παρουσιάζει, έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, χαρακτηριστικά που καθιστούν δυνατή τη μεγάλη ταχύτητα ροής του αερίου και του μικρού χρόνου ανάλυσης (Χατζηιωάννου, Κουππάρης 2005).

### B. Ρυθμιστής πίεσης – Ροόμετρο

Το φέρον αέριο από τη φιάλη όπου βρίσκεται σε υψηλή πίεση (100-200 atm), διαβιβάζεται μέσα από τον ρυθμιστή πίεσεως, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση και στη συνέχεια μέσα από το ροόμετρο, με το οποίο μετρείται με ακρίβεια η ταχύτητά του. Η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο και ειδικά για την ταυτοποίηση των αναλυτών βάση των χρόνων κατακράτησης ( $t_R$ ) (Χατζηιωάννου, Κουππάρης 2005).

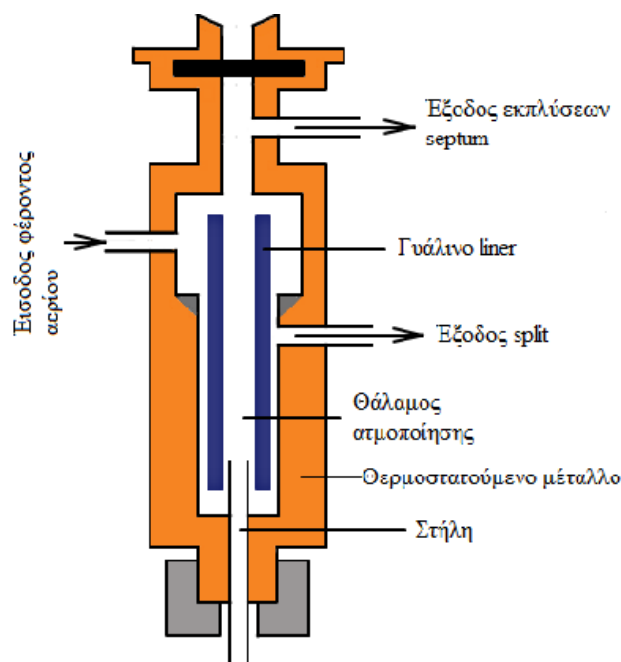
### Γ. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το εκχύλισμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της χρωματογραφικής στήλης, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το οποίο φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum), όπου δρα ως βαλβίδα που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, όχι όμως τη διαφυγή αυτού και του φέροντος αερίου. Για την επίτευξη καλών χρωματογραφικών διαχωρισμών πρέπει:

- i. Η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία ώστε να αποφευχθεί η διασπορά του δείγματος
- ii. Ο όγκος του δείγματος να είναι ο μικρότερος δυνατός, γιατί η διαχωριστικότητα ελαττώνεται όταν η ποσότητα του δείγματος αυξάνεται. Στην περίπτωση τριχοειδών στηλών, ειδική παρακαμπτήρια διάταξη επιτρέπει την εισαγωγή στη στήλη μικρού ποσοστού του δείγματος.



- iii. Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης ώστε να γίνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και μεταφορά των ατμών στη στήλη από το φέρον αέριο. Γενικά, η ακρίβεια των χρωματογραφικών προσδιορισμών εξαρτάται πάρα πολύ από την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα του τρόπου εισαγωγής του δείγματος.



**Σχήμα 17:** Σχηματική απεικόνιση συστήματος εισαγωγής δείγματος σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας

#### Δ. Θερμοστατούμενος κλίβανος – φούρνος

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος, η στήλη και ο ανιχνευτής σε διατάξεις αέριας χρωματογραφίας θερμοστατούνται σε μία περιοχή θερμοκρασιών από 50 έως 300°C, είτε όλα μαζί, είτε χωριστά το κάθε μέρος. Γενικά η διαχωριστικότητα αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας αυτό όμως έχει σαν αποτέλεσμα και αύξηση του απαιτούμενου χρόνου περάτωσης της ανάλυσης καθώς μεγαλώνουν οι χρόνοι κατακράτησης των αναλυτών. Η θερμοκρασία του φούρνου (στήλης) μπορεί να παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας, φαινόμενο αρκετά σπάνιο, και μερικές φορές είναι αδύνατο να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων συστατικών του δείγματος όταν αυτά είναι πολυάριθμα ή τα σημεία ζέσεως τους και η πολικότητές τους παρουσιάζουν ποικιλομορφία. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών εμφανίζονται η μία κοντά στην άλλη ή μπορεί και να αλληλεπικαλύπτονται σε ένα βαθμό,

ενώ αντίθετα οι κορυφές των λιγότερων πτητικών συστατικών χαρακτηρίζονται από μικρό ύψος, πλατιές και απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται.

Τα παραπάνω προβλήματα στη χρωματογραφία υπερνικούνται με τη θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία (programmed-temperature gas chromatography), κατά την οποία η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης, με βάση προκαθορισμένο θερμοκρασιακό πρόγραμμα (Χατζηιωάννου, Κουμπάρης 2005).

#### Ε. Στήλη

Η στήλη αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα μιας χρωματογραφικής διάταξης λόγω του ότι στη χρωματογραφική στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας μίας στήλης είναι:

- i. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών
- ii. Το ύψος ισοδύναμο με μία θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ)
- iii. Η διαχωριστικότητα
- iv. Η χωρητικότητα
- v. Ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης.

Υπάρχουν δύο είδη στηλών, οι πληρωμένες στήλες – πακεταρισμένες (packed columns) και οι τριχοειδείς (capillary columns). Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα, συνήθως από γη διατόμων ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό που αποτελεί την υγρή στατική φάση. Το στερεό υπόστρωμα πρέπει να είναι χημικά αδρανές, να παρουσιάζει μεγάλη επιφάνεια και η κοκκομετρική σύστασή του να καλύπτει στενή περιοχή.

Οι τριχοειδείς στήλες εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και σήμερα σε μεγάλο βαθμό έχουν αντικαταστήσει τις πακεταρισμένες. Η αρχική μορφή των τριχοειδών στηλών ήταν από γυαλί και αρκετά εύθραυστες και για αυτό αντικαταστάθηκαν από στήλες με βάση το πυρίτιο (Negrusz, Cooper 2013). Εξαιτίας της μικρής αντιστάσεώς τους στη ροή του φέροντος αερίου είναι δυνατή η χρήση τριχοειδών στηλών με μήκος μεγαλύτερο των 1000 μέτρων. Βασικά πλεονεκτήματα των στηλών αυτών είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης μικρού όγκου δείγματος και η υψηλή διαχωριστικότητα λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού θεωρητικών πλακών, μέχρι και  $10^6$ .



**Σχήμα 18:** Τριχοειδής στήλη σε διάταξη αέριας χρωματογραφίας

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για υγρή στατική φάση πρέπει να είναι:

- i. Σταθερές με αμελητέα τάση ατμών
- ii. Αδρανείς σε σχέση με τους αναλύτες και το φέρον αέριο
- iii. Διαλυτές για τα συστατικά του δείγματος με κατάλληλο συντελεστή κατανομής
- iv. Αρκετά μεγάλης ρευστότητας (Χατζηιωάννου, Κουμπάρης 2005).

#### ΣΤ. Ανιχνευτής

Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία των προσδιοριζόμενων ουσιών καθώς αυτές εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη και μετριέται σε σχέση με μία φυσικοχημική ιδιότητα η ποσότητα ή η συγκέντρωση αυτών στο φέρον αέριο. Υπάρχουν πολλοί ανιχνευτές, οι οποίοι συνήθως ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το αν αποκρίνονται στη συγκέντρωση ή στην ταχύτητα ροής του αναλύτη.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι:

- i. Η ευαισθησία
- ii. Η σταθερότητα
- iii. Η περιοχή γραμμικότητας
- iv. Ο χρόνος απόκρισης
- v. Η χημική δραστηριότητα
- vi. Ο τρόπος χρήση - ειδικός ή γενικός.

Επειδή η ευαισθησία ενός ανιχνευτή ποικίλει ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες ουσίες, πολλοί αέριοι χρωματογράφοι διαθέτουν περισσότερους του ενός ανιχνευτή, όπου

μπορεί να είναι συνδεδεμένοι σε παράλληλη διάταξη ή σε σειρά (Χατζηιωάννου, Κουμπάρης 2005).

Οι ανιχνευτές που συνήθως παρουσιάζονται σε αεριο-χρωμαγραφικές διατάξεις είναι οι παρακάτω:

- i. Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry Detector – MS)
- ii. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector – FID)
- iii. Ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector – ECD)
- iv. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector – TCD)
- v. Ανιχνευτής αζώτου – φωσφόρου (Nitrogen-Phosphorus Detector – NPD)
- vi. Φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (Flame Photometric Detector – FPD)
- vii. Ανιχνευτής υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Detector – FTIRD).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε χρήση αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών απλού τετραπόλου (GC-MS). Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, τον διαχωρισμό τους με βάση τον λόγο της μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) και την καταγραφή τους.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από:

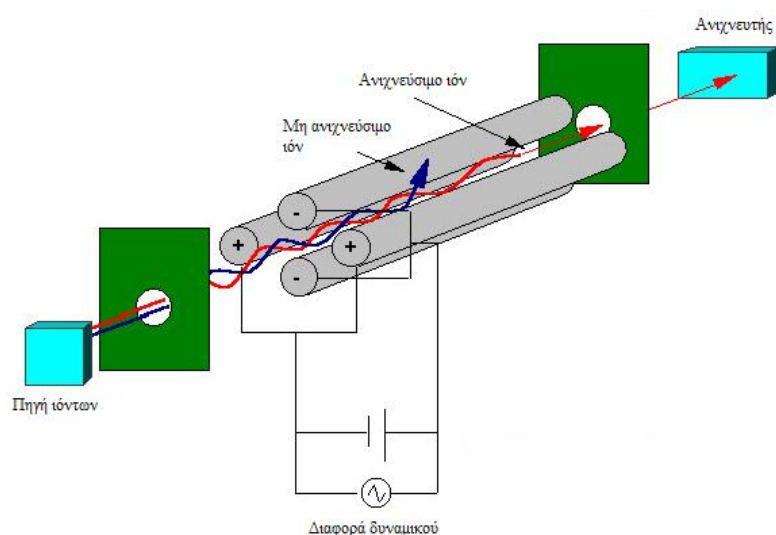
- i. Τον θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου
- ii. Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο  $m/z$
- iii. Τον ανιχνευτή.

Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί του αναλύτη χωρίς τη διάσπασή του, που οδηγούνται στον θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόρια και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από τον χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές – διαφράγματα μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα, ένα μέρος από τα ιόντα που δεν

εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται (Παπαδογιάννης, Σαμανίδου 2001, Στράτης, Βουλγαρόπουλος, Ζαχαριάδης 1999).

Κατά τη σύζευξη αέριου χρωματογράφου με φασματομέτρο μαζών απλού τετραπόλου ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό δέσμης ηλεκτρονίων (electron impact – EI) των συστατικών που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη, με μεγάλη ενέργεια, συνήθως 70eV. Οι χημικές ενώσεις απορροφούν την ενέργεια αυτή όπου ιονίζονται και θραυματοποιούνται με τρόπο χαρακτηριστικό και αναπαραγωγίμο. Τα παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται μέσω ενός τετραπόλου όπου λειτουργεί σαν φίλτρο με δυνατότητα σάρωσης πολλές φορές ανά δευτερόλεπτο και σε εύρος μαζών μέχρι τα 700 a.m.u. (atomic mass unit).



**Σχήμα 19:** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με απλό τετράπολο (Smith et al. 2007)

Η αφθονία κάθε συγκεκριμένου θραύσματος-μάζας σε δεδομένο αριθμό σαρώσεων δίνει το αντίστοιχο φάσμα μάζας. Όλα τα σημεία αθροιζόμενα σε συνάρτηση με τον χρόνο αποτελούν το συνολικό χρωματογράφημα (total ion chromatogram – TIC). Ο ανιχνευτής MS μπορεί να λειτουργήσει είτε με μέθοδο πλήρους σάρωσης (full-scan mode) είτε με μέθοδο επιλεγμένων ιόντων (selected-ion monitoring – SIM) στην οποία συλλέγει συγκεκριμένα θραύσματα μάζας, χαρακτηριστικά για τις ενώσεις που προσδιορίζονται. Οι δύο παραπάνω μέθοδοι παρουσιάζουν διαφορά ως προς την ευαισθησία, συγκεκριμένα με τη λειτουργία πλήρους σάρωσης, το όριο ανίχνευσης είναι από 1 έως 10 ng, ενώ με τη μέθοδο SIM 1 έως

10 pg και αυτό λόγω της σημαντικής μείωσης του «θορύβου» προερχόμενου από το υπόστρωμα. Τέλος, ο συγκεκριμένος τύπος ανιχνευτή χαρακτηρίζεται από πολύ καλή γραμμικότητα.

Με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της τεχνολογίας στο πεδίο των ηλεκτρονικών υπολογιστών και των αντίστοιχων λογισμικών το GC-MS από εργαλείο έρευνας έχει μετατραπεί σε μία από τις πλέον αναπόσπαστες ενόργανες διατάξεις για χημικές αναλύσεις ρουτίνας (Negrusz, Cooper 2013).

### **1.3.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης**

Η ικανότητα διαχωρισμού και ανάλυσης περίπλοκων βιολογικών δειγμάτων είναι μέγιστης σημασίας για την αναλυτική τοξικολογία. Η κλασική χρωματογραφία στήλης με το πέρασμα των δεκαετιών έχει εξελιχθεί σε μέγιστο βαθμό παράλληλα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας. Σήμερα, οι τεχνικές διαχωρισμού χαρακτηρίζονται από μεγάλη ταχύτητα, υψηλή διαχωριστική ικανότητα, χαμηλά όρια ανίχνευσης και δυνατότητα εφαρμογής σε ποικιλία βιολογικών υποστρωμάτων. Η πιο σπουδαία και αξιοσημείωτη από τις τεχνικές υγρής χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάστηκε αρχικά το 1969 αλλά η ευρεία εφαρμογή της, κυρίως στο τομέα της βιοανάλυσης έγινε αρκετά χρόνια αργότερα.

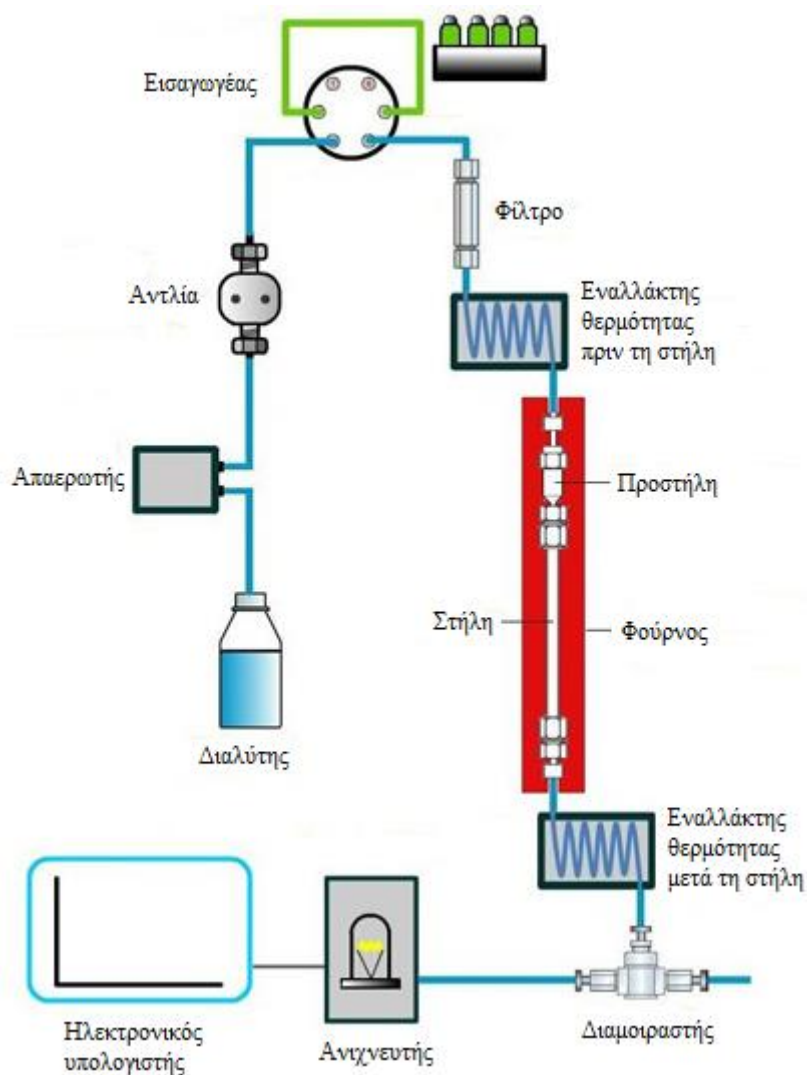
Από τη δεκαετία του 1990 η HPLC παρουσίασε μια εκρηκτική ανάπτυξη καθιστώντας την, την πλέον δημοφιλή τεχνική διαχωρισμού. Ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται σε εργαστήρια έρευνας και ανάπτυξης για:

- i. Καθαρισμό φυσικών ή συνθετικών προϊόντων
- ii. Χαρακτηρισμό μεταβολιτών
- iii. Προσδιορισμό διάφορων εκδόχων και προϊόντων διάσπασης
- iv. Μελέτες φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ακόμη μεγαλύτερη ανάπτυξη της HPLC όπως:

- i. Αλλαγές στο πληρωτικό υλικό της στήλης, όπως νέα υλικά και ακόμα μικρότερο μέγεθος σωματιδίων
- ii. Διαχωρισμοί υψηλής ταχύτητας
- iii. Micro-HPLC, αυτοματισμός και βελτιστοποίηση μέσω συγκεκριμένων λογισμικών
- iv. Μεγαλύτερη ευαισθησία (Negrusz, Cooper 2013).

Η βασική οργανολογία μίας διάταξης HPLC, περιλαμβάνει την αντλία, τον εισαγωγέα δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα – ηλεκτρονικό υπολογιστή.



**Σχήμα 20:** Σχηματική απεικόνιση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

#### A. Κινητές φάσεις υγρής χρωματογραφίας

Στην υγρή χρωματογραφία οι κινητές φάσεις είναι διαλύτες ή μίγματα αυτών και αποθηκεύονται σε συγκεκριμένα γυάλινα δοχεία με ειδικό καπάκι συνοδευόμενο από σωλήνα teflon και φίλτρα για την αναρρόφηση του διαλύτη. Η ποιότητα και η καθαρότητα τόσο των διαλυτών όσο και των ανόργανων αλάτων που τυχόν χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των κινητών φάσεων είναι ένας παράγοντας μεγάλης σημασίας για την απόδοση της υγρής χρωματογραφίας. Τυχόν μη αδιάλυτες ακαθαρσίες είναι πιθανόν να

επιφέρουν χρωματογραφικό θόρυβο στη γραμμή βάσης, επιπλέον κορυφές και αλλαγή του χρόνου κατακράτησης των προσδιοριζόμενων ουσιών. Σήμερα στο εμπόριο υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία από διαλύτες υψηλής καθαρότητας για χρήση σε διατάξεις HPLC.

Επιπλέον, η παρουσία φυσαλίδων αέρα στα κανάλια της κινητής φάσης είναι ένα ακόμη στοιχείο που μπορεί να μειώσει την απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού, για τον λόγο αυτό όλες οι σύγχρονες διατάξεις HPLC συνοδεύονται από απαερωτή. Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης. Η πραγματική τιμή μέτρησης του pH αποδίδεται σε υδατικά διαλύματα, όταν μέρος αυτού αποτελείται από οργανικό κλάσμα η τιμή του pH αυξάνει καθώς αυξάνει η αναλογία του οργανικού μέρους (Negrusz, Cooper 2013).

#### B. Αντλίες – Σύστημα παροχής κινητής φάσεως

Αποτελείται από μία αντλία ή και δύο αντλίες υψηλής πίεσης και συνήθως από ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλουση, στην οποία η κινητή φάση έχει μη μεταβαλλόμενη – σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά χρονικά διαστήματα με βάση συγκεκριμένο πρόγραμμα. Για την επίτευξη βαθμιδωτής έκλουσης απαιτείται μονάδα προγραμματισμού και ελέγχου του συστήματος παροχής που ελέγχεται από το αντίστοιχο λογισμικό πακέτο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή (Χατζηγιάννου, Κουμπάρης 2005).

Επειδή κατά τη λειτουργία της αντλίας δημιουργούνται παλμοί ροής όπου διαταράσσουν τη σταθερότητα του χρωματογραφήματος, παρεμβάλλεται μία συσκευή που σκοπό έχει την απόσβεση των παλμών για την εξομάλυνση του λαμβανόμενου σήματος (Χατζηγιάννου, Κουμπάρης 2005).

Οι σύγχρονες αντλίες υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

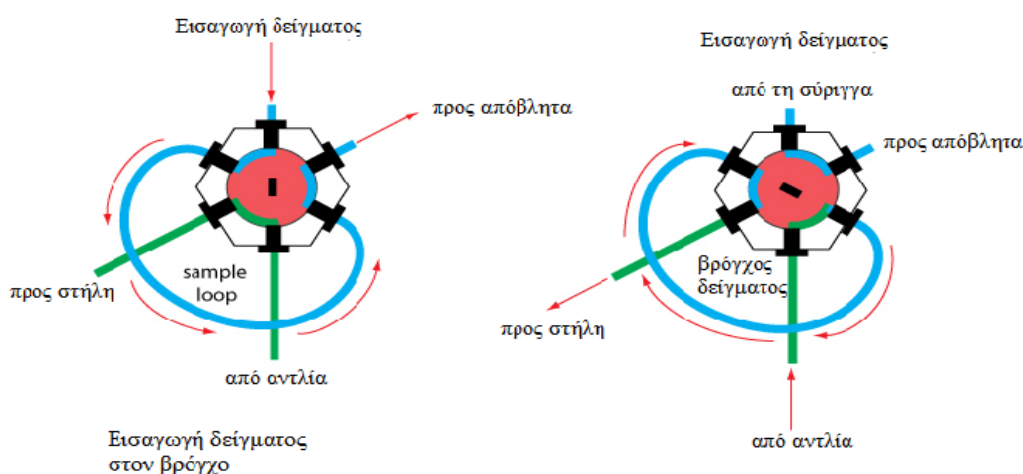
- i. Ροή από 0,01 έως 10 mL/min
- ii. Σταθερότητα ροής (μεταβολές μικρότερες του 1%)
- iii. Μέγιστη πίεση (μέχρι και 34500 kPa – 5000 psi) (Negrusz, Cooper 2013).



### Γ. Σύστημα εισαγωγής δείγματος – Εισαγωγέας

Ο εισαγωγέας συνήθως είναι μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης. Αποτελείται από έναν κύλινδρο ραδονίου με 6 διαύλους από τους οποίους ο ένας οδηγεί στη στήλη. Μέσα στον κύλινδρο υπάρχει ένας άλλος ο οποίος διαθέτει τρεις αύλακες, ο καθένας από τους οποίους συνδέει ένα ζευγάρι διαύλων. Δύο διαύλοι ενώνονται με εξωτερικό χαλύβδινο βρόγχο δείγματος πολύ μικρού και γνωστού όγκου. Στη θέση «φορτώσεως» η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη, ενώ με τη βοήθεια σύριγγας πληρώνεται ο βρόγχος δείγματος με το προς ανάλυση εκχύλισμα του εκάστοτε δείγματος. Ακολούθως στρέφεται ο δακτύλιος κατά τριάντα μοίρες (θέση εισαγωγής) με αποτέλεσμα η κινητή φάση να παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος προωθώντας τον προς τη στήλη (Χατζηιωάννου, Κουππάρης 2005).

Στις σύγχρονες διατάξεις HPLC ο εισαγωγέας έχει τη δυνατότητα να εισάγει το υγρό δείγμα σε τιμή όγκου της τάξης των 0,1100  $\mu\text{L}$  με μεγάλη επαναληψιμότητα σε πιέσεις μέχρι 27600 kPa (Negrusz, Cooper 2013).



**Σχήμα 21:** Σχηματική απεικόνιση συστήματος εισαγωγής δείγματος σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας (Harvey 2013)

### Δ. Χρωματογραφικές στήλες

Οι ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα αποτελούν ιδανικές στήλες για την HPLC. Η πλήρωση αυτών των στηλών δεν γίνεται από τον αναλυτή αλλά αγοράζονται έτοιμες από διάφορους οίκους. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι αναγκαία η θερμοστάτηση της στήλης. Η παρασκευή των στηλών είναι ένα πολύ κρίσιμο στάδιο για την καλή απόδοση της τεχνικής. Τα υλικά στηρίξεως ξηραίνονται πριν από την επικάλυψή τους με την υγρή

στατική φάση, ενώ τα στερεά υλικά προσροφήσεως ενεργοποιούνται με πύρωση. Για την ελαχιστοποίηση των λιμνάζοντων περιοχών της στήλης, απαιτείται άριστη πλήρωσή της, δηλαδή οι πόροι του υλικού στηρίξεως πρέπει να γεμίζουν τελείως με την υγρή στατική φάση. Μία καλά πληρωμένη στήλη της μορφής αυτής μπορεί να έχει απόδοση περίπου 400 θεωρητικών πλακών ανά εκατοστό, με σωματίδια μεγέθους 5 έως 10  $\mu\text{m}$ .

Επειδή η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία καταστροφή της στήλης συνήθως παρεμβάλλεται μία άλλη μικρή στήλη πριν από την κύρια που ονομάζεται προσθήλη, με αποτέλεσμα η κινητή φάση να φτάνει κορεσμένη με την υγρή στατική φάση. Η προσθήλη επίσης προστατεύει την κύρια στήλη από τυχόν αιωρούμενα σωματίδια και ακαθαρσίες που μπορεί να υπάρχουν στο εκχύλισμα του εκάστοτε δείγματος.



**Σχήμα 22:** Χρωματογραφικές στήλες για διάταξη HPLC

Η υψηλή πίεση σε συνδυασμό με τις μεγάλες ταχύτητες ροής, που εφαρμόζονται στην HPLC, έχουν ως αποτέλεσμα μερικές φορές τη μηχανική απομάκρυνση μέρους της υγρής στατικής φάσης από το υλικό στηρίξεως. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος αναπτύχθηκαν υλικά πληρώσεως με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις που αποτελούν και τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσεως στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα σωματίδια αυτά στις κλασικές διατάξεις HPLC είναι συνήθως διαμέτρου 3, 5 ή 10  $\mu\text{m}$  με πόρους διαμέτρου 20  $\mu\text{m}$  και διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια, ενώ το μήκος της στήλης μπορεί να είναι 3, 5, 10, 15 ή 25 cm. Η υγρή στατική φάση συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με την επιφάνεια της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου. Στις συνηθέστερες χρησιμοποιούμενες πολικές στατικές φάσεις η χημική ομάδα R είναι η  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  ή  $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ , ενώ για τις μη πολικές είναι  $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$  ή  $(\text{CH}_2)_2\text{-C}_6\text{H}_5$ . Με

χρήση αυτών των χημικά συνδεδεμένων φάσεων, επιτυγχάνεται πολύ μεγάλος βαθμός ομοιομορφίας, συμμετρικές κορυφές χρωματογραφήματος, μη διαρροή της υγρής φάσεως από τη στήλη και μεγάλο εύρος πολικότητας. Έχουν αναφερθεί αριθμοί θεωρητικών πλακών 600-800 ανά cm για σωματίδια διαμέτρου 5  $\mu\text{m}$  και 1200 για 3  $\mu\text{m}$ , αντίστοιχα.

#### Ε. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής στην υγρή χρωματογραφία (όπως και στην αέρια) είναι ένα κρίσιμο στοιχείο της όλης διάταξης γιατί κάνει ορατό στον αναλυτή τον διαχωρισμό που λαμβάνει χώρα στη χρωματογραφική στήλη. Ένας ιδανικός ανιχνευτής HPLC πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- i. Να αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μίγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα (ειδικός ανιχνευτής)
- ii. Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης στο επίπεδο των  $\mu\text{g}$  ή  $\text{ng}$
- iii. Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
- iv. Να παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποσοτικούς προσδιορισμούς
- v. Να είναι σταθερός σε μεταβολές θερμοκρασίας και στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- vi. Να έχει αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να μη συνεισφέρει στη διεύρυνση της ζώνης κάθε συστατικού και κατά συνέπεια της κορυφής του.

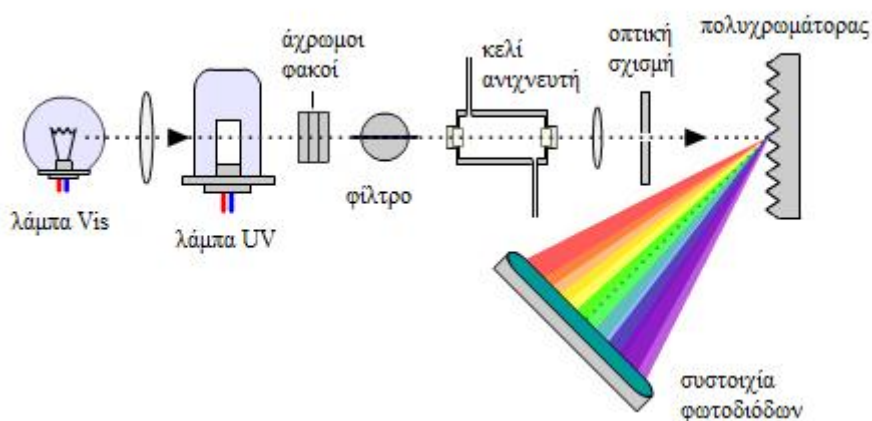
Φυσικά κανένας ανιχνευτής δεν παρουσιάζει στο σύνολο όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και υπάρχει μία συνεχής προσπάθεια για τη βελτίωση αυτών. Οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών για μία διάταξη HPLC είναι οι παρακάτω:

- i. Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector – DAD)
- ii. Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector – RID)
- iii. Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector – RF)
- iv. Ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής (Electrochemical Detector – EC)
- v. Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry Detector – MS) (Χατζηιωάννου & Κουπάρης 2005).

Από τους παραπάνω ανιχνευτές στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε χρήση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα σαρώνουν στο φάσμα ανά ένα μήκος κύματος τη φορά. Τα σύγχρονα όργανα μπορούν να καταγράψουν ολόκληρο το φάσμα σε κλάσματα του δευτερολέπτου, έτσι και στην υγρή χρωματογραφία το φάσμα

του αναλύτη καταγράφεται σε δευτερόλεπτα καθώς αυτός εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη (Harris 2010).

Στην καρδιά της γρήγορης φασματοσκοπίας βρίσκεται η συστοιχία διόδων. Σε ένα τέτοιο φασματοφωτόμετρο μετριοούνται όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα, επιτρέποντας έτσι τη δυνατότητα γρήγορης συλλογής του φάσματος ή μεγαλύτερου λόγου σήματος προς θόρυβο ή κάποιου ενδιάμεσου συνδυασμού των δύο. Σε έναν ανιχνευτή DAD, το δείγμα διαπερνά λευκό φως (με όλα τα μήκη κύματος), στη συνέχεια, το φως εισέρχεται σε έναν πολυχρωμάτορα, ο οποίος αναλύει το φως στα επιμέρους μήκη κύματος και το κατευθύνει στη συστοιχία φωτοδιόδων. Κάθε δίodos λαμβάνει διαφορετικό μήκος κύματος και έτσι όλα τα μήκη κύματος μετριοούνται ταυτόχρονα.



**Σχήμα 23:** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (LCGC Editors)

Η διακριτική ικανότητα του ανιχνευτή εξαρτάται από την απόσταση που έχουν μεταξύ τους οι δίodos και από τη διασπορά που προκαλεί ο πολυχρωμάτορας. Οι συστοιχίες φωτοδιόδων επιτρέπουν ταχύτερη συλλογή του φάσματος (περίπου ανά ένα δευτερόλεπτο) από ότι ένα όργανο διασποράς, το οποίο απαιτεί αρκετά λεπτά. Επίσης οι συγκεκριμένες διατάξεις δεν περιέχουν κινούμενα μέρη και έτσι είναι πιο σταθερές (Harris 2010).

Οι ανιχνευτές DAD παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα. Η γνώση του φάσματος των προσδιοριζόμενων ουσιών επιτρέπει την εξάλειψη άλλων κορυφών από τα συστατικά του μίγματος με αποτέλεσμα την επίτευξη ακριβέστερου ποσοτικού προσδιορισμού. Επίσης ο ταυτόχρονος προσδιορισμός δύο μηκών κύματος επιτρέπει τον υπολογισμό ενός λόγου απορρόφησης, σε περίπτωση που η τιμή αυτή δεν παραμένει σταθερή κατά μήκος μίας

χρωματογραφικής κορυφής, τότε η συγκεκριμένη κορυφή είναι σήμα όχι από ένα συστατικό του δείγματος αλλά από δύο (ή και περισσότερα). Ένα άλλο πλεονέκτημα που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος ανιχνευτής είναι η αφαίρεση ενός μήκους κύματος αναφοράς, έτσι ώστε να μειώνεται η ολίσθηση της γραμμής βάσης κατά την υγρή χρωματογραφία βαθμιδωτής έκλουσης. Επιπλέον, πολλά συστήματα HPLC-DAD περιέχουν βιβλιοθήκες φασμάτων UV, ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μη στοχευμένη ανάλυση (screening) βιολογικών δειγμάτων στην κλινική και δικαστική τοξικολογία (Negrusz, Cooper 2013).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έλαβε χώρα και εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας και ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Η σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών απαιτεί χρήση ενόργανων διατάξεων υψηλής τεχνολογίας καθώς λαμβάνει χώρα εξάτμιση του διαλύτη με ταυτόχρονο ιοντισμό των μορίων των προσδιοριζόμενων ουσιών.

#### A. Ιονισμός σε αέρια φάση

Ο ιονισμός σε αέρια φάση είναι η πιο συνηθισμένη πρακτική. Οι τεχνικές ιονισμού σε αέρια φάση εφαρμόζονται κατά προτίμηση σε ενώσεις σταθερές στη θέρμανση και με σημείο ζέσεως κάτω από τους ~500°C. Διαχωρίζονται σε τεχνικές με εφαρμογή κενού καθώς και σε τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι οποίες έχουν κυριαρχήσει στη φασματομετρία μαζών σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού στην υγρή φάση και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα των εφαρμογών και της αγοράς οργάνων.

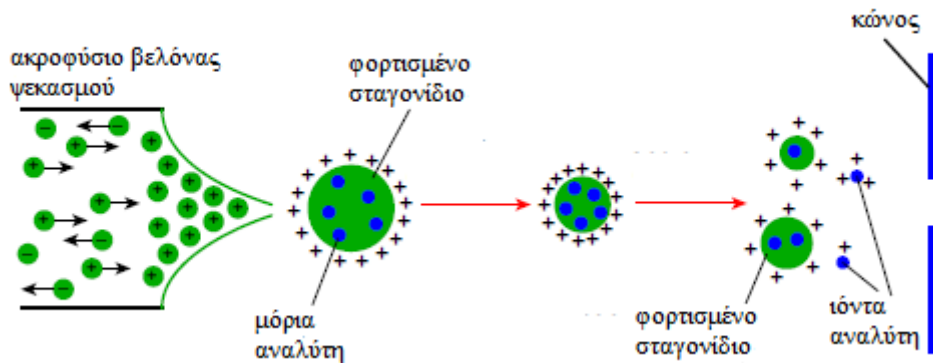
Οι τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν:

- i. Τον ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization – ESI)
- ii. Τον χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – APCI)
- iii. Το φωτο-ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionisation – APPI).

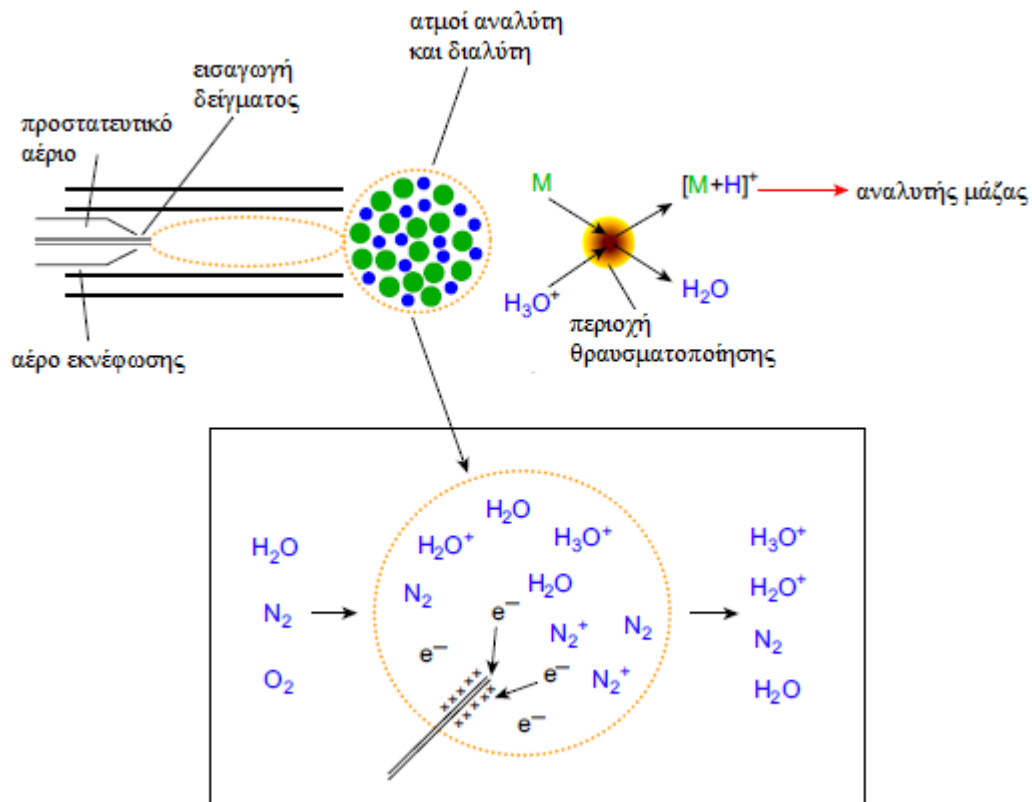
Η επιλογή της τεχνικής ή των διάφορων μορφών αυτής εξαρτάται από την απόδοση ιονισμού ανά περίπτωση.

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας. Το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο 3–5 kV ενώ παράλληλα διαβιβάζεται αέριο για τη δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες

σταγόνες και ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται εξάτμιση με ιονισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιονισμού. Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το δυναμικό, μπορεί να λαμβάνει ή όχι θραύση των μορίων, οπότε και το φάσμα μπορεί να διαφέρει κατά πολύ. Η διάταξη επιτρέπει την ανάλυση μεγαλομορίων όπως πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κλπ. (Kaklamanos et al. 2012, Θεοδωρίδης).

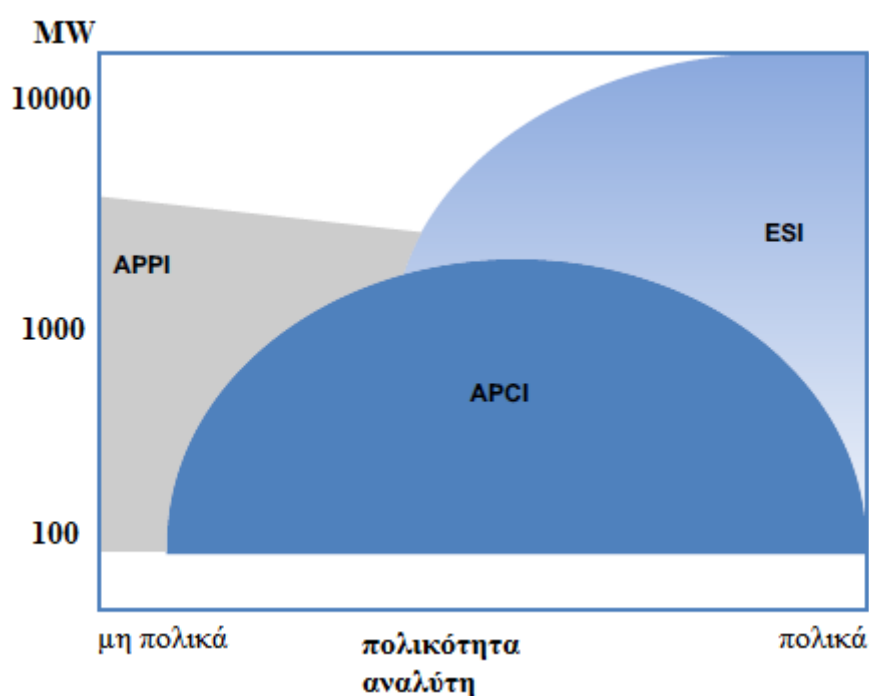


**Σχήμα 24:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης με ηλεκτροψεκασμό (Kaklamanos et al. 2012)



**Σχήμα 25:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης με χημικό ιονισμό (Kaklamanos et al. 2012)

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26, η μέθοδος ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης πολικότητας έως υψηλής πολικότητας και με μοριακά βάρη έως 10000, ενώ οι APCI και APPI εφαρμόζονται σε μικρότερα και λιγότερο πολικά μόρια όπως λιπίδια, στεροειδή, ορμόνες κ.α. Ο ESI καλύπτει το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής για την ανάλυση βιομορίων καθώς επιτυγχάνει τον ιονισμό πολλών κατηγοριών αυτών. Επίσης, στη τοξικολογική ανάλυση, η χρήση του ESI επικρατεί, γιατί τα περισσότερα φάρμακα εμπίπτουν στις κατηγορίες μορίων τα οποία ιονίζονται αποδοτικότερα με ESI. Αναλύτες που ιονίζονται καλύτερα με APCI, είναι οι στερόλες και συγγενή μόρια όπως οι στατίνες (Kaklamanos et al. 2012, Θεοδωρίδης).



**Σχήμα 26:** Σύγκριση των τεχνικών ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης ESI, APCI και APPI (Kaklamanos et al. 2012)

#### B. Δημιουργία ιόντων με εκρόφηση

Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται σε υγρά ή στερεά δείγματα. Τα δείγματα δέχονται ενέργεια από συγκεκριμένη πηγή, όπως δέσμη σωματιδίων ή laser και με την απορρόφηση της ενέργειας τα μόρια της προσδιοριζόμενης ουσίας εκροφόνται και ιονίζονται. Τέτοιες τεχνικές είναι:

- i. Ο βομβαρδισμός με άτομα (Fast Atom Bombardment – FAB)
- ii. Ο βομβαρδισμός με ιόντα (Secondary Ion MS)

- iii. Ο ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI)
- iv. Η εκρόφηση με πλάσμα (Plasma Desorption).

Η τεχνική MALDI έχει κυριαρχήσει στην ανάλυση μεγαλομορίων με μάζα πάνω από το  $10^6$  Dalton. Εφαρμόζεται, κυρίως, στην ανάλυση πρωτεϊνών και συνθετικών πολυμερών για την εύρεση του μοριακού βάρους, καθώς προσφέρει το πλεονέκτημα μέτρησης πολύ μεγάλων μοριακών μαζών. Τελευταία, έχει βρει εφαρμογή στο πεδίο της τοξικολογίας στην ανάλυση μικρών μορίων με την τεχνική της φασματομετρικής απεικόνισης ιστών (MS imaging). Στην τεχνική αυτή ένα υπόστρωμα/διάλυμα (matrix) αναμιγνύεται με το δείγμα και αφού εξατμιστεί ο διαλύτης, το δείγμα ακτινοβολείται με δέσμη laser. Το υπόστρωμα απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας, ιονίζεται και προκαλεί ιονισμό των μεγαλομορίων (Kaklamanos et al. 2012, Θεοδωρίδης).

Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η δυνατότητα μέτρησης πολύ μεγάλων μοριακών βαρών. Για τον λόγο αυτόν βρίσκει μεγάλη εφαρμογή και στην πρωτεομική ανάλυση.

#### Γ. Συζευγμένη φασματομετρία μάζας σε σειρά

Η φασματομετρία μαζών σε σειρά (tandem mass spectrometry – MS/MS) περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Σε τριπλά τετράπολα ή υβρίδια (πχ. TOF, Orbitrap), τα επιμέρους τμήματα μπορούν να επιλέξουν ένα ιόν να περάσει. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κτλ. Η επιλογή ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης και ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες στις οποίες υποβάλλονται τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης πολυάριθμων πειραμάτων MS/MS, τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμη πληροφορία για τη δομή της αναλυόμενης ένωσης και να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης.

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας και μπορεί πραγματοποιηθεί στο χώρο ή στο χρόνο. Για πειράματα φασματομετρίας μαζών σε σειρά στο χώρο (tandem mass spectrometry in space), απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μαζών. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι το τριπλό τετράπολο το οποίο χρησιμοποιεί δύο τετράπολα (Q1, Q3). Το ενδιάμεσο τετράπολο (Q2) χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιονισμένων μορίων και



πληρώνεται με αέριο σύγκρουσης (collision gas) που είναι, συνήθως, αδρανές αέριο όπως το αργό.

Ο συνδυασμός τετραπόλου με παγίδες ιόντων ή αναλυτή χρόνου πτήσης στη θέση του τελικού αναλυτή (αντί δηλαδή του Q3) επιτρέπει τη λήψη φασμάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας καθώς και πειράματα MS<sup>n</sup>. Αυτή η οργανολογία επιτρέπει αναλύσεις υψηλών απαιτήσεων και εφαρμόζεται, κυρίως, για ερευνητικούς σκοπούς ή για την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών σε σειρά στο χρόνο (tandem mass spectrometry in time) είναι οι παγίδες ιόντων και οι αναλυτές FT-MS (αναλυτής μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier). Τα ιόντα μπορούν να επιλεγούν και να αποθηκευτούν στον αναλυτή, να διασπαστούν και τα παραγόμενα ιόντα να αναλυθούν κατά τη διάρκεια ενός δεύτερου πειράματος MS, στον ίδιο αναλυτή. Οπότε, τα δύο πειράματα διαχωρίζονται στον χρόνο και όχι στον χώρο, όπως συμβαίνει στην περίπτωση άλλων αναλυτών MS. Το πλεονέκτημα στην περίπτωση αυτή είναι η δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων MS<sup>n</sup>. Πρακτικά το n μπορεί να φτάσει την τιμή 8, αλλά έχει αναφερθεί και η δυνατότητα για πειράματα με τιμή n=12 (Kaklamanos et al. 2012, Θεοδωρίδης).

Ένας περιορισμός των παγίδων είναι η αδυναμία συλλογής θυγατρικών ιόντων με m/z μικρότερο του 1/3 σε σχέση με το πρόδρομο ιόν. Γενικά, τα φάσματα MS/MS που λαμβάνονται σε παγίδες μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από φάσματα MS/MS που λαμβάνονται σε τετράπολα ή Q-TOF. Στη φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διάφορων πειραμάτων σάρωσης:

- Σάρωση παραγόμενων ιόντων (product ion scan)

Η σάρωση παραγόμενων ιόντων είναι από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες διαδικασίες σάρωσης στην MS/MS. Είναι γνωστή και ως «σάρωση θυγατρικού ιόντος» (daughter ion scan). Σε αυτήν ο πρώτος αναλυτής μαζών χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός ιόντος-πρόδρομο ιόν (precursor ion) το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στο χώρο θραύσης (Q2, collision cell). Εκεί λόγω της υψηλής ενέργειας και της παρουσίας αερίου (αργό ή άζωτο) λαμβάνουν χώρα συγκρούσεις του πρόδρομου ιόντος με τα μόρια του αερίου και θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος σε φορτισμένα θραύσματα (ιόντα) και ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Τα παραγόμενα ιόντα στη συνέχεια διέρχονται από τον επόμενο αναλυτή μαζών (Q3), ο οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Η διαδικασία αυτή

ονομάζεται «διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση» (collision activated dissociation – CAD ή collision induced dissociation – CID) (Θεοδωρίδης).

Τα πειράματα αυτά παρέχουν πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης και χρησιμοποιούνται για την εξέταση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων στη δικαστική και κλινική τοξικολογία, υστερούν όμως, λόγω της αργής σάρωσης, με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η εφαρμογή τους σε ποσοτικές αναλύσεις. Χρησιμοποιούνται για την ποσοτική αποτίμηση ενώσεων σε περίπλοκα δείγματα, συνήθως σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές MS/MS. Στο Σχήμα 27 δίνεται σχηματικά η πορεία του πειράματος (Θεοδωρίδης).

- Σάρωση πρόδρομου ιόντος (precursor ion scan)

Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q1 το οποίο λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Στη συνέχεια, τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q2, όπου υπόκεινται σε διάσπαση, σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Το τετράπολο Q3 στο δεύτερο στάδιο ανάλυσης επιτρέπει μόνο σε θυγατρικά συγκεκριμένου λόγου  $m/z$ , να εξέλθουν προς τον ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών που προκύπτει, δείχνει τα μητρικά ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικές με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ένωσης. Στο Σχήμα 27 δίνεται σχηματικά η πορεία του πειράματος (Θεοδωρίδης).

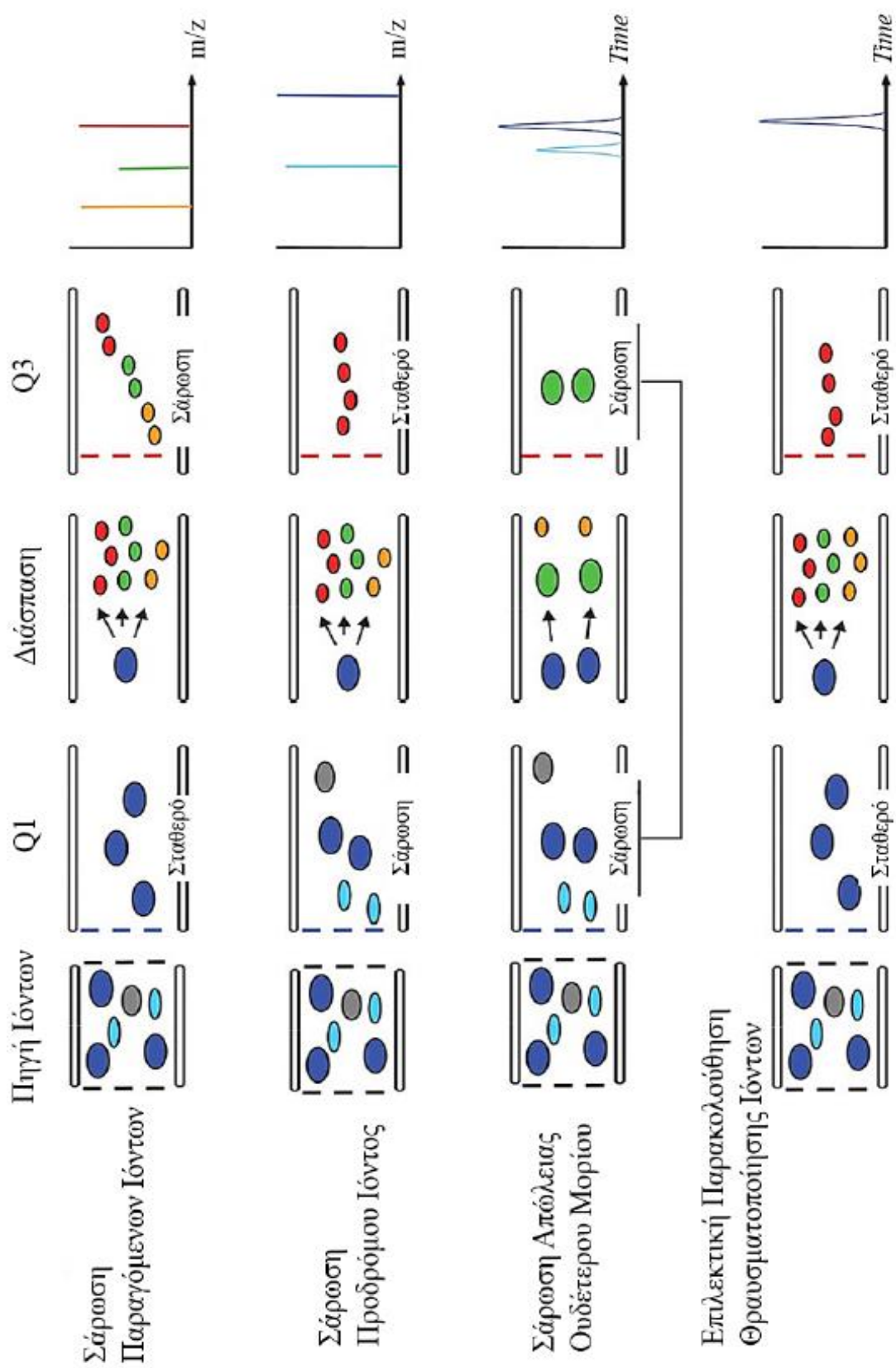
- Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (constant neutral loss scan – CNL)

Οι δύο αναλυτές (τετράπολο Q1 και Q3) σαρώνουν με καθορισμένη διαφορά μάζας ( $m/z$  του Q1 >  $m/z$  του Q3). Ανιχνεύονται μόνον τα ιόντα τα οποία χάνουν αυτήν τη συγκεκριμένη μάζα στο θάλαμο θραύσης. Το πείραμα παρέχει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν παραγόμενα ιόντα, τα οποία προέρχονται από μια κατηγορία ενώσεων, με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιείται για αναλύσεις συγγενών ενώσεων οι οποίες μοιράζονται τα ίδια δομικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα διάφορες κατηγορίες λιπιδίων. Η πορεία της μέτρησης στο πείραμα σάρωσης για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου, δίνεται στο Σχήμα 27 (Θεοδωρίδης).

- Επιλεκτική παρακολούθηση θραυσματοποίησης ιόντων

Στα πειράματα αυτά παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος ή μια ομάδα αντιδράσεων θραυσματοποίησης. Όταν επιλέγεται μία μόνο αντίδραση θραυσματοποίησης (ένα πρόδρομο ιόν προς ένα

παραγόμενο ιόν), η μέθοδος ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (single reaction monitoring – SRM) και παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, εξαιτίας της μείωσης του υποβάθρου του σήματος (χημικού θορύβου). Όταν επιλέγονται δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα, η τεχνική ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (multiple reaction monitoring – MRM). Με το πείραμα αυτό επιτυγχάνεται γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Το υπόβαθρο θορύβου είναι χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N), αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Η πορεία της μέτρησης στο πείραμα παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων δίνεται στο Σχήμα 27 (Θεοδωρίδης).



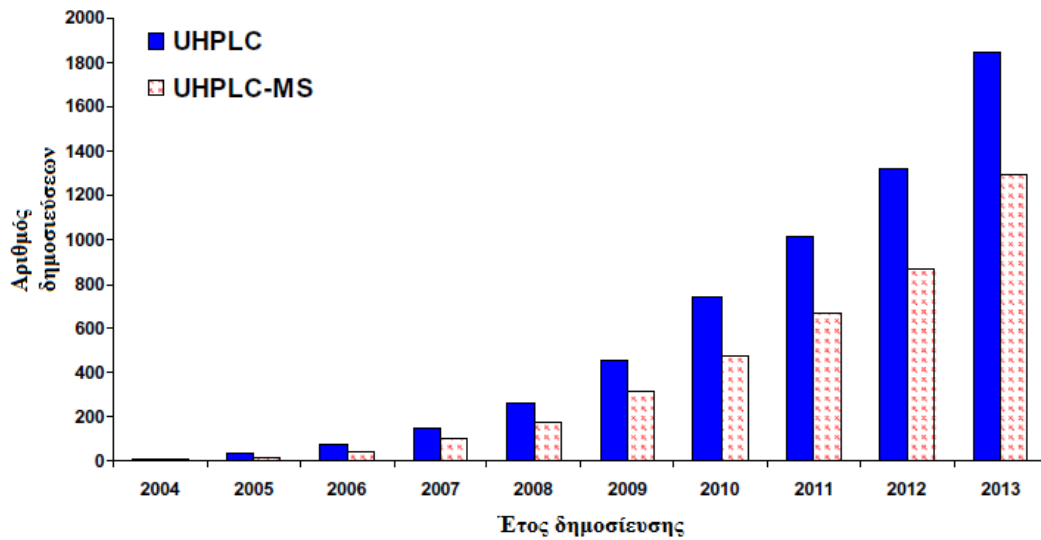
**Σχήμα 27:** Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο (Θεοδωρίδης)

### 1.3.3.3 Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας η ενόργανη διάταξη υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε, συζευγμένη με τον ανιχνευτή DAD, ήταν η πλέον σύγχρονη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής αποδόσεως.

Ο όρος Ultra High Performance (Pressure) Liquid Chromatography αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Jorgenson το 1997. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα ήταν η πρώτη που περιέγραψε τη χρήση χρωματογραφικών στηλών πληρωμένες με μέγεθος σωματιδίων 1,0 έως 1,5  $\mu\text{m}$  (nano-columns) με ένα πρωτότυπο σύστημα συμβατό με πολύ υψηλή πίεση, έως 1400 bar, το 1997 (MacNair et al. 1997) και 7200 το 2003 (Jerkovich et al. 2003). Μετά την έρευνα της ομάδας του Jorgenson, ακολούθησε η επιβεβαίωση από τον Lee και τους συνεργάτες του με τη δυνατότητα επίτευξης πιέσεων μέχρι και 3600 bar (Lippert et al. 1999). Με αφορμή αυτές τις ερευνητικές αποδείξεις, η πρώτη εμπορικά διάταξη UHPLC ήταν διαθέσιμη το 2004, από τον οίκο Waters, με δυνατότητα πίεσης 1000 bar και με μέγεθος σωματιδίων της στήλης τα 1,7  $\mu\text{m}$  (Mazzeo et al. 2005, Majors 2005). Την προηγούμενη δεκαετία, οι περισσότεροι από τους εμπορικούς οίκους διάθεσης χρωματογράφων κατασκεύασαν τις δικές τους διατάξεις UHPLC, συμβατές με πιέσεις εύρους 600 – 1400 bar (Mazzeo et al. 2005, Majors 2005) και συζευγμένες με όλους τους ανιχνευτές της κλασικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Fekete et al. 2014).

Σήμερα η χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής έχει κερδίσει πολύ μεγάλο έδαφος στην ανάλυση των βιολογικών υποστρωμάτων και κυρίως για την επίτευξη διαχωρισμών με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Συγκεκριμένα, μία στήλη UHPLC με διαστάσεις 50 × 2,1 mm I.D., 1,7  $\mu\text{m}$  σε σχέση με μία κλασική στήλη HPLC, 150 × 4,6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  μειώνει τον χρόνο ανάλυσης μέχρι και εννέα φορές (Fekete et al. 2014).



**Σχήμα 28:** Αριθμός δημοσιεύσεων για UHPLC και UHPLC-MS από το 2004 έως το 2013 (Fekete et al. 2014)

Για τη σωστή λειτουργία και χρήση μίας διάταξης UHPLC αρκετά τεχνικά χαρακτηριστικά πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, όπως:

- i. Τα ανώτερα όρια πίεσης του συστήματος
- ii. Η ταχύτητα ροής
- iii. Η θερμοκρασία της στήλης και ο έλεγχος αυτής (Fallas et al. 2009)
- iv. Ο νεκρός όγκος (dead volume) του συστήματος και η συσχέτισή του με τη διεύρυνση του πλάτους των χρωματογραφικών κορυφών
- v. Ο όγκος καθυστέρησης (delay or dwell volume)
- vi. Ο ρυθμός καταγραφής δεδομένων από τον ανιχνευτή (Fekete et al. 2014).

Για αρκετά χρόνια το σημαντικότερο χαρακτηριστικό των διατάξεων UHPLC θεωρούνταν τα ανώτερα συμβατά όρια πίεσης. Τα μηχανήματα πρώτης γενιάς χαρακτηρίζονταν με όριο τα 1000 bar και με ταχύτητα ροής μέχρι 1 mL/min. Σήμερα, είναι πλέον διαθέσιμες διατάξεις με ανώτερα όρια πίεσης 1200 – 1400 bar και με ταχύτητα ροής 2 – 5 mL/min (Fekete et al. 2014).

#### 1.4 Σκοπός

Βασικός σκοπός της μελέτης αυτής είναι η ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού αντιψυχωσικών φαρμάκων (αλοπεριδόλη, ολανζαπίνη, αμισουλπρίδη, ρισπεριδόνη, παλιπεριδόνη, κλοζαπίνη, κουετιαπίνη και αριπιπραζόλη) και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη, βενλαφαξίνη, σιταλοπράμη, παροξετίνη, αγομελατίνη, σερτραλίνη, κλομιπραμίνη και ντουλοξετίνη), καθώς και συγκεκριμένων μεταβολιτών τους (N-desmethylclozapine, N-desmethylcitalopram και N-desmethylsertraline) σε βιολογικά υλικά ασθενών και σε νεκροτομικό υλικό. Κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων φαρμάκων αποτέλεσε η συχνότητα με την οποία αυτά συνταγογραφούνται στη ψυχιατρική κλινική πράξη.

Επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν οι εξής:

- i. Η βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών εκχύλισης των αναλυτών από βιολογικά υλικά (πλάσμα – ορός, ολικό αίμα, ούρα και ιστός ήπατος)
- ii. Η βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των αναλυτών από εκχυλίσματα με χρήση αέριας χρωματογραφίας και υγρής χρωματογραφίας
- iii. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυόμενων φαρμάκων και μεταβολιτών
- iv. Η επικύρωση των αναλυτικών μεθοδολογιών με χαρακτηριστικά ποιότητας την εκλεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα, την ανιχνευσιμότητα και τη σταθερότητα.

Ακόμη, στόχοι της μελέτης ήταν:

η εφαρμογή των επικυρωμένων αναλυτικών μεθοδολογιών στον ποσοτικό προσδιορισμό αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είτε από κλινικά περιστατικά, για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς λόγους είτε από νεκροτομικό υλικό, κατά την τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος και τέλος,

η διερεύνηση της αναγκαιότητας εφαρμογής του προσδιορισμού επιπέδων αντιψυχωσικών σε πλάσμα από ψυχιατρικούς ασθενείς στην καθημερινή κλινική πρακτική.

*Το πρωτόκολλο της παρούσας διατριβής, εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής. Επιπροσθέτως, μετά τη δέσμευση ότι θα τηρηθεί το απόρρητο, τόσο κατά τη συγκέντρωση των δειγμάτων των βιολογικών υλικών που θα χρησιμοποιηθούν για την έρευνα, όσο και κατά την επεξεργασία των δεδομένων, τα δείγματα αυτά, όπως και τα αποτελέσματα της έρευνας, θα παραμείνουν ανώνυμα.*

## 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά – Όργανα – Συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία δειγμάτων

#### 2.1.1 Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα αυτών

Σε αυτήν την ερευνητική εργασία μελετήθηκαν εννέα αντιψυχωσικά (APs) και έντεκα αντικαταθλιπτικά φάρμακα (ADs). Όλες οι προσδιοριζόμενες χημικές ουσίες αγοράστηκαν ή προσφέρθηκαν (ως δωρεά) ως πρότυπα (αναλυτικής καθαρότητας) από συγκεκριμένους οίκους.

Από την πρώτη ομάδα εξετάστηκαν οι:

- i. Ολανζαπίνη ως Olanzapine  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 132539-06-1
- ii. Αμισουλπρίδη ως Amisulpride  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 71675-85-9
- iii. Παλιπεριδόνη ως Paliperidone  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 144598-75-4
- iv. Ρισπεριδόνη ως Risperidone  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 106266-06-2
- v. N-Desmethyloclozapine, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 6104-71-8
- vi. Κλοζαπίνη ως Clozapine, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 25 mg, CAS Number 5786-21-0
- vii. Κουετιαπίνη ως άλας Quetiapine hemifumarate salt  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10mg, CAS Number 111974-72-2
- viii. Αριπιπραζόλη, Certified Reference Material, Cerilliant Corporation (Paloma Drive, Round Rock, Texas), 1,0 mL/αμπούλα, 1,0 mg/mL σε 50:50 Μεθανόλη/Νερό σε 1% 1N HCl, CAS Number 129722-12-9
- ix. Αλοπεριδόλη ως Haloperidol, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 5g, CAS Number 52-86-8



Την ομάδα των αντικαταθλιπτικών αποτελούσαν οι:

- i. Μιρταζαπίνη ως Mirtazapine, LGC GmbH (Luckenwalde, Germany), 10 mg, CAS Number 85650-52-8
- ii. Βουπροπιόνη ως άλας Bupropion hydrochloride  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 50 mg, CAS Number 31677-93-7
- iii. Βενλαφαξίνη ως άλας Venlafaxine hydrochloride  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 99300-78-4
- iv. N-desmethylcitalopram ως άλας N-desmethylcitalopram hydrochloride, ευγενική προσφορά της H. Lundbeck A/S, CAS Number 97743-99-2
- v. Σιταλοπράμη ως άλας Citalopram hydrobromide  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 59729-32-7
- vi. Παροξετίνη ως άλας Paroxetine maleate salt  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 64006-44-6
- vii. Ντουλοξετίνη ως άλας (S)-Duloxetine hydrochloride  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 136434-34-9
- viii. Αγομελατίνη ως Agomelatine  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 5 mg, CAS Number 138112-76-2
- ix. N-Desmethylsertraline, ευγενική προσφορά της Pfizer (CP-062508), CAS Number 91797-57-8
- x. Σερτραλίνη ως άλας Sertraline hydrochloride  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 10 mg, CAS Number 79559-97-0
- xi. Κλομπραμίνη ως Clomipramine HCl σε μεθανόλη, Cerilliant (RoundRock, TX, USA), 1,0 mg/mL, CAS Number 17321-77-6

Για τους προσδιορισμούς με αέρια χρωματογραφία ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η κυκλοβενζαπρίνη ως Cyclobenzaprine hydrochloride European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, η οποία προμηθεύτηκε από τον οίκο Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 100 mg, CAS Number 6202-23-9. Ενώ, για τις αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας η χαρμίνη αποτέλεσε το εσωτερικό πρότυπο ως Harmine 98% λαμβανόμενη από τη Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 1g, CAS Number 442-51-3.

Για κάθε αναλύτη παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, για προσδιορισμό με τεχνική αέριας και υγρής χρωματογραφίας, αντίστοιχα, όπου αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  απουσία φωτός. Κατά τον ίδιο τρόπο από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν με κατάλληλες

αραιώσεις τα αντίστοιχα διαλύματα εργασίας (working solutions), με σκοπό τον έλεγχο απόκρισης του κάθε ανιχνευτή. Αντίθετα, τα διαλύματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με αραιώσεις του κάθε υποστρώματος και όχι με οργανικό διαλύτη (matrix-matched standards).

### 2.2.2 Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά

Οι διαλύτες ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό και τριφθοροξικό οξύ που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν υψηλής καθαρότητας (UHPLC grade) και αγοράστηκαν από τον οίκο Fisher Scientific (Loughborough, United Kingdom). Οι διαλύτες διχλωρομεθάνιο, 2-προπανόλη και οξικός αιθυλεστέρας ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τον οίκο Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Δις αποσταγμένο νερό λαμβανόταν από συσκευή συστήματος καθαρισμού Aquatron Water Still A4000D του οίκου Bibby Sterilin Limited (Staffordshire, United Kingdom). Το φορμικό οξύ 99% καθαρότητας ήταν του οίκου Carlo Erba (Arese, MI, Italy), το οξικό οξύ (παγόμορφο) και η αμμωνία 25% του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany) και το οξικό αμμώνιο (UHPLC grade) του οίκου Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany).

Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν τα:

- i. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), CAS Number 24589-78-4
- ii. Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), CAS Number 336-59-4

Η υγρή-στερεή εκχύλιση έγινε με χρήση μικροστηλών δύο τύπων, του οίκου Agilent Technologies (Lake Forest, CA, USA):

- i. Chem Elut (5 mL aqueous capacity, 100 unit/package)
- ii. Bond Elut Certify (3 mL aqueous capacity, sorbent mass 130 mg).

Για τη διήθηση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα μεμβράνης Millex-GV (Polyvinylidene fluoride – PVDF, 13mm, 0,22  $\mu\text{m}$ ) του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Τα φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη αγοράστηκαν από την Thermo Fisher Scientific Inc.

### 2.2.3 Ενόργανες διατάξεις και εργαστηριακός εξοπλισμός

Κατά την ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή των αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού των συγκεκριμένων φαρμάκων στα διάφορα βιολογικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- i. Σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών του οίκου Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)
- ii. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων του οίκου Dionex Softron GmbH, Part of Thermo Fisher Scientific Inc. (Dornierstraße, Germany).

Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός:

- i. Φυγόκεντρος
- ii. Αναλυτικός ζυγός
- iii. Παρασκευαστικός ζυγός
- iv. Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex)
- v. Συσκευή λουτρού υπερήχων
- vi. Συσκευή αντλίας κενού
- vii. Συσκευή θέρμανσης
- viii. Ηλεκτρονικό pHμετρο
- ix. Ομογενοποιητής
- x. Θερμοστατούμενος κλίβανος
- xi. Ψυγείο και καταψύκτης
- xii. Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο
- xiii. Σύστημα υγρής στερεής εκχύλισης
- xiv. Συσκευή παρασκευής υπερκάρθρου νερού
- xv. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (2-20 µL)
- xvi. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (10-100 µL)
- xvii. Ρυθμιζόμενη αυτόματη πιπέτα (100-1000 µL)
- xviii. Ρύγχη πιπετών (2-100 µL)
- xix. Ρύγχη πιπετών (100-1000 µL)
- xx. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσεως
- xxi. Γυάλινα σιφώνια μετρήσεων (5 και 10 mL)
- xxii. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- xxiii. Ογκομετρικές φιάλες (25, 50 και 100 mL)
- xxiv. Ογκομετρικοί κύλινδροι (10, 25, 50 και 100 mL)

- xxv. Γυάλινα δοχεία διαλυτών
- xxvi. Σύριγγες μίας χρήσης (1 mL)
- xxvii. Θερμαντικό σώμα
- xxviii. Φιαλίδια

Λόγω της σπουδαιότητάς τους, παρακάτω γίνεται αναλυτικότερη περιγραφή των συστημάτων και των συνθηκών χρωματογραφίας τόσο αέριας όσο και υγρής, που εφαρμόστηκαν σε αυτήν τη μελέτη.

#### A. Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών (GC-MS)

Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων APs και ADs χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος του οίκου Shimadzu GC-17A συζευγμένος με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών Shimadzu QP5050A. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις διαχωρίστηκαν με τριχοειδή στήλη Equity 5 (30 m × 0,25 mm I.D.) του οίκου Sigma-Aldrich Supelco (Steinheim, Germany), περιεκτικότητας 5% διφαινυλ-/95% διμέθυλο-πολυσιλοξάνιο και με πάχος φάσης 0,25 μm.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης ήταν συνολικής διάρκειας 15,50 min και περιγράφεται παρακάτω:

- i. Αρχική θερμοκρασία φούρνου 150°C και παραμονή για 2 min,
- ii. Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 20°C/min μέχρι 290°C και παραμονή για 5 min.

Η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος ήταν 260°C και ο τρόπος έκχυσης ρυθμισμένος κατά split-splitless. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για τη βέλτιστη λειτουργία του οργάνου, ως φέρον αέριο (carrier gas) χρησιμοποιήθηκε ήλιο με σταθερή ροή 1,5 mL/min. Το τμήμα διασύνδεσης (interface) και η πηγή ιόντων (ion source) είχαν θερμοκρασία 300°C.

Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος πλήρους σάρωσης σε εύρος 40-450 m/z, όπου ο ιονισμός οφειλόταν σε βομβαρδισμό ηλεκτρονίων και τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στα 70 eV. Με σκοπό την αποφυγή καταγραφής του σήματος του διαλύτη η έναρξη του χρωματογραφήματος έγινε με έναν χρόνο καθυστέρησης τριών λεπτών (solvent delay time). Στη μέθοδο επιλεγμένων ιόντων, τα ιόντα-στόχοι κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τον χρόνο κατακράτησης-έκλυσης ( $t_R$ ). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τρία ιόντα από κάθε ένωση (για τη βενλαφαζίνη δύο), σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά των φασμάτων μάζας πλήρους σάρωσης ιόντων, όπως επίσης και με σύγκριση αυτών με τα φάσματα της βιβλιοθήκης.

Τα κριτήρια ποιότητας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ότι οι χρόνοι κατακράτησης των αναλυτών δεν πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από  $\pm 2\%$  σε σχέση με τον αναμενόμενο χρόνο των προτύπων διαλυμάτων και οι σχετικές εντάσεις των επιλεγμένων ιόντων να μη διαφέρουν περισσότερο του 10% από εκείνες των ίδιων ιόντων που λαμβάνονται από αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (εμβολιασμένα δείγματα).

B. Υγρός χρωματογράφος με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού συστοιχίας διόδων (UHPLC-UV/DAD)

Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων έγινε και χρήση υγρής χρωματογραφίας. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με διάταξη UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων UV/VIS, DAD-3000RS (Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific Inc. Dornierstraße, Germany). Το όλο χρωματογραφικό σύστημα διέθετε:

- i. Υποδοχέα διαλυτών SRD-3400
- ii. Δυαδική αντλία HPG-3200RS
- iii. Θερμοστατούμενο, στους 5°C, αυτόματο δειγματολήπτη WPS-3000TRS
- iv. Θερμοστατούμενο φούρνο TCC-3000RS.

Ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών έγινε με χρωματογραφική στήλη Hypersil GOLD (100 mm × 2,1 mm i.d., particle size 1,9 μm) εφοδιασμένη με προστήλη (precolumn cartridge) (2,1 mm × 0,2 μm) επίσης του οίκου Thermo Fisher Scientific. Η θερμοκρασία τόσο της προστήλης όσο και της αναλυτικής στήλης παρέμενε σταθερή στους 30°C, ενώ η ρυθμιζόμενη τιμή θερμοκρασίας μετά τη χρωματογραφική στήλη ήταν 20°C.

Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM με 0,1% φορμικό οξύ (φάση A) και ακετονιτρίλιο (φάση B), με ροή 0,3 mL/min. Η έκλυση ήταν βαθμιδωτή σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

- i. Βήμα: 15% B από 0,0 μέχρι 1,0 min
- ii. Βήμα: 15% μέχρι 55% B μέχρι το 8,0 min
- iii. Βήμα: 55% μέχρι 100% B από 9,0 έως 10,2 min
- iv. Βήμα: έκπλυση με 100% B για 0,2 min
- v. Βήμα: επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (15% B) από 10,4 έως 13,5 min.

Η συνολική διάρκεια του προγράμματος ήταν 10,2 min και η αρχική τιμή πίεσης κατά την ανάλυση ήταν 4500 psi. Επιπλέον, εξετάστηκε και η σταθερότητα των ρυθμιστικών

διαλυμάτων που αποτελούσαν την υδατική κινητή φάση, τα οποία παρέμεναν σταθερά χωρίς την παρουσία αλγών και αιωρημάτων για τουλάχιστον ένα μήνα, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων ρυθμίστηκε ώστε να καταγράφει ορισμένα μήκη κύματος που ήταν χαρακτηριστικά για κάθε αναλύτη, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- i. 225 nm για την αμισουλπρίδη
- ii. 230 nm για τις κλοζαπίνη, N-desmethyloclozapine, αγομελατίνη, βενλαφαξίνη, ντουλοξετίνη, σετραλίνη και N-desmethysertraline
- iii. 238 nm για τις σιταλοπράμη, N-desmethycitalopram και παροξετίνη
- iv. 245 nm για τις κουετιαπίνη και χαρμίνη (I.S.)
- v. 254 nm για τις ολανζαπίνη, αριπιπραζόλη, μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη και κλομιπραμίνη
- vi. 278 nm για τις ρισπεριδόνη και παλιπεριδόνη.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα Chromeleon 7.2 Chromatography Data System, Reversion 1.1 του οίκου Thermo Fisher Scientific Inc.

Τα κριτήρια ταυτοποίησης κάθε προσδιοριζόμενου φαρμάκου ήταν ο χρόνος κατακράτησης και το φάσμα απορρόφησης. Το συγκεκριμένο λογισμικό πρόγραμμα παρείχε τη δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης του φάσματος σε όλο το εύρος της περιοχής UV, με χρήση σειράς φωτοδίοδων, παρέχοντας μια διαχωριστική ικανότητα περίπου 1nm. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την εύρεση και επιλογή του μήκους κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση για κάθε αναλύτη. Συνεπώς, κορυφές που χρωματογραφικά αλληλεπικαλύπτονταν διαχωρίστηκαν φασματοφωτομετρικά (διαφορετική απορρόφηση στο UV).

Γ. Υγρός χρωματογράφος με ανιχνευτή συζευγμένη φασματομετρία μάζας σε σειρά (UHPLC-MS/MS)

Οι μετρήσεις με τη συγκεκριμένη διάταξη πραγματοποιήθηκαν στο Τοξικολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας, Βέλγιο (Toxicological Centre, University of Antwerp, Belgium). Η ενόργανη διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν του οίκου Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa-Clara, California, U.S.A.) αποτελούμενη από απαερωτή, διπλή αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη και θερμοστατούμενο φούρνο. Το

σύστημα υγρής χρωματογραφίας ήταν συζευγμένο με αναλυτή φασματομετρίας μάζας τριπλού τετραπόλου σε σειρά του οίκου Agilent 6460 με τεχνική ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης και συγκεκριμένα ηλεκτροψεκασμού (ESI) εκτελούμενη με Jetstream®.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα Masshunter Workstation Software version B.06.00 του οίκου Agilent Technologies. Έλαβε χώρα βελτιστοποίηση της όλης διάταξης με σκοπό την επίτευξη μεγάλης διαχωριστικής και διακριτικής ικανότητας, για τον λόγο αυτό ο νεκρός όγκος (dead volume) ελαχιστοποιήθηκε με χρήση της μικρότερης διαθέσιμης βελόνας, διαμέτρου (0,075 mm) και με το ελάχιστο δυνατό ύψος.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη ανάστροφης φάσης Agilent SB C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm) του οίκου Agilent Technologies. Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM με pH 3,7 (φάση A) και ακετονιτρίλιο (φάση B), με θερμοκρασία στήλης-φούρνου 40°C και ροή 0,5 mL/min. Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

- i. Βήμα: 10% μέχρι 75% B από 0,0 μέχρι 2,5 min
- ii. Βήμα: 75% μέχρι 95% B μέχρι το 3,0 min
- iii. Βήμα: 95% B από 3,0 έως 4,5 min
- iv. Βήμα: επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (10% B) από 4,6 έως 6 min.

Η συνολική διάρκεια του προγράμματος για τη μέτρηση ενός δείγματος ήταν 6,0 min, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εξισορρόπησης της στήλης. Ο αυτόματος δειγματολήπτης ήταν σε θερμοκρασία δωματίου.

Όσον αφορά τις συνθήκες λειτουργίας του ανιχνευτή MS, ο ιονισμός ήταν θετικός και έγινε με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού Jetstream (ESI). Ως αέριο εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο με:

- i. Θερμοκρασία: 325°C
- ii. Ροή: 10 mL/min
- iii. Πίεση: 30 psi
- iv. Δυναμικό-τάση τριχοειδούς: 4000 V και
- v. Δυναμικό-τάση ακροφυσίου: 500 V.

Ο ανιχνευτής MS ρυθμίστηκε σε λειτουργία «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (multiple reaction monitoring – MRM). Για κάθε

προσδιοριζόμενη ουσία καθορίστηκαν τρία ιόντα (transitions), ο χρόνος κατακράτησης και ένα εύρος αυτού  $\pm 0,5$  min.

Έπειτα όλες οι παραπάνω συνθήκες αποθηκεύτηκαν σε μία μέθοδο MRM. Όλα τα ιόντα (transitions), τα δυναμικά θραυσματοποίησης (fragmentor voltage) και οι ενέργειες σύγκρουσης (collision energy) προσδιορίστηκαν με χρήση του αντίστοιχου λογισμικού προγράμματος Agilent MassHunter Optimizer του οίκου Agilent Technologies. Το ιόν με τη μεγαλύτερη αφθονία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ το δεύτερο και τρίτο σε αφθονία για ποιοτική ταυτοποίηση. Στον Πίνακα 7 φαίνεται μια συνοπτική εικόνα των συνθηκών του αναλυτή μαζών.



**Πίνακας 7:** Πρόδρομα και παραγόμενα ιόντα, ο λόγος αυτών, ο χρόνος κατακράτησης και τα δυναμικά CE και FV της διάταξης UHPLC-MS/MS

Αναλύτης	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Παραγόμενα ιόντα (m/z)	CE (V)	Λόγος ιόντων (%)	FV (V)	RT (min)
Αμισουλπρίδη	370,2	242,0	26	100,0	188	0,96
		196,0	42	51,2		
		112,1	22	34,4		
Αριπιπραζόλη	448,2	285,1	22	100,0	228	2,08
		98,1	38	44,3		
		176,1	30	41,8		
Κλοζαπίνη	327,1	270,0	18	100,0	172	1,72
		192,0	46	75,4		
		164,0	90	21,9		
N-desmethyloclozapine	313,1	192,0	42	100,0	172	1,65
		270,0	22	57,3		
		227,0	26	17,2		
Αλοπεριδόλη	376,2	165,0	22	100,0	172	1,92
		123,0	42	122,1		
		95,1	82	53,3		
Ολανζαπίνη	313,2	256,0	18	100,0	176	0,91
		198,0	42	28,0		
		169,0	42	14,4		
Ρισπεριδόνη	411,2	191,1	26	100,0	188	1,50
		82,1	66	8,3		
		110,0	54	7,3		
Παλιπεριδόνη	427,2	207,1	26	100,0	176	1,36
		110,0	46	26,2		
		82,1	58	7,3		
Κουετιαπίνη	384,2	253,0	18	100,0	172	1,76
		221,1	38	52,0		
		279,1	22	15,8		

#### 2.2.4 Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής, τα βιολογικά υλικά που εξετάστηκαν για τον προσδιορισμό αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων ήταν από το πεδίο της κλινικής και της δικαστικής τοξικολογίας.

##### A. Βιολογικά υλικά ασθενών / υγιών δοτών

Τα κλινικά δείγματα που μελετήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φαρμάκων ήταν το ολικό αίμα, το πλάσμα-ορός αίματος και τα ούρα. Για την ανάπτυξη και επικύρωση των προτεινόμενων αναλυτικών μεθοδολογιών συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος και ορού-πλάσματος από τη Μονάδα Αιμοληψίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ενώ τα δείγμα ούρων από το προσωπικό του εργαστηρίου. Και στις δύο περιπτώσεις τα συγκεκριμένα δείγματα ήταν από υγιείς δότες, με απουσία κάθε φαρμακευτικής αγωγής.

Η εφαρμογή των προτεινόμενων μεθόδων προσδιορισμού αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στα παραπάνω βιολογικά υλικά έλαβε χώρα σε πραγματικά δείγματα που ελήφθησαν από την Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Η παραλαβή του πλάσματος έγινε με φυγοκέντρηση σε 4000 rpm για 10 min από ολικό αίμα το οποίο πριν είχε συλλεχθεί σε σωληνάρια Vacutainer® παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων ( $K_2EDTA$  ή  $K_3EDTA$ ).



**Σχήμα 29:** Σωληνάρια Vacutainer® παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων

Για την παραλαβή του ορού, ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε σε σωληνάρια των 5 mL, BD Vacutainer® SST II (Becton Dickinson) σε 2500 rpm για 10 min.



**Σχήμα 30:** Σωληνάρια Vacutainer® SST II

Τα δείγματα από κάθε ασθενή, κωδικοποιήθηκαν, χωρίστηκαν σε επιμέρους κλάσματα του 1,0 mL και ακολούθησε άμεση ψύξη και αποθήκευση αυτών στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Όλα τα δείγματα αίματος και ούρων παρέμειναν κατεψυγμένα για χρονικό διάστημα μέχρι έξι μήνες.

ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΛΑΤΡΟΣ.  
ΤΗΛ:

ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΛΑΤΡΟΣ. ΤΗΛ:		Ημερομηνία και ώρα αιμοληψίας	
<b>ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ</b> Όνομα η Κωδικός Ημ. Γεν. Φύλλο Βάρος		<input type="checkbox"/> Έσω ασθένειες <input type="checkbox"/> Εξώ ασθένειες Διάγνωση /Συμπτώματα Καπνιστής <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Μίστρος (<10 πατηήμ) <input type="checkbox"/> Βαρύς (>10 πατηήμ)	
<b>ΑΙΤΙΑ</b> (σημειώστε περισσότερες από μια περιπτώσεις) <input type="checkbox"/> Περιτοδικός έλκυστος		<input type="checkbox"/> προσαρμογή της δόσης <input type="checkbox"/> ανεπαρκής βελτίωση <input type="checkbox"/> ανεπιθύμητες ενέργειες (προσδιορίστε παρακάτω)	
<b>Σοβαρότητα της ασθένειας (CGIS)</b> Πόσο διανοητικά άρρωστος είναι ο ασθενής αυτή τη στιγμή: <input type="checkbox"/> νηείς <input type="checkbox"/> οριακά ψυχικά ασθενείς <input type="checkbox"/> ήπια άρρωστος <input type="checkbox"/> μέτρια άρρωστος <input type="checkbox"/> σημαντικά άρρωστος <input type="checkbox"/> σοβαρά άρρωστος <input type="checkbox"/> εξαιρετικά κακή		<b>Βελτίωση (CGIS)</b> Μεταβολή σε σύγκριση με την κατάσταση κατά την εισαγωγή τους <input type="checkbox"/> Πόρα πολύ βελτιωμένη <input type="checkbox"/> Πολύ βελτιωμένη <input type="checkbox"/> Ελάχιστα βελτιωμένη <input type="checkbox"/> καμία αλλαγή <input type="checkbox"/> Ελάχιστα χειρότερα <input type="checkbox"/> Πολύ χειρότερα	
<b>Παρενέργειες (UKU)</b> <input type="checkbox"/> Καμία <input type="checkbox"/> Λίγες <input type="checkbox"/> Μέτριες <input type="checkbox"/> Σοβαρές		<input type="checkbox"/> Δυσκολία συγκέντρωσης <input type="checkbox"/> Εξοστέωση <input type="checkbox"/> Υπνηλία / Καταστολή <input type="checkbox"/> Ένταση / εσωτερική αναταραχή <input type="checkbox"/> Διαταραχές του ύπνου <input type="checkbox"/> Συναισθηματική αδιαφορία <input type="checkbox"/> Δυστονία <input type="checkbox"/> Ακαμψία <input type="checkbox"/> Υποκαηγρία / Ακνηγρία <input type="checkbox"/> Υπερκοινητικότητα <input type="checkbox"/> Τρέμουλο <input type="checkbox"/> Ακαθψρία <input type="checkbox"/> Επώλητικές κρίσεις <input type="checkbox"/> Παρασθησίες <input type="checkbox"/> Πονοκέφαλος <input type="checkbox"/> Διασχεματική διαταραχή <input type="checkbox"/> Σιελόρροια <input type="checkbox"/> Ξηροστομία <input type="checkbox"/> Εμετός / Ναυτία <input type="checkbox"/> Διάρροια <input type="checkbox"/> Δυσκοιλιότητα <input type="checkbox"/> Διαταραχή σφίξης <input type="checkbox"/> Πολυουρία / Πολυδιψία <input type="checkbox"/> Αυξημένη εφίδρωση <input type="checkbox"/> Γάλακτορροια <input type="checkbox"/> Αύξηση βάρους <input type="checkbox"/> Σεξουαλική δυσλειτουργία <input type="checkbox"/> Άλλο (διαυκρινίστε) Απώδης σγξση <input type="checkbox"/> Απιδανός <input type="checkbox"/> Δυνατόν <input type="checkbox"/> Πιθανός	
<b>Φάρμακο (α) προς προσδιορισμό</b>		Διάρκεια Δόση	Ημερήσια δόση
		Ημερνια Έναρξης	Τελευταία Δόση
Άλλα φάρμακα (συμπεριλαμβανομένου φυτικών, ενάλιακτικά, κλπ)			

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ / / --  
ΥΠΟΓΡΑΦΗ \_\_\_\_\_

Σχίμα 31: Έντυπο δειγματοληψίας πλάσματος-ορού από ψυχιατρικούς ασθενείς

## B. Νεκροτομικό υλικό

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας, εκτός από δείγματα κλινικού ενδιαφέροντος, έγινε μελέτη και μεταθανάτιων βιολογικών υλικών. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε ο προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε μεταθανάτιο (ολικό) αίμα, το οποίο συλλέχθηκε, κατά τη διάρκεια νεκροψίας-νεκροτομής, σε σωληνάρια του περιέχουν αντιπηκτικό παράγοντα ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) και συντηρητικό (KF). Επιπλέον, όργανο-στόχος και μελέτης αποτέλεσε το ήπαρ και ο εγκέφαλος για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φαρμάκων. Δείγματα από τους δύο ιστούς συλλέχθηκαν από περιστατικά που υπεβλήθησαν σε νεκροψία-νεκροτομή στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο 2013-2015.

Η διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής πραγματοποιήθηκε 12-18 ώρες μετά τη στιγμή του θανάτου, ενώ η απαιτούμενη συντήρηση του πτώματος έγινε με ψύξη στους  $4^\circ\text{C}$ . Τα περιστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτή τη μελέτη είναι όλα από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου, όπου υπέστησαν αιφνίδιο ή βίαιο θάνατο. Οι ιστοί του κάθε περιστατικού, τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιήθηκαν σε ειδικό ομογενοποιητή. Τα μικρότερα ομογενοποιημένα δείγματα (~10 gr) τοποθετήθηκαν σε περιέκτες πολυαιθυλενίου, κατάλληλους για νεκροτομικά υλικά όπου και κωδικοποιήθηκαν. Τέλος, ακολούθησε άμεση ψύξη και αποθήκευση των δειγμάτων στους  $-20^\circ\text{C}$ , μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους.

### 2.2.5 Επεξεργασία δειγμάτων

#### 2.2.5.1 Επεξεργασία δειγμάτων και ανάλυση με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (GC-MS)

Με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών, προσδιοριστήκαν τα αντιψυχωσικά κλοζαπίνη, ολανζαπίνη και αλοπεριδόλη και από την ομάδα των αντικαταθλιπτικών η μιρταζαπίνη, κλομιπραμίνη, βουπροπιόνη, σετραλίνη, σιταλοπράμη και βενλαφαξίνη. Συγκεκριμένα, μετά τα πειράματα ανάπτυξης και επικύρωσης των αναλυτικών μεθοδολογιών, το τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης και επεξεργασίας δείγματος διαμορφώθηκε όπως αναπτύσσεται παρακάτω.

Μεταφορά 1,0 mL δείγματος (πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, ούρα) σε γυάλινο εσφυρισμένο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα, εμβολιασμός με 100 ng κυκλοβενζαπρίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Προσθήκη 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{pH}=9,5$  συγκέντρωσης 0,1 M, ισχυρή ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης και

φυγοκέντρηση του δείγματος στις 4000 rpm για 10 min. Παραλαβή του δείγματος (υπερκείμενη φάση) με πλαστική πιπέτα μίας χρήσεως και εισαγωγή αυτού, χωρίς εφαρμογή κενού, σε στήλη SPE Chem Elut, παραμονή του δείγματος στο προσροφητικό υλικό της στήλης για 10 min. Έκλουση των αναλυτών, χωρίς εφαρμογή κενού, με προσθήκη επί δύο φορές 5,0 mL διαλύτη εκχύλισης διχλωρομεθάνιο : ισοπροπανόλη (90:10, v/v), μίγμα το οποίο παρασκευάζεται εντός της εργαστηριακής ημέρας. Το έκλουσμα συλλέγεται σε γυάλινο φιαλίδιο και ακολουθεί εξάτμιση αυτού μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 40°C.

Η κλοζαπίνη, μιρταζαπίνη, κλομιπραμίνη, βουπροπιόνη, σιταλοπράμη και σερτραλίνη, προσδιορίστηκαν αεριο-χρωματογραφικά, χωρίς παραγωγοποίηση, με το τελικό εκχύλισμα να επαναδιαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα όγκου 50,0 mL.

Για την ανάλυση των αντιψυχωσικών ολανζαπίνης και αλοπεριδόλης πραγματοποιήθηκε αντίδραση παραγωγοποίησης με προσθήκη στο εκχύλισμα 50,0 mL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) και παραμονή αυτού για 45 min στους 80°C. Τέλος, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ομοίως, για τον προσδιορισμό της βενλαφαξίνης έλαβε χώρα στάδιο παραγωγοποίησης πριν την ανάλυση. Στο εκχύλισμα προστέθηκαν 50,0 mL heptafluorobutyric anhydride (HFBA) σε 100,0 mL οξικού αιθυλεστέρα και παραμονή του μίγματος για 30 min στους 50°C. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το δείγμα εξατμίζεται ξανά μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub> και τελικώς επαναδιαλύεται σε 50,0 mL οξικού αιθυλεστέρα. Σε κάθε περίπτωση 1,0 mL του τελικού εκχυλίσματος εισάγεται στο σύστημα GC-MS.

Σε περίπτωση κλινικού ή νεκροτομικού δείγματος, όπου η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών είναι εκτός του εύρους εργασίας (working range), μεγαλύτερη δηλαδή από το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης, τότε το δείγμα αραιώνεται. Συγκεκριμένα, με προσθήκη 1,0 ή 49,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών saline (PBS) pH=7,4, σε 1,0 mL δείγματος, λαμβάνοντας αραιώσεις 1:1 και 1:50, αντίστοιχα. Τέλος, 1,0 mL του αραιωμένου δείγματος επεξεργάζεται σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο εκχύλισης.

### 2.2.5.2 Επεξεργασία δειγμάτων για ανάλυση με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού συστοιχίας διόδων (UHPLC-UV/DAD)

Με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού συστοιχίας διόδων (UHPLC-UV/DAD), προσδιοριστήκαν τα επιλεγμένα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής. Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων ανάπτυξης και επικύρωσης των αναλυτικών μεθοδολογιών, το τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης και επεξεργασίας των υγρών βιολογικών υποστρωμάτων (πλάσμα, ορός, ολικό αίμα και ούρα) διαμορφώθηκε όπως αναπτύσσεται παρακάτω.

Μεταφορά 1,0 mL δείγματος σε γυάλινο εσφυρισμένο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα, εμβολιασμός με 100 ng χαρμίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Προσθήκη 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M, ισχυρή ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης και φυγοκέντρηση του δείγματος στις 4000 rpm για 10 min. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού της στήλης SPE Bond Elute Certify με εφαρμογή κατά σειρά 3,0 mL μεθανόλης, 3,0 mL δις αποσταγμένου ύδατος και 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,1 M. Παραλαβή του δείγματος (υπερκεείμενη φάση) με πλαστική πιπέτα μίας χρήσεως και εισαγωγή αυτού, χωρίς εφαρμογή κενού, στη στήλη SPE. Έκπλυση της στήλης εκχύλισης με εφαρμογή κατά σειρά 3,0 mL δις αποσταγμένου ύδατος και 1,0 mL οξικού οξέος συγκέντρωσης 1,0 M με εφαρμογή μέγιστου κενού για μερικά λεπτά.

Η έκλυση των αναλυτών πραγματοποιείται, χωρίς εφαρμογή κενού, με προσθήκη επί δύο φορές 1,5 mL διαλύτη εκχύλισης μεθανόλη : π. αμμωνία (98:2, v/v), μίγμα το οποίο παρασκευάζεται εντός της εργαστηριακής ημέρας. Το έκλουσμα συλλέγεται σε γυάλινο φιαλίδιο και ακολουθεί εξάτμιση αυτού μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 40°C. Το τελικό εκχύλισμα επαναδιαλύεται σε 100,0 μL μίγματος υδατικής κινητής φάσης A (10 mM με 0,1% φορμικό οξύ) και οργανικής φάσης B (ακετονιτρίλιο), σε αναλογία (50:50, v/v). Τέλος, φιλτράρεται και μεταφέρεται σε φιαλίδιο ανάλυσης, το οποίο τοποθετείται στον αυτόματο δειγματολήπτη όπου 5,0 μL αυτού εισάγονται στο σύστημα UHPLC-UV/DAD.

Εκτός από το πλάσμα, τον ορό, το ολικό αίμα και τα ούρα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε μελέτη προσδιορισμού των επιλεγμένων APs και ADs σε ανθρώπινο ιστό ήπατος και εγκεφάλου. Οι ιστοί, σε αντίθεση με τα βιολογικά υγρά επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της υγρής – υγρής εκχύλισης. Μετά από την εκτέλεση πειραμάτων βελτιστοποίησης οι τελικές συνθήκες επεξεργασίας του ιστός ήπατος ήταν όπως αναπτύσσονται παρακάτω.

Αντιπροσωπευτικό ομογενοποιημένο δείγμα ιστού, 1,0 g, τοποθετείται σε γυάλινο εσφυρισμένο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα και εμβολιάζεται με 100 ng χαρμίνης ως εσωτερικό πρότυπο. Προσθήκη 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M. Ακολουθεί προσθήκη 3,0 mL διαιθυλαιθέρα, ως διαλύτης εκχύλισης, ισχυρή ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης, παραμονή του δείγματος σε λουτρό υπερήχων για 10 min και φυγοκέντρηση αυτού στις 4000 rpm για 10 min. Το εκχύλισμα (υπερεκείμενη φάση) παραλαμβάνεται με πλαστική πιπέτα μίας χρήσεως και συλλέγεται σε φιαλίδιο. Το δείγμα υφίσταται έναν δεύτερο κύκλο υγρής – υγρής εκχύλισης με την ίδια ακριβώς διαδικασία. Το συνολικό εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 40°C και επαναδιαλύεται σε 100,0 μL μίγματος υδατικής κινητής φάσης A (10 mM με 0,1% φορμικό οξύ) και οργανικής φάσης B (ακετονιτρίλιο), σε αναλογία (50:50, v/v). Τέλος, φιλτράρεται και μεταφέρεται σε φιαλίδιο ανάλυσης, το οποίο τοποθετείται στον αυτόματο δειγματολήπτη όπου 5,0 μL αυτού εισάγονται στο σύστημα UHPLC-UV/DAD.

Σε περίπτωση κλινικού ή νεκροτομικού δείγματος, όπου η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών είναι εκτός του εύρους εργασίας (working range), μεγαλύτερη δηλαδή από το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης, τότε το δείγμα αραιώνεται. Συγκεκριμένα, με προσθήκη 1,0 ή 49,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH=7,4, σε 1,0 mL δείγματος, λαμβάνοντας αραιώσεις 1:1 και 1:50, αντίστοιχα. Τέλος, 1,0 mL του αραιωμένου δείγματος επεξεργάζεται σύμφωνα με τις παραπάνω μεθόδους εκχύλισης.

#### **2.2.5.3 Επεξεργασία δειγμάτων για ανάλυση με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών σε σειρά (UHPLC-MS/MS)**

Η επεξεργασία δειγμάτων πλάσματος – ορού με τη διάταξη (UHPLC-MS/MS) έγινε στο Τοξικολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας, Βέλγιο (Toxicological Centre, University of Antwerp, Belgium). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης 200,0 μL δείγματος πλάσματος – ορού μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο Eppendorf των 2,0 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) με επακόλουθη προσθήκη 20,0 μL ακετονιτρίλιου και 20,0 μL εσωτερικού προτύπου. Εν συνεχεία, 50,0 μL ανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος (1 M, pH 9,5) προστέθηκαν στο μίγμα. Η εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών έγινε με προσθήκη 1,0 mL methyl tert-butyl ether (ethanol stabilized) (MTBE). Το δείγμα αναδεύεται για 1 min σε συσκευή Eppendorf MixMate (Eppendorf AG) σε 2000 rpm. Μετά από φυγοκέντρηση (5 min, 9000 ×g), η οργανική στιβάδα μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf όγκου 1,5 mL όπου εξατμίζεται μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 40°C. Το εκχύλισμα επαναδιαλύεται σε 50,0 μL ακετονιτρίλιου, αναδεύεται για 30s και φυγοκεντρείται για 2



min σε 4000×g. Τέλος, το εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο ανάλυσης, το οποίο τοποθετείται στον αυτόματο δειγματολήπτη όπου 0,3 μL αυτού εισάγονται στο σύστημα UHPLC-MS/MS.

### 2.2.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας

Με σκοπό την επαλήθευση της καταλληλότητας και της απόδοσης των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε επικύρωση αυτών. Ο τρόπος επικύρωσης των μεθοδολογιών έγινε με κατευθυντήριες γραμμές από την Ευρωπαϊκή Οδηγία (2002/657/ΕΚ), από διεθνή πρότυπα, όπως του FDA (Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation), από επιστημονικές εταιρίες (TIAFT, SWGTOX), καθώς και από δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά υψηλής απήχησης (Peters et al. 2007). Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που μελετήθηκαν ήταν:

#### A. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Με τη μελέτη εκλεκτικότητας διασφαλίζεται ότι η προτεινόμενη μέθοδος παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα συστατικά του μίγματος, χωρίς αυτά να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Κουμπάρης 2015). Ο έλεγχος εκλεκτικότητας διακρίνει τα προσδιοριζόμενα APs και ADs από άλλα φάρμακα ή ναρκωτικές ουσίες, μεταβολίτες και από συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν δέκα τυφλά (blank) δείγματα από διαφορετικούς δότες για κάθε ένα από τα εξεταζόμενα βιολογικά υποστρώματα. Επίσης, τα παραπάνω δείγματα εμβολιάστηκαν με άλλες ξενοβιοτικές ουσίες και φάρμακα που ήταν πιθανόν να υπάρχουν σε κλινικά και νεκροτομικά δείγματα, όπως τα ηρεμιστικά φάρμακα: διαζεπάμη, βρωμαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, οξαζεπάμη, φλουραζεπάμη και τις ναρκωτικές ουσίες: μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακέτυλο-μορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλεκγονίνη, τετραϋδροκανναβινόλη (tetrahydrocannabinol – THC) και 11-καρβοξυ- $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (11-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol – THCA).

#### B. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα εξετάστηκε σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (working range) των αναλυτικών μεθόδων, τόσο σε θεραπευτικά όσο και σε τοξικά επίπεδα των προσδιοριζόμενων φαρμάκων με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα (εμβασμό χρωματογραφικής κορυφής) ως προς τη συγκέντρωση του κάθε αναλύτη. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σε 5 – 6 επίπεδα εμβολιασμού με τρεις επαναλήψεις στο κάθε επίπεδο. Η αξιολόγηση έγινε με στατιστικές μεθόδους

(ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων), υπολογίζοντας για κάθε αναλύτη την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης και τον συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination,  $R^2$ ) (Κουμπάρης 2015).

#### Γ. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, bias) μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής ( $\mu$ ). Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται από τυχαία (random errors) ή/και συστηματικά σφάλματα (bias) (Κουμπάρης 2015). Στις αναλυτικές μεθοδολογίες μέτρο της ακρίβειας αποτελεί η ανάκτηση (Recovery, R%) που υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$R\% = \left\{ \frac{[\text{Αναλύτη}]_{\text{ανιχν}}}{[\text{Αναλύτη}]_{\text{εμβολ}}} \right\} \times 100\%$$

όπου,  $[\text{Αναλύτη}]_{\text{ανιχν}}$  η συγκέντρωση του αναλύτη που τελικά ανιχνεύθηκε στο εμβολιασμένο υπόστρωμα και  $[\text{Αναλύτη}]_{\text{εμβολ}}$  η συγκέντρωση εμβολιασμού. Η αξιολόγηση της ακρίβειας – ανάκτησης έγινε για κάθε περίπτωση (μεθοδολογία, αναλύτης, υπόστρωμα) με τρία δείγματα ελέγχου ποιότητας, σε αντίστοιχα τρία επίπεδα συγκέντρωσης, ένα χαμηλό, μεσαίο και υψηλό. Η ανάλυση κάθε δείγματος ελέγχου έγινε επαναληπτικά πέντε φορές.

#### Δ. Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου, και μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των μετρήσεων όταν η ανάλυση επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές (Κουμπάρης 2015). Η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα (within a day/intra-day precision) και μεταξύ ημερών αναπαραγωγιμότητα (between days/inter-day precision) αποτελούν μέτρα πιστότητας που εκφράζονται ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD%). Σε κάθε περίπτωση (εκχύλιση, αναλύτης, υπόστρωμα), η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκαν σε τρία επίπεδα (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό) για κάθε αναλύτη. Για την εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών πιστότητα έλαβαν χώρα έξι επαναλήψεις σε μία ημέρα και σε διάστημα επτά ημερών, αντίστοιχα.

### E. Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Η ανιχνευσιμότητα υποδηλώνει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limits of Quantification, LOQ). Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου (Κουμπάρης 2015). Τα LODs και LOQs στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 ( $S/N=3$ ) και 10 ( $S/N=10$ ), αντίστοιχα.

### ΣΤ. Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη της σταθερότητας είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς τις περισσότερες φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως. Έτσι επιβάλλεται να ελέγχεται η μέθοδος για τη σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Αυτό συμβαίνει, γιατί το δείγμα μπορεί να αλλοιωθεί πριν την ανάλυση, είτε στο στάδιο επεξεργασίας ή καθαρισμού του δείγματος, είτε ακόμα και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Έτσι, ο έλεγχος της σταθερότητας των αναλυτών στα βιολογικά δείγματα πρέπει να γίνεται σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και σε διάφορα στάδια: κατά τη δειγματοληψία, κατά την αποθήκευση του δείγματος και κατά την ανάλυση.

Τα είδη σταθερότητας που μελετήθηκαν για κάθε περίπτωση (εκχύλιση, αναλύτης, υπόστρωμα) ήταν:

- i. Η βραχυπρόθεσμη σταθερότητα, η οποία εξετάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 24 ωρών (short-term stability) και σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) για διάστημα 72 ωρών
- ii. Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα, η οποία εξετάστηκε σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C) για διάστημα 6 μηνών (long-term stability)
- iii. Η σταθερότητα κύκλων κατάψυξης-απόψυξης (freeze-thaw stability) και συγκεκριμένα για τρεις κύκλους
- iv. Η σταθερότητα του εκχυλίσματος μετά την επεξεργασία του δείγματος (post-preparation stability), με τοποθέτησή του στον αυτόματο δειγματολήπτη, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για διάστημα 24 ωρών
- v. Η σταθερότητα προτύπων διαλυμάτων (stock solution stability), με μέτρηση φρέσκου παρασκευασμένου προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 ng/mL και διαλύματος το οποίο είχε αποθηκευτεί σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C) για 2 μήνες.

Τα πειράματα σταθερότητας εκτελέστηκαν για τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό) με έξι επαναλήψεις για κάθε επίπεδο. Γενικά, ως αποδεκτό εύρος απόκλισης ορίστηκε το 80–120% της συγκέντρωσης του προσφάτως εμβολιασμένου δείγματος.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με αέρια χρωματογραφία

##### 3.1.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών

Ο όρος «βελτιστοποίηση» χρησιμοποιείται στην Αναλυτική Χημεία για να δηλωθεί η αναζήτηση εκείνων των πειραματικών συνθηκών που οδηγούν στο καλύτερο πιθανό πειραματικό αποτέλεσμα – απόκριση (response).

Οι συνθήκες του χρωματογραφικού συστήματος επηρεάζουν καθοριστικά τον επιτυχημένο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη των παραμέτρων του αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών που δύναται να επηρεάσουν την ανάλυση καθώς και πειράματα βελτιστοποίησής τους. Η βελτιστοποίηση έγινε μεταβάλλοντας έναν παράγοντα τη φορά (one factor at a time – OFAT) αναλύοντας πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.

#### A. Τρόπος εισαγωγή του δείγματος

Μία αρχική παράμετρος ήταν ο τρόπος εισαγωγής του δείγματος. Εξετάστηκε η επίδραση της μεθόδου εισαγωγής με διαμοιρασμό (split) και με διαμοιρασμό/μη διαμοιρασμό (split/splitless). Βάση του χρωματογραφήματος που ελήφθησε, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών, ο τρόπος που επιλέχτηκε ήταν ο δεύτερος.

#### B. Θερμοκρασία εισαγωγέα δείγματος

Σχετικά με τη θερμοκρασία κατά την εισαγωγή του δείγματος εξετάστηκαν οι τιμές: 240°C, 250°C, 260°C και 280°C. Η σύγκριση της θερμοκρασίας του εισαγωγέα έγινε βάση του χρωματογραφήματος των αναλυτών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων ως βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας κατά την εισαγωγή του δείγματος ορίστηκε αυτή των 260°C.

#### Γ. Θερμοκρασία τμήματος διασύνδεσης

Για τον επιτυχή προσδιορισμό των εξεταζόμενων APs και ADs, έπρεπε να επιλεγεί και η θερμοκρασία του τμήματος διασύνδεσης (interface). Οι τιμές που μελετήθηκαν ήταν

280°C, 290°C και 300°C. Η σύγκριση των θερμοκρασιών έγινε βάση του χρωματογραφήματος των αναλυτών, συγκεκριμένα, του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τα πειράματα βελτιστοποίησης προέκυψε ότι η αύξηση της ευαισθησίας ήταν ανάλογη της θερμοκρασίας του τμήματος διασύνδεσης, συνεπώς επιλέχθηκε η μέγιστη τιμή αυτή των 300 °C.

#### Δ. Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου

Σε κάθε ενόργανη διάταξη αέριας χρωματογραφίας επιλέγεται μία τιμή ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου. Στο συγκεκριμένο σύστημα GC-MS ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο. Οι τιμές ροής που εξετάστηκαν ήταν: 0,8 mL/min, 1,0 mL/min και 1,5 mL/min. Η σύγκριση των ροών του φέροντος αερίου έγινε βάση του χρωματογραφήματος των αναλυτών, συγκεκριμένα, του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν καλύτερος με την αύξηση της ροής του ηλίου, οπότε επιλέχθηκε η μέγιστη τιμή 1,5 mL/min.

#### Ε. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στήλης

Κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της ανάλυσης των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με αέριο χρωματογράφο σημαντική παράμετρος ήταν η εύρεση ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος. Εξετάστηκαν διάφορα θερμοκρασιακά προγράμματα θερμοστάτησης της στήλης, όπως αυτά φαίνονται στον Πίνακα 8. Η σύγκριση και η επιλογή των θερμοκρασιακών προγραμμάτων της στήλης έγινε βάση της χρωματογραφίας των αναλυτών, συγκεκριμένα, του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν καλύτερος με την τελευταία δοκιμή (10) όπου και αυτή επιλέχθηκε.

**Πίνακας 8:** Δοκιμές θερμοκρασιακών προγραμμάτων χρωματογραφικής στήλης σε GC-MS

<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 1</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	60,0	1,50
20,0	160,0	7,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 2</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	100,0	1,50
20,0	160,0	7,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 3</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	100,0	3,50
20,0	160,0	7,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 4</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	100,0	1,50
15,0	160,0	7,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 5</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	100,0	3,50
25,0	160,0	7,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0



<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 6</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	80,0	3,50
25	160,0	5,00
10,0	200,0	2,00
12,0	280,0	10,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 7</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	120,0	2,0
35,0	200,0	1,0
15,0	290,0	4,2
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 8</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	120,0	1,0
33,0	230,0	1,0
12,0	290,0	5,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 9</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	120,0	1,0
33,0	230,0	1,0
12,0	295,0	4,0
<b>Θερμοκρασιακό πρόγραμμα 10</b>		
Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
-	120,0	2,0
20,0	290,0	5,0

**Πίνακας 9:** Χρόνοι κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε διάταξη GC-MS χωρίς παραγωγποίησης

<b>Αναλύτης</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Ιόντα (m/z)<sup>a</sup></b>
Βουπροπιόνη	4,62	<b>44</b> , 100, 224
Κυκλοβενζαπρίνη (IS)	8,58	<b>58</b> , 202, 215
Μιρταζαπίνη	8,72	<b>195</b> , 180, 208
Σερτραλίνη	9,50	<b>274</b> , 159, 304
Σιταλοπράμη	9,67	<b>58</b> , 190, 324
Κλομιπραμίνη	9,75	<b>58</b> , 227, 269
Κλοζαπίνη	13,45	<b>243</b> , 192, 256

<sup>a</sup>Τα ιόντα με έντονο μαύρο χρώμα επιλέχθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό

**Πίνακας 10:** Χρόνοι κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε διάταξη GC-MS ως TMS παράγωγα

Αναλύτης	$t_R$ (min)	Ιόντα (m/z) <sup>a</sup>
Κυκλοβενζαπρίνη (IS)	8,58	<b>58</b> , 202, 215
Ολανζαπίνη-TMS	11,43	<b>301</b> , 285, 286
Αλοπεριδόλη-TMS	14,29	<b>296</b> , 123, 206

<sup>a</sup>Τα ιόντα με έντονο μαύρο χρώμα επιλέχθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό

**Πίνακας 11:** Χρόνος κατακράτησης και επιλεγμένα ιόντα της βενλαφαξίνης σε διάταξη GC-MS ως HFB παράγωγο

Αναλύτης	$t_R$ (min)	Ιόντα (m/z) <sup>a</sup>
Κυκλοβενζαπρίνη (IS)	8,58	<b>58</b> , 202, 215
Βενλαφαξίνη-HFB	10,05	<b>58</b> , 115

<sup>a</sup>Τα ιόντα με έντονο μαύρο χρώμα επιλέχθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό

### 3.1.2 Βελτιστοποίηση αντιδράσεων παραγωγοποίησης

Για τον αεριο-χρωματογραφικό προσδιορισμό συγκεκριμένων αναλυτών, τόσο αντιψυχωσικών όσο και αντικαταθλιπτικών, χρειάστηκε πριν την ανάλυση να γίνει παραγωγοποίηση αυτών. Μέρος της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της όλης αναλυτικής μεθοδολογίας ήταν συνεπώς και οι δοκιμές για την εύρεση των κατάλληλων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης και των αντίστοιχων συνθηκών της κάθε αντίδρασης. Τα πειράματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας παραγωγοποίησης έγιναν με μεταβολή της θερμοκρασίας και του χρόνου αντίδρασης αναλύοντας το παράγωγο σε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω:

#### A. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA)

Στην περίπτωση της χρήση του MSTFA, σε κάθε δοκιμή 50  $\mu$ L του προτύπου διαλύματος συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκαν με τον ίδιο όγκου αντιδραστηρίου. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι αντίδρασης που μελετήθηκαν ήταν: 70°C, 80°C, 100°C και 15 min, 30 min, 40 min, 45 min, 60 min, αντίστοιχα. Η σύγκριση και η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών έγινε βάση της ποιότητας του σχηματιζόμενου παραγώγου και συγκεκριμένα, της ευαισθησία που παρουσιάζει και της συμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής που παρέχει ως αναλυτικό σήμα. Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι για την ανάλυση των αντιψυχωσικών ολανζαπίνης και αλοπεριδόλης πραγματοποιήθηκε αντίδραση παραγωγοποίησης με MSTFA και παραμονή αυτού για 45 min στους 80°C.

#### B. Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)

Επίσης, εξετάστηκε το HFBA σαν αντιδραστήριο παραγωγοποίησης. Σε κάθε δοκιμή 50  $\mu$ L του προτύπου διαλύματος συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκαν με 100  $\mu$ L οξικού αιθυλεστέρα με προσθήκη 50  $\mu$ L από το συγκεκριμένο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης, μετά από την ολοκλήρωση της αντίδρασης το παράγωγο εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και τελικώς επαναδιαλύεται σε 50  $\mu$ L οξικού αιθυλεστέρα. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι αντίδρασης που μελετήθηκαν ήταν: 50°C, 70°C, 95°C και 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, αντίστοιχα. Η σύγκριση και η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών έγινε βάση της ποιότητας του σχηματιζόμενου παραγώγου και συγκεκριμένα, της ευαισθησία που παρουσιάζει και της συμμετρίας της χρωματογραφικής κορυφής που παρέχει ως αναλυτικό σήμα. Τα παραπάνω πειράματα βελτιστοποίησης οδήγησαν στο

συμπέρασμα ότι ο αεριο-χρωματογραφικός προσδιορισμός της βενλαφαξίνης ήταν καλύτερος μετά από αντίδραση με HFBA και συγκεκριμένα στους 50°C για χρονικό διάστημα 30 min.

Γ. N-methyl-N-t-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) με 1% tert-butyltrimethylchlorosilane (t-BDMCS)

Το MTBSTFA με 1% t-BDMCS, ήταν το τρίτο αντιδραστήριο το οποίο μελετήθηκε κατά την ανάπτυξη του προσδιορισμού των επιλεγμένων αναλυτών με αέρια χρωματογραφία. Πριν την έναρξη της αντίδρασης το πρότυπο διάλυμα επαναδιαλύεται σε 60 mL τολουολίου με προσθήκη 40 mL αντιδραστήριου MTBSTFA με 1% t-BDMCS. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι αντίδρασης που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη διαδικασία παραγωγοποίησης ήταν: 50°C, 70°C, 95°C και 20 min, 30 min, 40 min, 60 min, αντίστοιχα. Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών αντίδρασης, αποδείχθηκε πως για κανέναν αναλύτη δεν επιτεύχθηκε σχηματισμός κατάλληλου παραγώγου που να μπορεί να αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία, συνεπώς το MTBSTFA με 1% t-BDMCS αποκλείστηκε από περαιτέρω εφαρμογή και μελέτη. Τα τελικά αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης για τη διαδικασία παραγωγοποίησης φαίνονται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12:** Βέλτιστες συνθήκες παραγωγοποίησης για ολανζαπίνη, αλοπεριδόλη και βενλαφαξίνη

Αναλύτης	Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Αντίδρασης (min)	Τελικό παράγωγο
Ολανζαπίνη	MSTFA	80	45	Ολανζαπίνη-TMS
Αλοπεριδόλη	MSTFA	80	45	Αλοπεριδόλη-TMS
Βενλαφαξίνη	HFBA	50	30	Βενλαφαξίνη-HFB

### 3.1.3 Βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης βιολογικών δειγμάτων

Η βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης – επεξεργασίας βιολογικών δειγμάτων έγινε με τον κλασικό τρόπο. Συγκεκριμένα, με τη μεταβολή ενός μόνο παράγοντα τη φορά (one-variable-at-a-time) και την επίδραση που αυτή είχε στην απόκριση (ανάκτηση) της αναλυτικής μεθοδολογίας, ενώ όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμεναν σταθεροί.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής οι μέθοδοι εκχύλισης που μελετήθηκαν για τον αέριο-χρωματογραφικό προσδιορισμό APs και ADs σε βιολογικά υγρά ήταν η υγρή-υγρή εκχύλιση και υγρή-στερεή εκχύλιση. Όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο της μελέτης έγιναν με γνωστής συγκέντρωσης εμβολιασμένα δείγματα, 500 ng/mL για τα υγρά βιολογικά υλικά και 1000 ng/g για τους ιστούς.

#### A. Υγρή-υγρή εκχύλιση

Ο πλέον σημαντικός παράγοντας σε μία διεργασία LLE είναι ο διαλύτης εκχύλισης. Οι διαλύτες των οποίων μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση και γενικότερα η καταλληλότητα τους ήταν το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας, ο οξικός βουτυλεστέρας, ο t-βουτυλ-μεθυλ-αιθέρας, η ισοπροπανόλη και η μεθανόλη. Με μεγάλο πλήθος δοκιμών ελέγχθηκαν όλοι οι παραπάνω διαλύτες καθώς και πληθώρα συνδυασμών αυτών. Σε κάθε δοκιμή ο όγκος του εμβολιασμένου δείγματος ήταν 1 mL για τα υγρά βιολογικά δείγματα και 1 g για τους ιστούς.

Μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η τιμή του pH, με προσθήκη την πρώτη φορά 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=9,5 συγκέντρωσης 0,1 M και 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M τη δεύτερη. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο όγκος του διαλύτη καθώς και οι κύκλοι εκχύλισης, συγκεκριμένα έγιναν δοκιμές με 1, 2, 3 mL ανά κύκλο εκχύλιση και εξετάστηκαν ένας, δύο και τρεις κύκλοι εκχύλισης. Για την υποβοήθηση της εκχύλισης και την αύξηση απόδοσης της μεθόδου εκτός από ισχυρή ανάδευση έγινε και χρήση υπερήχων (ultrasound liquid-liquid extraction) για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min, παραλαβή της οργανικής στιβάδας και επανάληψη του κύκλου εκχύλισης ανάλογα με τη δοκιμή βελτιστοποίησης. Τέλος, το συνολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε και επαναδιαλύθηκε είτε για απευθείας έγχυση στον αέριο χρωματογράφο είτε για να προηγηθεί παραγωγοποίηση πρώτα.

Οι τιμές ανάκτησης για την πλειοψηφία τόσο των αντιψυχωσικών όσο και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων στα βιολογικά υγρά δεν ήταν ικανοποιητικές και επιπλέον τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα ήταν αρκετά επιβαρυμένα από παρεμποδίζουσες ουσίες, όπως και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Για τους παραπάνω λόγους μελετήθηκε και η υγρή-στερεή εκχύλιση.

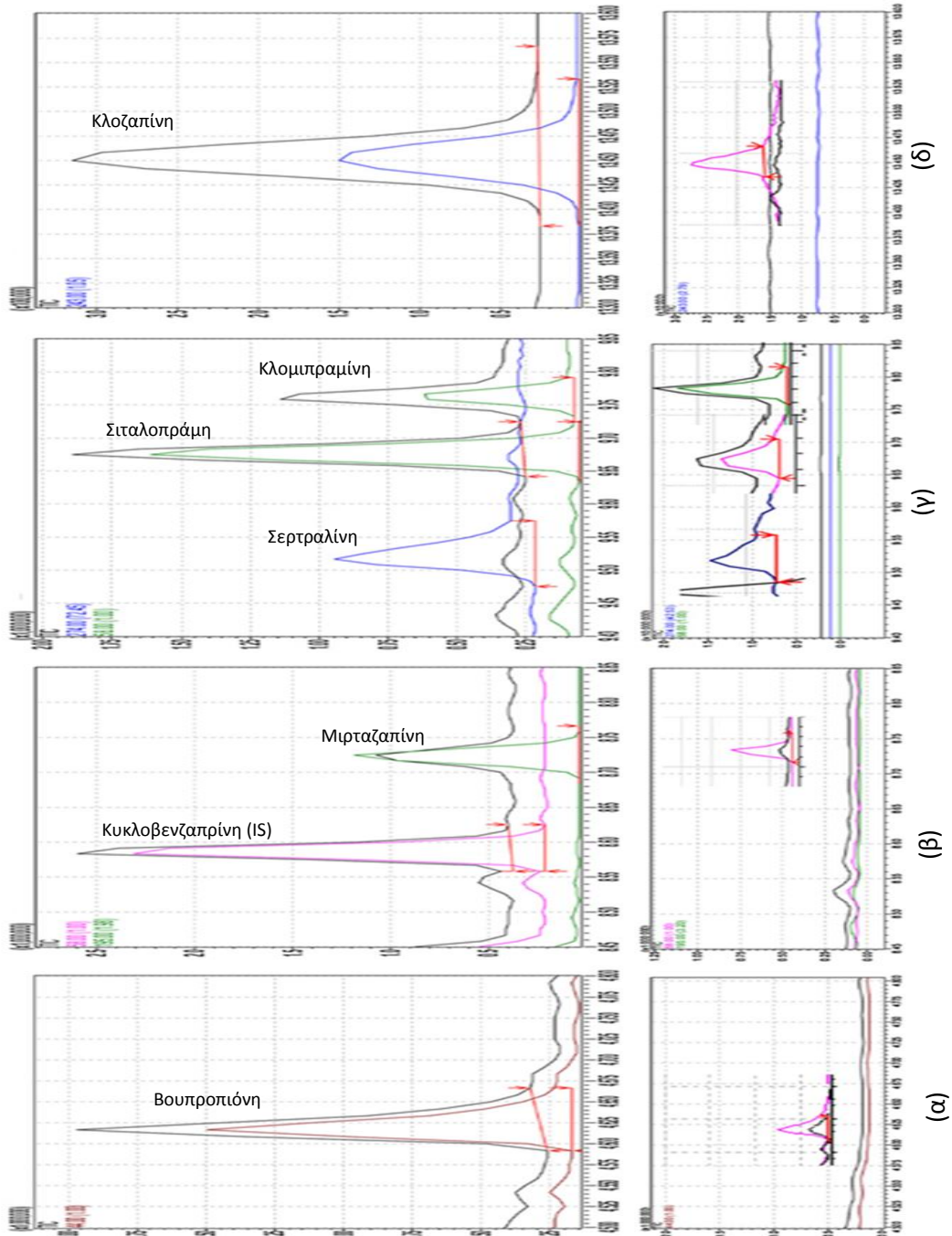
#### B. Υγρή-στερεή εκχύλιση

Κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης της επεξεργασίας δειγμάτων με υγρή-στερεή εκχύλιση δοκιμάστηκαν αρχικά διάφοροι τύποι στηλών εκχύλισης στερεάς φάσης και συγκεκριμένα οι: Chem Elute, Bond Elute C18, Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) και η Isolute HXC. Από τις δοκιμές αυτές φάνηκε ότι τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης επετεύχθησαν με χρήση των Chem Elute, οι υπόλοιπες είχαν ως αποτέλεσμα την παραλαβή αρκετά επιβαρυμένων εκχυλισμάτων με πληθώρα παρεμποδίζουσων ουσιών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Σε μερικές στήλες η ροή του δείγματος, ειδικά του ολικού αίματος, ήταν αρκετά δύσκολη και χρονοβόρα, φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στις Chem Elute. Επιπλέον, με τη συγκεκριμένη επιλογή ο χρόνος επεξεργασίας δείγματος ήταν αρκετά σύντομος καθότι δεν ήταν απαραίτητη η προσθήκη σταδίου καθαρισμού.

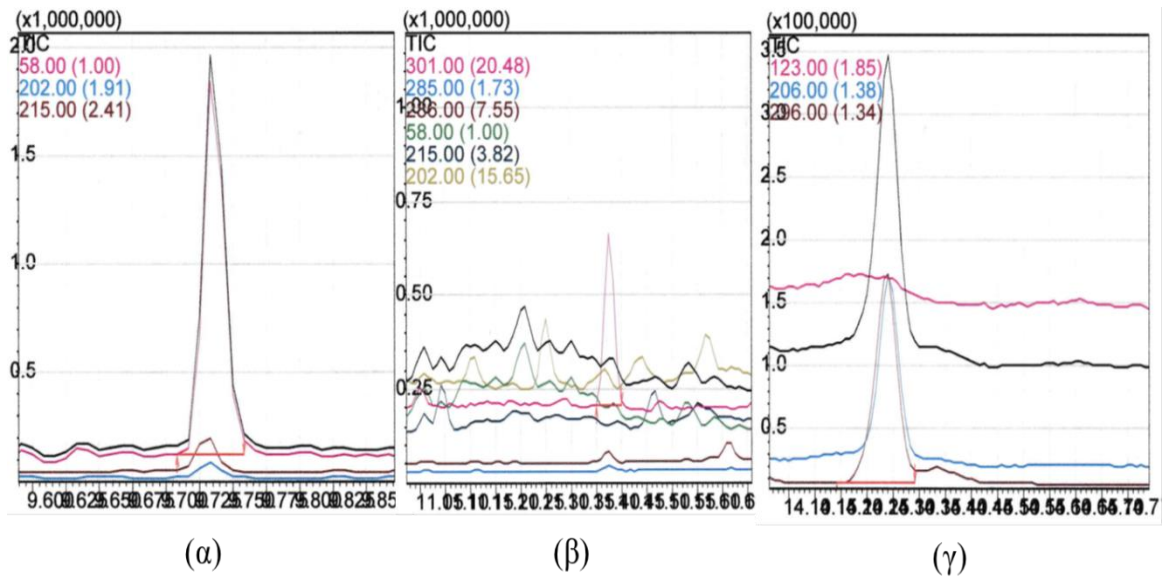
Επίσης και σε αυτή τη περίπτωση μελετήθηκε η επίδραση του pH, με προσθήκη την πρώτη φορά 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=9,5 συγκέντρωσης 0,1 M και 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M τη δεύτερη, όπου με αλκαλικό pH ελήφθησαν καλύτερα αποτελέσματα.

Τέλος, έγιναν δοκιμές για την εύρεση του καταλληλότερου εκλουστικού συστήματος και του όγκου αυτού. Εξετάστηκαν οι διαλύτες εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, διαιθυλαιθέρας, ισοπροπανόλη, μεθανόλη και αμμωνία. Από τις παραπάνω δοκιμές, η προσθήκη επί δύο φορές 5,0 mL διαλύτη εκχύλισης διχλωρομεθάνιο : ισοπροπανόλη (90:10, v/v) φάνηκε να παρέχει μεγαλύτερα ποσοστά ανακτήσεων για το σύνολο των προσδιοριζόμενων αναλυτών με αέρια χρωματογραφία.

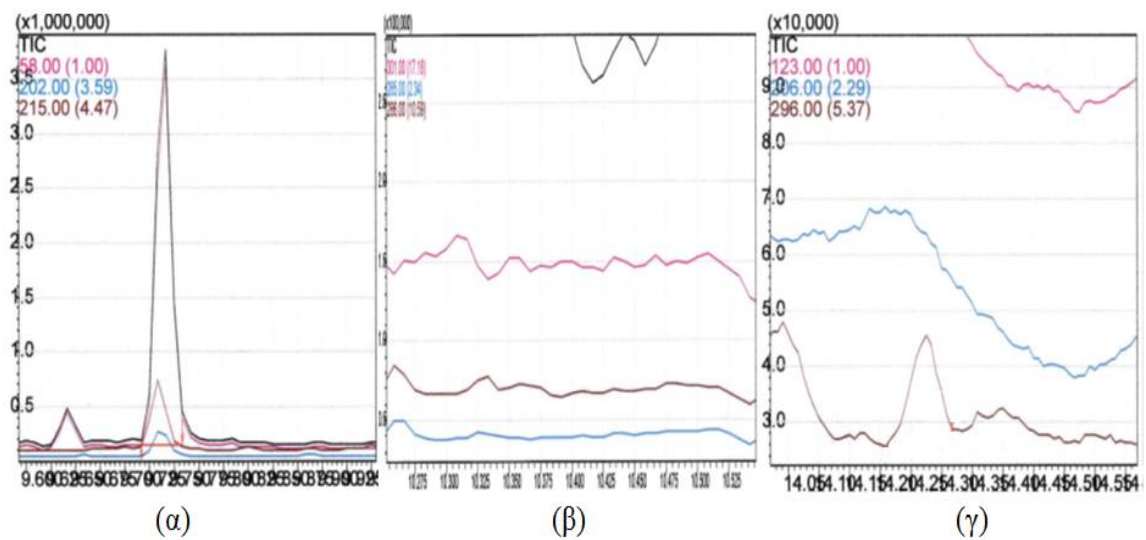




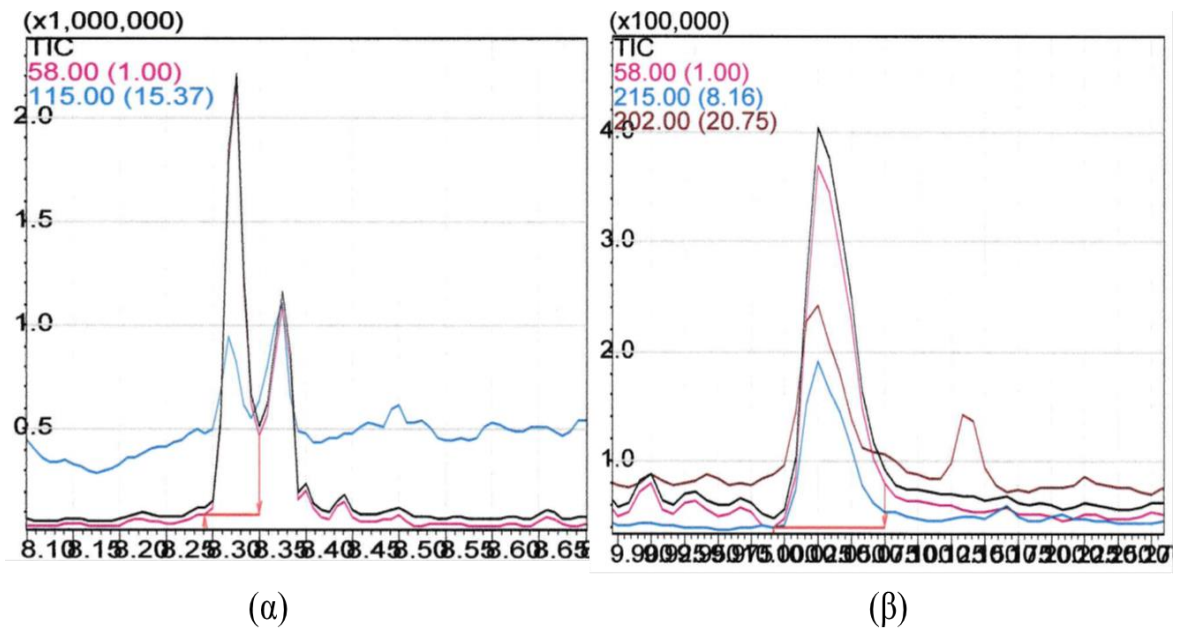
**Σχήμα 32:** Επάνω εικόνα: Χρωματογράφημα SPE-GC-MS, εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με (α) βουπροπιόνη (m/z 44) 200 ng/mL, (β) κυκλοβενζαπρίνη (m/z 58) 100 ng/mL και μιρταζαπίνη (m/z 195) 200 ng/mL, (γ) σερτραλίνη (m/z 274), σιταλοπράμη (m/z 58), κλομιπραμίνη (m/z 58) 200 ng/mL και (δ) κλοζαπίνη (m/z 243) 200 ng/mL, Κάτω εικόνα: Χρωματογράφημα SPE-GC-MS τυφλού δείγματος πλάσματος και τα αντίστοιχα για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία στο επίπεδο του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)



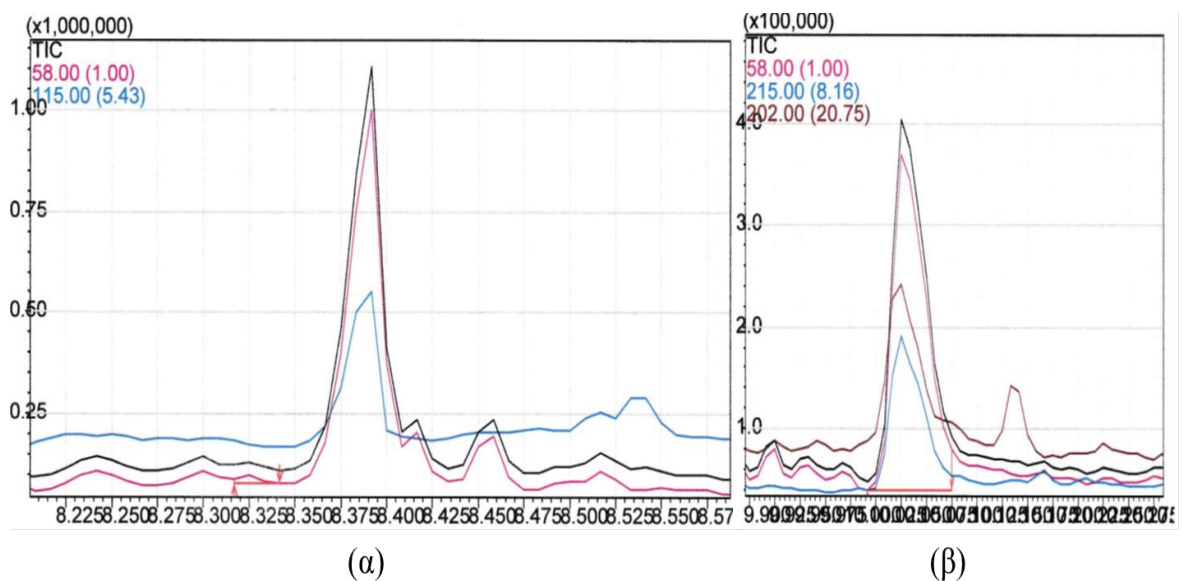
**Σχήμα 33:** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη (β) ολανζαπίνη-TMS και (γ) αλοπεριδόλη-TMS



**Σχήμα 34:** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη (β) απουσία ολανζαπίνης και (γ) απουσία αλοπεριδόλης (τυφλό δείγμα)



**Σχήμα 35:** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος – ορού με (α) βενλαφαξίνη-HFB και (β) εσωτερικό πρότυπο κυκλοβενζαπρίνη



**Σχήμα 36:** Χρωματογράφημα SPE-GC-MS δείγματος πλάσματος – ορού (α) απουσία βενλαφαξίνης-HFB (η παρατηρούμενη χρωματογραφική κορυφή οφείλεται στο υπόστρωμα) και (β) με προσθήκη κυκλοβενζαπρίνης ως εσωτερικό πρότυπο

### 3.1.4 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας SPE-GC-MS

Μετά τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων από τα βιολογικά υλικά ακολούθησε η επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας. Τα κριτήρια και ο τρόπος επικύρωσης ήταν όπως αναπτύχθηκαν στο θεωρητικό μέρος της διδακτορικής διατριβής στην παράγραφο 2.2.6.

Η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, παρέχοντας ορθά αναλυτικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, οι αναλύτες δεν συνεκλούνται ούτε παρεμποδίζονται από άλλες ουσίες όπως διαζεπάμη, βρωμαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, οξαζεπάμη, φλουραζεπάμη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακέτυλο-μορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλεκγονίνη, THC και THCA που παρουσιάζουν μεγάλο τοξικολογικό ενδιαφέρον αφού συναντώνται συχνά τόσο σε κλινικά δείγματα όσο και σε νεκροτομικά υλικά.

Σχετικά με τη γραμμικότητα της μεθόδου αυτή έγινε προσπάθεια να εξεταστεί τόσο σε θεραπευτικά όσο και σε τοξικά επίπεδα, φυσικά όπου αυτό ήταν εφικτό. Συγκεκριμένα, το εύρος εργασίας για την κλοζαπίνη, μιρταζαπίνη, κλομιπραμίνη και σιταλοπράμη κάλυπτε τα θεραπευτικά, υπο-θεραπευτικά αλλά και τοξικά επίπεδα των φαρμάκων αυτών. Ενώ για τη βουπροπιόνη και σερτραλίνη ήταν αδύνατη η μελέτη σε επίπεδα συγκεντρώσεων κάτω του θεραπευτικού ορίου. Το εύρος των λαμβανόμενων τιμών για τους συντελεστές προσδιορισμού ( $R^2$ ) όλων των αναλυτών στο σύνολο των βιολογικών δειγμάτων ήταν από 0,9970 έως 0,9999 (Πίνακας 17-20).

Σε περίπτωση δειγμάτων που η εκτιμώμενη τιμή συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας ήταν εκτός του εύρους της καμπύλης αναφοράς τότε λάμβανε χώρα αραιώση του δείγματος. Συγκεκριμένα, το μέσο αραιώσης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ισοτονικό ως προς τη συγκέντρωση του ανθρώπινου αίματος. Η διαδικασία αραιώσης ήταν για όλους τους αναλύτες επιτυχημένη. Η ακρίβεια αραιωμένου δείγματος πλάσματος για την κλοζαπίνη ήταν 42,4% με πιστότητα μικρότερη του 10,9% και για τον προσδιορισμό μιρταζαπίνης σε αραιωμένο δείγμα ολικού αίματος οι αντίστοιχες τιμές ακρίβειας και πιστότητας ήταν 101,5% και 3,7%.

Η αξιολόγηση της ακρίβειας – ανάκτησης έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία σε ορό, πλάσμα, ολικό αίμα και ούρα. Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα προσδιορισμός των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας (τρία επίπεδα εμβολιασμού). Επιπλέον, το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών και η διαχωριστικότητα των προσδιοριζόμενων φαρμάκων στο εκχύλισμα ήταν αρκετά ικανοποιητική και παρόμοια με αυτή που λαμβανόταν με μέτρηση προτύπων διαλυμάτων. Στο σύνολο των αναλυτών οι

ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και στα χαμηλά επίπεδα εμβολιασμού, με εξαίρεση τη σερτραλίνη. Οι υψηλότερες τιμές ανάκτησης παρατηρήθηκαν για τα αντικαταθλιπτικά μιρταζαπίνη, σιταλοπράμη και βουπροπιόνη και η χαμηλότερη τιμή ήταν για τη σερτραλίνη στο υψηλό επίπεδο εμβολιασμού (9,33% για το πλάσμα) (Πίνακας 13-16).

Τα LODs και LOQs στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 ( $S/N=3$ ) και 10 ( $S/N=10$ ), αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν ίδια ανεξάρτητα του βιολογικού υποστρώματος και εκτιμήθηκαν για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, τα LODs των αναλυτών κυμαίνονταν από 2,50 έως 30,00 ng/mL και τα LOQs από 8,33 έως 100,0 ng/mL (Πίνακας 17-20).

Η μελέτη και εκτίμηση της πιστότητας εκφρασμένης ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (RSD%), πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό) για κάθε αναλύτη. Για την εντός ημέρας και μεταξύ των ημερών πιστότητα έλαβαν χώρα έξι επαναλήψεις σε μία ημέρα και σε διάστημα επτά ημερών, αντίστοιχα. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα, οι τιμές RSD% για την εντός ημέρας επαναληψιμότητα κυμαίνονταν από 0,8% έως 12,3% για το σύνολο των αναλυτών και των εξεταζόμενων βιολογικών υποστρωμάτων, ενώ μεταξύ των ημερών από 2,6% έως 12,9% (Πίνακας 21-24).

Σχετικά με τη μελέτη σταθερότητας, τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών έδειξαν ότι οι προσδιοριζόμενες ουσίες παρέμεναν σταθερές για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για 48 ώρες στους 4°C. Η σταθερότητα για τρεις κύκλους κατάψυξης-απόψυξης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων με εξαίρεση τη σερτραλίνη. Όσον αφορά τα πειράματα μακροπρόθεσμης σταθερότητας, έδειξαν ότι σε κάθε βιολογικό υλικό οι συγκεκριμένοι αναλύτες ήταν σταθεροί σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C) για χρονικό διάστημα 3 μηνών.

**Πίνακας 13:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Βουπροπιόνη (100/200/400)	83,0	91,0	91,0
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	97,8	74,7	83,0
Σερτραλίνη (50/150/300)	18,0	27,3	9,3
Σιταλοπράμη (80/160/500)	82,6	52,1	50,5
Κλομιπραμίνη (50/200/400)	25,8	38,6	29,9
Κλοζαπίνη (100/250/500)	41,1	47,4	45,4
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	30,6	35,3	40,9
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	86,3	96,8	95,2
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	80,3	90,6	89,8

**Πίνακας 14:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό

Αναλύτης (C, ng/ml)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Βουπροπιόνη (100/200/400)	78,7	89,8	90,2
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	91,0	79,0	90,2
Σερτραλίνη (50/150/300)	20,2	30,4	10,9
Σιταλοπράμη (80/160/500)	85,2	65,0	68,6
Κλομιπραμίνη (50/200/400)	30,6	35,2	39,4
Κλοζαπίνη (100/250/500)	55,7	46,2	60,0
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	33,7	42,3	44,0
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	76,0	82,5	90,6
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	78,6	80,4	83,2

**Πίνακας 15:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Βουπροπιόνη (100/200/400)	75,3	82,2	85,3
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	89,6	80,0	88,9
Σερτραλίνη (50/150/300)	15,5	29,1	10,9
Σιταλοπράμη (80/160/500)	90,2	58,7	59,8
Κλομπραμίνη (50/200/400)	23,5	30,3	32,3
Κλοζαπίνη (100/250/500)	40,7	44,4	50,4
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	30,5	42,7	40,5
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	70,9	80,0	92,8
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	79,7	85,6	83,0



**Πίνακας 16:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Βουπροπιόνη (100/200/400)	78,3	86,1	90,0
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	93,9	70,3	79,3
Σερτραλίνη (50/150/300)	14,7	19,6	16,0
Σιταλοπράμη (80/160/500)	78,5	60,7	69,4
Κλομιπραμίνη (50/200/400)	30,5	31,2	35,3
Κλοζαπίνη (100/250/500)	40,3	50,6	47,0
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	29,3	35,9	39,0
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	79,0	78,5	85,8
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	80,6	80,8	95,3

**Πίνακας 17:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα

Αναλύτης	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Βουπροπιόνη	20,80 – 1000	0,9981	20,83	6,250
Μιρταζαπίνη	8,330 – 400	0,9992	8,330	2,500
Σερτραλίνη	25,00 – 400,0	0,9977	25,00	7,500
Σιταλοπράμη	15,63 – 500,0	0,9979	15,63	4,690
Κλομιπραμίνη	12,50 – 400,0	0,9982	12,50	3,750
Κλοζαπίνη	25,00 – 800,0	0,9990	25,00	7,500
Ολανζαπίνη-TMS	50,00 – 200,0	0,9975	50,00	15,00
Αλοπεριδόλη-TMS	100,0 – 400,0	0,9995	100,0	30,00
Βενλαφαξίνη-HFB	50,00 – 400,0	0,9979	50,00	15,00

**Πίνακας 18:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό

Αναλύτης	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Βουπροπιόνη	20,80 – 1000	0,9991	20,83	6,25
Μιρταζαπίνη	8,330 – 400,0	0,9999	8,330	2,50
Σερτραλίνη	25,00 – 400,0	0,9985	25,00	7,50
Σιταλοπράμη	15,63 – 500,0	0,9999	15,63	4,69
Κλομιπραμίνη	12,50 – 400,0	0,9998	12,50	3,75
Κλοζαπίνη	25,00 – 800,0	0,9999	25,00	7,50
Ολανζαπίνη-TMS	50,00 – 200,0	0,9987	50,00	15,00
Αλοπεριδόλη-TMS	100,0 – 400,0	0,9990	100,0	30,00
Βενλαφαξίνη-HFB	50,00 – 400,0	0,9970	50,00	15,00

**Πίνακας 19:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αναλύτης	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Βουπροπιόνη	20,80 – 1000	0,9985	20,83	6,25
Μιρταζαπίνη	8,33 – 400	0,9995	8,33	2,50
Σερτραλίνη	25,00 – 400	0,9984	25,00	7,50
Σιταλοπράμη	15,63 – 500	0,9979	15,63	4,69
Κλομιπραμίνη	12,50 – 400	0,9990	12,50	3,75
Κλοζαπίνη	25,00 – 800	0,9996	25,00	7,50
Ολανζαπίνη-TMS	50,00 – 200,00	0,9994	50,00	15,00
Αλοπεριδόλη-TMS	100,00 – 400,00	0,9986	100,00	30,00
Βενλαφαξίνη-HFB	50,00 – 400,00	0,9983	50,00	15,00

**Πίνακας 20:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αναλύτης	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Βουπροπιόνη	20,80 – 1000	0,9978	20,83	6,25
Μιρταζαπίνη	8,33 – 400	0,9989	8,33	2,50
Σερτραλίνη	25,00 – 400	0,9984	25,00	7,50
Σιταλοπράμη	15,63 – 500	0,9995	15,63	4,69
Κλομιπραμίνη	12,50 – 400	0,9987	12,50	3,75
Κλοζαπίνη	25,00 – 800	0,9998	25,00	7,50
Ολανζαπίνη-TMS	50,00 – 200,00	0,9983	50,00	15,00
Αλοπεριδόλη-TMS	100,00 – 400,00	0,9990	100,00	30,00
Βενλαφαξίνη-HFB	50,00 – 400,00	0,9985	50,00	15,00

**Πίνακας 21:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Βουπροπιόνη(100/200/400)	6,9	5,1	4,5	10,0	12,9	8,9
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	5,5	3,6	3,0	6,8	5,6	5,1
Σερτραλίνη (50/150/300)	5,3	6,4	5,0	5,9	7,7	7,1
Σιταλοπράμη (80/160/500)	3,7	1,6	2,9	4,0	3,4	3,5
Κλομπραμίνη (50/200/400)	2,0	0,8	1,0	7,6	5,2	5,0
Κλοζαπίνη (100/250/500)	5,4	7,3	4,7	10,2	11,6	8,9
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	12,3	7,7	4,0	12,5	8,6	7,6
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	7,7	3,2	8,4	8,5	9,6	7,7
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	10,6	3,5	4,5	12,6	5,9	6,2

**Πίνακας 22:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ορό

Αναλύτης (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Βουπροπιόνη (100/200/400)	6,8	4,0	4,5	8,7	10,5	7,9
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	7,1	5,5	6,9	7,1	5,9	5,0
Σερτραλίνη (50/150/300)	6,6	4,4	3,1	7,0	6,2	4,9
Σιταλοπράμη (80/160/500)	4,5	1,0	2,5	5,1	2,6	3,8
Κλομπραμίνη (50/200/400)	2,8	1,3	1,0	4,7	3,2	3,5
Κλοζαπίνη (100/250/500)	3,0	4,3	4,0	10,6	8,8	8,0
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	10,3	6,7	6,2	11,0	10,1	8,8
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	8,0	5,2	4,4	7,1	8,8	6,5
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	9,6	5,0	7,1	10,0	7,0	9,2

**Πίνακας 23:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Βουπροπιόνη (100/200/400)	7,9	6,1	4,7	9,5	10,5	8,6
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	6,6	5,6	5,2	10,2	8,8	9,0
Σερτραλίνη (50/150/300)	5,2	4,8	2,4	8,6	6,6	5,4
Σιταλοπράμη (80/160/500)	3,3	3,6	4,0	4,9	5,2	4,5
Κλομιπραμίνη (50/200/400)	5,9	5,8	2,6	7,5	8,2	5,6
Κλοζαπίνη (100/250/500)	8,5	7,8	7,9	9,4	10,5	8,6
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	9,2	4,3	5,6	10,1	9,0	6,6
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	8,0	5,0	8,0	9,2	7,0	8,2
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	10,0	7,5	5,6	12,0	6,9	8,6



**Πίνακας 24:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-GC-MS προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αναλύτης (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Βουπροπιόνη (100/200/400)	9,6	6,7	5,8	9,6	10,1	8,4
Μιρταζαπίνη (30/90/200)	5,3	3,0	4,2	6,1	4,9	5,6
Σερτραλίνη (50/150/300)	7,9	4,8	5,1	10,2	8,2	8,5
Σιταλοπράμη (80/160/500)	5,9	2,4	3,5	7,5	5,9	6,3
Κλομιπραμίνη (50/200/400)	4,7	2,0	1,9	5,9	3,2	3,0
Κλοζαπίνη (100/250/500)	6,2	7,0	3,6	9,6	9,2	8,0
Ολανζαπίνη-TMS (50/100/200)	8,3	5,8	6,7	10,4	9,7	8,2
Αλοπεριδόλη-TMS (100/200/400)	9,6	5,0	7,2	10,2	9,0	10,0
Βενλαφαξίνη-HFB (250/500/2500)	9,0	7,6	8,5	9,9	8,0	9,2

### **3.2 Προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με υγρή χρωματογραφία**

#### **3.2.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών υγρής χρωματογραφία υπερ-υψηλής αποδόσεως με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων**

Όπως στις δοκιμές με χρήση αέριας χρωματογραφίας έτσι και στην περίπτωση της υγρής, ο επιτυχημένος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός εξαρτάται ομοίως από τις συνθήκες του χρωματογραφικού συστήματος. Αντίθετα, στην περίπτωση αυτή η μελέτη έγινε ξεχωριστά για τα αντιψυχωσικά και για τα αντικαταθλιπτικά. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εξέταση των παραμέτρων που δύναται να επηρεάσουν την ανάλυση καθώς και πειράματα βελτιστοποίησης ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες τιμές για κάθε σημαντική παράμετρο του υγρού χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων (UHPLC-UV/DAD). Τα πειράματα βελτιστοποίησης έγιναν με τον κλασικό τρόπο μεταβολής ενός παράγοντα τη φορά (one factor at a time – OFAT) αναλύοντας πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.

##### **A. Κινητή φάση και εκλουστικό πρόγραμμα**

Ως οργανική φάση (B), οι διαλύτες που εξετάστηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Ως υδατική φάση (A) μελετήθηκε το αναλυτικής καθαρότητας ύδωρ καθώς και διαλύματα αυτού με 0,1% HCOOH, 0,1% HCOOH σε διάλυμα 10 mM οξικού αμμωνίου και 0,05% τριφθοροξικό οξύ. Εξετάστηκε ο συνδυασμός όλων των παραπάνω φάσεων με ισοκρατική έκλουση καθώς και πλειάδα προγραμμάτων βαθμιδωτής έκλουσης όπως φαίνεται στον Πίνακα 25.

**Πίνακας 25:** Δοκιμές εκλουστικών προγραμμάτων κινητής φάσης σε UHPLC-UV/DAD

<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 1</b>		<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 2</b>	
Χρόνος (min)	% αναλογία Β	Χρόνος (min)	% αναλογία Β
0,0	10	0,0	10
0,1	10	0,1	10
4,0	45	3,5	45
9,5	70	7,0	45
9,7	100	9,5	70
10,2	100	9,7	100
10,4	10	10,2	100
11,0	10	10,4	10
–	–	11,0	10
<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 3</b>		<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 4</b>	
Χρόνος (min)	% αναλογία Β	Χρόνος (min)	% αναλογία Β
0,0	10	0,0	15
0,1	10	1,0	15
3,5	45	8,0	55
6,0	45	9,0	100
9,5	70	10,2	100
9,7	100	10,4	15
10,2	100	11,0	15
10,4	10	–	–
11,0	10	–	–
6,0	45	–	–
<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 5</b>		<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 6</b>	
Χρόνος (min)	% αναλογία Β	Χρόνος (min)	% αναλογία Β
0,0	15	0,0	15
1,0	15	1,0	15
4,0	55	6,0	55
9,0	100	9,0	100
10,2	100	10,2	100
10,4	15	10,4	15
11,0	15	11,0	15

<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 7</b>		<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 8</b>	
Χρόνος (min)	% αναλογία Β	Χρόνος (min)	% αναλογία Β
0,0	25	0,0	25
2,0	25	1,5	25
7,0	50	6,5	50
9,0	100	8,5	100
10,4	100	10,0	100
10,5	25	10,5	25
11,0	25	11,0	25
<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 9</b>		<b>Εκλουστικό πρόγραμμα 10</b>	
Χρόνος (min)	% αναλογία Β	Χρόνος (min)	% αναλογία Β
0,0	25	0,00	25
1,5	25	1,00	25
6,5	40	5,00	45
8,5	100	6,00	70
10,0	100	8,00	100
10,5	25	9,50	100
11,0	25	9,75	25
-	-	10,00	25

Η σύγκριση και η επιλογή των εκλουστικών προγραμμάτων της κινητής φάσης έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν καλύτερος με την κινητή φάση να αποτελείται από υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM με 0,1% φορμικό οξύ (φάση A) και ακετονιτρίλιο (φάση B), με ροή 0,3 mL/min.

Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

- i. Βήμα: 15% B από 0,0 μέχρι 1,0 min
- ii. Βήμα: 15% μέχρι 55% B μέχρι το 8,0 min
- iii. Βήμα: 55% μέχρι 100% B από 9,0 έως 10,2 min
- iv. Βήμα: έκπλυση με 100% B για 0,2 min
- v. Βήμα: επανασύσταση της αρχικής αναλογίας (15% B) από 10,4 έως 13,5 min.

**Πίνακας 26:** Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών σε διάταξη UHPLC-UV/DAD

<b>Αντιψυχωσικό</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>λ (nm)</b>
Ολανζαπίνη	2,3	254
Αμισουλπρίδη	2,7	225
Χαρμίνη (IS)	4,6	245
Παλιπεριδόνη	5,3	278
Ρισπεριδόνη	5,7	278
N-desmethylclozapine	6,4	230
Κλοζαπίνη	6,7	230
Κουετιαπίνη	6,8	245
Αριπιπραζόλη	7,8	254

**Πίνακας 27:** Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος των προσδιοριζόμενων αντικαταθλιπτικών σε διάταξη UHPLC-UV/DAD

<b>Αντικαταθλιπτικό</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>λ (nm)</b>
Χαρμίνη (IS)	4,6	245
Μιρταζαπίνη	5,0	254
Βουπροπιόνη	5,5	254
Βενλαφαξίνη	5,6	230
N-desmethylocitalopram	6,8	238
Σιταλοπράμη	6,9	238
Παροξετίνη	7,5	238
Ντουλοξετίνη	7,8	230
Αγομελατίνη	7,9	230
N-desmethylertraline	8,2	230
Σερτραλίνη	8,4	230
Κλομιπραμίνη	8,5	254

## B. Μήκη κύματος

Κατά τη ρύθμιση των συνθηκών του ανιχνευτή έγινε επιλογή καταγραφής οκτώ μηκών κύματος σε αντίστοιχα οκτώ κανάλια όπως φαίνεται στον Πίνακα 28.

**Πίνακα 28:** Επιλογή μηκών κύματος του ανιχνευτή UV/DAD

Κανάλι	Μήκος κύματος (nm)
1	230
2	254
3	200
4	225
5	278
6	238
7	220
8	245



### Γ. Όγκος εισαγωγής δείγματος

Σχετικά με τον όγκο εισαγωγής του δείγματος εξετάστηκαν οι τιμές: 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  και 20  $\mu\text{L}$ . Η σύγκριση των όγκων έγχυσης έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων ως βέλτιστη τιμή ορίστηκε αυτή των 5  $\mu\text{L}$ .

### Δ. Ταχύτητα ροής κινητής φάσης

Σε κάθε ενόργανη διάταξη υγρής χρωματογραφίας επιλέγεται μία τιμή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Στο συγκεκριμένο σύστημα UHPLC-UV/DAD οι τιμές ροής που εξετάστηκαν ήταν: 0,3 mL/min, 0,5 mL/min και 0,7 mL/min. Η σύγκριση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν καλύτερος με τιμή ταχύτητα ροής 0,3 mL/min.

### Ε. Θερμοκρασία προστήλης και αναλυτικής στήλης

Για τον επιτυχή προσδιορισμό των εξεταζόμενων APs και ADs, έπρεπε να επιλεγεί η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης αλλά και της προστήλης. Οι τιμές που μελετήθηκαν ήταν 25°C, 30°C και 40°C. Η σύγκριση των θερμοκρασιών έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τα πειράματα βελτιστοποίησης προέκυψε ότι η πλέον κατάλληλη θερμοκρασία ήταν αυτή των 30°C.

### ΣΤ. Θερμοκρασία μετά την αναλυτική στήλη

Σχετικά με τη θερμοκρασία μετά τη χρωματογραφική στήλη μελετήθηκαν οι τιμές 25°C, 30°C και 40°C. Η σύγκριση των θερμοκρασιών έγινε βάση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών. Από τις παραπάνω δοκιμές επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 30°C.

## 3.2.2 Βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης βιολογικών δειγμάτων

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής οι μέθοδοι εκχύλισης που μελετήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων APs και ADs με χρήση υγρής χρωματογραφίας ήταν η υγρή-υγρή εκχύλιση και υγρή-στερεή εκχύλιση. Όλα τα πειράματα

που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο της μελέτης έγιναν με γνωστή συγκέντρωσης εμβολιασμένα δείγματα, 500 ng/mL για τα υγρά βιολογικά υλικά και 1000 ng/g για τους ιστούς. Όπως και στις δοκιμές βελτιστοποίησης με αέριο χρωματογράφο έλαβε χώρα μεταβολή μίας παραμέτρου τη φορά εξετάζοντας την επίδραση που αυτή είχε στην απόκριση (ανάκτηση).

#### A. Υγρή-υγρή εκχύλιση

Οι διαλύτες των οποίων μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα στην εκχύλιση και γενικότερα η καταλληλότητά τους ήταν το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο διαιθυλαιθέρας, ο οξικός βουτυλεστέρας, ο t-βουτυλ-μεθυλ-αιθέρας, η ισοπροπανόλη και η μεθανόλη. Με μεγάλο πλήθος δοκιμών ελέγχθηκαν όλοι οι παραπάνω διαλύτες καθώς και πληθώρα συνδυασμών αυτών. Σε κάθε δοκιμή ο όγκος του εμβολιασμένου δείγματος ήταν 1,0 mL.

Επιπλέον, και σε αυτή την περίπτωση μελετήθηκε η τιμή του pH, με προσθήκη την πρώτη φορά 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=9,5 συγκέντρωσης 0,1 M και 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M τη δεύτερη. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο όγκος του διαλύτη καθώς και οι κύκλοι εκχύλισης, συγκεκριμένα έγιναν δοκιμές με 1, 2 και 3 mL ανά κύκλο εκχύλιση και εξετάστηκαν ένας, δύο και τρεις κύκλοι εκχύλισης. Για την υποβοήθηση της εκχύλισης και την αύξηση απόδοσης της μεθόδου εκτός από ισχυρή ανάδευση έγινε και χρήση υπερήχων (ultrasound liquid - liquid extraction) για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min, παραλαβή της οργανικής στιβάδας και επανάληψη του κύκλου εκχύλισης ανάλογα με τη δοκιμή βελτιστοποίησης. Τέλος, το συνολικό εκχύλισμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε σε 100,0 mL μίγματος υδατικής κινητής φάσης A (10 mM με 0,1% φορμικό οξύ) και οργανικής φάσης B (ακετονιτρίλιο), σε αναλογία (50:50, v/v).

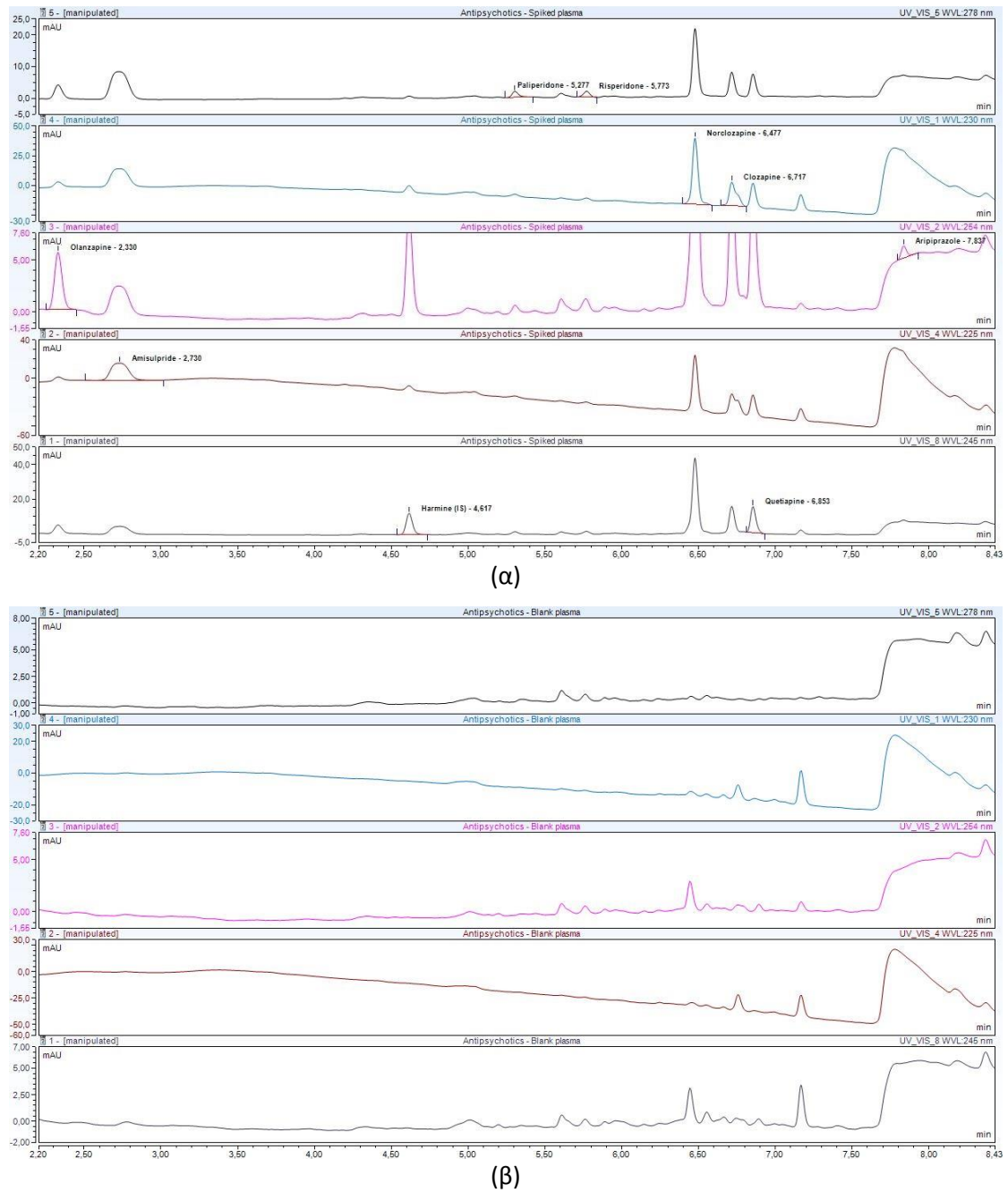
Παρόλα τα πειράματα βελτιστοποίησης, οι τιμές ανάκτησης για την πλειοψηφία τόσο των αντιψυχωσικών όσο και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων δεν ήταν ικανοποιητικές και επιπλέον τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα αρκετά επιβαρυνμένα από παρεμποδίζουσες ουσίες, όπως και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Για τους παραπάνω λόγους μελετήθηκε και η υγρή-στερεή εκχύλιση.

Στην περίπτωση του ιστού ήπατος καλύτερες αποδόσεις ελήφθησαν με εφαρμογή LLE και συγκεκριμένα με χρήση 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M και διαλύτη εκχύλισης διαιθυλαιθέρα (3,0 mL × 2). Αντίθετα, η

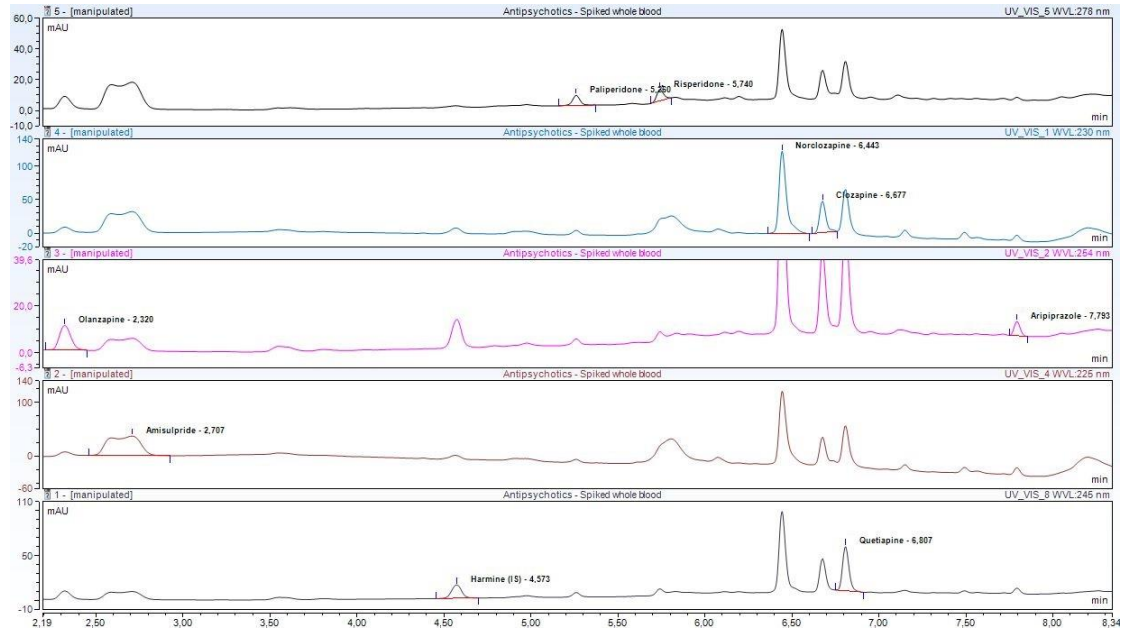
εκχύλιση των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών από ιστό εγκεφάλου ήταν αδύνατη τόσο με εφαρμογή υγρής-υγρής όσο και υγρής-στερεής εκχύλισης, με αποτέλεσμα να αποκλειστεί από περαιτέρω μελέτη.

#### B. Υγρή-στερεή εκχύλιση

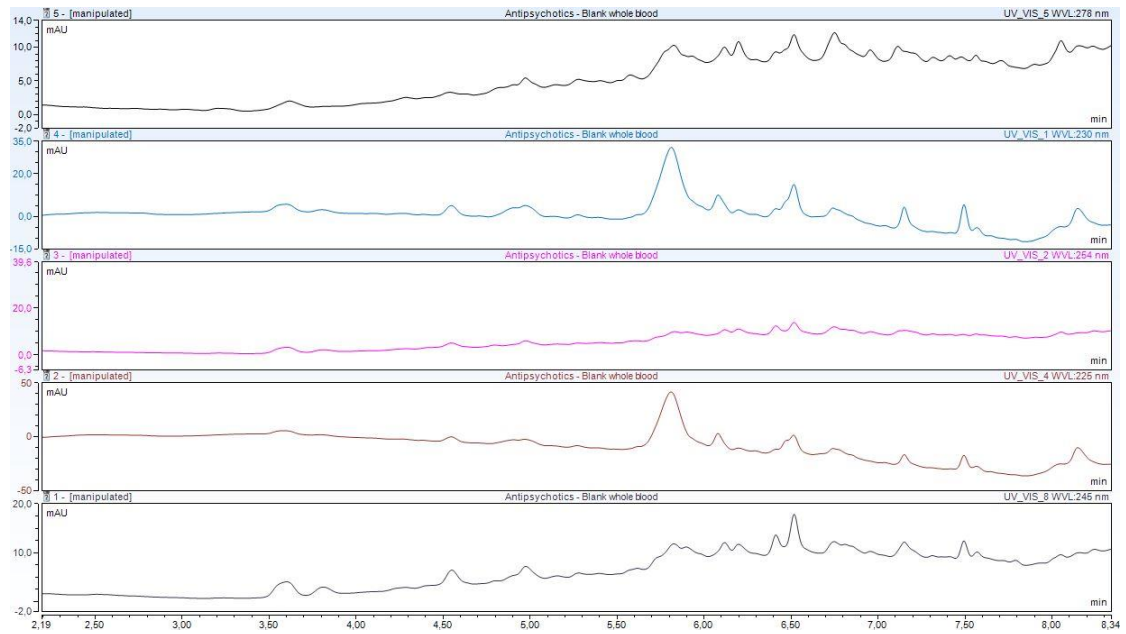
Κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης της επεξεργασίας δειγμάτων με υγρή-στερεή εκχύλιση δοκιμάστηκαν αρχικά οι τύποι στηλών εκχύλισης στερεάς φάσης που είχαν εξεταστεί και στις δοκιμές με αέρια χρωματογραφία, συγκεκριμένα οι: Chem Elute, Bond Elute C18, Oasis HLB και Isolute HXC. Λόγω του μεγαλύτερου αριθμού προσδιοριζόμενων αναλυτών κανείς από τους παραπάνω τύπους στηλών δεν είχε σαν αποτέλεσμα μια ικανοποιητική μέση ανάκτηση για το σύνολο των εξεταζόμενων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών. Στη μελέτη εκχύλισης προστέθηκε ο τύπος στήλης Bond Elut Certify όπου φάνηκε να παρέχει τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης. Η επίδραση του pH εξετάστηκε αρχικά με προσθήκη 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=9,5 συγκέντρωσης 0,1 M και μετά με 2,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,2 M όπου και τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα σε σχέση με το αλκαλικό περιβάλλον. Στην περίπτωση χρήσης των στηλών Bond Elut Certify ήταν απαραίτητη η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού. Δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες εγκλιματισμού καθώς και μίγματα αυτών όπως μεθανόλη, ισοπροπανόλη, αιθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ύδωρ. Τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα ελήφθησαν με εφαρμογή κατά σειρά 3,0 mL μεθανόλης, 3,0 mL δις αποσταγμένου ύδατος και 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6 συγκέντρωσης 0,1 M. Μετά την εισαγωγή του δείγματος απαραίτητο ήταν το στάδιο της έκπλυσης. Για τον καθαρισμό του δείγματος μελετήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα που περιλάμβαναν έκπλυση με μεθανόλη, οξινομένη μεθανόλη, ισοπροπανόλη, αιθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ύδωρ, φορμικό και οξικό οξύ. Η έκπλυση με 3,0 mL δις αποσταγμένου ύδατος και 1,0 mL οξικού οξέος έδωσε τη μέγιστη απόκριση της αναλυτικής μεθοδολογίας, χωρίς την παρουσία παρεμποδίζουσων ουσιών από το εκάστοτε υπόστρωμα. Τέλος, έγιναν δοκιμές για την εύρεση του καταλληλότερου εκλουστικού συστήματος και του όγκου αυτού. Εξετάστηκαν οι διαλύτες εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, διαιθυλαιθέρας, ισοπροπανόλη, μεθανόλη και αμμωνία. Από τις παραπάνω δοκιμές, η προσθήκη επί δύο φορές 1,5 mL διαλύτη εκχύλισης μεθανόλη : π. αμμωνία (98:2, v/v) φάνηκε να παρέχει τα μεγαλύτερα ποσοστά ανακτήσεων για το σύνολο των προσδιοριζόμενων αναλυτών με υγρή χρωματογραφία.



**Σχήμα 37:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος

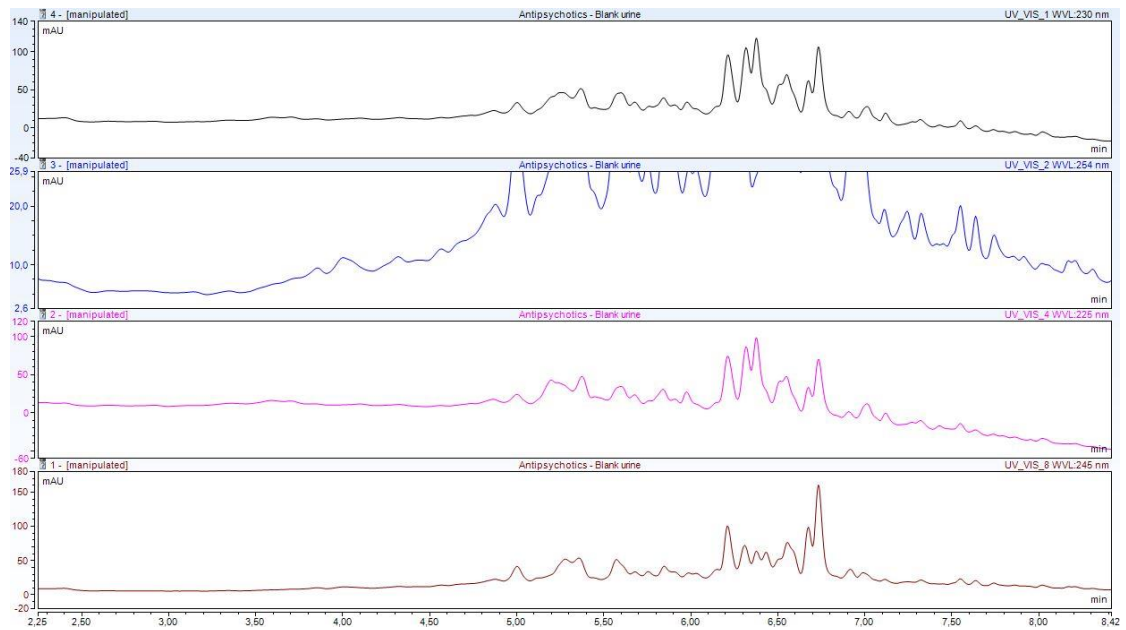
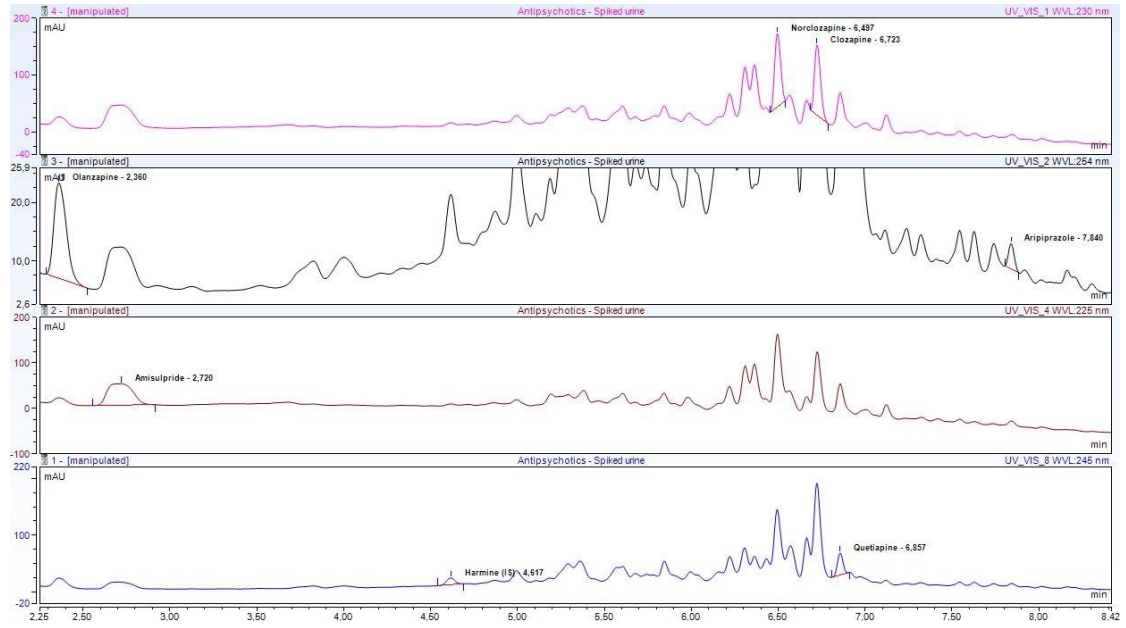


(α)

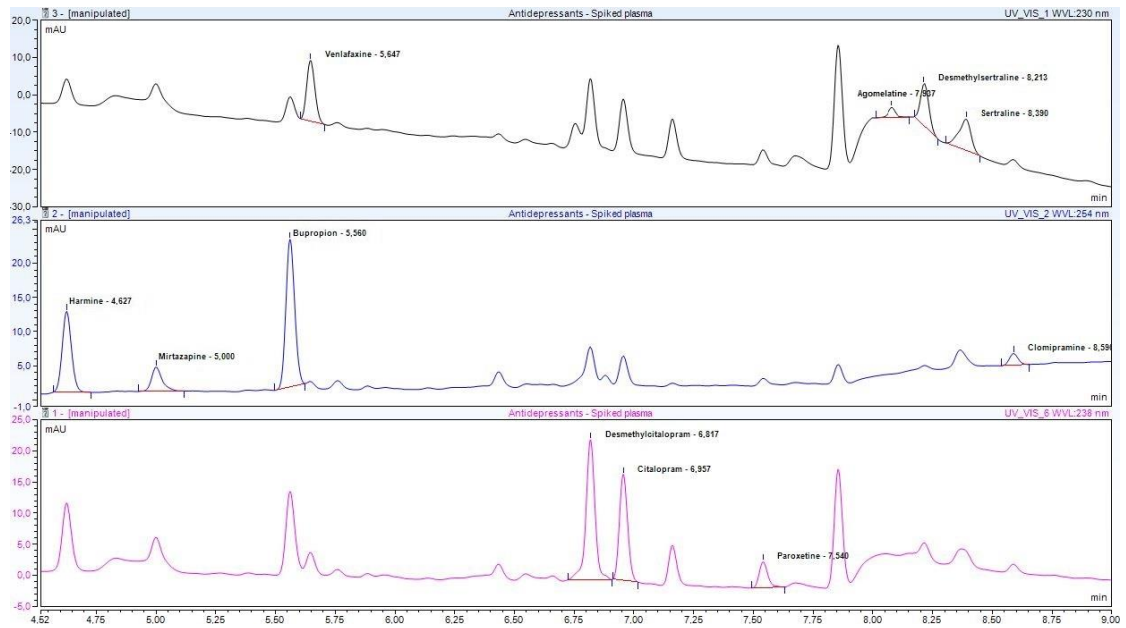


(β)

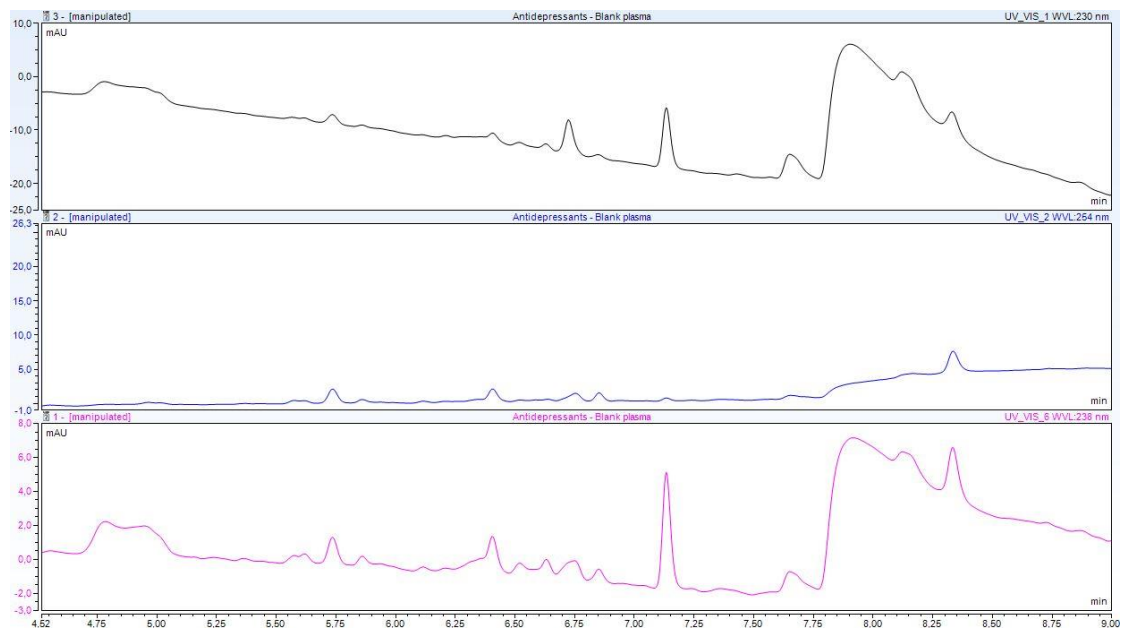
**Σχήμα 38:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ολικού αίματος με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος



**Σχήμα 39:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ούρων με τα προσδιοριζόμενα APs και (β) τυφλού δείγματος

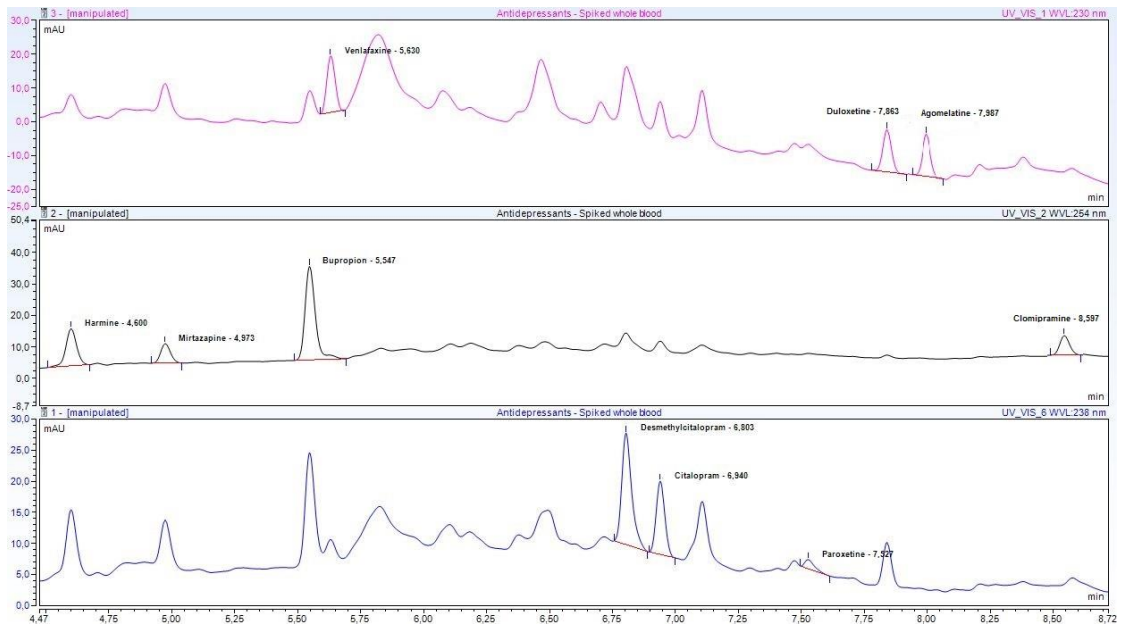


(α)

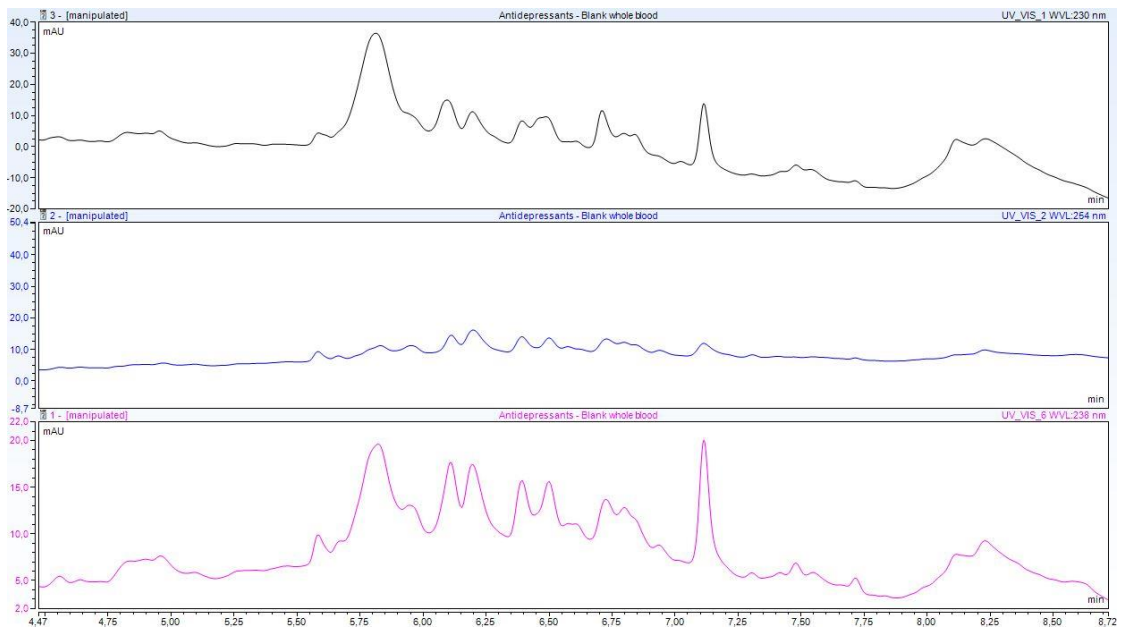


(β)

**Σχήμα 40:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος



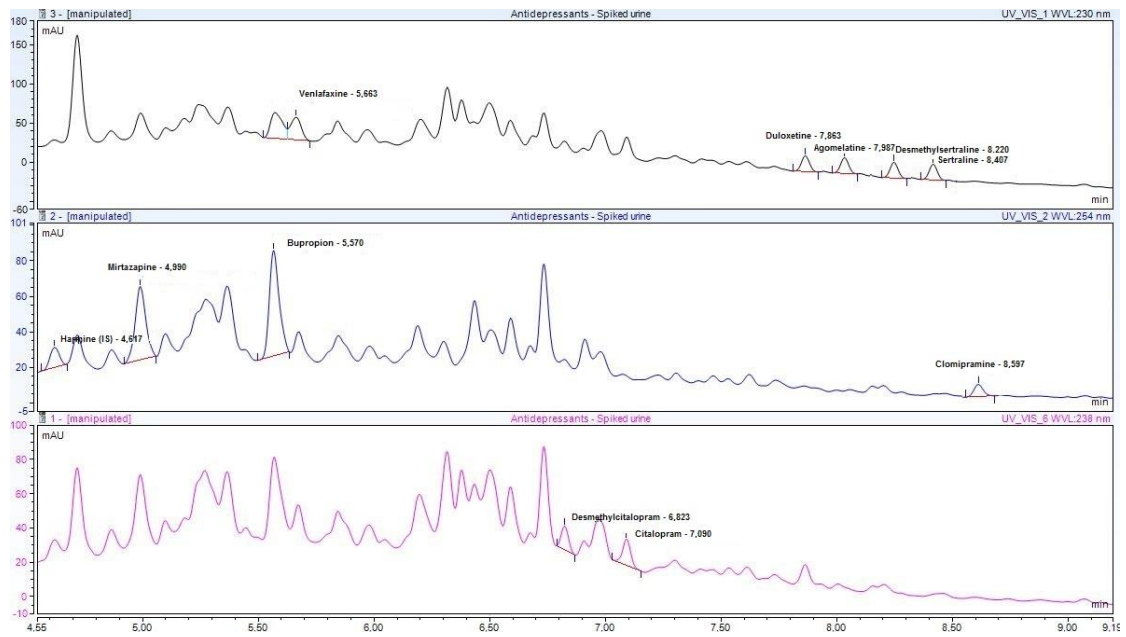
(α)



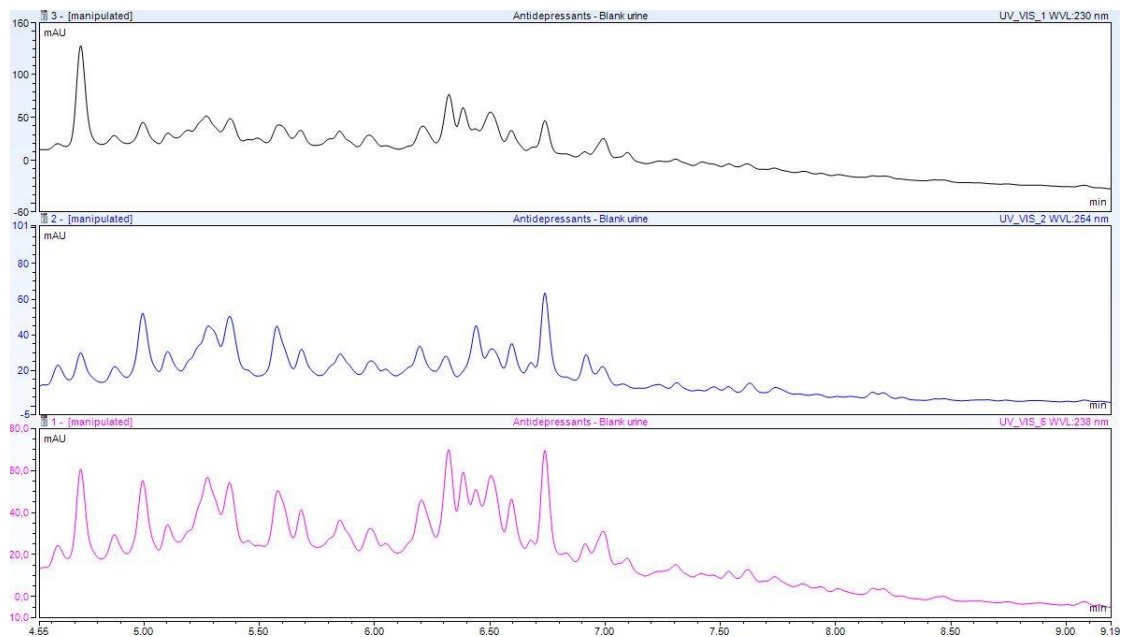
(β)

**Σχήμα 41:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ολικού αίματος με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος





(α)



(β)

**Σχήμα 42:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD (α) εμβολιασμένου δείγματος ούρων με τα προσδιοριζόμενα ADs και (β) τυφλού δείγματος

### 3.2.3 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD

Μετά τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων από τα βιολογικά υλικά ακολούθησε η επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας. Τα πειράματα επικύρωσης πραγματοποιήθηκαν τόσο για τα αντιψυχωσικά όσο και για τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Τα κριτήρια και ο τρόπος επικύρωσης ήταν όπως αναπτύχθηκαν στο θεωρητικό μέρος της διδακτορικής διατριβής στην παράγραφο 2.2.6.

Η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, παρέχοντας ορθά αναλυτικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, όλα τα προσδιοριζόμενα φάρμακα δεν συνεκλούνται ούτε παρεμποδίζονται από άλλες ουσίες όπως διαζεπάμη, βρωμαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, οξαζεπάμη, φλουραζεπάμη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακέτυλο-μορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλεκγονίνη, THC και THCA που παρουσιάζουν μεγάλο τοξικολογικό ενδιαφέρον αφού συναντώνται συχνά τόσο σε κλινικά δείγματα όσο και σε νεκροτομικά υλικά.

Η αξιολόγηση της ακρίβειας – ανάκτησης έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία σε ορό-πλάσμα, ολικό αίμα και ούρα. Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα προσδιορισμός των APs και ADs σε εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας (τρία επίπεδα εμβολιασμού). Επιπλέον, το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών και η διαχωριστικότητα των προσδιοριζόμενων φαρμάκων στο εκχύλισμα ήταν αρκετά ικανοποιητική και παρόμοια με αυτή που λαμβανόταν με μέτρηση προτύπων διαλυμάτων. Στο σύνολο των αναλυτών οι ανακτήσεις ήταν αρκετά υψηλές ακόμη και στα χαμηλά επίπεδα εμβολιασμού (Πίνακας 29-34).

**Πίνακας 29:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Ολανζαπίνη (20/80/200)	83,0	93,5	85,7
Αμισουλπρίδη (100/500/1000)	70,7	89,4	83,5
Παλιπεριδόνη (20/60/200)	98,0	77,1	109,0
Ρισπεριδόνη (20/60/200)	79,0	85,0	93,5
N-desmethyloclozapine (100/500/1000)	99,1	98,5	88,3
Κλοζαπίνη (100/500/1000)	64,6	90,5	94,7
Κουετιαπίνη (100/500/1000)	72,0	100,3	92,2
Αριπιπραζόλη (100/500/1000)	79,0	105,4	79,4

**Πίνακας 30:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Ολανζαπίνη (50/100/200)	62,4	84,4	74,9
Αμισουλπρίδη (50/500/1000)	100,6	91,1	80,5
Παλιπεριδόνη (50/100/200)	78,8	92,4	74,8
Ρισπεριδόνη (50/100/200)	91,9	86,7	89,8
N-desmethylclozapine (100/500/1000)	103,5	89,4	70,2
Κλοζαπίνη (100/500/1000)	82,0	96,6	92,9
Κουετιαπίνη (50/500/1000)	72,8	118,7	90,0
Αριπιπραζόλη (100/500/1000)	72,6	69,5	70,7

**Πίνακας 31:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Ολανζαπίνη (20/100/200)	107,9	98,3	98,0
Αμισουλπρίδη (250/500/1000)	104,3	96,7	90,0
Παλιπεριδόνη (-/-/-)	–	–	–
Ρισπεριδόνη (-/-/-)	–	–	–
N-desmethylclozapine (250/500/1000)	78,7	82,9	90,2
Κλοζαπίνη (250/500/1000)	102,8	91,5	80,5
Κουετιαπίνη (250/500/1000)	74,0	112,3	83,5
Αριπιπραζόλη (250/500/1000)	83,3	87,5	85,7

**Πίνακας 32:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό

Αντικαταθλιπτικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Μιρταζαπίνη (50/250/500)	61,5	92,4	120,8
Βουπροπιόνη (50/1000/2000)	97,3	83,2	80,6
Βενλαφαξίνη (50/500/1000)	90,9	88,9	84,0
N-desmethylcitalopram (50/250/500)	102,6	72,0	80,3
Σιταλοπράμη (50/250/500)	82,9	60,4	90,0
Παροξετίνη (100/250/500)	86,0	71,7	97,2
Ντουλοξετίνη (500/1000)	–	–	–
Αγομελατίνη (50/200/800)	91,4	83,2	77,4
N-desmethylertraline (250/500/1000)	114,0	96,3	90,8
Σερτραλίνη (250/500/1000)	75,2	85,0	97,6
Κλομιπραμίνη (100/500/1000)	96,8	82,3	82,9

**Πίνακας 33:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αντικαταθλιπτικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Μιρταζαπίνη (100/500/1000)	104,2	71,1	87,4
Βουπροπιόνη (100/500/2000)	89,6	76,6	96,8
Βενλαφαξίνη (250/500/1000)	106,0	93,1	97,3
N-desmethylcitalopram (250/500/1000)	88,9	71,6	109,9
Σιταλοπράμη (250/500/1000)	74,9	100,9	98,3
Παροξετίνη (250/500/1000)	101,3	71,6	82,8
Ντουλοξετίνη (100/500/1000)	70,6	85,8	70,9
Αγομελατίνη (100/500/1000)	70,5	81,0	85,3
N-desmethylsertraline (250/500/1000)	–	–	–
Σερτραλίνη (250/500/1000)	–	–	–
Κλομιπραμίνη (100/500/1000)	83,3	92,7	111,7

**Πίνακας 34:** Ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αντικαταθλιπτικό (C, ng/mL)	Ανάκτηση (%)		
	Χαμηλό επίπεδο	Μεσαίο επίπεδο	Υψηλό επίπεδο
Μιρταζαπίνη (250/500/1000)	84,4	65,3	90,3
Βουπροπιόνη (500/1000/2000)	80,0	76,9	100,5
Βενλαφαξίνη (250/500/1000)	74,3	63,9	99,4
N-desmethylcitalopram (250/500/1000)	100,4	79,7	95,5
Σιταλοπράμη (250/500/1000)	90,5	89,3	87,6
Παροξετίνη (100/250/500)	–	–	–
Ντουλοξετίνη (100/500/1000)	86,5	65,2	68,8
Αγομελατίνη (100/500/1000)	85,0	76,3	80,3
N-desmethylsertraline (250/500/1000)	70,3	72,4	86,5
Σερτραλίνη (250/500/1000)	74,4	99,5	81,7
Κλομιπραμίνη (250/500/1000)	89,8	62,5	96,8



Σχετικά με τη γραμμικότητα της μεθόδου αυτή έγινε προσπάθεια να εξεταστεί τόσο σε θεραπευτικά όσο και σε τοξικά επίπεδα, φυσικά όπου αυτό ήταν εφικτό. Το εύρος των λαμβανόμενων τιμών για τους συντελεστές προσδιορισμού ( $R^2$ ) ήταν 0,9921 έως 0,9999 και 0,9840 έως 0,9999 για τα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά, αντίστοιχα, στο σύνολο των εξεταζόμενων βιολογικών υγρών (Πίνακας 35-40).

Σε περίπτωση δειγμάτων που η εκτιμώμενη τιμή συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας ήταν εκτός του εύρους της καμπύλης αναφοράς τότε έλαβε χώρα αραίωση του δείγματος με ισοτονικό ως προ τη συγκέντρωση του ανθρώπινου αίματος διάλυμα PBS. Η διαδικασία αραίωσης ήταν για όλους τους αναλύτες επιτυχημένη.

Τα LODs και LOQs στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 ( $S/N=3$ ) και 10 ( $S/N=10$ ), αντίστοιχα. Στην περίπτωση των δοκιμών με τη διάταξη UHPLC-UV/DAD, σε αντίθεση με χρήση GC-MS, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του ίδιου αναλύτη παρουσίαζαν διαφορές ανάλογα με το υπόστρωμα. Για την ομάδα των αντιψυχωσικών τα LODs κυμαίνονταν από 3 έως 75 ng/mL και τα LOQs από 10 έως 250 ng/mL. Για τον προσδιορισμό των αντικαταθλιπτικών οι τιμές ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμαίνονταν από 15 έως 75 ng/mL και 50 έως 250 ng/mL, αντίστοιχα, για το σύνολο των αναλυόμενων βιολογικών υγρών (Πίνακας 35-40).

Η μελέτη και εκτίμηση της πιστότητας εκφρασμένη ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (RSD%), πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό). Για την εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών πιστότητα έλαβαν χώρα έξι επαναλήψεις σε μία ημέρα και σε διάστημα επτά ημερών, αντίστοιχα. Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα, οι τιμές RSD% για την εντός ημέρας επαναληψιμότητα κυμαίνονταν από 0,2% έως 6,9% και από 0,4% έως 9,7% για τα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά, αντίστοιχα. Η μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα κυμαινόταν από 1,5% έως 10,2% και από 2,1% έως 10,0%, αντίστοιχα (Πίνακας 41-46).

Σχετικά με τη μελέτη σταθερότητας, τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δεν παρουσίασαν αισθητές διαφορές σε σχέση με αυτά που είχαν πραγματοποιηθεί για τους προσδιορισμούς με GC-MS, παρότι στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας ο αριθμός των προσδιοριζόμενων ουσιών ήταν μεγαλύτερος. Η μελέτη σταθερότητας έδειξε ότι οι προσδιοριζόμενες ουσίες παρέμεναν σταθερές για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για 48 ώρες στους 4°C. Η σταθερότητα για τρεις κύκλους κατάψυξης-απόψυξης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Όσον αφορά τα πειράματα μακροπρόθεσμης σταθερότητας,

έδειξαν ότι σε κάθε βιολογικό υλικό οι συγκεκριμένοι αναλύτες ήταν σταθεροί σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C) για χρονικό διάστημα 3 μηνών.

**Πίνακας 35:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό

Αντιψυχωσικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Ολανζαπίνη	10 – 200	0,9984	10,0	3,0
Αμισουλπρίδη	25 – 1000	0,9997	25,0	7,5
Παλιπεριδόνη	20 – 200	0,9990	20,0	6,0
Ρισπεριδόνη	20 – 200	0,9997	20,0	6,0
N-desmethyloclozapine	50 – 1000	0,9992	50,0	15,0
Κλοζαπίνη	100 – 1000	0,9974	100,0	30,0
Κουετιαπίνη	25 – 1000	0,9997	25,0	7,5
Αριπιπραζόλη	100 – 1000	0,9990	100,0	30,0

**Πίνακας 36:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα

Αντιψυχωσικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Ολανζαπίνη	50 – 200	0,9873	50,0	15,0
Αμισουλπρίδη	50 – 1000	0,9967	50,0	15,0
Παλιπεριδόνη	50 – 200	0,9993	50,0	15,0
Ρισπεριδόνη	50 – 200	0,9987	50,0	15,0
N-desmethylclozapine	100 – 1000	0,9934	100,0	30,0
Κλοζαπίνη	250 – 1000	0,9986	250,0	75,0
Κουετιαπίνη	50 – 500	0,9987	50,0	15,0
Αριπιπραζόλη	100 – 1000	0,9983	100,0	30,0

**Πίνακας 37:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα

Αντιψυχωσικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Ολανζαπίνη	20 – 200	0,9999	20,0	6,0
Αμισουλπρίδη	50 – 1000	0,9996	50,0	15,0
Παλιπεριδόνη	–	–	–	–
Ρισπεριδόνη	–	–	–	–
N-desmethyloclozapine	250 – 1000	0,9995	250,0	75,0
Κλοζαπίνη	250 – 1000	0,9991	250,0	75,0
Κουετιαπίνη	250 – 1000	0,9999	250,0	75,0
Αριπιπραζόλη	250 – 1000	0,9921	250,0	75,0

**Πίνακας 38:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό

Αντικαταθλιπτικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Μιρταζαπίνη	50 – 500	0,9998	50,0	15,0
Βουπροπιόνη	50 – 2000	0,9996	50,0	15,0
Βενλαφαξίνη	50 – 1000	0,9999	50,0	15,0
N-desmethylcitalopram	50 – 500	0,9999	50,0	15,0
Σιταλοπράμη	50 – 500	0,9953	50,0	15,0
Παροξετίνη	100 – 500	0,9999	100,0	30,0
Ντουλοξετίνη	–	–	–	–
Αγομελατίνη	50 – 800	0,9946	50,0	15,0
N-desmethylsertraline	250 – 1000	0,9998	250,0	75,0
Σερτραλίνη	250 – 1000	0,9840	250,0	75,0
Κλομιπραμίνη	100 – 1000	0,9999	100,0	30,0

**Πίνακας 39:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αντικαταθλιπτικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Μιρταζαπίνη	100 – 1000	0,9967	100,0	30,0
Βουπροπιόνη	100 – 2000	0,9946	100,0	30,0
Βενλαφαξίνη	250 – 1000	0,9997	250,0	75,0
N-desmethylcitalopram	250 – 1000	0,9813	250,0	75,0
Σιταλοπράμη	100 – 1000	0,9880	100,0	30,0
Παροξετίνη	250 – 1000	0,9995	250,0	75,0
Ντουλοξετίνη	100 – 1000	0,9991	100,0	30,0
Αγομελατίνη	100 – 1000	0,9939	100,0	30,0
N-desmethylsertraline	–	–	–	–
Σερτραλίνη	–	–	–	–
Κλομιπραμίνη	100 – 1000	0,9989	100,0	30,0

**Πίνακας 40:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αντικαταθλιπτικό	Εύρος εργασίας (ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Μιρταζαπίνη	250 – 1000	0,9999	250,0	75,0
Βουπροπιόνη	500 – 2000	0,9999	500,0	150,0
Βενλαφαξίνη	250 – 1000	0,9997	250,0	75,0
N-desmethylocitalopram	250 – 1000	0,9873	250,0	75,0
Σιταλοπράμη	250 – 1000	0,9997	250,0	75,0
Παροξετίνη	–	–	–	–
Ντουλοξετίνη	100 – 500	0,9999	100,0	30,0
Αγομελατίνη	100 – 1000	0,9966	100,0	30,0
N-desmethylertraline	250 – 1000	0,9999	250,0	75,0
Σερτραλίνη	250 – 1000	0,9985	250,0	75,0
Κλομιπραμίνη	250 – 1000	0,9999	250,0	75,0



**Πίνακας 41:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε πλάσμα – ορό

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Ολανζαπίνη (20/80/200)	2,8	1,9	1,6	4,5	2,6	2,0
Αμισουλπρίδη (100/500/1000)	2,7	4,5	4,9	3,5	4,5	6,8
Παλιπεριδόνη (20/60/200)	7,8	0,9	4,9	8,0	5,4	5,1
Ρισπεριδόνη (20/60/200)	4,9	3,9	4,2	5,6	4,9	5,0
N-desmethyloclozapine(100/500/1000)	6,4	2,5	3,3	8,9	7,6	3,8
Κλοζαπίνη (100/500/1000)	5,5	5,8	5,6	5,5	6,6	7,9
Κουετιαπίνη (100/500/1000)	1,4	4,8	2,2	10,2	7,5	8,5
Αριπιπραζόλη (250/500/1000)	4,1	3,1	1,7	5,0	6,8	3,3

**Πίνακας 42:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ολικό αίμα

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Ολανζαπίνη (50/100/200)	4,4	1,5	0,8	5,6	2,7	2,0
Αμισουλπρίδη (50/500/1000)	5,8	1,0	0,9	6,5	2,8	1,7
Παλιπεριδόνη (50/100/200)	0,9	6,4	6,9	2,6	6,5	7,0
Ρισπεριδόνη (50/100/200)	5,0	0,2	2,5	5,9	1,5	4,0
N-desmethyloclozapine (100/500/1000)	4,3	4,0	6,5	5,2	5,5	4,9
Κλοζαπίνη (250/500/1000)	2,7	0,8	0,4	3,6	2,5	4,3
Κουετιαπίνη (50/500/1000)	1,0	1,6	1,9	2,6	3,8	4,9
Αριπιπραζόλη (100/500/1000)	2,6	1,9	2,6	5,9	4,6	4,4

**Πίνακας 43:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ούρα

Αντιψυχωσικό (C, ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Ολανζαπίνη (20/100/200)	0,5	3,4	1,3	2,5	4,3	2,2
Αμισουλπρίδη (250/500/1000)	3,0	1,2	0,9	4,6	5,5	5,7
Παλιπεριδόνη (-/-/-)	–	–	–	–	–	–
Ρισπεριδόνη (-/-/-)	–	–	–	–	–	–
N-desmethylclozapine (250/500/1000)	3,7	1,4	2,6	3,8	2,4	4,3
Κλοζαπίνη (250/500/1000)	2,2	0,7	1,5	3,4	2,8	3,6
Κουετιαπίνη (250/500/1000)	1,5	3,4	5,6	4,6	5,8	7,2
Αριπιπραζόλη (250/500/1000)	2,5	1,9	2,3	4,0	4,6	3,1

**Πίνακας 44:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε πλάσμα – ορό

Αντικαταθλιπτικό (ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Μιρταζαπίνη (50/250/500)	5,4	2,2	0,8	7,4	5,6	3,8
Βουπροπιόνη (50/1000/2000)	2,4	1,6	7,6	5,4	4,4	5,0
Βενλαφαξίνη (50/500/1000)	3,0	1,0	5,1	4,5	6,1	5,9
N-desmethylcitalopram (50/250/500)	1,5	4,4	4,1	3,2	5,2	6,4
Σιταλοπράμη (50/250/500)	3,8	6,9	3,1	3,9	7,1	6,1
Παροξετίνη (100/250/500)	8,9	6,4	7,2	9,9	7,8	8,9
Ντουλοξετίνη (100/500/1000)	–	–	–	–	–	–
Αγομελατίνη (50/200/800)	7,6	6,9	4,5	9,3	10,0	9,5
N-desmethylsertraline (250/500/1000)	7,0	9,7	7,9	8,5	7,4	7,0
Σερτραλίνη (250/500/1000)	3,9	3,2	2,2	5,7	3,9	4,2
Κλομιπραμίνη (100/500/1000)	4,0	5,4	3,9	6,3	5,9	4,8

**Πίνακας 45:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ολικό αίμα

Αντικαταθλιπτικό (ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Μιρταζαπίνη (100/500/1000)	3,1	2,2	2,8	4,6	4,0	3,8
Βουπροπιόνη (100/500/2000)	3,6	0,4	4,3	3,1	2,1	5,6
Βενλαφαξίνη (250/500/1000)	8,6	2,1	6,0	8,0	3,0	5,9
N-desmethylocitalopram (250/500/1000)	4,1	1,5	6,9	5,3	4,8	6,5
Σιταλοπράμη (250/500/1000)	3,7	4,0	1,9	5,7	4,6	3,5
Παροξετίνη (250/500/1000)	8,3	6,5	3,9	9,0	7,6	5,5
Ντουλοξετίνη (100/500/1000)	8,1	4,7	4,5	9,2	6,3	5,1
Αγομελατίνη (100/500/100)	6,6	7,9	5,5	8,1	5,0	7,5
N-desmethylertraline (-/-/-)	-	-	-	-	-	-
Σερτραλίνη (-/-/-)	-	-	-	-	-	-
Κλομιπραμίνη (100/500/1000)	4,0	4,4	3,2	5,6	5,0	4,7

**Πίνακας 46:** Πιστότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας SPE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ούρα

Αντικαταθλιπτικό (ng/mL)	Πιστότητα (RSD%)					
	Εντός ημέρας			Μεταξύ ημερών		
	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό	Χαμηλό	Μεσαίο	Υψηλό
Μιρταζαπίνη (250/500/1000)	5,3	4,0	6,8	6,4	7,0	6,5
Βουπροπιόνη (500/1000/2000)	1,7	3,3	5,4	2,2	5,6	5,9
Βενλαφαξίνη (250/500/1000)	1,7	0,6	7,4	2,4	3,9	6,8
N-desmethylcitalopram (250/500/1000)	4,8	4,3	0,2	5,0	6,7	3,9
Σιταλοπράμη (250/500/1000)	2,4	1,3	0,5	3,1	2,9	4,0
Παροξετίνη (100/250/500)	–	–	–	–	–	–
Ντουλοξετίνη (100/500/1000)	2,6	2,3	2,2	4,9	5,4	3,2
Αγομελατίνη (100/500/100)	7,0	6,3	4,3	7,8	6,0	5,2
N-desmethylertraline (250/500/1000)	1,9	2,4	0,2	2,6	2,9	3,7
Σερτραλίνη (250/500/1000)	8,0	8,7	5,3	8,9	9,2	6,7
Κλομιπραμίνη (250/500/1000)	7,8	1,6	0,9	8,8	3,5	2,9

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής εργασίας, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης και μερικής επικύρωσης μίας αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε ιστό ήπατος από νεκροτομικό υλικό.

Οι λαμβανόμενες τιμές για τους συντελεστές προσδιορισμού ( $R^2$ ) ήταν 0,9328 έως 0,9921 και 0,9128 έως 0,9897 για τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά, αντίστοιχα. Για το σύνολο των αντιψυχωσικών φαρμάκων το LOQ ήταν 500 ng/g, ενώ για τα αντικαταθλιπτικά 800 ng/g. Το εύρος της ακρίβειας εκφραζόμενη έως ανάκτηση στο επίπεδο του ορίου ποσοτικοποίησης ήταν 39,8% έως 59,5% και 35,9% έως 59,2% για τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά, αντίστοιχα (Πίνακας 47-48).

**Πίνακας 47:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντιψυχωσικών σε ιστό ήπατος από νεκροτομικό υλικό

Αντιψυχωσικό	Εύρος εργασίας (ng/g)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/g)	Ανάκτηση (%)
Ολανζαπίνη	500 – 3000	0,9870	500	50,2
Αμισουλπρίδη	500 – 3000	0,9750	500	45,4
Παλιπεριδόνη	500 – 3000	0,9578	500	59,5
Ρισπεριδόνη	500 – 3000	0,9479	500	55,9
N-desmethyloclozapine	500 – 3000	0,9328	500	40,9
Κλοζαπίνη	500 – 3000	0,9921	500	49,6
Κουετιαπίνη	500 – 3000	0,9684	500	39,8
Αριπιπραζόλη	500 – 3000	0,9651	500	48,2



**Πίνακας 48:** Εύρος εργασίας, γραμμικότητα, όρια ποσοτικοποίησης και ακρίβεια ως ανάκτηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας LLE-UHPLC-UV/DAD προσδιορισμού των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών σε ιστό ήπατος από νεκροτομικό υλικό

Αντικαταθλιπτικό	Εύρος εργασίας (ng/g)	R <sup>2</sup>	LOQ (ng/g)	Ανάκτηση (%)
Μιρταζαπίνη	800 – 3000	0,9254	800	59,2
Βουπροπιόνη	800 – 3000	0,9556	800	47,6
Βενλαφαξίνη	800 – 3000	0,9492	800	38,5
N-desmethylcitalopram	800 – 3000	0,9580	800	40,2
Σιταλοπράμη	800 – 3000	0,9235	800	49,0
Παροξετίνη	800 – 3000	0,9473	800	55,8
Ντουλοξετίνη	800 – 3000	0,9136	800	46,0
Αγομελατίνη	800 – 3000	0,9850	800	54,2
N-desmethylsertraline	800 – 3000	0,9753	800	50,5
Σερτραλίνη	800 – 3000	0,9897	800	44,6
Κλομιπραμίνη	800 – 3000	0,9128	800	35,9

### 3.3 Εφαρμογή σε κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά

Οι παραπάνω αναλυτικές μεθοδολογίες (SPE-GC-MS και SPE-UHPLC-UV/DAD) που βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν, στη συνέχεια εφαρμόστηκαν με επιτυχία στη μέτρηση επιπέδων αντιψυχωσικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος εξωτερικών ψυχιατρικά ασθενών κατά τη διάρκεια εξέτασης αυτών από τον εκάστοτε θεράποντα ιατρό. Επιπλέον, έγινε και εφαρμογή αυτών σε νεκροτομικό υλικό και συγκεκριμένα σε αίμα και ούρα.

#### 3.3.1 Κλινικά περιστατικά

Τα δείγματα αίματος συλλέχτηκαν στην Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για το χρονικό διάστημα μεταξύ Σεπτεμβρίου 2014 και Ιουλίου 2015. Ο κάθε ασθενής έλαβε λεπτομερή πληροφόρηση για τον σκοπό της συγκεκριμένης έρευνας και όσοι συμπεριλήφθησαν υπέγραψαν σχετικό έγγραφο για τη συμμετοχή τους. Ο κάθε ασθενής υποβλήθηκε αρχικά σε εξέταση ούρων με σκοπό την απόκλιση κατάχρησης κάποιου φαρμάκου. Η δειγματοληψία του αίματος έλαβε χώρα πριν από την πρωινή χορήγηση της δόσης, συνήθως στις 9:00 πμ. Τα δείγματα πλάσματος παραλήφθηκαν μετά από φυγοκέντρηση του ολικού αίματος για 10 min στους  $2415 \times g$  (RCF), διαχωρίστηκαν σε κλάσματα του 1,0 mL, όπου καταψύχθηκαν άμεσα στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή τους.

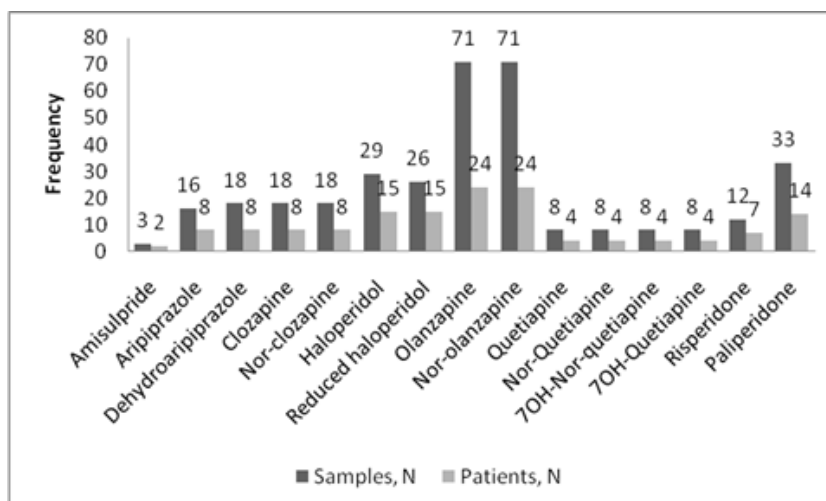
Ο συνολικός αριθμός των ψυχιατρικά ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν 70, εκ των οποίων 43 άνδρες (61,4%) και 27 θήλεα (38,6%), με ηλικιακό εύρος από 19 μέχρι 74 ετών (μέσος όρος ηλικίας  $\pm$  SD =  $35,6 \pm 11,2$  γ). Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων πλάσματος που συλλέχτηκαν από το παραπάνω σύνολο ασθενών ήταν 187, πάνω από ένα δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 45 ασθενείς (64,3%), ενώ τα εννέα δείγματα ήταν ο μέγιστος αριθμός από έναν ασθενή. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης σε μερικές περιπτώσεις έγινε και τροποποίηση του θεραπευτικού σχήματος ή/και της λαμβανόμενης δόσης, πάντα σε σχέση με την κλινική εικόνα του ασθενούς.

Στα δείγματα πλάσματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τον προσδιορισμό οκτώ αντιψυχωσικών φαρμάκων και επτά μεταβολιτών (Σχήμα 43 και Πίνακας 49). Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών όπου δεν είχε στη διάθεσή του το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Τοξικολογίας, του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας στο Βέλγιο, με υπεύθυνο καθηγητή τον Δρ. Kristof Maudens. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων

για τις προσδιοριζόμενες ουσίες που συμπεριλήφθησαν σε αυτή τη μελέτη επαληθευτήκαν μεταξύ των συνεργαζόμενων ερευνητικών ομάδων.

Ως θετικά χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα εκείνα όπου η συγκέντρωση του φαρμάκου ή του μεταβολίτη ήταν μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης του εκάστοτε αναλύτη. Οι μεταβολίτες οι οποίοι προσδιορίστηκαν στα δείγματα πλάσματος ήταν της: αριπιπραζόλης (dehydroaripiprazole), κλοζαπίνης (N-desmethyloclazapine), αλοπεριδόλης (reduced haloperidol), ολανζαπίνης (N-desmethylolanzapine), κουετιαπίνης (7-OH-quetiapine, norquetiapine και 7-OH-norquetiapine) και ρισπεριδόνης (9-OH-risperidone).

Το πλέον συχνά συνταγογραφούμενο αντιψυχωσικό ήταν η ολανζαπίνη και ακολουθούσε η αλοπεριδόλη, συνταγογραφούμενα σε 24 και 15 ασθενείς, αντίστοιχα. Τα δύο παραπάνω APs φάρμακα ήταν κατά συνέπεια και τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα σε 71 και 29 δείγματα πλάσματος, αντίστοιχα (Σχήμα 43). Ο μεταβολίτης της αριπιπραζόλης ανιχνεύθηκε σε δύο παραπάνω δείγματα σε σχέση με τη μητρική ένωση και συγκεκριμένα σε 18 από 16, φαινόμενο το οποίο μπορεί να αποδοθεί στον ρυθμό κάθαρσης του φαρμάκου μετά από κάποια διακοπή της θεραπείας. Επιπλέον, η παλιπεριδόνη ανιχνεύθηκε σε 33 δείγματα ενώ η ρισπεριδόνη σε 12, το εύρημα αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι η παλιπεριδόνη δεν είναι μόνο ο φαρμακολογικά δραστικός μεταβολίτης της ρισπεριδόνης, αλλά χορηγείται και σαν φάρμακο σε πολλούς ψυχιατρικά ασθενείς.



**Σχήμα 43:** Συχνότητα παρουσίας των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών φαρμάκων και των μεταβολιτών αυτών στα εξεταζόμενα δείγματα πλάσματος και στους ασθενείς

**Πίνακας 49:** Εύρος συγκεντρώσεων των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών και μεταβολιτών τους από ψυχιατρικά ασθενείς

Προσδιοριζόμενο αντιψυχωσικό και μεταβολίτης	Προσδιοριζόμενο εύρος συγκέντρωσης (ng/mL)	Προσδιοριζόμενη μέση τιμή συγκέντρωσης (ng/mL)	Θεραπευτικό επίπεδο συγκέντρωσης (ng/mL)
Αμισουλπρίδη	143,0 – 314,0	169,0	100 – 400
Αριπιπραζόλη	14,0 – 377,0	114,0	150 – 500
Dehydroaripiprazole	13,4 – 118,0	45,0	60 – 200
Κλοζαπίνη	70,0 – 926,0	409,0	350 – 600
N-desmethyloclozapine	16,0 – 596,0	246,0	–
Αλοπεριδόλη	0,7 – 9,4	3,4	1 – 10
Reduced haloperidol	0,3 – 6,8	1,0	–
Ολανζαπίνη	1,0 – 83,0	33,0	20 – 80
N-desmethyloanzapine	1,4 – 16,0	7,6	–
Κουετιαπίνη	6,7 – 85,0	34,0	75 – 500
Norquetiapine	16 – 129	26,0	–
7-OH-norquetiapine	1,0 – 7,3	1,8	–
7-OH-quetiapine	1,6 – 10,5	7,5	–
Ρισπεριδόνη	1,2 – 18,0	2,4	4 – 30
Παλιπεριδόνη (9-OH-risperidone)	0,3 – 49,0	18,0	12 – 60

**Πίνακας 50:** Συχνότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος ψυχιατρικά ασθενών με υπο-, υπερ- και θεραπευτικές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών

Αντιψυχωσικό	Θεραπευτικές συγκεντρώσεις C, n (n/N%) <sup>c</sup>		Υπο-θεραπευτικές συγκεντρώσεις C, n (n/N%) <sup>c</sup>		Υπερ-θεραπευτικές συγκεντρώσεις C, n (n/N%) <sup>c</sup>		Συνολικός αριθμός δειγμάτων, N	
	M <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	M <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	M <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	M <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>
Αμισουλπρίδη	2	1	-	-	-	-	2	1
Αριπιπραζόλη	4 (40)	2 (29)	6 (60)	5 (71)	-	-	10	7
Κλοζαπίνη	1 (33)	3 (19)	-	9 (56)	2 (67)	4 (25)	3	16
Αλοπεριδόλη	3 (100)	12 (50)	-	12 (50)	-	-	3	24
Ολανζαπίνη	29 (88)	22 (63)	4 (12)	12 (34)	-	1 (3)	33	35
Κουετιαπίνη	-	1 (12)	-	7 (88)	-	-	-	8
Ρισπεριδόνη	-	3 (30)	2 (100)	7 (70)	-	-	2	10
Παλιπεριδόνη	-	15 (45)	-	18 (55)	-	-	-	33

<sup>a</sup>M: ανίχνευση ενός μόνο αντιψυχωσικού ή μεταβολίτη

<sup>b</sup>P: ανίχνευση πάνω από του ενός αντιψυχωσικών ή μεταβολιτών

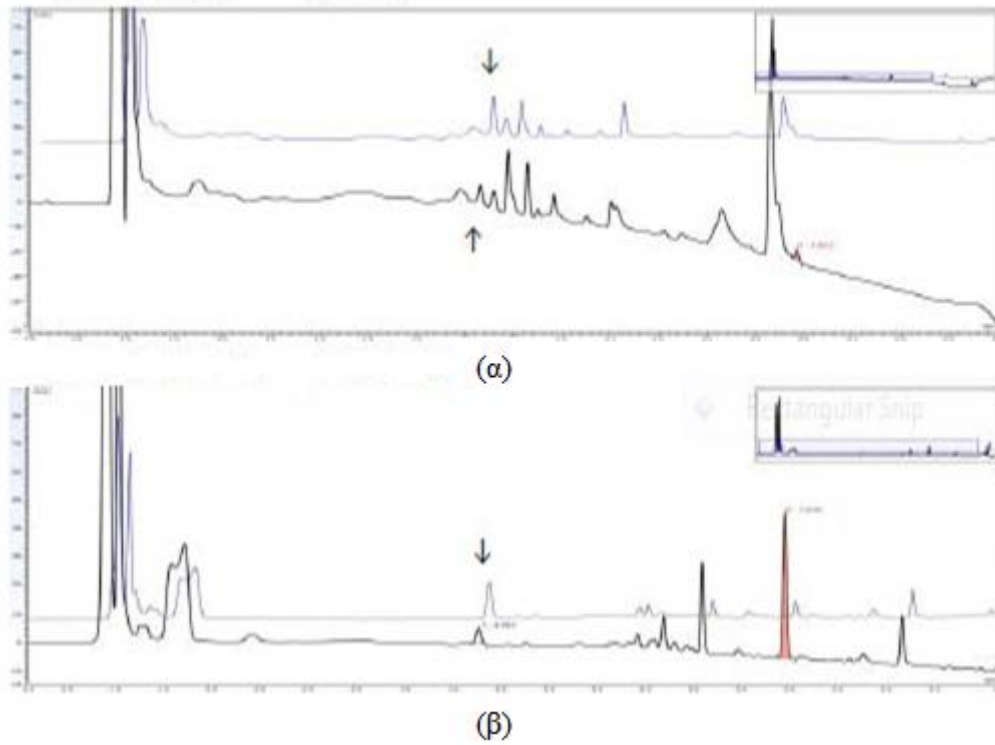
<sup>c</sup>(n/N%): σχετική συχνότητα δειγμάτων για κάθε υποκατηγορία σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των θετικών δειγμάτων για κάθε προσδιοριζόμενο αντιψυχωσικό

Από τον Πίνακα 50 προκύπτει ότι στα δείγματα με ανίχνευση ενός μόνου αντιψυχωσικού, οι συγκεντρώσεις ρισπεριδόνης και αριπιπραζόλης ήταν κάτω των θεραπευτικών επιπέδων, με ποσοστά 100% και 60%, αντίστοιχα. Σε δείγματα όπου ανιχνεύτηκε συνδυασμός αντιψυχωσικών, οι συγκεντρώσεις αριπιπραζόλης, κουετιαπίνης ή ρισπεριδόνης ήταν υπο-θεραπευτικές σε σχετικά υψηλά ποσοστά και συγκεκριμένα 71%, 88% και 70% των δειγμάτων, αντίστοιχα. Αντίθετα, υπερ-θεραπευτικές συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σε μικρό αριθμό δειγμάτων (7/187, 4%) και κυρίως σε ασθενείς υπό θεραπεία με κλοζαπίνη. Εν κατακλείδι, 44% (82/187), των μελετώμενων αντιψυχωσικών προσδιορίστηκαν σε επίπεδα κάτω του θεραπευτικού ορίου, ενώ σε 52% (98/187) των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν θεραπευτικές συγκεντρώσεις αντιψυχωσικών.

Επίσης από τον Πίνακα 50 προκύπτει ότι τα θεραπευτικά επίπεδα της αλοπεριδόλης και της ολανζαπίνης προσδιορίστηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκε μόνο αλοπεριδόλη ή ολανζαπίνη, και συγκεκριμένα σε ποσοστό 100% και 88%, αντίστοιχα. Ομοίως, σε ασθενείς με ανίχνευση πάνω από του ενός αντιψυχωσικών ή μεταβολιτών, τα θεραπευτικά επίπεδα των συγκεκριμένων δύο αντιψυχωσικών στα αναλυόμενα δείγματα ήταν σε ποσοστό 63% για την ολανζαπίνη και 50% για την αλοπεριδόλη. Στη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών, θεραπευτικές συγκεντρώσεις κλοζαπίνης και κουετιαπίνης ανιχνεύθηκαν σε λίγα δείγματα, με ποσοστό 19% και 12%, αντίστοιχα.

Μεταξύ άλλων, επιλεχθήκαν δύο ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με το πλέον πρόσφατο αντικαταθλιπτικό αγομελατίνη, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα.

Στο πρώτο κλινικό περιστατικό, το δείγμα αίματος συλλέχτηκε 12 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση 50 mg αγομελατίνης και η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης. Αντίθετα, στο δεύτερο περιστατικό που η δειγματοληψία έγινε μία ώρα μετά τη χορήγηση της ίδιας δόσης, η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση αγομελατίνης ήταν στα θεραπευτικά επίπεδα και συγκεκριμένα 213,0 ng/mL.



**Σχήμα 44:** Χρωματογράφημα SPE-UHPLC-UV/DAD, σε δύο μήκη κύματος 230 και 245 nm για τα δείγματα πλάσματος των ασθενών με συγκέντρωση αγομελατίνης (α) <LOQ και (β) 213,0 ng/mL. Κάθε δείγμα πλάσματος είναι εμβολιασμένο με 100 ng/mL χαρμίνης (IS)

### 3.3.2 Περιστατικό ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αναλυτικές μεθοδολογίες που βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν εφαρμόστηκαν με επιτυχία στην ανάλυση νεκροτομικών δειγμάτων από συγκεκριμένο περιστατικό.

Πτώμα άρρενος ενήλικα, 52 ετών, βρέθηκε στο μπάνιο της οικίας του, δίπλα στο οποίο υπήρχαν δύο πλαστικοί περιέκτες (μπουκάλια) με σήμανση “deltamethrin 1.5% w/v, total volume 160 mL” και “alpha-cypermethrin 6% w/v, total volume 50 mL”, αντίστοιχα. Η διενέργεια της νεκροψίας-νεκροτομής πραγματοποιήθηκε 24 h μετά την εύρεση του πτώματος, από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η νεκροψία δεν έδειξε κακώσεις καθώς και πρώιμων σημείων σήψης και κυάνωσης. Κατά τη νεκροτομή ανευρέθη γενικευμένη σπλαχνική συμφόρηση και οίδημα των οργάνων. Η στομαχική κοιλότητα περιείχε υγρό χρώματος πρασινωπό, όγκου περίπου 300 mL, πέντε στρογγυλά κιτρινωπά δισκία (διαμέτρου ~0,8 cm) καθώς και υπολείμματα δισκίων.

Κατά τη διαδικασία νεκροψίας-νεκροτομής συλλέχθηκε αίμα από τις καρδιακές κοιλότητες, ούρα από την ουροδόχο κύστη και όλο το περιεχόμενο του στομάχου.

Με τις προτεινόμενες μεθόδους ανάλυσης στο αίμα και στα ούρα ανιχνεύθηκε το αντικαταθλιπτικό μιρταζαπίνη και προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 12500 και 10700 ng/mL, αντίστοιχα.

Από τα εξαγόμενα αποτελέσματα της νεκροτομής και των τοξικολογικών αναλύσεων, η αιτία θανάτου ήταν η δηλητηρίαση από τη συνεργιστική δράση της κατάποσης πυρεθροειδών (deltamethrin και alpha-cypermethrin) και του αντικαταθλιπτικού μιρταζαπίνη – αυτοκτονία.



**Πίνακας 51:** Συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών σε νεκροτομικό υλικό

Προσδιοριζόμενη ουσία	Ολικό αίμα (μg/mL)	Ούρα (μg/mL)
Alpha-cypermethrin	2,46	0,41
Deltamethrin	2,40	0,46
Μιρταζαπίνη	15,2	10,7
Αιθανόλη	0,75 (g/L)	n.a. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> n.a.: not analyzed

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ως εξεταζόμενες, και κατά συνέπεια προσδιοριζόμενες, χημικές ουσίες συμπεριλήφθησαν φάρμακα που δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα, που αποτελούν δύο πολύ μεγάλες κατηγορίες ξενοβιοτικών ενώσεων. Είναι αξιοσημείωτο ότι 64 διαφορετικές χημικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί ως αντιψυχωσικά φάρμακα, σύμφωνα με τον WHO, μέχρι σήμερα. Η επιλογή των προσδιορισθέντων φαρμάκων σε αυτή τη μελέτη έγινε με βάση τη συχνότητα συνταγογράφησης αυτών, κατά τις υποδείξεις των ψυχιάτρων, στους ασθενείς της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, και είναι σε αντιστοιχία με τη συχνότητα συνταγογράφησης τους σε πανελλήνια κλίμακα.

Οι συγκεκριμένες κατηγορίες φαρμάκων, παρουσιάζουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον από αναλυτική σκοπιά, τόσο στην κλινική πράξη που εμπύπτει στο αντικείμενο της Κλινικής Τοξικολογίας, όσο και κατά την τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, που εμπύπτουν στο αντικείμενο της Δικαστικής Τοξικολογίας. Στις σύγχρονες κοινωνίες πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, πάσχει από διάφορες ψυχιατρικές νόσους, όπως κατάθλιψη, διπολική διαταραχή, σχιζοφρένεια και άλλες. Στον παραπάνω κανόνα δεν αποτελεί εξαίρεση η Ελλάδα, όπου σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία (Ελληνική Στατιστική Αρχή 2016), το 4,7% του πληθυσμού πάσχει από κατάθλιψη. Το ποσοστό αυτό είναι αυξημένο κατά 80,8%, σε σχέση με αυτό που είχε καταγραφεί το 2009 (2,6%), με τη νόσο να εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες (7/10 ασθενείς είναι γυναίκες). Όπως είναι αναμενόμενο, η ραγδαία αύξηση των ψυχιατρικών νόσων έχει σαν επακόλουθο αποτέλεσμα την αύξηση της χρήσης των σχετικών ψυχοφαρμάκων.

Ο προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά, που προέρχονται από ψυχιατρικά ασθενείς, μπορεί να κριθεί απαραίτητος για διάφορους λόγους, όπως η διερεύνηση περιστατικών δηλητηριάσεων, ή/και για τη συστηματική ή ακόμη και τη σποραδική παρακολούθηση των επιπέδων τους για θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι πολλά από τα αντιψυχωσικά φάρμακα έχουν μικρό εύρος θεραπευτικών συγκεντρώσεων, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα απόκλιση από τα θεραπευτικά επίπεδα των επιπέδων που παρατηρούνται στους ασθενείς, και τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης τοξικών παρενεργειών, με τη συνδρομή και πολλών άλλων παραγόντων. Δύο χαρακτηριστικά των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών

φαρμάκων είναι η ποικίλη φαρμακοκινητική μεταξύ των ασθενών και η άμεση συσχέτιση του όποιου φαρμακολογικού αποτελέσματος με τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντικαταθλιπτικών, και κυρίως των αντιψυχωσικών σε ορό ή πλάσμα ψυχιατρικά ασθενών μπορεί να συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος, παρέχοντας στοιχεία για την ερμηνεία πιθανών ανεπιθύμητων επιδράσεων, για τη μη ανταπόκριση στο αρχικό θεραπευτικό σχήμα, για τις πιθανές φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις και για την ενδεχόμενη μη συμμόρφωση του ασθενούς (Hiemke et al. 2011, Patteet et al. 2015).

Στις περισσότερες χώρες, και κυρίως σε αυτές με ανεπτυγμένες οικονομίες και συστήματα υγείας, οι δηλητηριάσεις από ψυχιατρικά φάρμακα είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο, είτε οφείλεται σε απόπειρες αυτοκτονίας είτε σε ατύχημα. Συγκεκριμένα, δηλητηριάσεις λόγω ατυχήματος γίνονται εξαιτίας λήψης υπερβολικής δόσης, είτε από τους ίδιους τους ασθενείς είτε από άτομα του οικείου στον ασθενή περιβάλλον, κυρίως παιδιά. Τα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες που μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο, με συχνότερες αιτίες την καρδιακή ανεπάρκεια, την υποξαιμία και την οξέωση. Επιπλέον, η λήψη τέτοιων φαρμάκων συνδέεται μερικές φορές με σημαντική αύξηση των αυτοκτονικών τάσεων του ψυχιατρικά ασθενή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα APs και ADs να συμπεριλαμβάνονται πολύ συχνά στα φάρμακα που αναζητούνται κατά τη διενέργεια τοξικολογικής ανάλυσης, για να διαπιστωθεί η πιθανή συνεισφορά τους στην αιτία θανάτου, ιδιαίτερα σε περιστατικά αιφνιδίων θανάτων (Drummer 2007).

Η κατεστημένη εργαστηριακή αναλυτική πρακτική καθιστά αναγκαία και σημαντική την προσπάθεια για ανάπτυξη νέων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, σε βιολογικά υλικά που προέρχονται, είτε από ασθενείς για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους είτε σε νεκροτομικό υλικό κατά τη διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος. Οι υποκείμενοι λόγοι αφορούν τις διαφορετικές δυνατότητες, ανάγκες, ή/και προτεραιότητες των σχετικών εργαστηρίων ανά την επικράτεια, και διεθνώς, αλλά και τους περιορισμούς που τίθενται τόσο από τον διαθέσιμο εξοπλισμό, όσο και από τους διαθέσιμους οικονομικούς και ανθρώπινους πόρους για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και παροχή νέων υπηρεσιών, σε κάθε εργαστήριο.

Για όλους τους παραπάνω λόγους καθίσταται αναγκαία και σημαντική η ανάπτυξη νέων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε κλινικά δείγματα και σε νεκροτομικό υλικό.

#### *Προσδιορισμός APs και ADs με αέρια χρωματογραφία*

Η τεχνική GC-MS αποτελεί ενόργανη διάταξη η οποία χαρακτηρίζεται από προσιτό κόστος, ενώ ταυτόχρονα, παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία και υψηλή εκλεκτικότητα στην ανίχνευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων που εξασφαλίζει η φασματομετρία μάζας.

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού και προσδιορισμού ξενοβιοτικών ενώσεων σε βιολογικά υποστρώματα. Ειδικότερα, ο αεριο-χρωματογραφικός προσδιορισμός πολλών αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών έχει μελετηθεί από σχετικά μικρό αριθμό ερευνητικών ομάδων (Paterson et al. 2004, Papoutsis et al. 2012, Wille et al. 2005, Wille et al. 2007, Vardakou et al. 2010, Huang et al. 2007, Khraiwesh et al. 2011, Gerace et al. 2012, Pujadas et al. 2007, Sánchez de la Torre et al. 2005, Sasaki et al. 2013).

Ο όρος «βελτιστοποίηση» χρησιμοποιείται στην Αναλυτική Χημεία για να δηλωθεί η αναζήτηση εκείνων των πειραματικών συνθηκών μιας αναλυτικής μεθοδολογίας, που οδηγούν στην καλύτερη πιθανή αναλυτική απόκρισή της. Η βελτιστοποίηση στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε μεταβάλλοντας έναν παράγοντα τη φορά, ενώ όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμεναν σταθεροί (Σακκάς 2010). Η εύρεση των βέλτιστων τιμών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος, η θερμοκρασία του ανιχνευτή, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης και η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου έγινε με σειρά πειραματικών δοκιμών με στόχο τη βελτίωση του εμβαδού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για πρώτη φορά αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία αναλυτική μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού κλοζαπίνης, βουπροπιόνης, μιρταζαπίνης, σερτραλίνης, σιταλοπράμης, κλομπραμίνης, σε τέσσερα βιολογικά υλικά (πλάσμα, ορός, ούρα και ολικό αίμα), χωρίς παραγωγοποίηση των αναλυτών, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Vardakou et al. 2010, Papoutsis et al. 2012). Η παραγωγοποίηση κατέστη αναγκαία μόνο για την ολανζαπίνη, την αλοπεριδόλη και τη βενλαφαξίνη, καθότι στα συγκεκριμένα φάρμακα ο αεριο-χρωματογραφικός διαχωρισμός χωρίς στάδιο παραγωγοποίησης ήταν αδύνατος. Η επιλογή των αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης

(MSTFA για την ολανζαπίνη και την αλοπεριδόλη και HFBA για τη βενλαφαξίνη), έγινε επειδή εξασφάλιζαν μεγάλη απόδοση κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης, ευαίσθητη ανίχνευση των αναλυτών, συμμετρία κορυφών στο χρωματογράφημα, και τέλος μεγάλη σταθερότητα των παραγώγων.

Όσον αφορά την επεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων πριν την παραγωγοποίηση, η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για την απομόνωση αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων από βιολογικά υποστρώματα (Wohlfarth et al. 2011, Llerena et al. 2001, Paterson et al. 2004, Amundsen et al. 2013, Kirchherr et al. 2006, Malfarà et al. 2007, Josefsson et al. 2010). Στις αντίστοιχες μελέτες οι τιμές ανάκτησης που αναφέρονται για την πλειοψηφία, τόσο των αντιψυχωσικών όσο και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων δεν ήταν ικανοποιητικές, και επιπλέον τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα ήταν αρκετά επιβαρυνμένα σε παρεμποδίζουσες ουσίες, όπως έδειχναν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Από την άλλη, η συγκριμένη τεχνική, αν και χαρακτηρίζεται από τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών οργανικών διαλυτών, θεωρείται χαμηλού κόστους.

Αντίθετα, η υγρή-στερεή εκχύλιση (SPE), που επιλέχτηκε τελικά, παρείχε καλύτερη απόδοση εκχύλισης, καθαρότερα εκχυλίσματα και εξασφάλιζε την επεξεργασία του δείγματος σε λιγότερο χρόνο, σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες (Patteet et al. 2015, Proença et al. 2013, Meulder et al. 2008, Frahnert et al. 2003, Vardakou et al. 2010, Choong et al. 2009, Papoutsis et al. 2012, Wille et al. 2005, Wille et al. 2007, Castro et al. 2008, Ohman et al. 2001, Bhatt et al. 2005). Αξίζει να τονιστεί ότι για τον συγκεκριμένο προσδιορισμό τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης επετεύχθησαν με χρήση στηλών (Chem Elut) σχετικά χαμηλού κόστους. Επιπλέον, με τη συγκεκριμένη επιλογή ο χρόνος επεξεργασίας δείγματος ήταν αρκετά σύντομος καθότι δεν κατέστη απαραίτητη η προσθήκη σταδίου καθαρισμού. Τέλος, η επιλογή της έκλουσης εις διπλούν (με διχλωρομεθάνιο : ισοπροπανόλη) φάνηκε ότι παρείχε μεγαλύτερα ποσοστά ανακτήσεων στα υγρά βιολογικά δείγματα, για το σύνολο των προσδιοριζόμενων αναλυτών με αέρια χρωματογραφία.

Μετά τη βελτιστοποίηση του αεριο-χρωματογραφικού διαχωρισμού και του πρωτοκόλλου εκχύλισης των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων από τα βιολογικά υγρά (πλάσμα, ορό, ούρα και ολικό αίμα) έγινε η επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας. Η αξιολόγηση της ανάκτησης έγινε για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία και σε κάθε βιολογικό υλικό ξεχωριστά. Η διαχωριστικότητα των προσδιοριζόμενων φαρμάκων και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών ήταν αρκετά

ικανοποιητικά και παρόμοια με αυτά που λαμβανόταν κατά τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών. Για τους περισσότερους αναλύτες οι ανακτήσεις ήταν αρκετά υψηλές (>70%), ακόμη και για τα χαμηλά επίπεδα εμβολιασμού, με εξαίρεση την σερτραλίνη. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανάκτηση δεν είναι πρώτιστης σπουδαιότητας κριτήριο επικύρωσης, αν πληρούνται τα κριτήρια της γραμμικότητας, της πιστότητας και της ανιχνευσιμότητας (Peters et al. 2007). Τα λαμβανόμενα ποσοστά ανακτήσεων, αν και παρουσίαζαν διαφορές μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών, ήταν συγκρίσιμα με εκείνα άλλων αντίστοιχων δημοσιευμένων εργασιών (Sánchez de la Torre et al. 2005, Nevado et al. 2006, Cartiser et al. 2011).

Το εύρος των συγκεντρώσεων προσδιορισμού ήταν μεγάλο και για τα τέσσερα εξεταζόμενα βιολογικά υγρά, με μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με προηγούμενες δημοσιευμένες μεθόδους προσδιορισμού των εν λόγω αναλυτών (Meyer et al. 2014). Τα όρια ποσοτικοποίησης των προσδιοριζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών, με τις επιλεγμένες συνθήκες, ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα θεραπευτικά επίπεδα, με εξαίρεση τη σερτραλίνη, της οποίας το θεραπευτικό εύρος συγκεντρώσεων βρισκόταν μεταξύ των τιμών του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της σερτραλίνης παρά μόνο η ανίχνευσή της ποιοτικά.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε κλινικά όσο και σε νεκροτομικά δείγματα χωρίς αλλαγή του αναλυτικού πρωτοκόλλου. Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ 2010 έως 2014 δημοσιεύθηκαν μόνο τέσσερις εργασίες με χρήση GC-MS(/MS) για τον προσδιορισμό αντιψυχωσικών φαρμάκων, εκ των οποίων, οι τρεις αφορούσαν μόνο πλάσμα (Vardakou et al. 2010, Kumazawa et al. 2011, Fonseca et al. 2013) και η μία μόνο ολικό αίμα (Papoutsis et al. 2014), ενώ καμία δεν ανέφερε ως εξεταζόμενο βιολογικό υλικό τα ούρα.

Το ούρα αποτελούν ένα σημαντικό βιολογικό υπόστρωμα κατά την τοξικολογική ανάλυση. Στο συγκεκριμένο υλικό μπορεί να συσσωρευτούν μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκων, αλλά και μεταβολιτών τους, διευκολύνοντας έτσι την διαδικασία ανίχνευσης των προσδιοριζόμενων ουσιών και παρέχοντας πληροφορίες για τυχόν έκθεση του ατόμου σε διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες πριν τον θάνατο. Επιπλέον, αποτελεί συχνά το βιολογικό υλικό επιλογής για την εκτέλεση προσανατολιστικών αναλύσεων σε περιστατικά αιφνιδίων θανάτων (Drummer et al. 2002). Τα ούρα, σε αντίθεση με το αίμα, έχουν ελάχιστη περιεκτικότητα σε λιπίδια και πρωτεΐνες, ουσίες που συχνά δρουν παρεμποδιστικά στη

διαδικασία ανάλυσης διαφορών φαρμάκων, μεταξύ των οποίων τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά. Ακόμη, σε περιπτώσεις που στην ανάλυση αίματος δεν έχει ανιχνευτεί κάποιο φάρμακο ή τοξική ουσία, ο προσδιορισμός χαρακτηριστικού μεταβολίτη στα ούρα αποτελεί στοιχείο πρόσφατης έκθεσης του οργανισμού στην αντίστοιχη μητρική ουσία (Skopp 2004).

Η μέθοδος SPE-GC-MS που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην παρούσα διατριβή υπερτερεί σε σχέση με προηγούμενες αντίστοιχες μεθόδους. Συγκεκριμένα, εξασφαλίζει τον προσδιορισμό πολλών αναλυτών ταυτοχρόνως, με μεγάλη εκλεκτικότητα, σε αντίθεση με εργασίες που εξετάζουν ένα μόνο φάρμακο και τον κύριο μεταβολίτη του (Vardakou et al. 2010, Khraiwesh et al. 2011). Επίσης, χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και σχετικά ταχεία ανάλυση (Papoutsis et al. 2012), με ικανοποιητική ακρίβεια και πιστότητα. Τέλος, η μελέτη σταθερότητας έχει συμπεριληφθεί ως αναλυτικό κριτήριο επικύρωσης σε ελάχιστες δημοσιεύσεις (Paterson et al. 2004, Papoutsis et al. 2012, Wille et al. 2005, Wille et al. 2007, Vardakou et al. 2010, Huang et al. 2007, Khraiwesh et al. 2011, Gerace et al. 2012, Pujadas et al. 2007, Sánchez de la Torre et al. 2005, Sasaki et al. 2013).

Η μέθοδος αποδείχτηκε κατάλληλη για εφαρμογή σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας, με την αξιοπιστία και ταχύτητα που απαιτείται στην ορθή και άμεση αντιμετώπιση των σχετικών περιστατικών. Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε βιολογικά δείγματα από κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά.

#### *Προσδιορισμός APs και ADs με υγρή χρωματογραφία*

Τα περισσότερα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι θερμικά μη σταθερές ενώσεις, ενώ δεν είναι αρκετά πτητικά. Κατά συνέπεια, η χρήση υγρής χρωματογραφίας (LC) για τον διαχωρισμό τους από εκχυλίσματα βιολογικών υλικών αποτελεί τη μέθοδο επιλογής, όπου είναι δυνατόν. Η πλειοψηφία των ερευνητικών εργασιών προσδιορισμού των συγκεκριμένων φαρμάκων αφορά εφαρμογή LC, ειδικά για κλινικά περιστατικά, όπου ο χρόνος ολοκλήρωσης της ανάλυσης είναι σημαντική παράμετρος (Chaves et al. 2007, Choong et al. 2009, Unceta et al. 2010, Mandrioli et al. 2011, Uřinová et al. 2012, Ansermot et al. 2013).

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, η τεχνική υγρής χρωματογραφίας που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υποστρώματα ήταν η UHPLC-UV/DAD. Η συγκεκριμένη ενόργανη διάταξη χαρακτηρίζεται από μικρό κόστος σε σχέση με διάταξη GC-

MS και μικρότερο χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία με την ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων από τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες (UV) (Moreno et al. 2014).

Η χρήση UHPLC παρείχε σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι μιας συμβατικής διάταξης HPLC. Συγκεκριμένα, καθιστά πιο εύκολη τη διαδικασία ανάπτυξης αναλυτικής μεθοδολογίας, λόγω του ταχύ διαχωρισμού των αναλυτών στη στατική φάση και της άμεσης απόκρισης του συστήματος σε αλλαγές των χρωματογραφικών παραμέτρων. Με εφαρμογή της τεχνικής UHPLC η ταχύτητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού δύναται να μειωθεί τρεις έως δέκα φορές σε σχέση με τη κλασική HPLC, ενώ παράλληλα, χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία και ακρίβεια (Chesnut et al. 2007, Guillaume et al. 2008, Guillaume et al. 2013, Dong et al. 2014, Fekete et al. 2014).

Κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της ανάλυσης των επιλεγμένων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών με διάταξη υγρής χρωματογραφίας, η σημαντικότερη παράμετρος που ελέγχθηκε ήταν η κινητή φάση και το εκλουστικό πρόγραμμα. Η σύγκριση και η επιλογή των εκλουστικών προγραμμάτων της κινητής φάσης, ο βέλτιστος όγκος εισαγωγής δείγματος, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, η θερμοκρασία της προστήλης και της αναλυτικής στήλης έγινε με αξιολόγηση των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων των προσδιοριζόμενων ουσιών, και συγκεκριμένα, του εμβადού, της συμμετρίας και της διαχωριστικότητας των κορυφών.

Τα πειράματα βελτιστοποίησης με LLE έδειξαν, όπως και στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας, ότι οι τιμές ανάκτησης για την πλειοψηφία, τόσο των αντιψυχωσικών όσο και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων δεν ήταν ικανοποιητικές. Επιπλέον, τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα ήταν αρκετά επιβαρυμένα, τόσο μακροσκοπικά όσο και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Αντίθετα, η SPE με χρήση στηλών Bond Elute Certify, με διαλύτη εκχύλισης μεθανόλη : αμμωνία, παρείχε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για το σύνολο των προσδιοριζόμενων αναλυτών.

Η εκχύλιση των εξεταζόμενων αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών από ιστό εγκεφάλου κατέστη αδύνατη, τόσο με εφαρμογή υγρής-υγρής όσο και υγρής-στερεής εκχύλισης, με αποτέλεσμα να αποκλειστεί από περεταίρω μελέτη. Η αδυναμία προσδιορισμού των συγκεκριμένων αναλυτών στον εγκέφαλο οφείλεται στο γεγονός ότι τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα, μετά την επεξεργασία του δείγματος, είχαν πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε παρεμποδίζουσες ουσίες (κυρίως λιπίδια), γεγονός που καθιστούσε



αδύνατη την ανάλυση με τις διαθέσιμες ενόργανες διατάξεις του εργαστηρίου. Ο προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε επιβαρυμένα υποστρώματα, όπως είναι οι ιστοί, απαιτεί χρήση τεχνικών μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας και εκλεκτικότητας, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία με συζευγμένο ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών (LC-MS/MS) (Sampedro et al. 2012, Liang et al. 2012, Nedahl et al. 2018).

Μετά τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης των επιλεγμένων αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων από τα βιολογικά υγρά, ακολούθησε πλήρη επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας. Η αξιολόγηση της ανάκτησης για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία έγινε για κάθε ένα ξεχωριστά βιολογικό υγρό. Επιπλέον, η διαχωριστικότητα των προσδιοριζόμενων φαρμάκων στο εκχύλισμα και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών ήταν ικανοποιητικά και παρόμοια με αυτά που λαμβανόταν με την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών. Οι ανακτήσεις ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα (>80%) για την πλειοψηφία των αναλυτών, ακόμη και στα χαμηλά επίπεδα εμβολιασμού. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ανάκτηση δεν είναι πρώτιστης σπουδαιότητας κριτήριο επικύρωσης αν πληρούνται η γραμμικότητα, η πιστότητα και η ανιχνευσιμότητα (Peters et al. 2007). Τα λαμβανόμενα ποσοστά ανακτήσεων αν και παρουσίαζαν διαφορές μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών ήταν συγκρίσιμα με εκείνα άλλων δημοσιευμένων εργασιών (Mandrioli et al. 2011, Saracino et al. 2010, Titier et al. 2003a, Titier et al. 2003b, Duverneuil et al. 2003, Raggi et al. 2005).

Αξίζει να τονιστεί ότι στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία έχει συμπεριληφθεί και το πλέον σύγχρονο αντικαταθλιπτικό φάρμακο, η αγομελατίνη. Για τη συγκεκριμένη ουσία οι βιβλιογραφικές αναφορές σε μεθόδους προσδιορισμού είναι περιορισμένες (Patil et al. 2012, Wang et al. 2014, Li et al. 2015, Sistik et al. 2016), ενώ η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη εργασία που εξασφαλίζει τον προσδιορισμό της αγομελατίνης σε νεκροτομικό υλικό.

Η προσπάθεια ανάπτυξης και επικύρωσης αναλυτικής μεθοδολογίας LLE-UHPLC-UV/DAD για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων αναλυτών σε ιστό ήπατος, από νεκροτομικό υλικό, ήταν επιτυχής, παρόλα τα υψηλά όρια ανίχνευσης, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων σε αυτόν τον ιστό μπορεί να είναι πολλαπλάσιες των αντίστοιχων θεραπευτικών (Baselt 2014).

Η μέθοδος SPE-UHPLC-UV/DAD που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην παρούσα διατριβή υπερτερεί σε σχέση με τις υπάρχουσες αντίστοιχες μεθόδους σε διάφορα σημεία.

Συγκεκριμένα, εξασφαλίζει τον προσδιορισμό πολλών αναλυτών ταυτοχρόνως, με μεγάλη εκλεκτικότητα, σε αντίθεση με εργασίες που εξετάζουν ένα μόνο φάρμακο και τον κύριο μεταβολίτη του (Sabbioni et al. 2004, Raggi et al. 2005), και επίσης, το χαμηλό κόστος σε σχέση με αναλυτικές μεθοδολογίες προσδιορισμού με τεχνική LC-MS/MS (Ansermot et al. 2013). Επίσης, ικανοποιητικά ήταν τα ποσοστά ανάκτησης και η πιστότητα. Τέλος, η μελέτη σταθερότητας έχει συμπεριληφθεί ως αναλυτικό κριτήριο επικύρωσης σε ελάχιστες προηγούμενες δημοσιεύσεις (Mandrioli et al. 2011, Saracino et al. 2010, Titier et al. 2003a, Titier et al. 2003b, Duverneuil et al. 2003, Raggi et al. 2005).

Η προτεινόμενη μέθοδος SPE-UHPLC-UV/DAD είναι κατάλληλη ώστε να εφαρμοστεί σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας, ενώ συνδυάζει αξιοπιστία και ταχύτητα, προκειμένου να εξυπηρετήσει την άμεση και αξιόπιστη αντιμετώπιση των σχετικών περιστατικών. Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων από κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθούν οι περιορισμοί μίας διάταξης υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (UV/DAD) σε σχέση με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS/MS). Συγκεκριμένα, η τεχνική διαχωρισμού LC-MS/MS χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αξιοπιστία, όπου την καθιστούν σήμερα την πλέον ευαίσθητη και αξιόπιστη τεχνική ταυτοποίησης ξενοβιοτικών ουσιών σε πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα. Τα μειονεκτήματα των ενόργανων διατάξεων LC-MS/MS είναι το υψηλό κόστος αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης, καθώς και η μεγάλου βαθμού εξειδίκευση του επιστημονικού προσωπικού που απαιτείται για τον χειρισμό τέτοιων αναλυτικών διατάξεων.

#### *Εφαρμογή σε κλινικά και νεκροτομικά περιστατικά*

Όπως προαναφέρθηκε, οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες προσδιορισμού των επιλεγμένων αναλυτών εφαρμόστηκαν με επιτυχία για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αντιψυχωσικών φαρμάκων στο πλάσμα ασθενών, όσο και σε αίμα και ούρα από νεκροτομικό υλικό.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των αντιψυχωσικών φαρμάκων στο πλάσμα ασθενών, τα αντίστοιχα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν στο συνεργαζόμενο Εργαστήριο Τοξικολογίας, του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας, Βέλγιο, με υπεύθυνο Καθηγητή τον Δρ. Kristof Maudens, με χρήση τεχνικής LC-MS/MS. Στο ίδιο εργαστήριο έγινε και ο προσδιορισμός των μεταβολιτών των αντιψυχωσικών φαρμάκων.

Για όλα τα εξεταζόμενα αντιψυχωσικά, με εξαίρεση την αμισουλπρίδη, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στο πλάσμα των ασθενών εκτείνονται εκτός των αντίστοιχων θεραπευτικών ορίων (Πίνακας 49). Στα περισσότερα δείγματα η ανίχνευση κάποιου μεταβολίτη συνοδεύεται και με την ανίχνευση του αντίστοιχου μητρικού φαρμάκου. Ο μεταβολίτης της αριπιπραζόλης ανιχνεύθηκε σε δύο παραπάνω δείγματα σε σχέση με τη μητρική ένωση, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην κάθαρση του φαρμάκου μετά από διακοπή της θεραπείας. Επιπλέον, η παλυπεριδόνη ανιχνεύθηκε σε περισσότερα δείγματα από τη ρισπεριδόνη, εύρημα που δικαιολογείται από το γεγονός ότι η παλυπεριδόνη δεν είναι μόνο ο φαρμακολογικά δραστικός μεταβολίτης της ρισπεριδόνης, αλλά χορηγείται και σαν συνταγογραφούμενο φάρμακο σε πολλούς ασθενείς.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέση τιμή των μετρούμενων συγκεντρώσεων αριπιπραζόλης, κουετιαπίνης και ρισπεριδόνης ήταν μικρότερη από τη χαμηλότερη μέση τιμή των αντίστοιχων θεραπευτικών επιπέδων, υποδεικνύοντας έτσι ότι τα μισά τουλάχιστον από τα αναλυόμενα δείγματα παρουσίαζαν συγκεντρώσεις κάτω των θεραπευτικών επιπέδων για τα παραπάνω φάρμακα (Πίνακας 49).

Οι προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών ήταν σε λογική και αναμενόμενη αναλογία σε σχέση με αυτή του μητρικού φαρμάκου. Σε μελέτες παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων ο προσδιορισμός των μεταβολιτών θεωρείται χρήσιμος, καθότι από τις μετρήσεις αυτών μπορούν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με ενδεχόμενες φαρμακοκινητικές ιδιαιτερότητες (Hiemke et al. 2011). Επίσης, συχνά προτείνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενεργού μεταβολίτη καθότι συνεισφέρει στη συνολική φαρμακολογική επίδραση μαζί με το μητρικό φάρμακο, όπως στην περίπτωση της ρισπεριδόνης (Hiemke et al. 2011).

Η μέτρηση των μεταβολιτών άλλων αντιψυχωσικών, όπως της κλοζαπίνης και της αριπιπραζόλης, αποτελεί ένα θέμα συζήτησης και διχογνωμίας για την επιστημονική κοινότητα. Παρόλα αυτά, η ανάλυση των φαρμακολογικά μη δραστικών μεταβολιτών μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον μεταβολισμό του φαρμάκου, καθώς και για τη συμμόρφωσή του ασθενή στην συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή. Ακόμη, ο λόγος της συγκέντρωσης του μεταβολίτη προς τη μητρική ένωση αποτελεί έναν άμεσο τρόπο εκτίμησης του ρυθμού μεταβολισμού του φαρμάκου (Schutze et al. 2016). Γενικά, η απόκλιση του παραπάνω λόγου από το αναμενόμενο εύρος τιμών, μπορεί να είναι ένδειξη για μερική μη συμμόρφωση του ασθενούς στο θεραπευτικό σχήμα, για γενετικές ιδιαιτερότητες ή για διάφορες φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις (Schutze et al. 2016).

Τέλος, η μη συμμόρφωση του ασθενούς με τη συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή υποδεικνύεται σαφώς, από τα αποτελέσματά μας, για τις περιπτώσεις όπου δεν ανιχνεύθηκε το συνταγογραφούμενο φάρμακο ή ανιχνεύθηκε διαφορετικό φάρμακο από το συνταγογραφούμενο.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα δείγματα πλάσματος που αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν από εξωτερικούς ασθενείς κατά την επίσκεψη ρουτίνας στον θεράποντα ιατρό. Για τον λόγο αυτό τα εξαγόμενα αποτελέσματα δεν μπορούν να συγκριθούν ή να συσχετιστούν με προηγούμενες ανάλογες μελέτες οι οποίες πραγματοποιηθήκαν για συγκεκριμένες κατηγορίες ψυχιατρικά ασθενών (Paz et al. 2008, Patteet et al. 2014, Yalcin-Siedentopf et al. 2015).

Η μέτρηση των επιπέδων αντιψυχωσικών στο πλάσμα αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον θεράποντα ιατρό καθότι αναδεικνύει ενδεχομένους περιορισμούς στην προτεινόμενη θεραπεία. Τα αποτελέσματα, μας δείχνουν ότι παρατηρήθηκαν αποκλίσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων των αντιψυχωσικών και των αντίστοιχων θεραπευτικών επιπέδων στο πλάσμα, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες, όπως η πολυφαρμακία, η γενετική ποικιλομορφία, η ηλικία και ο τρόπος ζωής, μεταξύ των οποίων το κάπνισμα ή η κατανάλωση καφεΐνης (Kaufmann et al. 2016). Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν τη σπουδαιότητα της παρακολούθησης των επιπέδων αντιψυχωσικών στο πλάσμα και συμβάλουν στην κατεύθυνση της επιλογής εξατομικευμένης φαρμακολογικής θεραπείας για κάθε ασθενή.

Οι αναλυτικές μεθοδολογίες που βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν εφαρμόστηκαν με επιτυχία κατά την τοξικολογική ανάλυση αίματος και ούρων από νεκροτομικό υλικό περιστατικών που εξετάστηκαν στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι κατά την ιατροδικαστική διερεύνηση του θανάτου άρρενος ενήλικα ηλικίας 52 ετών, τα αποτελέσματα των τοξικολογικών αναλύσεων σε συνδυασμό με τα νεκροτομικά ευρήματα έδειξαν ως αιτία θανάτου τη δηλητηρίαση από τη συνεργιστική δράση πυρεθροειδών παρασιτοκτόνων (deltamethrin και alpha-cypermethrin) με το αντικαταθλιπτικό μιρταζαπίνη, με σκοπό την αυτοκτονία (στο αίμα και στα ούρα ανιχνεύθηκε το αντικαταθλιπτικό μιρταζαπίνη σε συγκέντρωση 12500 και 10700 ng/mL, αντίστοιχα).

Τα σχετικά τοξικολογικά ευρήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη μεταθανάτια τοξικολογία. Μελέτες έχουν δείξει πως η μιρταζαπίνη είναι πιθανόν να υπόκειται σε

μεταθανάτια ανακατανομή. Έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις της μιρταζαπίνης αυξάνονται στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μετά από τη διακομιδή στο νεκροτομείο και κατά την παραμονή σε αυτό μέχρι την εκτέλεση της νεκροψίας-νεκροτομής (Gerostamoulios et al. 2012). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την έκταση της μεταθανάτιας ανακατανομής, και συνεπώς την τοξικολογική ανάλυση σε νεκροτομικό υλικό, είναι η θέση της δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα για τη μιρταζαπίνη, έχει αναφερθεί σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεων της μεταξύ δειγμάτων αίματος που ελήφθησαν από τις καρδιακές κοιλότητες και από τα περιφερικά (μηριαία) αγγεία (Anderson et al. 1999). Από όλα τα παραπάνω διαφαίνεται η σημασία της ακριβής και αξιόπιστης τοξικολογικής ανάλυσης και της δυσκολίας της ορθής ερμηνείας των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων προσδιορισμού διαφόρων φαρμάκων σε νεκροτομικό υλικό, καθώς και η σημασία της ανάπτυξης αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθοδολογιών.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- A. Πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και η επικύρωση αναλυτικών μεθοδολογιών ποσοτικού προσδιορισμού αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε τέσσερα βιολογικά υγρά (πλάσμα, ορός, ούρα, ολικό αίμα) και σε ήπαρ.
- i. Ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας SPE-GC-MS που εξασφαλίζει τον προσδιορισμό εννέα αναλυτών (τα αντιψυχωσικά: αλοπεριδόλη, ολανζαπίνη, κλοζαπίνη, και τα αντικαταθλιπτικά: μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη, βενλαφαξίνη, σιταλοπράμη, σερτραλίνη, κλομιπραμίνη), με μεγάλη εκλεκτικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια, πιστότητα, χαμηλό κόστος και σχετικά ταχεία ανάλυση.
- ii. Ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας SPE(LLE)-UHPLC-UV/DAD που εξασφαλίζει τον προσδιορισμό 19 αναλυτών (τα αντιψυχωσικά: ολανζαπίνη, αμισουλπρίδη, ρισπεριδόνη, παλιπεριδόνη, κλοζαπίνη, κουετιαπίνη και αριπιπραζόλη, τα αντικαταθλιπτικά: μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη, βενλαφαξίνη, σιταλοπράμη, παροξετίνη, ντουλοξετίνη, αγομελατίνη, σερτραλίνη, κλομιπραμίνη και τους μεταβολίτες N-desmethylclozapine, N-desmethylcitalopram, N-desmethylsertraline), με μεγάλη εκλεκτικότητα, ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης, πιστότητα, και χαμηλό κόστος.
- B. Ο προσδιορισμός της αγομελατίνης, του πλέον σύγχρονου αντικαταθλιπτικού φαρμάκου, με την μεθοδολογία SPE-UHPLC-UV/DAD αποτελεί τη μοναδική, προς το παρόν μέθοδο, προσδιορισμού της σε νεκροτομικό υλικό.
- Γ. Οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν με επιτυχία σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, είτε από ασθενείς για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους είτε σε νεκροτομικό υλικό κατά τη διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος.
- Δ. Οι αποκλίσεις των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων των αντιψυχωσικών από τα αντίστοιχα θεραπευτικά επίπεδα, υποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της (συστηματικής ή σποραδικής) παρακολούθησης των επιπέδων αντιψυχωσικών στο πλάσμα των ψυχιατρικά ασθενών, που συμβάλλει στην εξατομικευμένη φαρμακολογική θεραπεία για κάθε ασθενή.
- E. Η εφαρμογή των μεθόδων στην τοξικολογική ανάλυση νεκροτομικού υλικού επιβεβαίωσε την αναγκαιότητα αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού των APs και ADs.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιψυχωσικά και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, της κατάθλιψης και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών. Αποτελούν δύο μεγάλες κατηγορίες ξενοβιοτικών ενώσεων που ο προσδιορισμός τους παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους που εμπíπτουν στο αντικείμενο της Κλινικής Τοξικολογίας, όσο και κατά την τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος, που εμπíπτουν στο αντικείμενο της Δικαστικής Τοξικολογίας. Ο προσδιορισμός αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά που λαμβάνονται από ψυχιατρικά ασθενείς, μπορεί να κριθεί απαραίτητος κατά τη διερεύνηση περιστατικών δηλητηριάσεων, ή/και για τη συστηματική, ή ακόμη και τη σποραδική, παρακολούθηση των επιπέδων τους στο πλάσμα του ασθενούς. Σε κλινικά περιστατικά ο προσδιορισμός των παραπάνω φαρμάκων είναι χρήσιμος όταν υπάρχει υποψία, μερικής ή ολικής, μη συμμόρφωσης του πάσχοντος στη θεραπευτική αγωγή και μη βελτίωση της κλινικής εικόνας. Τα αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες που μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο. Ακόμη, η λήψη τέτοιων φαρμάκων συνδέεται συχνά με αύξηση των αυτοκτονικών τάσεων του ασθενή και με περιστατικά αυτοκτονίας. Επιπλέον, στις περισσότερες χώρες και κυρίως σε αυτές με ανεπτυγμένες οικονομίες και συστήματα υγείας, η δηλητηρίαση από ψυχιατρικά φάρμακα είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο, είτε οφείλεται σε απόπειρες αυτοκτονίας είτε σε ατυχήματα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα APs και ADs να συμπεριλαμβάνονται συνήθως μεταξύ των φαρμάκων που αναζητούνται κατά τη διενέργεια τοξικολογικής ανάλυσης, για να διαπιστωθεί η πιθανή συνεισφορά τους στην αιτία και στον μηχανισμό θανάτου. Για όλους τους παραπάνω λόγους καθίσταται αναγκαία και σημαντική η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των αντιψυχωσικών και των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε κλινικά δείγματα καθώς και σε νεκροτομικό υλικό.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οκτώ αντιψυχωσικά φάρμακα: η αλοπεριδόλη, η ολανζαπίνη, η αμισουλπρίδη, η ρισπεριδόνη, η παλιπεριδόνη, η κλοζαπίνη η κουετιαπίνη, η αριπιπραζόλη και ο μεταβολίτης της κλοζαπίνης, N-desmethylclozapine. Από την κατηγορία των αντικαταθλιπτικών μελετήθηκαν εννέα φάρμακα: η μιρταζαπίνη, η βουπροπιόνη, η βενλαφαξίνη, η σιταλοπράμη, η παροξετίνη, η αγομελατίνη, η σερτραλίνη, η κλομιπραμίνη, η ντουλοξετίνη και οι μεταβολίτες N-desmethylcitalopram και N-desmethylsertraline.



Για τον προσδιορισμό των παραπάνω αναλυτών, αρχικά πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών εκχύλισής τους (LLE, SPE) από βιολογικά υλικά (πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, ούρα και ιστός ήπατος) και χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων με αέρια (GC) και υγρή χρωματογραφία (LC). Για την επαλήθευση της καταλληλότητας και της απόδοσης των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό των αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε επικύρωση αυτών με χαρακτηριστικά ποιότητας την εκλεκτικότητα, την γραμμικότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα, την ανιχνευσιμότητα και την σταθερότητα.

Συγκεκριμένα, έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας SPE-GC-MS που εξασφάλιζε τον προσδιορισμό εννέα αναλυτών (τα αντιψυχωσικά: αλοπεριδόλη, ολανζαπίνη, κλοζαπίνη και τα αντικαταθλιπτικά: μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη, βενλαφαξίνη, σιταλοπράμη, σερτραλίνη, κλομιπραμίνη), με μεγάλη εκλεκτικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια, πιστότητα, χαμηλό κόστος και σχετικά ταχεία ανάλυση. Ακόμη, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μεθοδολογία SPE(LLE)-UHPLC-UV/DAD που εξασφάλιζε τον προσδιορισμό 19 αναλυτών (τα αντιψυχωσικά: ολανζαπίνη, αμισουλπρίδη, ρισπεριδόνη, παλιπεριδόνη, κλοζαπίνη, N-desmethylclozapine, κουετιαπίνη και αριπιπραζόλη, και τα αντικαταθλιπτικά: μιρταζαπίνη, βουπροπιόνη, βενλαφαξίνη, σιταλοπράμη, N-desmethylcitalopram, παροξετίνη, ντουλοξετίνη, αγομελατίνη, σερτραλίνη, N-desmethylsertraline, κλομιπραμίνη), με μεγάλη εκλεκτικότητα, ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης, πιστότητα, και χαμηλό κόστος.

Η μεθοδολογία SPE(LLE)-UHPLC-UV/DAD επιτρέπει τον προσδιορισμό της αγομελατίνης, του πλέον σύγχρονου αντικαταθλιπτικού φαρμάκου, ενώ αποτελεί τη μοναδική προς το παρόν μέθοδο που εξασφαλίζει τον προσδιορισμό της σε νεκροτομικό υλικό.

Οι αναπτυχθείσες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν με επιτυχία σε τοξικολογικές αναλύσεις ρουτίνας για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων είτε από ψυχιατρικούς ασθενείς για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους, είτε σε νεκροτομικό υλικό κατά τη διερεύνηση περιστατικών ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος.

Κατά την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων από ψυχιατρικούς ασθενείς παρατηρήθηκαν σε αρκετές περιπτώσεις, αποκλίσεις των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων των αντιψυχωσικών από τα αντίστοιχα θεραπευτικά επίπεδα. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή των μετρούμενων συγκεντρώσεων αριπιπραζόλης, κουετιαπίνης

και ρισπεριδόνης ήταν μικρότερη από τη χαμηλότερη μέση τιμή των αντίστοιχων θεραπευτικών επίπεδων. Ακόμη, σε μικρό αριθμό δειγμάτων μετρήθηκαν συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις αντίστοιχες θεραπευτικές, κυρίως για την κλοζαπίνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της συστηματικής ή σποραδικής παρακολούθησης των επιπέδων αντιψυχωσικών στο πλάσμα των ψυχιατρικά ασθενών για τη βελτίωση της ψυχοφαρμακευτικής αγωγής από τον θεράποντα ιατρό, πρακτική που συμβάλλει στην κατεύθυνση της εξατομικευμένης φαρμακολογικής θεραπείας για κάθε ασθενή.

Η εφαρμογή των μεθόδων στην τοξικολογική ανάλυση νεκροτομικού υλικού επιβεβαίωσε την αναγκαιότητα αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθοδολογιών προσδιορισμού των APs και ADs, προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή τους στην αιτία και στον μηχανισμό θανάτου.



## SUMMARY

### **“Development and validation of analytical methods for the determination of antipsychotic and antidepressant drugs in postmortem and clinical specimens”**

**Georgios N. Rallis, Chemist M.Sc.**

The antipsychotic and antidepressant drugs are two classes of prescribed medication with central nervous system action. They are prescribed for the treatment of different psychotic disorders, primarily schizophrenia and depression. These classes of xenobiotic compounds are of significant interest in the fields of Clinical and Forensic Toxicology. The determination of APs and ADs in clinical samples from psychiatric patients could contribute to the monitoring of therapeutic drug levels. Uncertain drug adherence, suboptimal tolerability, non-response at therapeutic doses, or pharmacokinetic drug-drug interactions are typical situations revealed during therapeutic drug monitoring. Moreover, antipsychotics and antidepressants can cause severe side effects to the psychiatric patient, even death. Furthermore, they are accused for significant increase in suicidal ideation and subsequent suicidal attempts. In addition, poisonings due to psychiatric drugs can frequently occur worldwide especially in countries with developed economies and health systems. Poisonings could be the result either of suicide attempts or accidental ingestions. Therefore, APs and ADs are included among the drugs routinely screened for during postmortem toxicological analyses. For all the aforementioned reasons, the development of analytical methods for the qualitative and quantitative determination of these drugs in clinical and postmortem specimens is very significant.

In this contribution, eight antipsychotic drugs (olanzapine, haloperidol, amisulpride, risperidone, paliperidone, clozapine-with metabolite N-desmethylclozapine-, quetiapine and aripiprazole), nine antidepressants (mirtazapine, bupropion, venlafaxine, citalopram, (with metabolite N-desmethylcitalopram), paroxetine, duloxetine, agomelatine, sertraline (with metabolite N-desmethylsertraline) and clomipramine were included as target analytes for new method development.

Initially, different extraction procedures (LLE, SPE), for the isolation of analytes from biological samples (plasma, serum, whole blood, urine and liver tissue), were optimized. The extracts were analyzed further either with gas (GC) or with liquid chromatography (LC). The proposed analytical protocols were validated by applying international guidelines. The

validation criteria were the following: selectivity, specificity linearity, accuracy, precision, detectability and stability.

More specifically, a new SPE-GC-MS method was developed for the quantification of nine analytes, (antipsychotics: haloperidol, olanzapine, clozapine and antidepressants: mirtazapine, bupropion, venlafaxine, citalopram, sertraline clomipramine), with high selectivity, accuracy, precision and relative low cost and rapid quantification.

In addition, a new SPE(LLE)-UHPLC-UV/DAD method was developed for the quantification of 19 analytes (antipsychotics: olanzapine, amisulpride, risperidone, paliperidone, clozapine, N-desmethylozapine, quetiapine, aripiprazole and antidepressants: mirtazapine, bupropion, venlafaxine, citalopram, N-desmethylozapine, paroxetine, duloxetine, agomelatine, sertraline, N-desmethylozapine, clomipramine); the LC method was validated with the same analytical criteria as the GC method.

It is worth mentioning, that the SPE(LLE)-UHPLC-UV/DAD method is the only one far which ensures the quantitative determination of agomelatine (one of the most modern antidepressants) in postmortem material, to the best of our knowledge.

The developed analytical methods were successfully applied for the determination of the selected antipsychotics and antidepressants in clinical samples from psychiatric patients, under antipsychotic medication, as well as, in postmortem specimens, sampled during autopsy for routine death investigation processes.

The analysis of clinical samples revealed, that relatively high frequencies of samples had concentrations of antipsychotics lower or higher than respective therapeutic ranges. More specifically, the mean concentrations of aripiprazole, quetiapine and risperidone were lower than the lower values of the respective therapeutic range levels. Furthermore, the concentrations of clozapine in some samples were higher than the higher value of the respective therapeutic window. These findings indicate that the measurement of antipsychotics level can be a useful tool for the optimization of psychopharmacotherapy and a significant contributor to the individualized medicine.

Last but not least, the proposed methodologies were proved suitable for postmortem toxicological investigations and confirmed the importance of accurate and sensitive analytical methods for the determination of APs and ADs in biological specimens, order to contribute the forensic investigation of postmortem cases.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 2002/657/ΕΚ: Απόφαση της Επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
2. Adli M, Baethge C, Heinz A et al., Is dose escalation of antidepressants a rational strategy after a medium-dose treatment has failed?, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005, 55: 387-400.
3. Alves V, Conceição C, Gonçalves J, Teixeira HM, Câmara JS, Improved Analytical Approach Based on QuEChERS/UHPLC-PDA for Quantification of Fluoxetine, Clomipramine and their Active Metabolites in Human Urine Samples, *J Anal Toxicol* 2017, 41: 45-53.
4. Aman MG, Vinks AA, Remmerie B et al., Plasma pharmacokinetic characteristics of risperidone and their relationship to saliva concentrations in children with psychiatric or neurodevelopment disorders, *Clin Therap* 2007, 29: 1476-1486.
5. American Psychiatric Association (APA), [www.psychiatry.org](http://www.psychiatry.org)
6. Amundsen I, Oiestad ÅM, Ekeberg D, Kristoffersen L, Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013, 927: 112-123.
7. Anderson DT, Fritz KL, Muto JJ, Distribution of mirtazapine (Remeron) in thirteen postmortem cases, *J Anal Toxicol* 1999, 23: 544-8.
8. Anderson DT, Fritz KL, Quetiapine (Seroquel) concentrations in seven postmortem cases, *J Anal Toxicol* 2000, 4: 300-304.
9. Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB, Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J Chromatogr A* 2013, 1292: 160-172.
10. Aps JK, Martens LC, Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva, *Forensic Sci Int* 2005, 150: 119-131.
11. Aravagiri M, Marder SR, Yuwiler A et al., Distribution of fluphenazine and its metabolites in brain regions and other tissues of the rat, *Neuropsychopharmacology* 1995, 13: 235-247.

12. Aravagiri M, Teper Y, Marder SR, Pharmacokinetics and tissue distribution of olanzapine in rats, *Biopharm Drug Dispos* 1999, 8: 369-377.
13. Aravagiri M, Yuwiler A, Marder SR, Distribution after repeated oral administration of different dose levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in the brain and other tissues of rat, *Psychopharmacology* 1998, 139: 356-363.
14. Bakken GV, Rudberg I, Christensen H et al., Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B5, *Drug Metab Dispos* 2009, 37: 254-258.
15. Baselt RC, *Disposition of Toxic Drugs and Chemical in Man, Tenth Edition*, 2014, Biomedical Publications, Sea Beach, California.
16. Baumann P, Hiemke C, Ulrich S et al., The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry, *Pharmacopsychiatry* 2004, 37: 243-265.
17. Baumann P, Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors, *Clin Pharmacokinet* 1996, 31: 444-469.
18. Bazhdanzadeh S, Talebpour Z, Adib N, Aboul-Enein HY, A simple and reliable stir bar sorptive extraction-liquid chromatography procedure for the determination of chlorpromazine and trifluoperazine in human serum using experimental design methodology, *J Sep Sci* 2011, 34: 90-97.
19. Benedetti MS, Whomsley R, Poggesi I et al., Drug metabolism and pharmacokinetics, *Drug Metab Rev* 2009, 41: 344-390.
20. Bengtsson F, Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs, TDM "nouveau", *Ther Drug Monit* 2004, 26: 145-151.
21. Bergemann N, Kopitz J, Kress KR et al., Plasma amisulpride levels in schizophrenia or schizoaffective disorder, *Eur Neuropsychopharmacology* 2004, 14: 245-250.
22. Bertelsen KM, Venkatakrishnan K, von Moltke LL et al., Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 in vitro by paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine, *Drug Metab Dispos* 2003, 31: 289-293.
23. Bhatt J, Jangid A, Venkatesh G, Subbaiah G, Singh S, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethyl venlafaxine in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, 829: 75-81.
24. Blau K, King G, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 1979, Heyden & Sons Ltd, London.

25. Bogaards JJ, Hissink EM, Briggs M et al., Prediction of interindividual variation in drug plasma levels in vivo from individual enzyme kinetic data and physiologically based pharmacokinetic modeling, *Eur J Pharm Sci* 2000, 12: 117-124.
26. Bosse GM, Spiller HA, Collins AM, A fatal case of venlafaxine overdose, *J Med Toxicol* 2008, 4: 18-20.
27. Brockmöller J, Kirchheiner J, Schmider J et al., The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment, *Clin Pharmacol Ther* 2002, 72: 438-452.
28. Brøsen K, Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry, *Ther Drug Monit* 1996, 18: 393-396.
29. Brøsen K, Naranjo CA, Review of pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction studies with citalopram, *Eur Neuropsychopharmacol* 2001, 11: 275-283.
30. Burke MJ, Preskorn SH, Therapeutic drug monitoring of antidepressants – cost implications and relevance to clinical practice, *Clin Pharmacokinet* 1999, 37: 147-165.
31. Caccia S, Garattini S, Pharmacokinetic and pharmacodynamic significance of antidepressant drug metabolites, *Pharmacol Res* 1992, 26: 317-329.
32. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR et al., Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, *Clin Pharmacokinet* 1999, 37: 177-193.
33. Canal-Raffin M, Déridet E, Titier K et al., Simplified ultraviolet liquid chromatographic method for determination of sertindole, dehydrosertindone and norsertindole, in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, 814: 61-67.
34. Carlsson B, Olsson G, Reis M et al., Enantioselective analysis of citalopram and metabolites in adolescents, *Ther Drug Monit* 2001, 23: 658-664.
35. Cartiser N, Bévalot F, Le Meur C, Gaillard Y, Malicier D, Hubert N, Guitton J, Gas chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011, 879: 2909-2918.
36. Casey D, Motor and mental aspects of extrapyramidal syndromes, *Int Clin Psychopharmacol* 1995, 10: 105-114.
37. Castaing N et al., Postmortem redistribution of two antipsychotic drugs, haloperidol and thioridazine, in the rat, *J Anal Toxicol* 2006, 7: 419-425.



38. Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M, LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices, *J Pharm Biomed Anal* 2008, 48: 183-193.
39. Chaves AR, Silva SM, Queiroz RH, Lanças FM, Queiroz ME, Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 850: 295-302.
40. Chaves AR, Chiericato Júnior G, Queiroz ME, Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009, 877: 587-593.
41. Chaves AR, Leandro FZ, Carris JA, Queiroz ME, Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010, 878: 2123-2129.
42. Chen BG, Wang SM, Liu RH, GC-MS analysis of multiply derivatized opioids in urine, *J Mass Spectrom* 2007, 42: 1012-1023.
43. Chesnut SM, Salisbury JJ, The role of UHPLC in pharmaceutical development, *J Sep Sci* 2007, 30: 1183-1190.
44. Choong E, Rudaz S, Kottelat A, Guillarme D, Veuthey JL, Eap CB, Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS, *J Pharm Biomed Anal* 2009, 50: 1000-1008.
45. Cooper TB, Bost R, Sunshine I, Postmortem blood and tissue levels of loxapine and its metabolites, *J Anal Toxicol* 1981, 2: 99-100.
46. Cooper TB, Plasma level monitoring of antipsychotic drugs, *Clin Pharmacokinet* 1978, 3: 14-38.
47. Courvoisier S, Pharmacodynamic basis for the use of chlorpromazine in psychiatry, *J Clin Exp Psychopathol* 1956, 17: 25-37.
48. Cunningham OD, Advances in psychopharmacology-Schizophrenia, *Br Med Bull* 1996, 52: 556-574.
49. Danielson ND, Gallagher PA, Bao JJ, *Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2000, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

50. Degner D, Grohmann R, Kropp S et al., Severe adverse drug reactions of antidepressants: results of the German multicenter drug surveillance program AMSP, *Pharmacopsychiatry* 2004, 37(Suppl 1): 39-45.
51. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR, 4<sup>th</sup> Edition, Text Revision, 2000, American Psychiatric Association, Washington DC.
52. Domino E, History of modern psychopharmacology: A personal view with an emphasis on antidepressants, *Psychosom Med* 1999, 61: 591-598.
53. Dong MW, Zhang K, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends Analyt Chem* 2014, 63: 21-30.
54. Drummer OH, Gerostamoulos J, Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects, *The Drug Monit* 2002, 24: 199-209.
55. Drummer OH, Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology, *Anal Bioanal Chem* 2007, 388: 1495-1503.
56. Duverneuil C, de la Grandmaison GL, de Mazancourt P, Alvarez JC, A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs, *The Drug Monit* 2003, 25: 565-573.
57. Eibak LE a, Parmer MP, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A. Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate, *Anal Bioanal Chem* 2014, 406: 431-440.
58. Eibak LE b, Rasmussen KE, Oiestad EL, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A, Parallel electromembrane extraction in the 96-well format, *Anal Chim Acta* 2014, 828: 46-52.
59. Fallas MM, Hadley MR, McCalley DV, Practical assessment of frictional heating effects and thermostat design on the performance of conventional (3  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ ) columns in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 2009, 1216: 3961-3969.
60. Fekete S, Schappler J, Veuthey JL, Guillarme D, Current and future trends in UHPLC, *Trends Analyt Chem* 2014, 63: 2-13.
61. Fernandes C, Van Hoeck E, Sandra P, Lanças FM, Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir barsorptive extraction, *Anal Chim Acta* 2008, 614: 201-207.
62. Fisher M, 2013, The Washington Post

63. Flanagan RJ, Amin A, Seinen W, Effect of post-mortem changes on peripheral and central whole blood and tissue clozapine and norclozapine concentrations in the domestic pig (*Susscrofa*), *Forensic Sci Int* 2003, 1: 9-17.
64. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton R, *Fundamentals of Analytical Toxicology*, 2007, John Wiley & Sons, West Sussex.
65. Fonseca BM, Moreno IE, Barroso M, Costa S, Queiroz JA, Gallardo E, Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 2013, 12: 3953-3963.
66. Frahnert C, Rao ML, Grasmäder K, Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 794: 35-47.
67. Francis O, *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis*, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd (Ed.), ISBN: 978-953-51-0298-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/advanced-gaschromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-andreagents-for-gas-chromatography-analysis>, 2012.
68. Gerace E, Salomone A, Pellegrino S, Vincenti M, Evidence of Haldol (haloperidol) long-term intoxication, *Forensic Sci Int* 2012, 215: 121-123.
69. Gerostamoulos D, Beyer J, Staikos V, Tayler P, Woodford N, Drummer OH, The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens, *Forensic Sci Med Pathol* 2012, 8: 373-379.
70. Gervasini G, Carrillo JA, Benitez J, Potential role of cerebral cytochrome P450 in clinical pharmacokinetics: modulation by endogenous compounds, *Clin Pharmacokinet* 2004, 43: 693-706.
71. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP, Clomipramine concentration as a predictor of delayed response: a naturalistic study, *Eur J Clin Pharmacol* 1999, 54: 895-902.
72. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP, Therapeutic drug monitoring of olanzapine: the combined effect of age, gender, smoking, and comedication, *Ther Drug Monit* 2003, 25: 46-53.

73. Gillman PK, Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated, *Br J Pharmacol* 2007, 151: 737-748.
74. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2013.
75. Guillarme D, Dong MW, Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review, *Am Pharm Rev* 2013, 16: 38-43.
76. Guillarme D, Nguyen DT, Rudaz S, Veuthey JL, Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments, *Eu J Pharm Biopharm* 2008, 68: 430-440.
77. Han E, Kim E, Hong H, Jeong S, Kim J, In S, Chung H, Lee S, Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs, *Forensic Sci Int* 2012, 219: 265-271.
78. Harris DC, *Quantitative Chemical Analysis*, Eighth Edition, 2010, W. H. Freeman and Company, New York.
79. Hartling L, Abou-Setta AM, Dursun S, Mousavi SS, Pasichnyk D, Newton AS, Antipsychotics in adults with schizophrenia: comparative effectiveness of first-generation versus second-generation medications: a systematic review and meta-analysis, *Ann Intern Med* 2012, 157: 498-511.
80. Harvey D, *Loop Injector for HPLC*, 2013.
81. Heller S, Hiemke C, Stroba G et al., Assessment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a nationwide TDM service, *The Drug Monit* 2004, 26: 459-461.
82. Hendset M, Hermann M, Lunde H et al., Impact of the CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole, *Eur J Clin Pharmacol* 2007, 63: 1147-1151.
83. Hesse LM, He P, Krishnaswamy S et al., Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes, *Pharmacogenetics* 2004, 14: 225-238.
84. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgler R, Zernig G, AGNP

- Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011, *Pharmacopsychiatry* 2011, 44: 195-235.
85. Hiemke C, Clinical utility of drug measurement and pharmacokinetics – therapeutic drug monitoring in psychiatry, *Eur J Clin Pharmacol* 2008, 64: 159-166.
  86. Hiemke C, Härtter S, Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Pharmacol Ther* 2000, 85: 11-28.
  87. Hilberg T et al., The extent of postmortem drug redistribution in a rat model, *J Forensic Sci* 1999 5: 956-962.
  88. Hopenwasser J et al., Postmortem distribution of the novel antipsychotic drug quetiapine, *J Anal Toxicol* 2004, 4: 264-267.
  89. Horak EL, Jenkins AJ, Postmortem tissue distribution of olanzapine and citalopram in a drug intoxication, *J Forensic Sci* 2005, 3: 679-681.
  90. Huang HC, Liu CH, Lan TH, Hub TM, Chiu HJ, Wu YC, Tseng YL, Detection and quantification of aripiprazole and its metabolite, dehydroaripiprazole, by gas chromatography–mass spectrometry in blood samples of psychiatric patients, *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 856: 57-61.
  91. Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP et al., ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine, *J Clin Psychopharmacol* 2009, 29: 319-326.
  92. Jaquenoud Sirot E, van der Velden JW, Rentsch K et al., Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic tests as tools in pharmacovigilance, *Drug Safety* 2006, 29: 735-768.
  93. Jefferson JW, Pradko JF, Muir KT, Bupropion for major depressive disorder: pharmacokinetic and formulation considerations, *Clin Therap* 2005, 27: 1685-1695.
  94. Jenkins AJ, Sarconi KM, Raaf HN, Determination of olanzapine in a postmortem case, *J Anal Toxicol* 1998, 7: 605-609.
  95. Jerkovich AD, Mellors JS, Jorgenson JW, The use of micron-sized particles in ultrahigh-pressure liquid chromatography, *LC GC Eur* 2003, 16: 20-23.
  96. Josefsson M, Roman M, Skogh E, Dahl ML, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid, *J Pharm Biomed Anal* 2010, 53: 576-582.
  97. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G, *Mass Spectrometry*, Chapter 9, Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications 2012, 249-283.

98. Kataoka H, Gas chromatography of amines as various derivatives. Quantitation of amino acids and amines by chromatography - methods and protocols, *Journal of Chromatography Library* 2005, 70: 364-404.
99. Kaufman E, Lamster IB, The diagnostic applications of saliva – a review, *Crit Rev Oral Biol Med* 2002, 13: 197-212.
100. Kaufmann A, Wartelsteiner F, Yalcin-Siedentopf N, Baumgartner S, Biedermann F, Edlinger et al., Changes in psychopathology in schizophrenia patients starting treatment with new-generation antipsychotics: therapeutic drug monitoring in a naturalistic treatment setting, *Eur Neuropsychopharmacol* 2016, 26: 717-728.
101. Khraiwesh A, Papoutsis I, Nikolaou P, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of sertraline and its major metabolite desmethyl sertraline in blood, *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011, 879: 2576-2582.
102. Kirchherr H, Kühn-Velten WN, Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006, 843: 100-113.
103. Klotz U, Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly, *Drug Metab Rev* 2009, 41: 67-76.
104. Knapp DR, *Handbook of Analytical Derivatization Reaction*, 1979, Wiley & Sons, New York.
105. Kousoulos C, Dotsikas Y, Loukas YL, Turbulent flow and ternary column-switching on-line clean-up system for high-throughput quantification of risperidone and its main metabolite in plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study, *Talanta* 2007, 72 : 360-367.
106. Krska J, Corner DA, Serum drug level monitoring in affective disorders, *J Clin Pharm Ther* 1992, 17: 357-363.
107. Kumazawa T, Hasegawa C, Uchigasaki S, Lee XP, Suzuki O, Sato K, Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* 2011, 1218: 2521-2527.
108. Kóhnel E, Laffan DDP, Lloyd-Jones GC, Martvnez del Campo T, Shepperson IR Slaughter JL, Mechanism of Methyl Esterification of Carboxylic Acids by

- Trimethylsilyldiazomethane, *Angewandte Chemie International Edition* 2007, 46: 7075-7078.
109. Laborit H, Hugueuard P, Alluaume R, Un nouveau stabilisateur vegetatif (le 4560 RP), *Press Med* 1952, 60: 206-208.
  110. Lange EC, Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier, *Adv Drug Deliv Rev* 2004, 56: 1793-1809.
  111. LCGC Editors, *The LCGC Blog: So Just How Well Set-Up is Your UV Detector?*, 2014.
  112. Lehmann H, Ban T, The history of the psychopharmacology of schizophrenia, *Can J Psychiatry* 1997, 42: 152-162.
  113. Leikin JB, Watson WA, Post-mortem toxicology: what the dead can and cannot tell us, *J Toxicol Clin Toxicol* 2003, 1: 47-56.
  114. Leon J, Wynn G, Sandson NB, The pharmacokinetics of paliperidone versus risperidone, *Psychosomatics* 2010, 51: 80-88.
  115. Li M, Bao Z, Su B, Xing H, Yang Y, Ren Q, Enantiomeric separation of citalopram base by supercritical fluid chromatography, *J Sep Sci* 2013, 36: 3093-3100.
  116. Li M, Sun Q, Li Y, Lv M, Lin L, Wu Y, Ashfaq M, Yu CP, Simultaneous analysis of 45 pharmaceuticals and personal care products in sludge by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 2016, 408: 4953-4964.
  117. Li M, Tang F, Xie F, Lv Y, Yu P, Liu Z, Cheng Z, Development and validation a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of agomelatine and its metabolites, 7-desmethyl-agomelatine and 3-hydroxy-agomelatine in human plasma: Application to a bioequivalence study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015, 1003: 60-66.
  118. Liang F, Terry AV, Bartlett MG, Determination of aripiprazole in rat plasma and brain using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr* 2012, 26: 1325-1332.
  119. Licata M, Rustichelli C, Palazzoli F, Ferrari A, Baraldi C, Vandelli D, Verri P, Marchesi F, Silingardi E, Hair testing in clinical setting: Simultaneous determination of 50 psychoactive drugs and metabolites in headache patients by LC tandem MS, *J Pharm Biomed Anal* 2016, 126: 14-25.
  120. Lin DL, Wang SM, Wu CH, Chen BG, Liu RH, Chemical Derivatization for the Analysis of Drugs by GC-MS — A Conceptual Review, *J Food Drug Anal* 2008, 16: 1-1.

121. Lind AB, Reis M, Bengtsson F et al., Steady-state concentrations of mirtazapine, N-desmethylmirtazapine, 8-hydroxymirtazapine and their enantiomers in relation to cytochrome P450 2D6 genotype, age and smoking behavior, *Clin Pharmacokinet* 2009, 48: 63-70.
122. Lindenmayer J, Long-acting injectable antipsychotics: focus on Olanzapine pamoate, *Neuropsychiatr Dis Treat* 2010, 6: 261-267.
123. Lippert JA, Xin B, Wu N, Lee ML, Fast ultrahigh-pressure liquid chromatography: on-column UV and time-of-flight mass spectrometric detection, *J Microcolumn Sep* 1999, 11: 631-643.
124. Llerena A, Berecz R, Norberto MJ, de la Rubia A, Determination of clozapine and its N-desmethyl metabolite by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, 755: 349-354.
125. Lobo ED, Bergstrom RF, Reddy S et al., In vitro and in vivo evaluations of cytochrome P450 1A2 interactions with duloxetine, *Clin Pharmacokinet* 2008, 47: 191-202.
126. MacNair JE, Lewis KC, Jorgenson JW, Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns, *Anal Chem* 1997, 69: 983-989.
127. Majors RE, Fast and ultrafast HPLC on sub-2- $\mu$ m porous particles — where do we go from here?, *LC GC N Am* 2005, 23: 1248-1255.
128. Malfará WR, Bertucci C, Costa Queiroz ME, Dreossi Carvalho SA, Pires Bianchi Mde L, Cesarino EJ, Crippa JA, Costa Queiroz RH, Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants, *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44: 955-962.
129. Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D, Boncompagni G, Raggi MA, Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011, 879: 167-173.
130. Mazzeo JR, Neue UD, Kele M, Plumb RS, Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure, *Anal Chem* 2005, 77: 460A-467A.
131. McAlpine DE, Biernacka JM, Mrazek DA et al., Effect of cytochrome P450 enzyme polymorphisms on pharmacokinetics of venlafaxine, *Ther Drug Monit* 2011, 33: 14-20.
132. McIntyre IM, Mallett P, Sertraline concentrations and postmortem redistribution, *Forensic Sci Int* 2012, 223: 349-352.



133. Meeker JE et al., Clozapine tissue concentrations following an apparent suicidal overdose of Clozaril, *J Anal Toxicol* 1992, 1: 54-56.
134. Melo LP, Nogueira AM, Lanças FM, Queiroz ME, Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples, *Anal Chim Acta* 2009, 3: 57-64.
135. Meltzer HY, Fatemi SH, *Treatment of schizophrenia*, The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology, 1998 American Psychiatric Press Washington DC.
136. Merrick TC, Felo JA, Jenkins AJ, Tissue distribution of olanzapine in a postmortem case, *Am J Forensic Med Pathol* 2001, 3: 270-274.
137. Meulder M, Remmerie BM, de Vries R, Sips LL, Boom S, Hooijschuur EW, van de Merbel NC, Timmerman PM, Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008, 870: 8-16.
138. Meyer GMJ, Weber AA, HH Maurer, Development and validation of a fast and simple multi-analyte procedure for quantification of 40 drugs relevant to emergency toxicology using GC-MS and one-point calibration, *Drug Test Anal* 2014, 6: 472-481.
139. Meyer JH, Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment, *J Psychiatry Neurosci* 2007, 32: 86-102.
140. Meyer JH, Wilson AA, Sagrati S et al., Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: an [<sup>11</sup>C]DASB positron emission tomography study, *Am J Psychiatry* 2004, 161: 826-835.
141. Meyer RP, Gehlhaus M, Knoth R et al., Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism, *Curr Drug Metab* 2007, 8: 297-306.
142. Molden E, Lunde H, Lunder N et al., Pharmacokinetic variability of aripiprazole and the active metabolite dehydroaripiprazole in psychiatric patients, *Ther Drug Monit* 2006, 28: 744-749.
143. Mora G, *History of Psychiatry*, in *Comprehensive Textbook of Psychiatry/IV*, Edited by Kaplan.
144. Moreno AM, Navas MJ, Asuero AG, HPLC-DAD determination of CNS-acting drugs in human blood, plasma, and serum, *Crit Rev Anal Chem* 2014, 2014 44: 68-106.

145. Müller MJ, Dragicevic A, Fric M et al., Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants: how does it work under clinical conditions? *Pharmacopsychiatry* 2003, 36: 98-104.
146. Müller MJ, Dragicevic A, Fric M et al., Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants: how does it work under clinical conditions?, *Pharmacopsychiatry* 2003, 36: 98-104.
147. National Institute of Mental Health (NIMH) <https://www.nimh.nih.gov/index.shtml>
148. Nazirizadeh Y, Vogel F, Bader W et al., Serum concentrations of paliperidone versus risperidone and clinical effects, *Eur J Clin Pharmacol* 2010, 66: 797-803.
149. Nedahl M, Johansen SS, Linnet K, Reference Brain/Blood Concentrations of Citalopram, Duloxetine, Mirtazapine and Sertraline, *J Anal Toxicol* 2018, 42: 149-156.
150. Negrusz A, Cooper G, *Clarkes's Forensic Toxicology, Second Edition*, 2013, Pharmaceutical Press, London.
151. Nemeroff CB, *Psychopharmacology of affective disorders in the 21st century*, *Biol Psychiatry* 1998, 44: 517-525.
152. Nevado JB, Lierena MJV, Cabanillas GG, Robledo VR, Buitrago S, Sensitive capillary GC-MS-SIM determination of selective serotonin reuptake inhibitors: reliability evaluation by validation and robustness study, *J Sep Sci* 2006, 29: 103-113.
153. Ohman D, Carlsson B, Norlander B, On-line extraction using an alkyl-diol silica precolumn for racemic citalopram and its metabolites in plasma. Results compared with solid-phase extraction methodology, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, 753: 365-373.
154. Olesen OV, Linnet K, Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations, *J Clin Pharmacol* 2001, 41: 823-832.
155. Ostad Haji E, Tadić A, Wagner S et al., Association between citalopram serum levels and clinical improvement of patients with major depression, *J Clin Psychopharmacol* 2011, 31: 281-286.
156. Papoutsis I, Rizopoulou A, Nikolaou P, Pistos C, Spiliopoulou C Athanaselis S, A validated GC/MS method for the determination of amisulpride in whole blood, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014, 947-948: 111-116.
157. Papoutsis I, Khraiweh A, Nikolaou P, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs

- in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 2012, 70: 557-562.
158. Parker DR, McIntyre IM, Case studies of postmortem quetiapine: therapeutic or toxic concentrations?, *J Anal Toxicol* 2005, 5: 407-412.
159. Paterson S, Cordero R, Burlinson S, Screening and semi-quantitative analysis of post mortem blood for basic drugs using gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *J Chromatogr B* 2004, 813: 323-330.
160. Patil SR, Nerurkar KK, Kalamkar AM, Pukale V, Mangaonkar KV, Pingale SG, Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *J Mass Spectrom* 2012, 47: 23-28.
161. Patteet L, Maudens KE, Vermeulen Z, Dockx G, De Doncker M, Morrens M, Sabbe B, Neels H, Retrospective evaluation of therapeutic drug monitoring of clozapine and norclozapine in Belgium using a multidrug UHPLC-MS/MS method, *Clin Biochem* 2014, 47: 336-339.
162. Patteet L, Cappelle D, Maudens KE, Crunelle CL, Sabbe B, Neels H, Advances in detection of antipsychotics in biological matrices, *Clin Chim Acta* 2015, 441: 11-22.
163. Paz E, Bouzas L, Hermida J et al., Evaluation of three dosing models for the prediction of steady-state trough clozapine concentrations, *Clin Biochem* 2008, 41: 603-606.
164. Pélissier-Alicot AL, Gaulier JM, Champsaur P, Marquet P, Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review, *J Anal Toxicol* 2003, 27: 533-544.
165. Perry PJ, Miller DD, Arndt SV et al., Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients, *Am J Psychiatry* 1991, 148: 231-235.
166. Perry PJ, Miller DD, Arndt SV et al., Haloperidol dosing requirements: the contribution of smoking and nonlinear pharmacokinetics, *J Clin Psychopharmacol* 1993, 13: 46-51.
167. Perry PJ, Therapeutic drug monitoring of antipsychotics, *Psychopharmacol Bull* 2001, 35: 19-29.
168. Perry PJ, Zeilmann C, Arndt S, Tricyclic antidepressant concentrations in plasma: an estimate of their sensitivity and specificity as a predictor of response, *J Clin Psychopharmacol* 1994, 14: 230-240.
169. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F, Validation of new methods, *Forensic Sci Int* 2007, 165: 216-224.

170. Pierce AE, *Silylation of Organic Compounds*, 1968 Pierce Chemical Company.
171. Pounder DJ, Jones GR, Post-mortem drug redistribution – a toxicological nightmare, *ForensicSci Int* 1990, 3: 253-263.
172. Pounder DJ, The nightmare of postmortem drug changes, *Leg Med* 1993, 163-191.
173. Preskorn SH, Burke MJ, Fast GA, Therapeutic drug monitoring: Principles and practice, *Ther Drug Monit* 1993, 16: 611-641.
174. Preskorn SH, Fast GA, Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety, and cost effectiveness, *J Clin Psychiat* 1991, 52(Suppl): 23-33.
175. Preskorn SH, Practical application of therapeutic drug monitoring: a tale of two patients, *J Psychiatr Pract* 2008, 14: 301-306.
176. Preskorn SH, Tricyclic antidepressant plasma level monitoring: an improvement over the dose-response approach, *J Clin Psychiatry* 1986, 47: 24-30.
177. Proença P, Franco JM, Mustra C, Monteiro C, Costa J, Corte-Real F, Vieira DN, UPLC-MS/MS determination in blood of a mixed-drug fatal intoxication: a case report, *Forensic Sci Int* 2013, 227: 85-89.
178. Prouty RW, Anderson WH, The forensic science implications of site and temporal influences on postmortem blood-drug concentrations, *J Forensic Sci* 1990, 2: 243-270.
179. PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
180. Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, de la Torre R, A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44: 594-601.
181. Raggi MA, Bugamelli F, Sabbioni C, Saracino MA, Petio C, HPLC-DAD determination of plasma levels of the antipsychotic risperidone and its main metabolite for toxicological purposes, *J Sep Sci* 2005, 28: 245-250.
182. Rasmussen BB, Brøsen K, Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors?, *Ther Drug Monit* 2000, 22: 143-154.
183. Reis M, Aamo T, Spigset O et al., Serum concentrations of antidepressant drugs in a naturalistic setting: compilation based on a large therapeutic drug monitoring database, *Ther Drug Monit* 2009, 31: 42-56.
184. Reis M, Åberg-Wistedt A, Ågren H et al., Compliance with SSRI medication during 6 months of treatment for major depression: an evaluation by determination of repeated serum drug concentrations, *J Affect Disorders* 2004, 82: 443-446.

185. Reis M, Lundmark J, Bengtsson F, Therapeutic drug monitoring of racemic citalopram: a 5-year experience in Sweden, 1992–1997, *Ther Drug Monit* 2003, 25: 183-191.
186. Riedel M, Schwarz MJ, Strassnig M et al., Risperidone plasma levels, clinical response and side-effects, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005, 255: 261-268.
187. Rodda KE, Drummer OH, The redistribution of selected psychiatric drugs in post-mortem cases, *Forensic Sci Int* 2006, 2-3: 235-239.
188. Rosenzweig P, Canal M, Patat A et al., A review of the pharmacokinetics, tolerability and pharmacodynamics of amisulpride in healthy volunteers, *Hum Psychopharmacol* 2002, 17: 1-13.
189. Rummel-Kluge C, Komossa K, Schwarz S, Hunger H, Schmid F, Kissling W, Davis JM, Leucht S, Second-generation antipsychotic drugs and extrapyramidal side effects: a systematic review and meta-analysis of head-to-head comparisons, *Schizophr Bull* 2012, 38: 167-177.
190. Saar E et al., Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC–MS/MS, *J Mass Spectrom* 2010, 8: 915-925.
191. Saar E, Beyer J, Gerostamoulos D, Drummer OH, The time-dependant post-mortem redistribution of antipsychotic drugs, *Forensic Sci Int* 2012, 222: 223-227.
192. Sabbioni C, Bugamelli F, Varani G, Mercolini L, Musenga A, Saracino MA, Fanali S, Raggi MA, A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients, *J Pharm Biomed Anal* 2004, 36: 351-356.
193. Sadock BJ, Sadock VA, *Εγχειρίδιο Κλινικής Ψυχιατρικής*, 2007, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.
194. Samanidou V, Kovatsi L, Fragou D, Rentifis K, Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology, *Bioanalysis* 2011, 3: 2019-2046.
195. Sampedro MC, Unceta N, Gómez-Caballero A, Callado LF, Morentin B, Goicolea MA, Meana JJ, Barrio RJ, Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to postmortem diagnostics of forensic interest, *Forensic Sci Int* 2012, 219:172-178.
196. Sánchez de la Torre C, Martínez MA, Almarza E, Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with

- nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures, *Forensic Sci Int* 2005, 155: 193-204.
197. Saracino MA, Marcheselli C, Somaini L, Gerra G, De Stefano F, Pieri MC, Raggi MA, Simultaneous determination of disulfiram and bupropion in human plasma of alcohol and nicotine abusers, *Anal Bioanal Chem* 2010, 398: 2155-2161.
198. Sasaki C, Shinozuka T, Murakami C, Irie W, Maeda K, Watanabe T, Nakamaru N, Furukawa M, Nakamura S, Kurihara K, Simultaneous determination of 5 psychotropic drugs of various types in an autopsy case of acute multiple drug poisoning, *Forensic Sci Int* 2013, 227: 90-94.
199. Schutze G, Schwarz MJ, Therapeutic drug monitoring for individualized risk reduction in psychopharmacotherapy, *Trends Analyt Chem* 2016, 84: 14-22.
200. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, 2013
201. Scott RPW, *Gas chromatography*, 2003, book 2 Chrom-Ed Book Series. <http://www.library4science.com/eula.html>. 2.
202. Second-Generation Antipsychotic Drugs and Extrapyramidal Side Effects: A Systematic Review and Meta-analysis of Head-to-Head Comparisons, *Schizophr Bull* 2012, 38: 167-177.
203. Shams M, Hiemke C, Härtter S, Therapeutic drug monitoring of antidepressant mirtazapine and its N-demethylated metabolite in human serum, *Ther Drug Monit* 2004, 26: 78-84.
204. Shams ME, Arneith B, Hiemke C et al., CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine, *J Clin Pharm Ther* 2006, 31: 493-502.
205. Silva BJ, Lanças FM, Queiroz ME, In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008, 862: 181-188.
206. Sistik P, Urinovska R, Brozmanova H, Kacirova I, Silhan P, Lemr K, Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication, *Biomed Chromatogr* 2016, 30: 217-224.
207. Siva N, Tackling the booming trade in counterfeit drugs, *Lancet* 2010, 376: 1725-1726.

208. Skogh E, Reis M, Dahl ML et al., Therapeutic drug monitoring data on olanzapine and its N-demethyl metabolite in the naturalistic clinical setting, *Ther Drug Monit* 2002, 24: 518-526.
209. Skopp G, Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Sci Int* 2004, 142: 75-100.
210. Smith ML, Vorce SP, Holler JM, Shimomura E, Magluilo J, Jacobs AJ, Huestis MA, Modern Instrumental Methods in Forensic Toxicology, *J Anal Toxicol* 2007, 31: 237-253.
211. Sobolevsky TG, Alexander IR, Miller B, Oriedo V, Chernetsova ES, Revelsky IA, Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids, *J Sep Sci* 2003, 26: 1474-1478.
212. Stevens HM, The Stability of Some Drugs and Poisons in Putrefying Human Liver Tissues, *J Forensic Sci Soc* 1984, 24: 577-589
213. Störmer E, von Moltke LL, Shader RI et al., Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6, and 3A4, *Drug Metab Dispos* 2000, 28: 1168-1175.
214. Sweet RA, Pollock BG, Kirshner M et al., Pharmacokinetics of single and multiple-dose bupropion in elderly patients with depression, *J Clin Pharmacol* 1995, 35: 876-884.
215. Takano A, Suzuki K, Kosaka J et al., A dose-finding study of duloxetine based on serotonin transporter occupancy, *Psychopharmacology* 2006, 185: 395-399.
216. Tasker TCG, Kaye CM, Zussman BD et al., Paroxetine plasma levels: lack of correlation with efficacy or adverse events, *Acta Psychiatr Scand* 1989, 80: 152-155.
217. Taylor D, Antidepressant drugs and cardiovascular pathology: a clinical overview of effectiveness and safety, *Acta Psychiatr Scand* 2008, 118: 434-442.
218. Tenth Revision of the International Classification of Diseases (ICD-10), 1987, World Health Organization, Geneva.
219. The Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/>
220. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances, 2004, The International Association of Forensic Toxicologists.
221. Titier K (a), Bouchet S, Péhourcq F, Moore N, Molimard M, High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify

- and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 788: 179-185.
222. Titier K (b), Castaing N, Scotto-Gomez E, Pehourcq F, Moore N, Molimard M, High-performance liquid chromatographic method with diode array detection for identification and quantification of the eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose, *Ther Drug Monit* 2003, 25: 581-587.
223. Touw DJ, Neef C, Thomson AH et al., Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: a systematic review, *Ther Drug Monit* 2005, 27: 10-17.
224. Turner T, Chlorpromazine: unlocking psychosis, *BMJ* 2007, 337: S7.
225. Ulrich S, Sandmann U, Genz A, Serum concentrations of haloperidol pyridinium metabolites and the relationship with tardive dyskinesia and parkinsonism: a cross-section study in psychiatric patients, *Pharmacopsychiatry* 2005, 38: 171-177.
226. Unceta N, Ugarte A, Sánchez A, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ, Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples, *J Pharm Biomed Anal* 2010, 51: 178-185.
227. Uřinová R, Brozmannová H, Siřtík P, Silhán P, Kacířová I, Lemr K, Grundmann M, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012, 907: 101-107.
228. Van der Weide J, van Baalen-Benedek EH, Kootstra-Ros JE, Metabolic ratios of psychotropics as indication of cytochrome P450 2D6/2C19 genotype, *Ther Drug Monit* 2005, 27: 478-483.
229. Vardakou I, Dona A, Pistos C, Alevisopoulos G, Athanaselis S, Maravelias C, Spiliopoulou C, Validated GC/MS method for the simultaneous determination of clozapine and norclozapine in human plasma. Application in psychiatric patients under clozapine treatment, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010, 878: 2327-2332.
230. Vasiliadis P, Blood components Chemical composition EL.PNG.
231. Vernaleken I, Janouschek H, Raptis M et al., Dopamine D2/3 receptor occupancy by quetiapine in striatal and extrastriatal areas, *Int J Neuropsychopharmacol* 2010, 13: 951-960.



232. Ververs FF, Voorbij HA, Zwarts P et al., Effect of cytochrome P450 2D6 genotype on maternal paroxetine plasma concentrations during pregnancy, *Clin Pharmacokinet* 2009, 48: 677-683.
233. Voineskos AN, Wilson AA, Boovariwala A et al., Serotonin transporter occupancy of high-dose selective serotonin reuptake inhibitors during major depressive disorder measured with [<sup>11</sup>C]DASB positron emission tomography, *Psychopharmacology (Berl)* 2007, 193: 539-545.
234. Waade RB, Christensen H, Rudberg I et al., Influence of comedication on serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole, *Ther Drug Monit* 2009, 31: 233-238.
235. Wang JH, Liu ZQ, Wang W et al., Pharmacokinetics of sertraline in relation to genetic polymorphism of CYP2C19, *Clin Pharmacol Ther* 2001, 70: 42-47.
236. Wang X, Zhang D, Liu M, Zhao H, Du A, Meng L, Liu H, LC-MS/MS method for the determination of agomelatine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Biomed Chromatogr* 2014, 28:218-222.
237. White NC, Litovitz T, Clancy C, Suicidal antidepressant overdoses: a comparative analysis by antidepressant type, *J Med Toxicol* 2008, 4: 238-250.
238. Wikipedia (free encyclopedia), [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
239. Wille SM, Maudens KE, Van Peteghem CH, Lambert WE, Development of a solid phase extraction for 13 'new' generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis, *J Chromatogr A* 2005, 1098: 19-29.
240. Wille SM, Van Hee P, Neels HM, Van Peteghem CH, Lambert WE, Comparison of electron and chemical ionization modes by validation of a quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma, *J Chromatogr A* 2007, 1176: 236-245.
241. Winek CL, Zaveri NR, Wahba WW, The study of tricyclic antidepressants in formalin-fixed human liver and formalin solutions, *Forensic Sci Int* 1993, 61: 175-183.
242. Winter HR, Earley WR, Hamer-Maansson JE et al., Steady-state pharmacokinetic, safety, and tolerability profiles of quetiapine, Norquetiapine, and other quetiapine metabolites in pediatric and adult patients with psychotic disorders, *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2008, 18: 81-98.

243. Wohlfarth A, Toepfner N, Hermanns-Clausen M, Auwärter V, Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up, *Anal Bioanal Chem* 2011, 400: 737-746.
244. World Health Organization (WHO), <http://www.who.int/en/>
245. Woźniakiewicz M, Wietecha-Posłuszny R, Garbacik A, Kościelniak P, Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination, *J Chromatogr A* 2008, 1190: 52-56.
246. Xiang Q, Zhao X, Zhou Y et al., Effect of CYP2D6, CYP3A5, and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone and its active moiety, *J Clin Pharmacol* 2010, 50: 659-666.
247. Xiong C, Ruan J, Cai Y, Tang Y, Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 2009, 49: 572-578.
248. Yalcin-Siedentopf N, Wartelsteiner F, Kaufmann A, Biedermann F, Edlinger M, Kemmler G et al., Measuring adherence to medication in schizophrenia: the relationship between attitudes toward drug therapy and plasma levels of new-generation antipsychotics, *Int J Neuropsychopharmacol* 2015, 18: 1-7.
249. Yarema MC, Becker CE, Key concepts in postmortem drug redistribution, *Clin Toxicol* 2005, 4: 235-241.
250. Zaikin VG, Halket JM, Derivatization in mass spectrometry-2. Acylation, *Eur J Mass Spectrometry* 2003, 9: 421-434.
251. Zenkevich IG, *Acids: Derivatization for GC Analysis Encyclopedia of Chromatography, Third Edition*, 2009, DOI: 10.1081/E-ECHR3-120045222.
252. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B, Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact, *Drug Metab Rev* 2009, 41: 289-295.
253. Zhou SF, Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I, *Clin Pharmacokinet* 2009, 48: 689-723.
254. Zhou SF, Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part II, *Clin Pharmacokinet* 2009, 48: 761-804.
255. Αλεβιζόπουλος ΓΑ, *Μάθημα Θεραπευτικής: Φάρμακα για τις μείζονες παθήσεις του ΚΝΣ*, 2018.

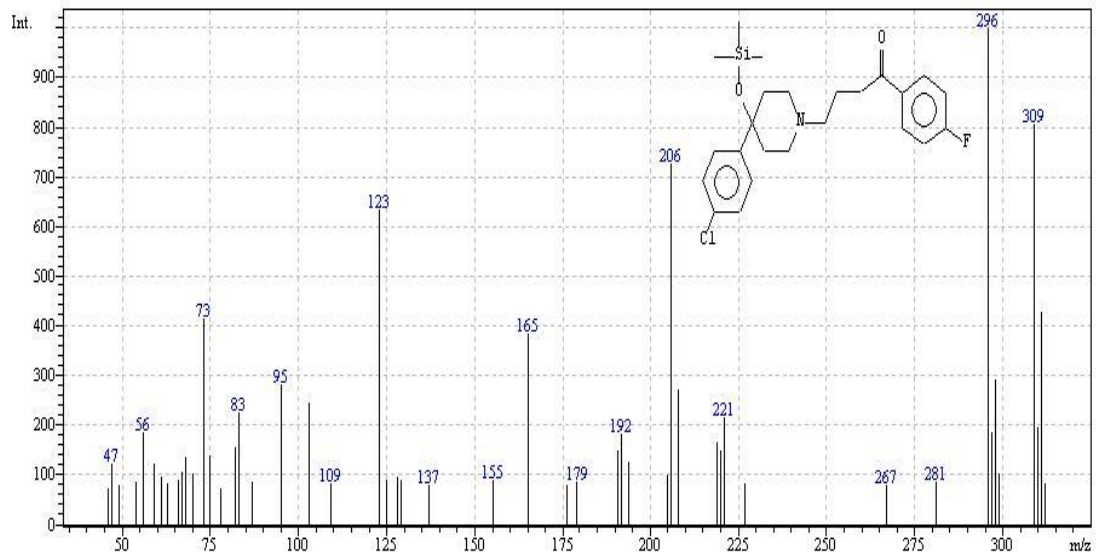
256. Ελληνική Στατιστική Αρχή, *Δελτίο Τύπου, Έρευνα Υγείας: Έτος 2014*, Ελληνική Δημοκρατία, 2016.
257. Θεοδωρίδης Γ, *Κεφάλαιο 12:Φασματομετρία Μάζας*.
258. Κουμπάρης Μ, *Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας – Διαπίστευση*, Έκδοση: 1.0., Αθήνα 2015, Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM102> Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών.
259. Κουτσελίνης ΑΣ, *Ιατροδικαστική Ε Έκδοση*, 2002, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα.
260. Κυζιρίδης ΘΧ, *Μισός αιώνας αντιψυχωσικών φαρμάκων: ένα μικρό ταξίδι στην ιστορία, Η ιατρική σήμερα*, τεύχος 54.
261. Μάνου Ν, *Βασικά στοιχεία Κλινικής Ψυχιατρικής*, Αναθεωρημένη έκδοση, 1997.
262. Μαρσέλος Μ, Μάλαμας Μ, *Ιατρική Φαρμακολογία Ι*, 2004, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
263. Μπούμπα ΒΑ, *Σημειώσεις στη Δικαστική Τοξικολογία*, 2006, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
264. Παπαδογιάννης ΙΝ, Σαμανίδου ΒΦ, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, 2001, Θεσσαλονίκη.
265. Ράλλης Γ, *Μεταπτυχιακή Διατριβή: Χρωματογραφικός προσδιορισμός ξενοβιοτικών ενώσεων με χημειομετρικές μεθόδους βελτιστοποίησης σε πνεύμονα από νεκροτομικό υλικό*, 2012, Ιωάννινα.
266. Σακκάς Β, *Διδακτικές Σημειώσεις*, 2010, Ιωάννινα.
267. Σαμανίδου Β, *Κεφάλαιο 4: Βιολογικά Υποστρώματα*.
268. Σαμανίδου Β, *Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων*.
269. Στράτης ΙΑ, Βουλγαρόπουλος Α.Ν, Ζαχαριάδης ΙΑ, *Ποσοτική Χημική Ανάλυση*, 1999 Θεσσαλονίκη.
270. Χαρτοκόλλης Π, *Εισαγωγή στην Ψυχιατρική*, 1986, Θεμέλιο, Αθήνα.
271. Χατζηϊωάννου ΘΠ, Κουμπάρης ΜΑ, *Ενόργανη Ανάλυση*, 2005, Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι  
ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ

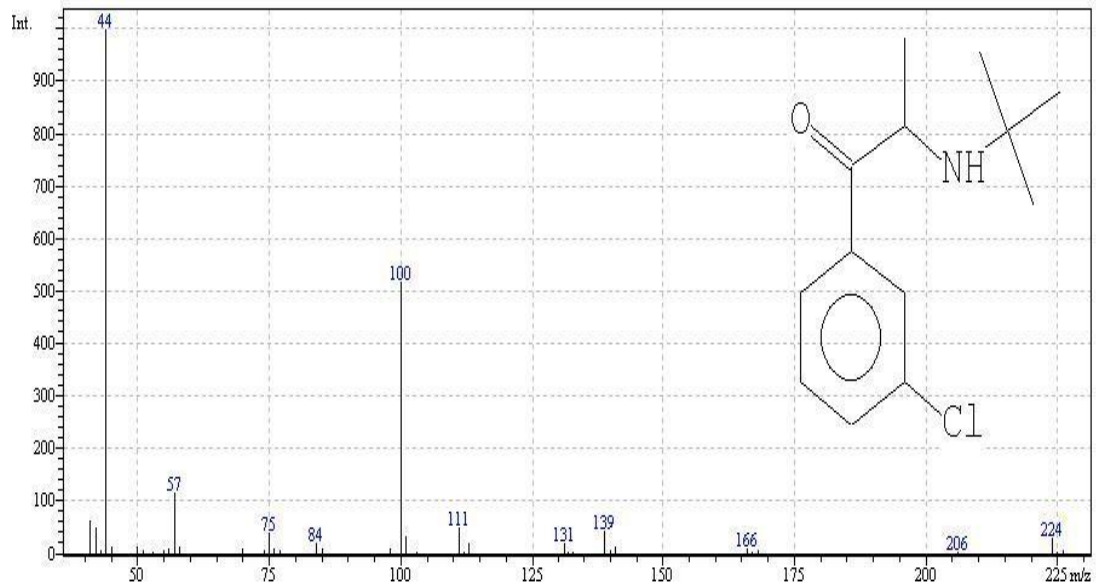
---

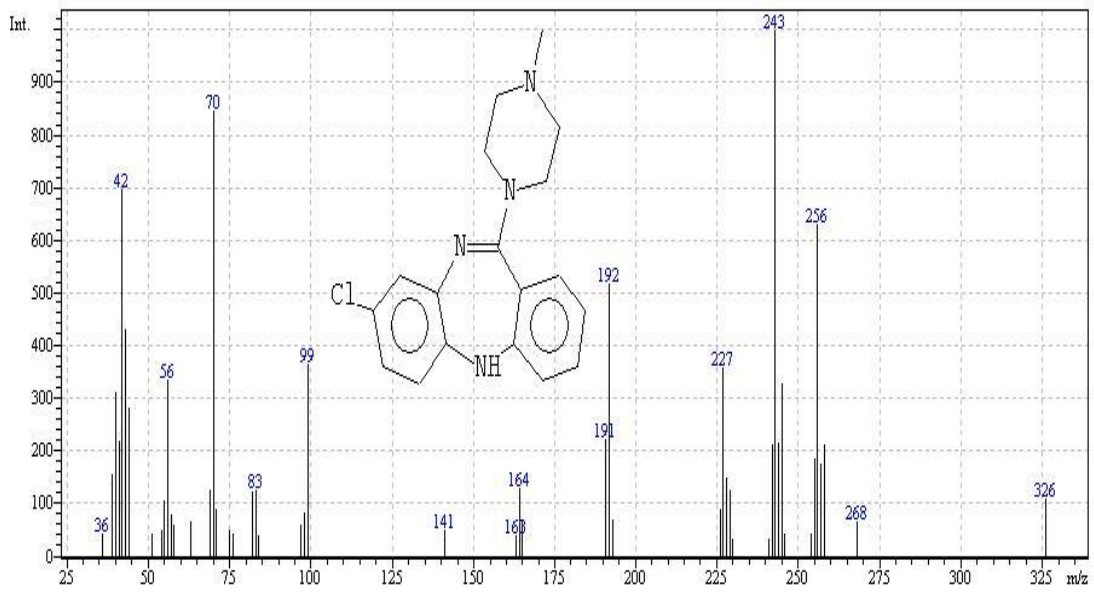
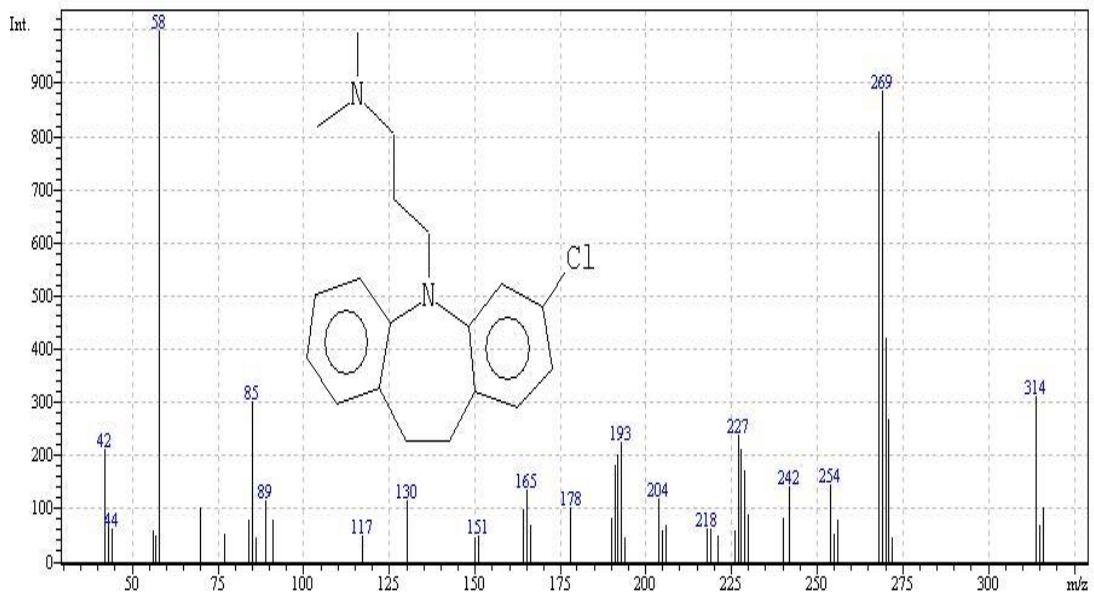


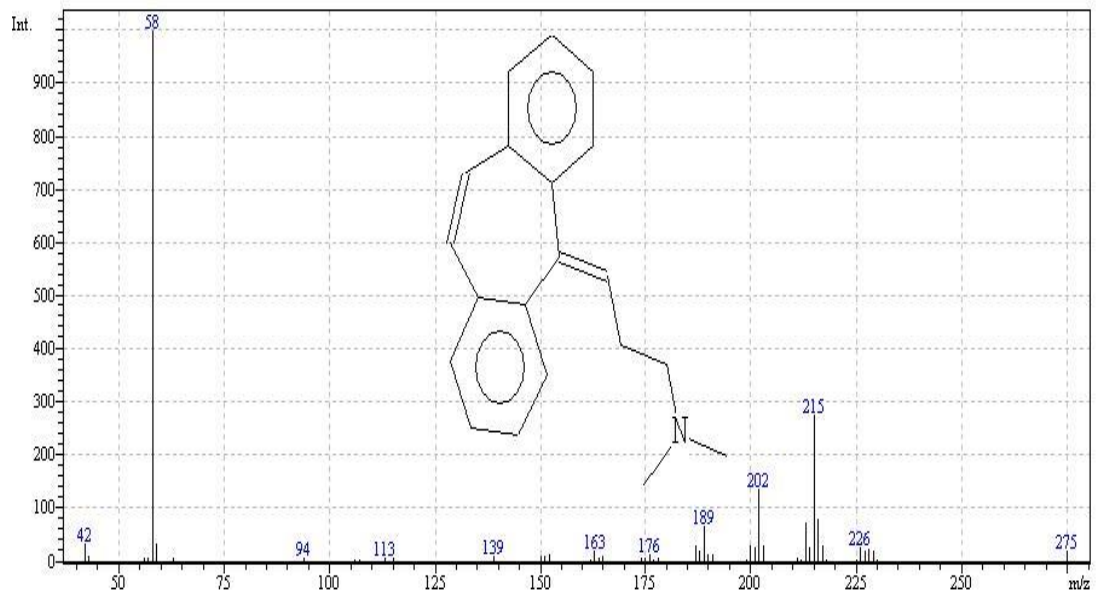
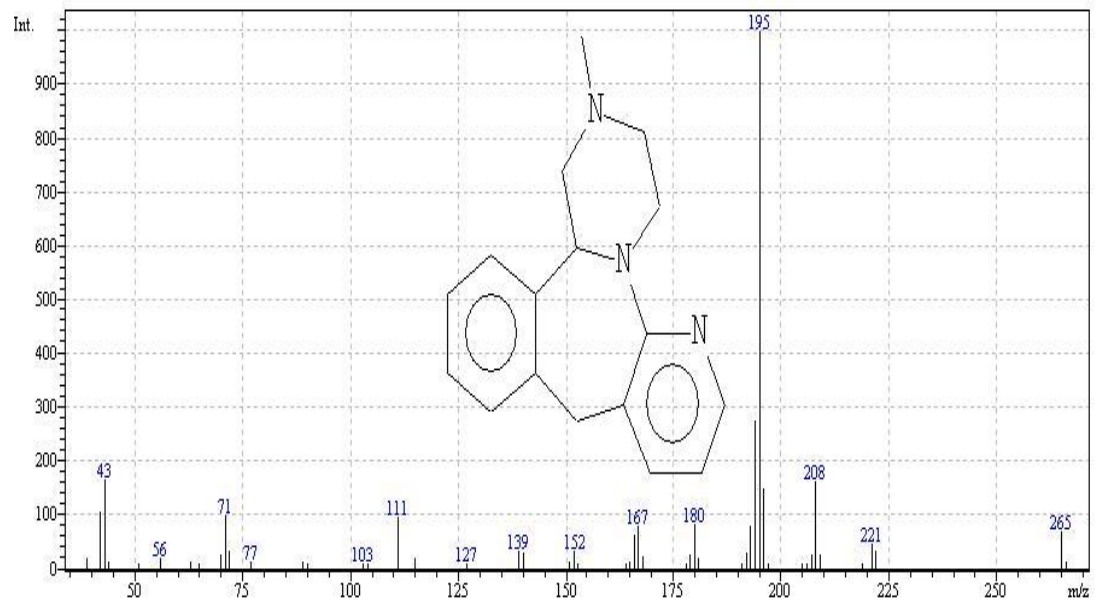
## Αλοπεριδόλη-TMS



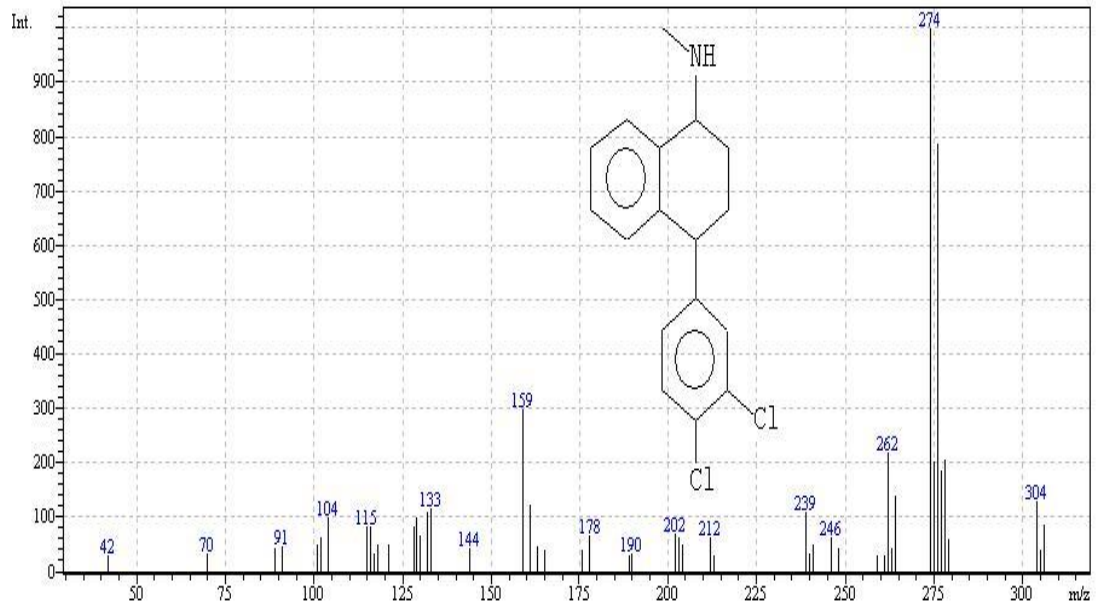
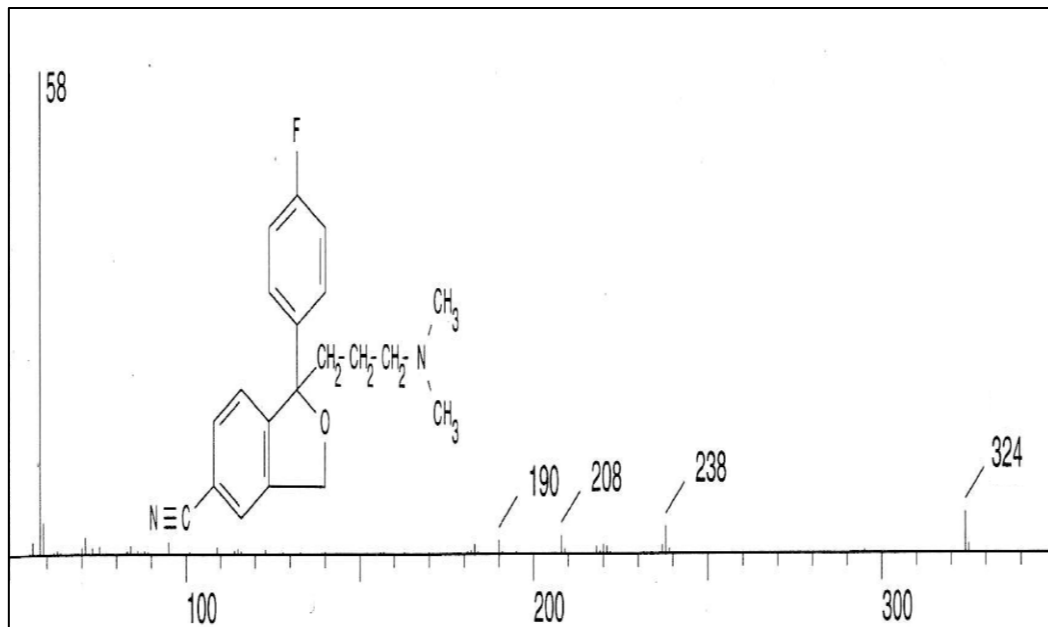
## Βουπροπρόνη



**Κλοζαπίνη****Κλομιπραμίνη**

**Κυκλοβενζαπρίνη (IS)****Μιρταζαπίνη**



**Σερτραλίνη****Σιταλοπράμη**

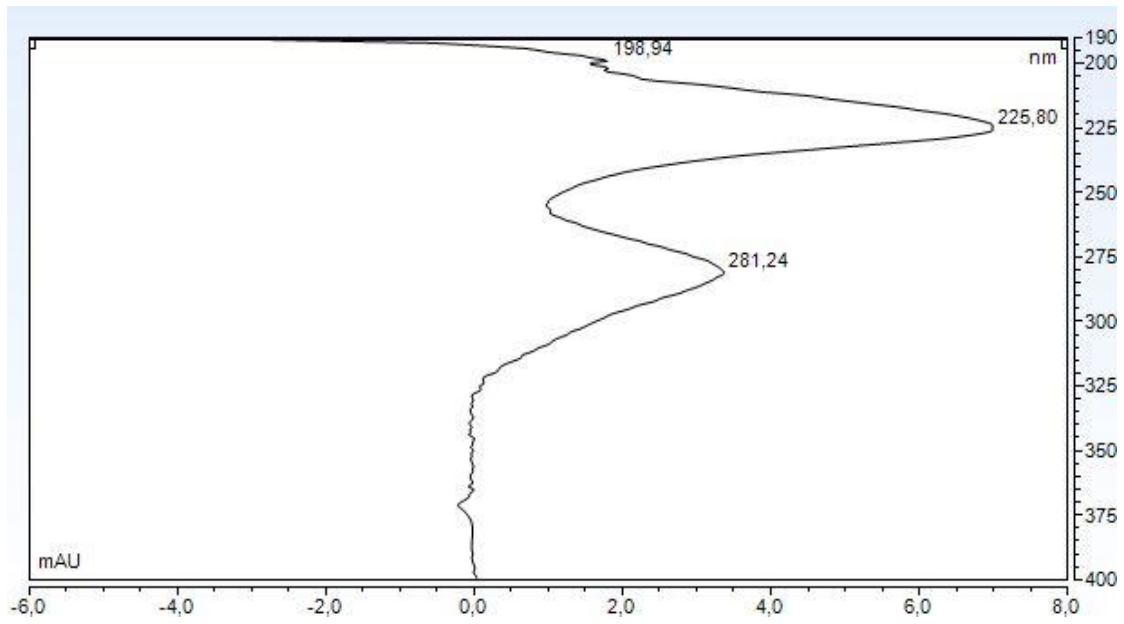
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

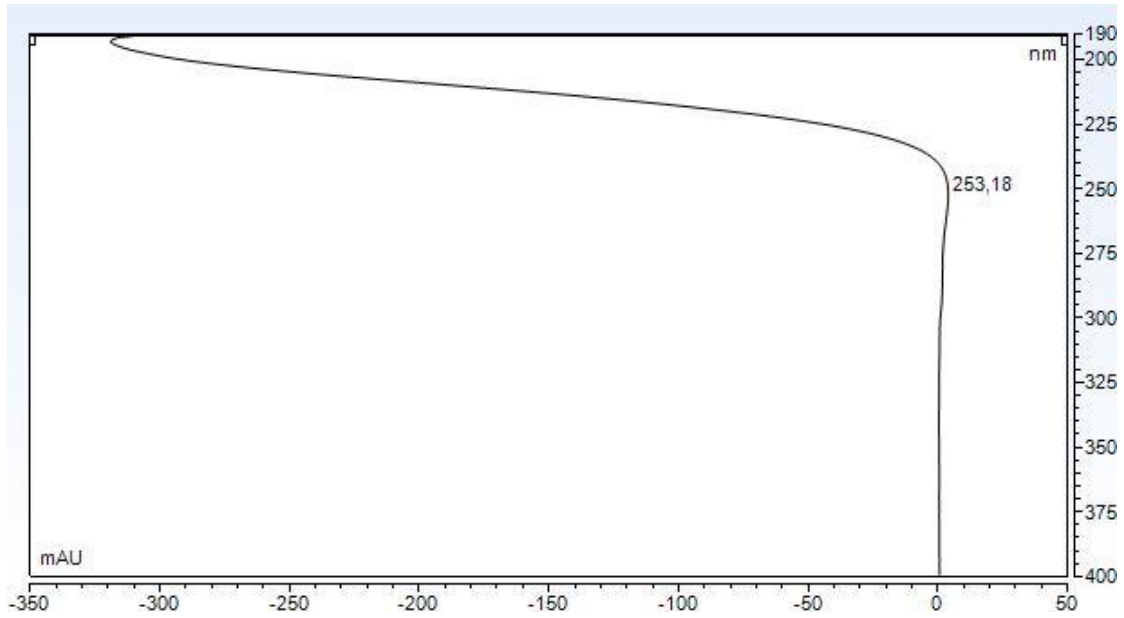
---



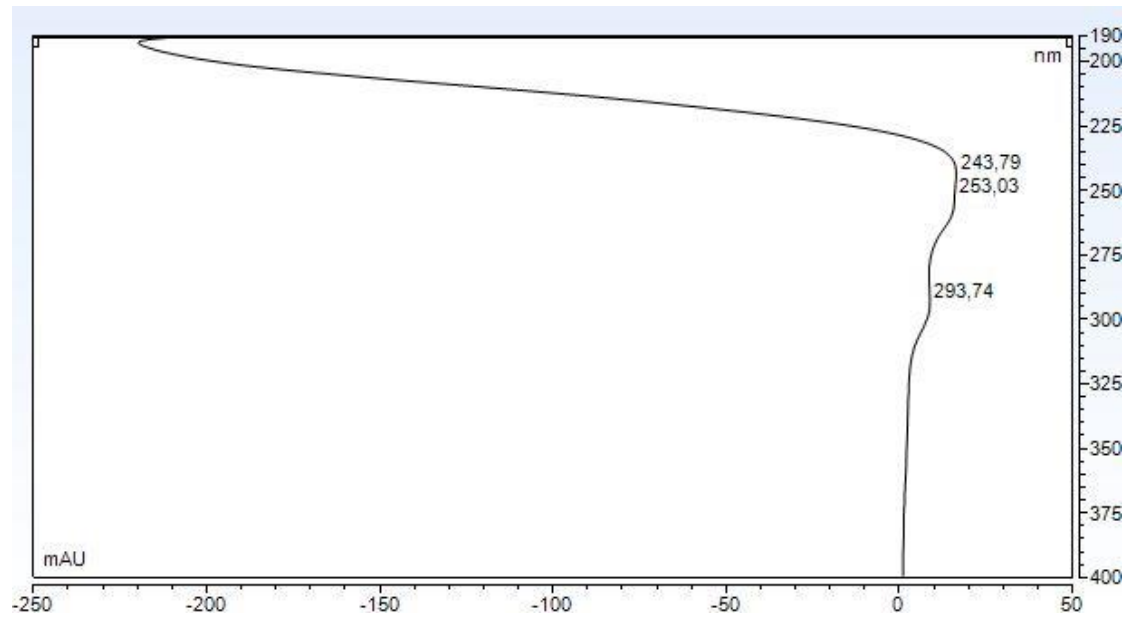
## Αμισουλπρίδη



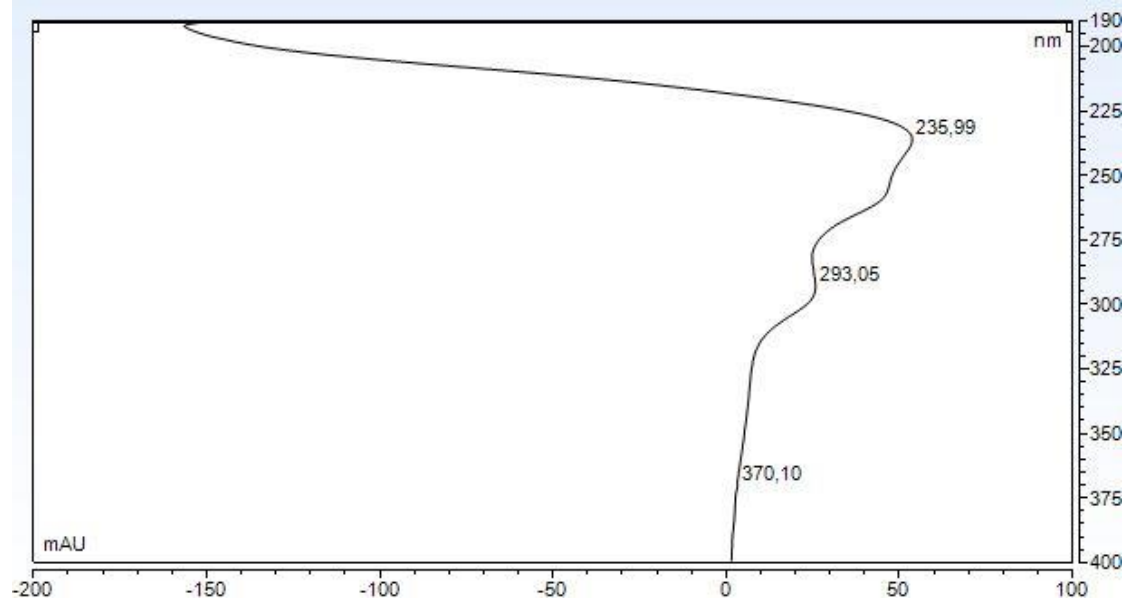
## Αριπιραζόλη

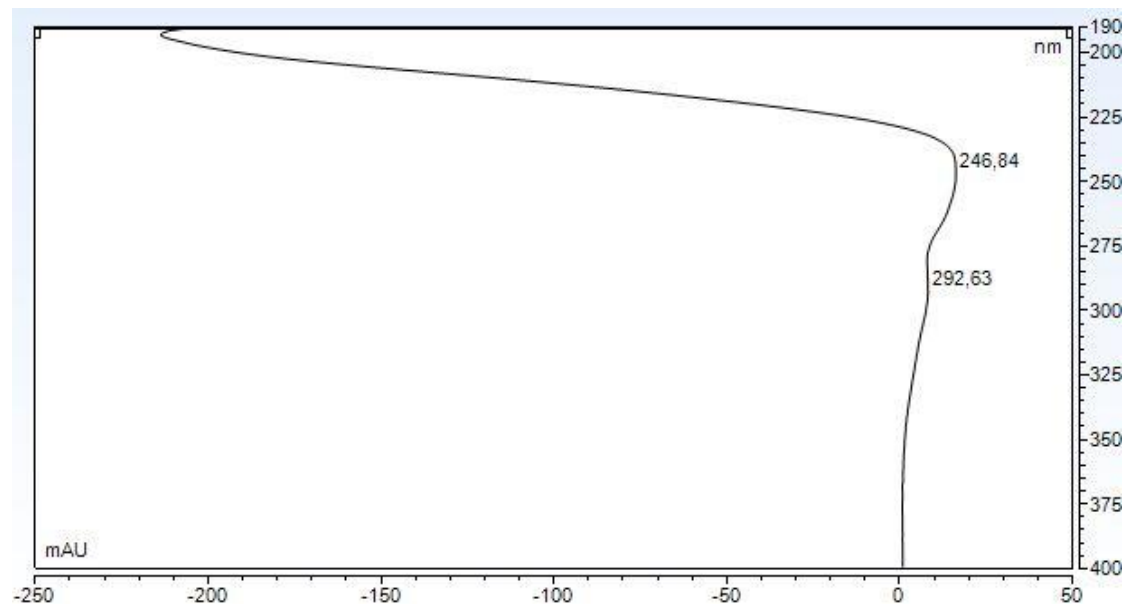
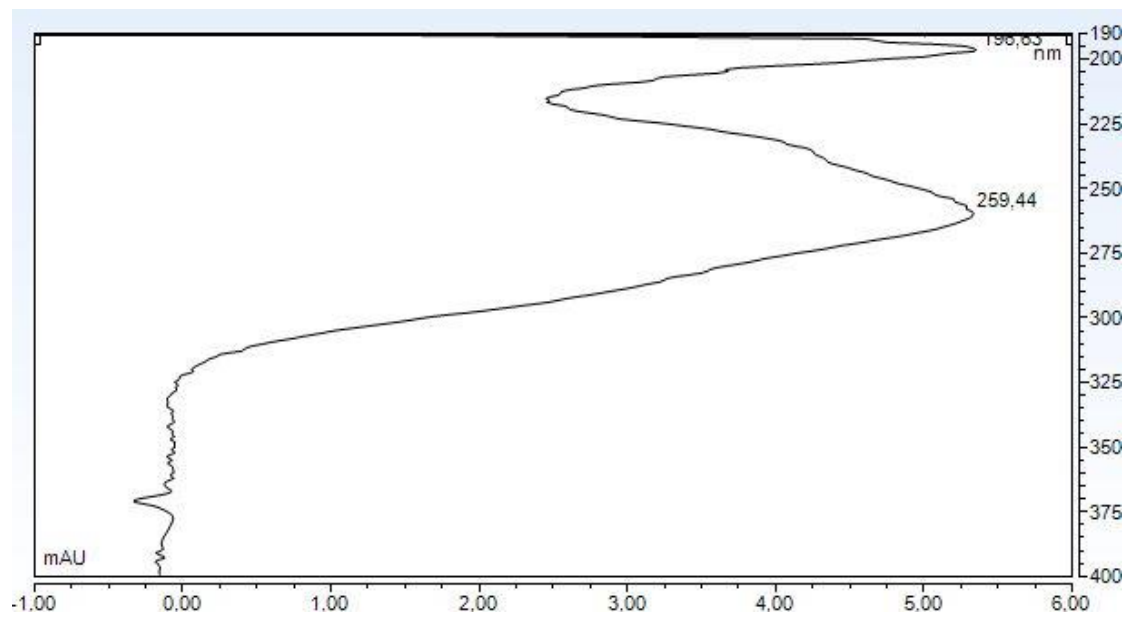


## Κλοζαπίνη

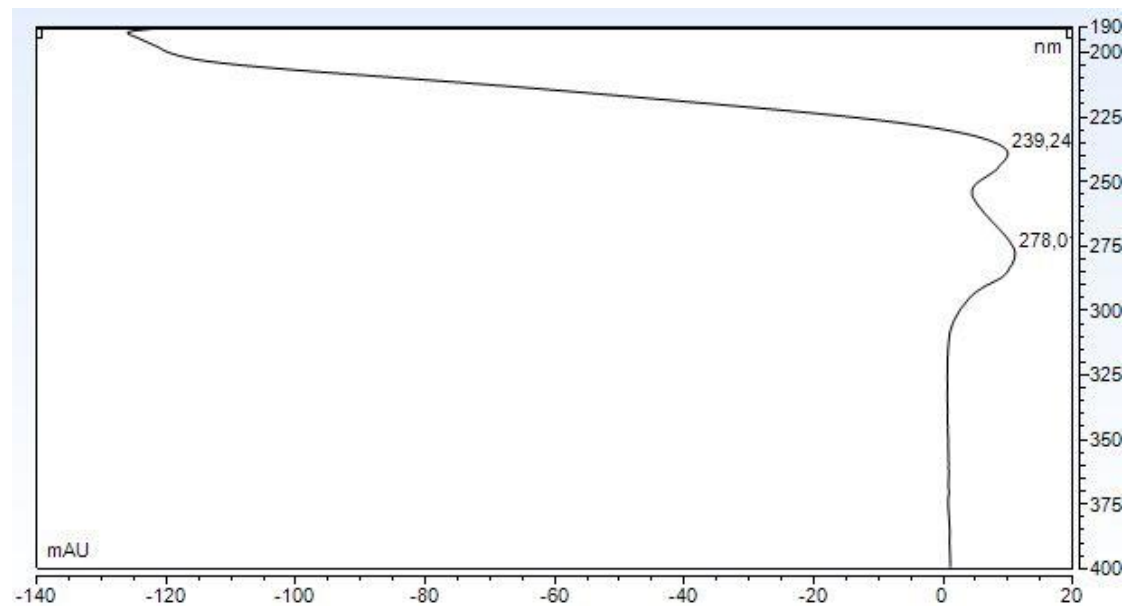


## N-desmethylozapine

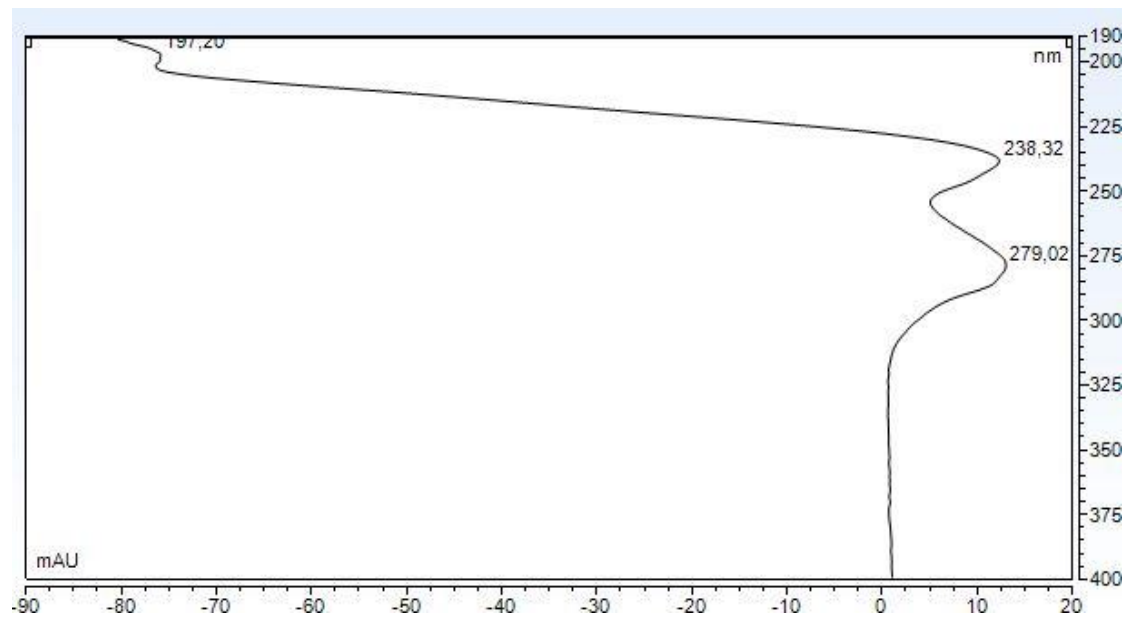


**Κουετιαπίνη****Ολανζαπίνη**

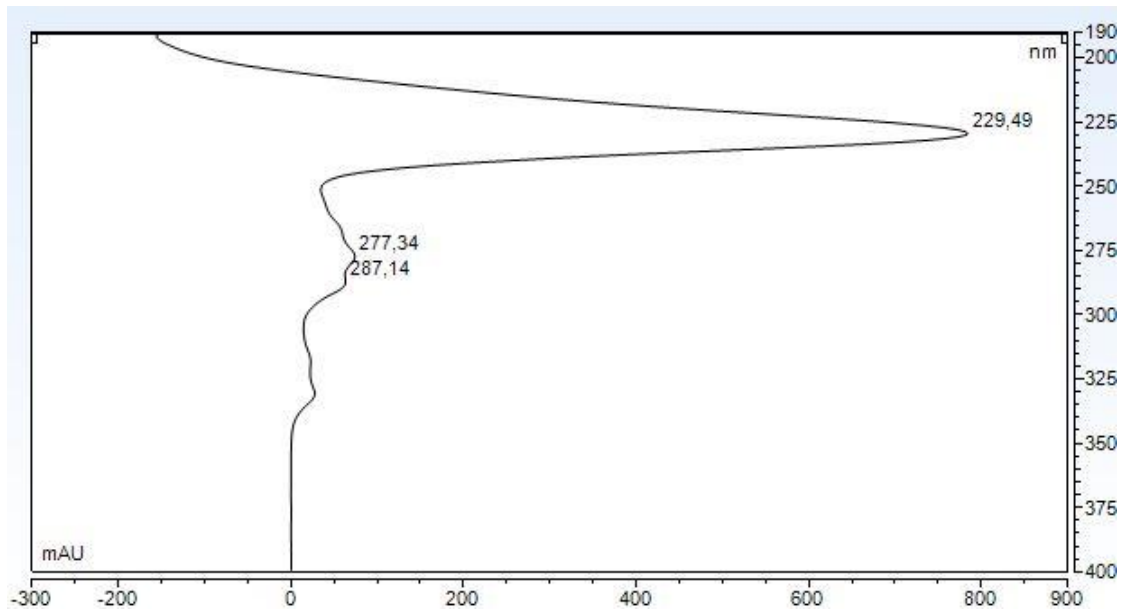
## Ρισπεριδόνη



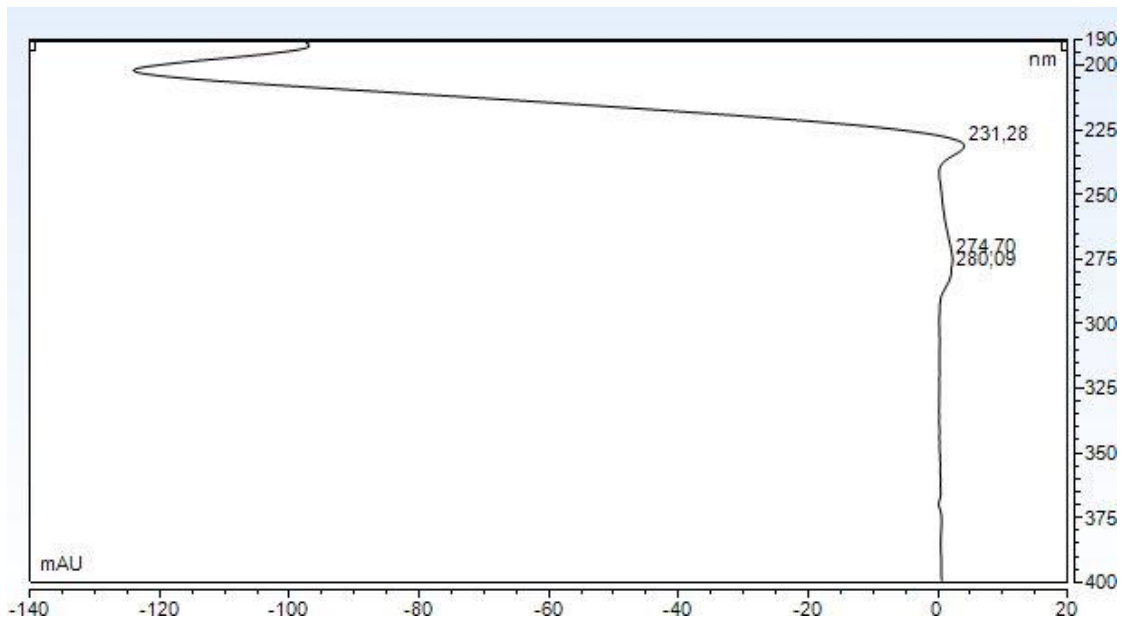
## Παλιπεριδόνη



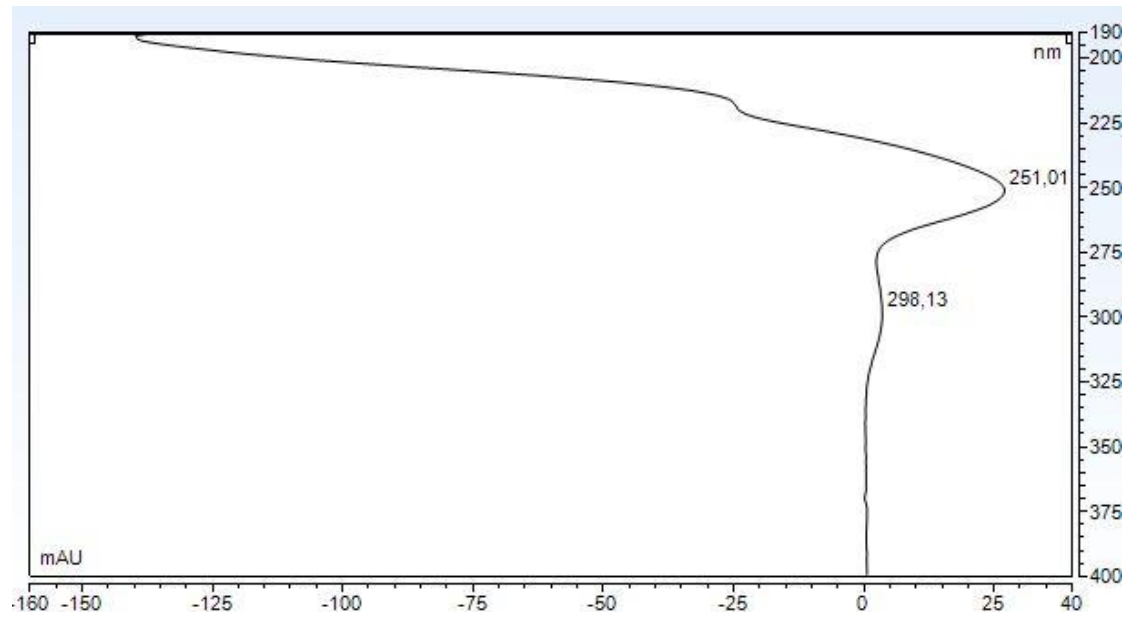
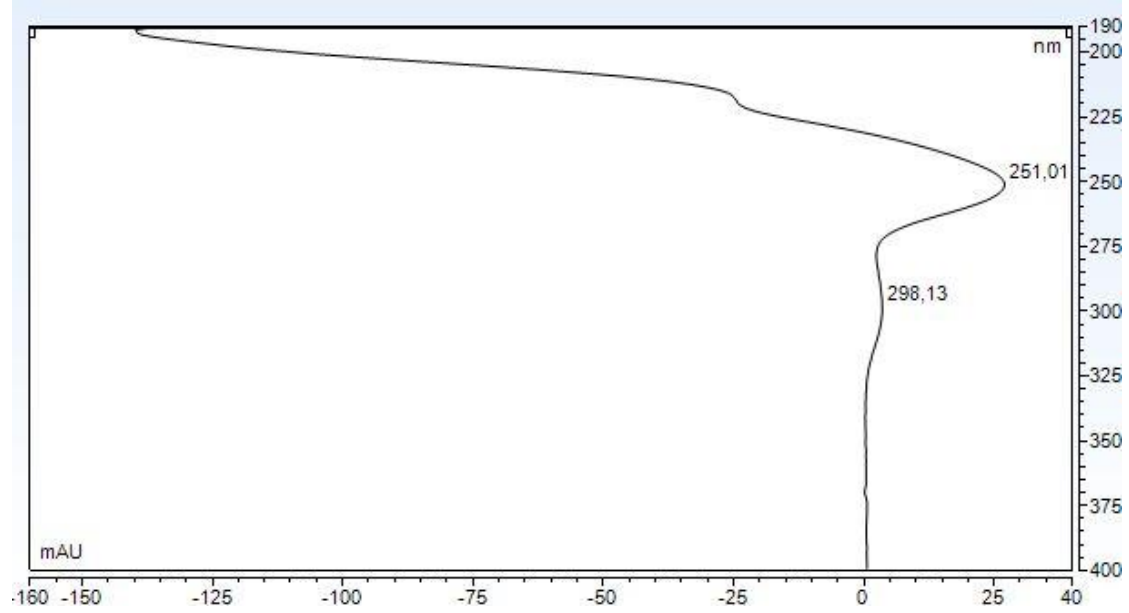
## Αγομελατίνη



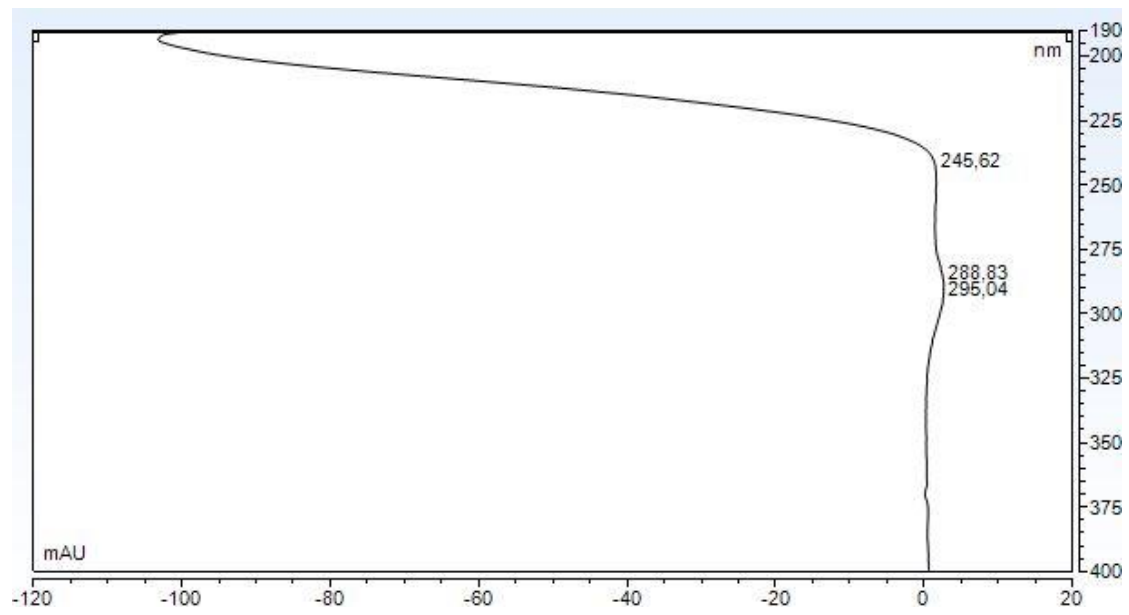
## Βενλαφαξίνη



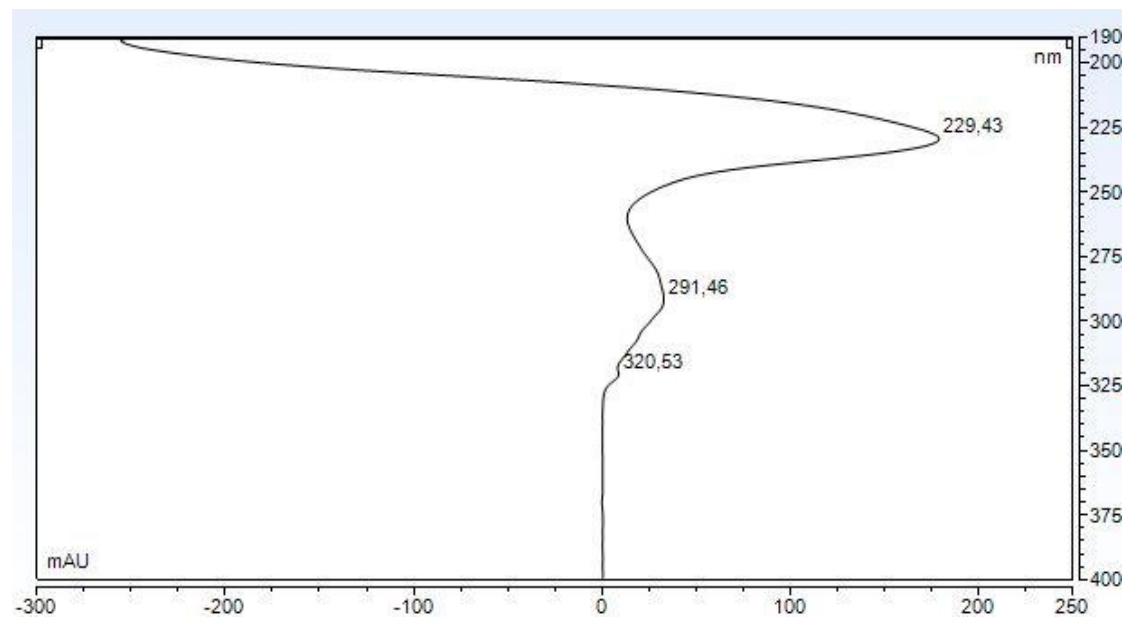


**Βουπροπρόνη****Κλομιπραμίνη**

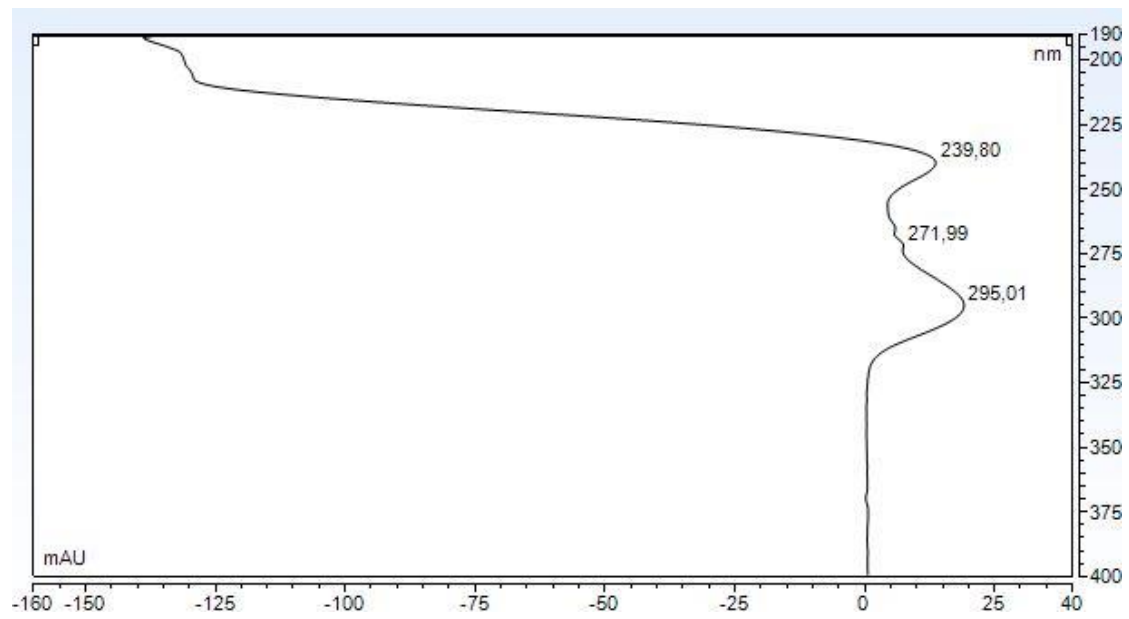
## Μιρταζαπίνη



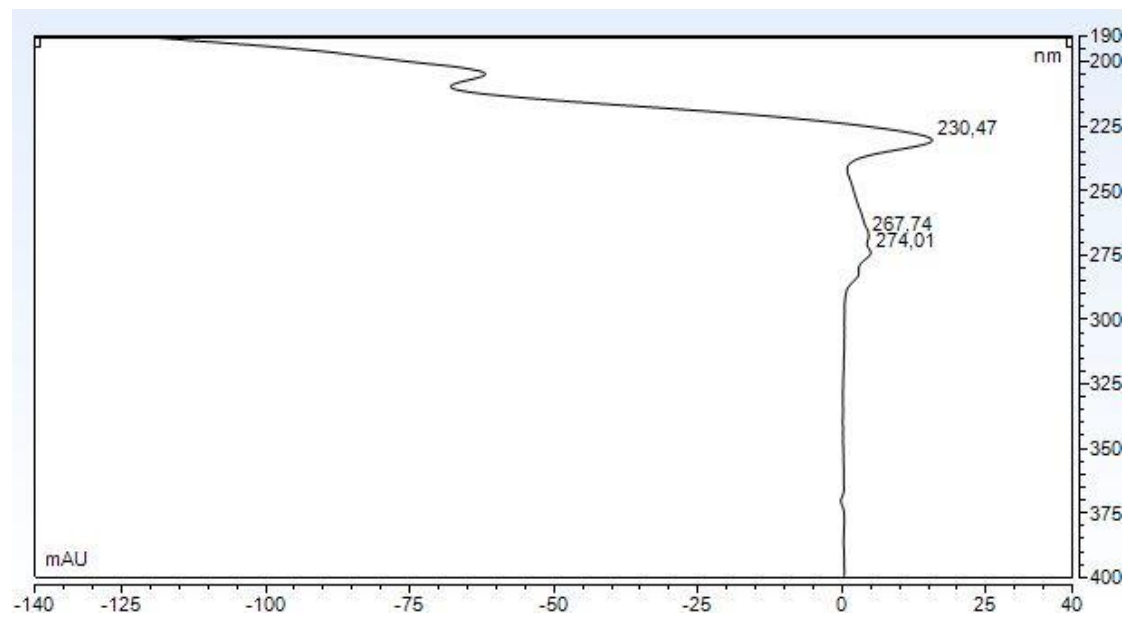
## Ντουλοξετίνη



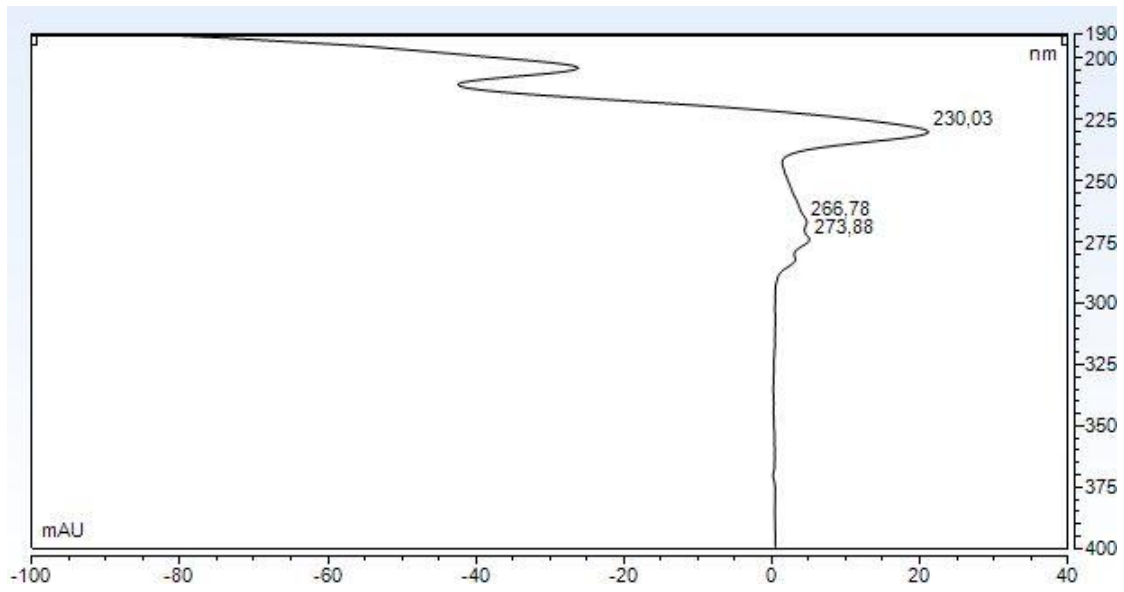
## Παροξετίνη



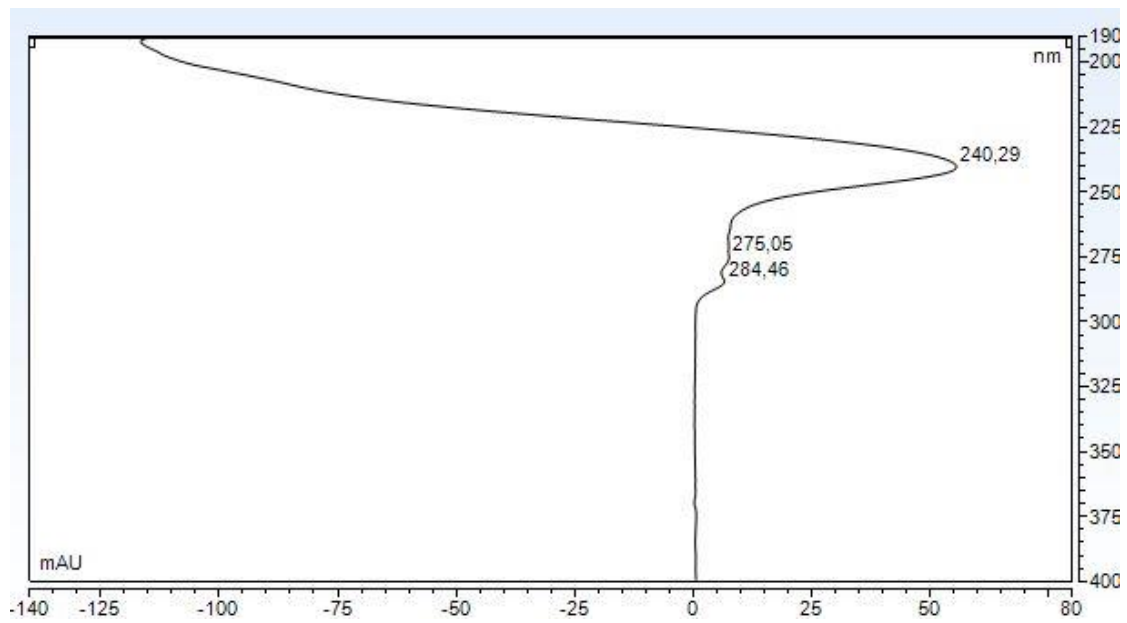
## Σερτραλίνη

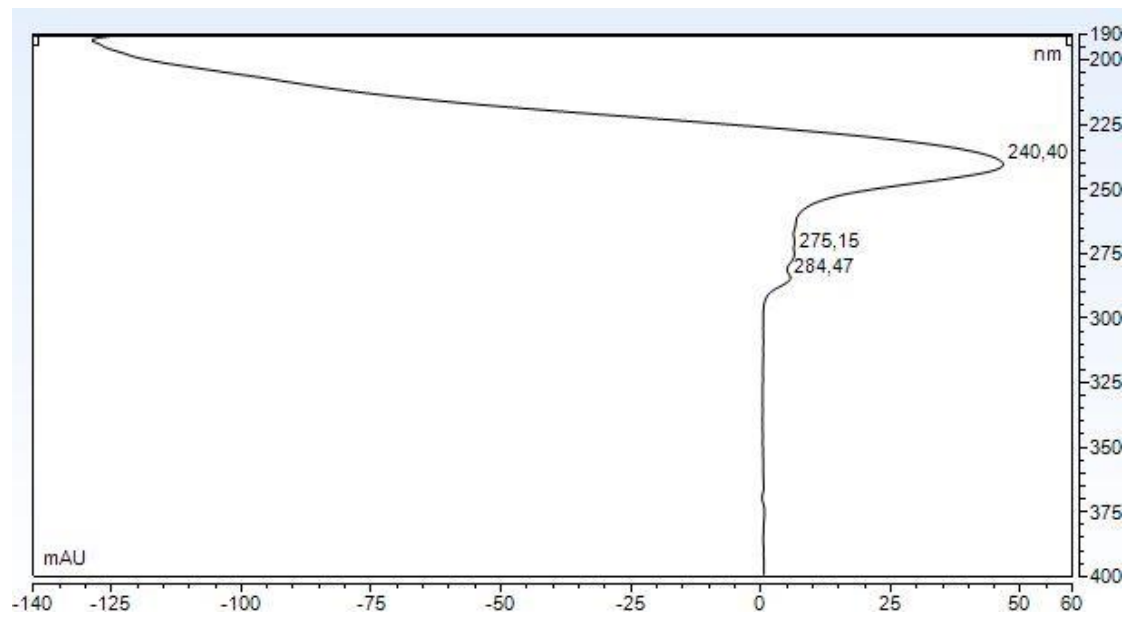


## N-desmethylsertraline



## Σιταλοπράμη



**N-desmethycitalopram****Χαρμίνη (IS)**