



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΠΑΠΑΧΑΡΙΣΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ LC-MS/MS**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΜΠΟΥΜΠΑ Α. ΒΑΣΙΛΙΚΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΠΑΠΑΧΑΡΙΣΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ LC-MS/MS**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΜΠΟΥΜΠΑ Α. ΒΑΣΙΛΙΚΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

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

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΠΑΠΑΧΑΡΙΣΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ LC-MS/MS

Ημερομηνία παρουσίασης: 05/07/2022

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Μπούμπα Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

Μαγκλάρα Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

Μπούμπα Α. Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)» με κατεύθυνση «Εφαρμοσμένη Βιοϊατρική» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Πρώτα απ όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας κυρία Μπούμπα Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για την καθοδήγηση και την επιστημονική συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής αλλά και για την τεράστια στήριξη σε προσωπικό επίπεδο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την κυρία Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας που συνέβαλε στην επιλογή του θέματος όπως και την κυρία Μαγκλάρα Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας που μου έκαναν την τιμή να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ψυχολογική υποστήριξη καθώς και τους φίλους και συνεργάτες μου Γλυκερία Βελιβάση, Χαρούλα Μυστακίδου, Δήμητρα Φλώρου, Θάλεια Βλάχου, Σαββίνα Τσουλτσίδου, Φωτεινή Αλβανοπούλου και Νικόλαο Γκαρέλια Οικονόμου.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	15
1.1 Βιοδείκτες.....	15
1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδεικτών.....	16
1.2.1 Ανοσοδοκιμασίες.....	16
1.2.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.....	17
1.2.3 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	20
ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	20
2.1 Υγρή χρωματογραφία.....	20
2.2 Φασματομετρία μαζών.....	21
2.3 Συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	24
ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΝΕΚΡΟΤΟΜΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ.....	24
3.1 Αίμα.....	25
3.2 Ούρα.....	27
3.3 Ξηρά κηλίδα αίματος.....	28
3.4 Ιδρώτας.....	29
3.5 Σίελος.....	30
3.6 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό.....	30
3.7 Υαλοειδές υγρό.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	35
ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	35
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	36
4.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών.....	37
4.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	39
4.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....	42
4.4 Υγρή -υγρή εκχύλιση.....	46
4.5 Εκχύλιση υγρού - υγρού με εξαλάτωση.....	48
4.6 Εκχύλιση σε αδρανές στερεό υπόστρωμα.....	50
4.7 Πλάκες αφαίρεσης φωσφολιπιδίων.....	52
4.8 Τυρβώδης ροή.....	54
4.9 Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.....	55
4.10 Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης.....	58
4.11 Μαγνητικά σφαιρίδια.....	60
4.12 Εκχύλιση με περιστρεφόμενη στήλη μονόλιθου.....	61

4.13 Μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	75
ΝΕΟΤΕΡΑ ΥΛΙΚΑ.....	75
5.1 Νανοσωλήνες άνθρακα.....	75
5.2 Υλικά περιορισμένης πρόσβασης.....	75
5.3 Ανοσοπροσροφητικά.....	76
5.4 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή.....	76
5.5 Απταμερή.....	78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

5HIAA	5-Hydroxyindoleacetic acid	5-Υδροξυινδολοξικό Οξύ
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine	8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη
17-OHP Ac-SDKP	17-Hydroxyprogesterone N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline	17-Υδροξυπρογεστερόνη
ADMA	Asymmetric dimethylarginin	Ασυμμετρική Διμεθυλαργινίνη
ATCA	2-aminothiazoline-4-carboxylic acid	2-αμινοθειαζολίνη-4-καρβοξυλικό οξύ
C18	Octyldecylsilane	
CE	Capillary electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
CGE	Capillary gel electrophoresis	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής
CIA	Counting immunoassay	Ανοσοδοκιμασίες καταμέτρησης
CITP	Capillary isotachopheresis	Ισοταχοφόρηση
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay	Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας
CNTs	Carbon nanotubes	Νανοςωλήνες άνθρακα
CZE	Capillary zone electrophoresis	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης
CIEF	Capillary isoelectric focusing	Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση
DBS	Dried blood spot	Ξηρά κηλίδα αίματος
DHEAS	Dehydroepiandrosterone sulfate	Θευκή Δεϋδροεπιανδροστερόνη
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης
EMIT	Ezyme Multiplied Immunoassay Technique	Ενισχυμένη Ανοσοενζυμική Μέθοδος
FDA	Food and Drug Administration	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
FIA	Fluoroimmunoassay	Ανοσοπροσδιορισμός φθορισμού
FPSE	Fabric Phase Sorptive Extraction	Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry	Αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας
HPLC	High-performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LC	Liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem Mass spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία - Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
LLE	Liquid Liquid extraction	Εκχύλιση υγρού υγρού
L-NMMA	Nitric oxide synthase	Αναστολέας συνθάσης

LSD	inhibitor Lysergic acid diethylamide	νιτρικού οξειδίου Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography	Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία
MEPS	Microextraction by packed sorbent	Μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό
MIPs	Molecular imprinted polymers	Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή
NIH	National Institutes of Health	Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PDMS	Polydimethylsiloxane	Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο
PPT	Protein precipitation	Καταβύθιση πρωτεϊνών
PRA	Plasma renin activity	Δραστηκότητα της Ρενίνης του πλάσματος
RAM	Restricted access materials	Υλικά περιορισμένης πρόσβασης
RGH-188	Trans-4-(2-(4-(2,3- dichlorophenyl)piperazine- 1-yl)-ethyl)-N,N- dimethylcarbamoyl- cyclohexyl-amine hydrochloride	
RIA	Radioimmunoassay technique	Ραδιοανοσοδοκιμασία
SALLE	Salting-out assisted liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρού υγρού με εξαλάτωση
SLE	Supported liquid extraction	Υποστηριζόμενη υγρή εκχύλιση
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction	Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης
SDMA	Symmetric dimethylarginine	Συμμετρική διμεθυλαργινίνη
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	Solid-Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης
THCA	Tetrahydrocannabinolic acid	Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ
THC-COOH	11-Nor- Δ 9-carboxy-THC	11-Nor-9-καρβοξυ- Δ 9- τετραϋδροκανναβινόλη
UHPLC	Ultra-high performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας με φασματογραφία μάζας τριπλού τετραπόλου (https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm).....	22
Εικόνα 2 Σύσταση αίματος (https://usmle-rx.com/podcast/plasma-composition/).....	25
Εικόνα 3 Σωληνάριο συλλογής αίματος BD Vacutainer με φθοριοϋχο νάτριο και οξαλικό κάλιο. (https://www.mtshs.com/vacutainer-blood-collection-tubes-5-ml-gray.html).....	27
Εικόνα 4 Ξηρές κηλίδες αίματος σε κατάλληλο διηθητικό χαρτί (https://www.bioanalysis-zone.com/spotlights/what-is-the-future-of-dried-blood-spots).....	28
Εικόνα 5 Επιθέματα ιδρώτα για ανίχνευση φαρμάκων (https://www.alcopro.com/product/sweat-patch-drug-test-system/).....	29
Εικόνα 6 Σύσταση ENY (Fishman RA. <i>Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system</i> . Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company, 1980).....	31
Εικόνα 7 Σχεδιάγραμμα οφθαλμού όπου διακρίνεται η θέση του ναλοειδούς υγρού (https://moodyeyes.com/what-is-included-in-an-eye-exam/).....	33
Εικόνα 8 Σύντομος οδηγός για την επιλογή τεχνικής προκατεργασίας δειγμάτων για ανάλυση με LC-MS/MS (A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology (https://www.spectroscopyeurope.com/article/practical-guide-sample-preparation-liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry-).....	36
Εικόνα 9 Στάδια για καταβύθιση πρωτεϊνών (http://www.proteinslides.cn/showMessage.shtml?message.id=351)....	38
Εικόνα 10 Καταβύθιση πρωτεϊνών σε Eppendorf https://www.researchgate.net/figure/Formation-of-protein-pellet-during-protein-precipitation-step-A-100-l-of-human-plasma_fig5_264091174	39
Εικόνα 11 Στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης (https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE_fig2_320024643).....	40
Εικόνα 12 Η διεπαφή SPME -LC στην λειτουργία φόρτωσης (A) και στην λειτουργία έγχυσης (B) https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267014001421	44
Εικόνα 13 Σχηματική αναπαράσταση των εφαρμογών της in tube SPME https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300005355#FIG14	45
Εικόνα 14 Γεωμετρία και κατασκευή τριχοειδών για In tube SPME (In-tube solid-phase microextraction: Current trends and future perspectives).....	46
Εικόνα 15 Βήματα υγρής υγρής εκχύλισης (https://www.researchgate.net/figure/Diagrammatic-illustration-of-liquid-liquid-extraction-adapted-from-Nichols-100_fig1_353282886).....	48
Εικόνα 16 Διαδικασία εκχύλισης υγρού υγρού με εξαλάτωση (https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.15.142).....	49
Εικόνα 17 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας SLE (https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/34786-Utilizing-Supported-Liquid-Extraction-in-a-Novel-Format-to-Improve-Productivity-in-the-Analytical-Laboratory/).....	52
Εικόνα 18 Στάδια λειτουργίας της πλάκας αφαίρεσης φωσφολιπιδίων (https://www.biocomma.com/product/294.mhtml).....	53
Εικόνα 19 Στήλες TurboFlow™ (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CH-953275).....	55
Εικόνα 20 Στάδια FSPE (https://www.preprints.org/manuscript/201701.0085/v1).....	56
Εικόνα 21 Βήματα SBSE (https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.13.52).....	59
Εικόνα 22 Προσοφητική ράβδος ανάδευσης (http://laballiance.com.my/product/twister-stir-bar-sorptive-extraction-sbse/).....	60
Εικόνα 23 Σχηματική απεικόνιση προκατεργασίας δειγμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια (https://steinbrenner-laborsysteme.de/language/en/products/magsimus/).....	61
Εικόνα 24 Στάδια εκχύλισης με χρήση περιστρεφόμενων στήλων μονολιθίου.....	62
Εικόνα 25 Συσκευή και διαδικασία εκχύλισης MEPS (https://www.mdpi.com/2297-8739/4/4/36/htm).....	63
Εικόνα 26 Υλικά περιορισμένης πρόσβασης (https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000326701730020X).....	76
Εικόνα 27 Σχηματισμός μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (https://www.chromatographyonline.com/view/molecular-imprinting-sample-preparation).....	78
Εικόνα 28 Σχηματισμός απταμερών για δέσμευση σε συγκεκριμένους στόχους (https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/planning-to-work-with-aptamers).....	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ...</i>	<i>64</i>
<i>Πίνακας 2</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΡΑΒΔΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>66</i>
<i>Πίνακας 3</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ</i>	<i>66</i>
<i>Πίνακας 4</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ ΜΕ ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>67</i>
<i>Πίνακας 5</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>68</i>
<i>Πίνακας 6</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΝ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ</i>	<i>69</i>
<i>Πίνακας 7</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>69</i>
<i>Πίνακας 8</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΕ ΑΔΡΑΝΕΣ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>70</i>
<i>Πίνακας 9</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>70</i>
<i>Πίνακας 10</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΛΑΚΩΝ ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ</i>	<i>71</i>
<i>Πίνακας 11</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΥΡΒΩΔΟΥΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ..</i>	<i>71</i>
<i>Πίνακας 12</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΣΤΡΕΦΟΜΕΝΗ ΣΤΗΛΗ ΜΟΝΟΛΙΘΙΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....</i>	<i>73</i>
<i>Πίνακας 13</i>	<i>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ...</i>	<i>73</i>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Βιοδείκτες

Σύμφωνα με τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) και την υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) ως βιοδείκτης ορίζεται ένα χαρακτηριστικό που μετράται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή ως απόκριση σε μια έκθεση ή μια θεραπευτική παρέμβαση . Οι διάφοροι βιοδείκτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής : (Califf, 2018)

- *Διαγνωστικοί βιοδείκτες*, που μπορούν να βοηθήσουν στην ανίχνευση ή την επιβεβαίωση μιας νόσου
- *Βιοδείκτες παρακολούθησης*, που προσδιορίζονται για την παρακολούθηση της πορείας μιας νόσου αλλά μπορούν να είναι και ενδεικτικοί για την έκθεση σε έναν παράγοντα.
- *Βιοδείκτες απόκρισης*, που χρησιμοποιούνται για να δείχθει αν η βιολογική απόκριση ενός ατόμου που έχει εκτεθεί σε κάποιο παράγοντα είναι ωφέλιμη ή επιβλαβής
- *Προβλεπτικοί βιοδείκτες*, που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ατόμων που είναι πιθανότερο να εμφανίσουν ευνοϊκή ή δυσμενή αντίδραση σε κάποιο παράγοντα σε σχέση με όμοια άτομα που δεν έχουν τον βιοδείκτη
- *Προγνωστικοί βιοδείκτες*, που υποδεικνύουν την πιθανότητα εμφάνισης ενός μελλοντικού κλινικού συμβάντος και την υποτροπή ή εξέλιξη μιας ασθένειας
- *Βιοδείκτες ασφάλειας*, που προσδιορίζονται για την μελέτη της τοξικότητας πριν ή μετά από την έκθεση ενός ατόμου σε κάποιο παράγοντα
- *Βιοδείκτες ευαισθησίας/κινδύνου*, που υποδεικνύουν την πιθανότητα ανάπτυξης νόσου ή μιας ιατρικής κατάστασης σε άτομα τα οποία δεν έχουν ακόμα εμφανίσει την νόσο ή την ιατρική κατάσταση αυτή.

Η Εθνική Ακαδημία Ερευνών ορίζει τον βιοδείκτη ως τις μετρήσιμες αλλαγές, που προκαλούνται από ξενοβιοτικά, σε βιολογικά συστήματα και που αφορούν αλλαγές σε κυτταρικά ή βιοχημικά συστατικά, δομές ή λειτουργίες. Από τον ορισμό αυτό προκύπτει πως βιοδείκτης είναι η βιολογική απάντηση του οργανισμού σε οποιοδήποτε χημικό παράγοντα αλλά όχι ο ίδιος ο παράγοντας. Ωστόσο η παρουσία ενός ξενοβιοτικού (ή των μεταβολιτών

του) που μετράται σε ένα βιολογικό δείγμα είναι αναμφισβήτητα ένας βιοδείκτης έκθεσης και κατά συνέπεια μπορεί να θεωρηθεί ένας βιοδείκτης (Gil & Pla, 2001).

Η μέτρηση των βιοδεικτών αποτελεί ένα σύνθετο ζήτημα στο οποίο παράγοντες όπως η ειδικότητα, η ευαισθησία και η σταθερότητα στην ανάλυση τούς αποτελούν τις κύριες αναλυτικές προκλήσεις (Amaravadi, 2016). Η ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού διαφόρων βιομορίων έχει συμβάλει σημαντικά στην επιστήμη και κυρίως στην διάγνωση και παρακολούθηση διαφόρων ασθενειών μέσω της μέτρησης επίπεδων βιομορίων σε ανθρώπινα βιολογικά υλικά. Επίσης έχει συνεισφέρει στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής στην οποία είναι αυξημένη η ανάγκη για ποσοτικό προσδιορισμό πάνελ βιομορίων ως βιοδείκτες καθώς και μια ποικιλία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για θεραπεία ή πρόληψη (Cross & Hornshaw, 2016).

1.2 Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδεικτών

Σήμερα υπάρχει πληθώρα τεχνικών που χρησιμοποιούνται στα κλινικά εργαστήρια προκειμένου να προσδιοριστούν διάφοροι βιοδείκτες σε βιολογικά υγρά για την κλινική διάγνωση και την παρακολούθηση επίπεδων φαρμάκων.

1.2.1 Ανοσοδοκιμασίες

Ανάμεσα σε αυτές οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι οι ανοσοδοκιμασίες οι οποίες βασίζονται στην δέσμευση ενός επισημασμένου και ενός μη επισημασμένου μορίου σε ένα συγκεκριμένο για αυτό το μόριο αντίσωμα με ανταγωνιστικό τρόπο. Εφαρμόζονται για ποσοτική, ημιποσοτική και ποιοτική ανάλυση και σε αυτή την κατηγορία τεχνικών ανήκουν οι : α) Ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA), β) Φθοριοανοσοδοκιμασίες (FIA), γ) Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELIZA), δ) Ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA), ε) Ανοσοδοκιμασίες καταμέτρησης (CIA), ζ) Ανοσοδοκιμασία πολλαπλασιαζόμενου ενζύμου (EMIT) κα. (Dutta Sanchari Sinha, 2018; Routledge & Hutchings, 2013).

Οι ανοσοδοκιμασίες έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών όπως η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και το χαμηλό κόστος της ανάλυσης για εργαστήρια με μεγάλο όγκο δειγμάτων. Επίσης δεν απαιτείται μεγάλη προκατεργασία του δείγματος πριν την ανάλυση και έχουν την δυνατότητα να αυτοματοποιηθούν. Ωστόσο έχουν

αρκετά μειονεκτήματα γεγονός που δεν τις καθιστούν κατάλληλες για αναλύσεις όλων των μορίων ιδιαίτερα των πολύ μικρών μορίων τα οποία δεν διαθέτουν επιτοπικά κέντρα και δεν είναι κατάλληλα για την δημιουργία αντισωμάτων ειδικών για αυτά τα μόρια. Ανάμεσα σε αυτά τα μειονεκτήματα είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις από ενώσεις με παρόμοια δομή με αυτή της προς ανάλυση ουσίας, η διαθεσιμότητα των εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων και η ανεπαρκής ποσοτικοποίηση (Θεοδωρίδης, 2015b).

1.2.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE) αποτελεί μια τεχνική καθιερωμένη στις αναλύσεις ρουτίνας στον τομέα της κλινικής χημείας. Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού και η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα μέσα σε τριχοειδή αγγεία, τα οποία είναι πληρωμένα με ένα ρυθμιστικό διάλυμα, και αποτελούνται από τετηγμένο πυρίτιο. Οι τριχοειδείς σωλήνες, οι οποίοι έχουν μήκος 10-100 cm και εσωτερική διάμετρο 25-100 μm , είναι επικαλυμμένοι με πολυαμίδιο με σκοπό την αύξηση της αντοχής του τριχοειδούς. Η τεχνική αυτή μπορεί να λειτουργήσει με διάφορους τρόπους διαχωρισμού όπως α) Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE), β) Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία (MECC), γ) Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής (CGE), Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση (CIEF), Ιστοαχοφόρηση (CITP) με την CZE να είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη (Sastre Toraño et al., 2019; Wätzig & Günter, 2003; Ζώτου, 2015).

Παρότι είναι μια οικονομική, εύκολη και γρήγορη τεχνική με καλή διαχωριστική απόδοση παρουσιάζει μειονεκτήματα που αφορούν την κακή ευαισθησία και την χαμηλή ανοχή στα συστατικά της μήτρας των δειγμάτων με αποτέλεσμα να απαιτείται προκατεργασία αυτών πριν τον διαχωρισμό και την ανίχνευση (Ramos-Payán et al., 2018).

1.2.3 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας

Η αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας (GC-MS) είναι η αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων μέσα σε ένα δείγμα και συνδυάζει τις δυνατότητες

διαχωρισμού της χρωματογραφίας αερίου-υγρού με την ικανότητα ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας (Chauhan, 2014).

Στην μεταβολική η αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας αποτελεί την πιο τυποποιημένη τεχνική με σχεδόν 50 χρόνια καθιερωμένων πρωτοκόλλων για αναλύσεις σακχάρων, αμινοξέων, στερολών, κατεχολαμινών, υδροξυοξέων, λιπαρών οξέων καθώς και άλλων προϊόντων του πρωτογενούς και ενδιάμεσου μεταβολισμού (Oliver Fiehn, 2017). Ιστορικά η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογραφία μάζας είναι η μέθοδος εκλογής για την μέτρηση στεροειδών ορμονών οι οποίες είναι ιδανικές γιαυτό το είδος ανάλυσης λόγω της λιπόφιλης ή μη πολικής φύσης τους. Σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών η τεχνική αυτή αποτελεί πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση βιοδεικτών χαμηλής συγκέντρωσης όπως η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη. Ωστόσο επειδή πολλές στεροειδείς ορμόνες έχουν παρόμοια θραύσματα ιόντων πρέπει να διαχωριστούν χρωματογραφικά κάτι που μπορεί να οδηγήσει με μεγάλους χρόνους χρωματογραφικής ανάλυσης. Επίσης στα κλινικά δείγματα κάποιες στεροειδείς ορμόνες υπάρχουν ως συζυγή θεικών ή γλυκουρονιδίων τα οποία είναι πολύ πολικά για να αναλυθούν με GC-MS (Cook-Botelho et al., 2017).

Πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η καταλληλότητα για ανίχνευση πτητικών μεταβολιτών, η υψηλή επαναληψιμότητα στους χρόνους κατακράτησης και η ύπαρξη παγκοσμίων βάσεων δεδομένων και βιβλιοθηκών φασμάτων που διευκολύνουν την ταυτοποίηση των δομών. Αντίθετα κύριο μειονέκτημα είναι ότι μη πτητικοί και οι θερμικά ασταθείς μεταβολίτες είναι ακατάλληλοι. Επίσης η προκατεργασία δειγμάτων πριν την ανάλυση είναι απαιτητική και συχνά απαιτεί τεχνικές παραγωγοποιήσεις όπως αλκυλίωση, ακυλίωση και σιλυλίωση (Ren et al., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

2.1 Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού με την οποία ένα δείγμα διαχωρίζεται στα συστατικά του μέσω καταμερισμού, προσρόφησης ή άλλων αλληλεπιδράσεων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Η διαδικασία διεξάγεται μεταξύ δυο φάσεων, της στατικής φάσης και της κινητής φάσης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) η οποία αρχικά έγινε διαθέσιμη στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Kuriec et al., 2013) αποτελεί εξελιγμένη μορφή της LC στην οποία η κινητή φάση αντλείται με την βοήθεια υψηλής πίεσης και ρέει μέσα από στήλες με μικρά σωματίδια. Σήμερα η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC) είναι η πιο πρόσφατη εξέλιξη της HPLC. Σημαντικά πρόσωπα που διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία αυτή είναι ο James Jorgenson με την ομάδα του και ο Milton Lee έως το 2004 που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το πρώτο εμπορικό σύστημα από την εταιρία Waters (Dong, 2019a). Η HPLC και η UHPLC μοιράζονται τις περισσότερες αρχές λειτουργίας, ωστόσο η UHPLC χρησιμοποιεί εξοπλισμό με πολύ υψηλές πιέσεις και στήλες με μικρά σωματίδια επιτυγχάνοντας ταχύτερο διαχωρισμό συστατικών ενός δείγματος με υψηλότερη απόδοση (Dong, 2019b).

Τα συστατικά ενός μίγματος ουσιών κατά την διέλευση τους από μια χρωματογραφική στήλη κατανέμονται και αλληλοεπιδρούν διαφορετικά ανάμεσα στην κινητή και την στατική φάση. Η συγγένεια που παρουσιάζουν τα συστατικά του εκάστοτε δείγματος προς τις δυο αυτές φάσεις εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως :

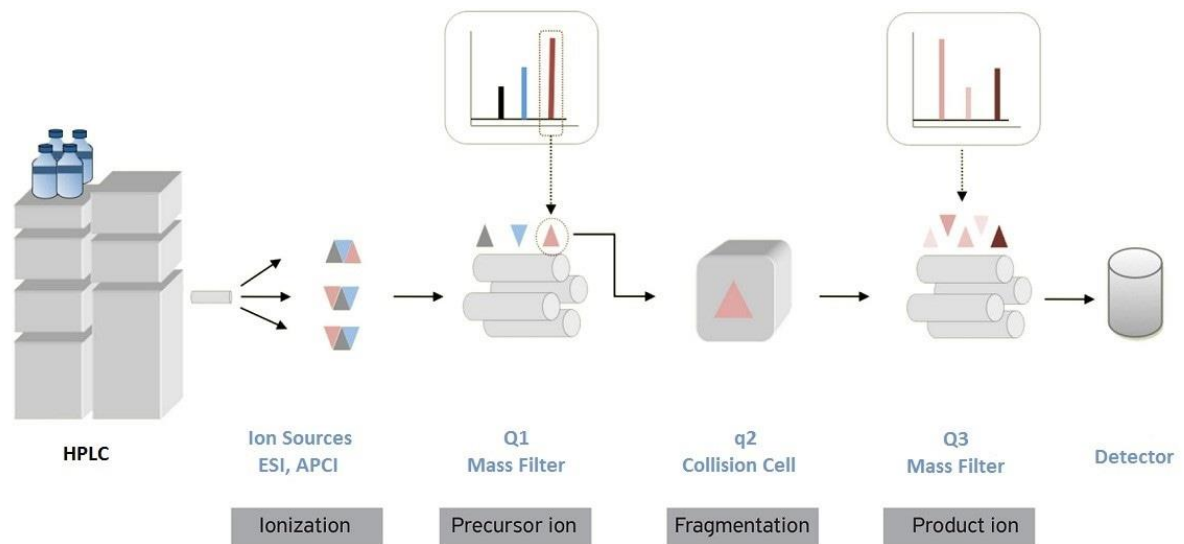
- Τα διαφορετικά μεγέθη των μορίων
- Το φορτίο
- Η πολικότητα
- Η διαλυτότητα

2.2 Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές με ευρεία εφαρμογή σε πολλούς κλάδους της επιστήμης και της έρευνας. Είναι η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στην συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) (Θεοδωρίδης, 2015a).

2.3 Συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών

Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας αποτελεί μια ισχυρή αναλυτική τεχνική και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε αντίθεση με άλλες τεχνικές αυξάνοντας έτσι την διαγνωστική της αξία και τελικά την καλύτερη παροχή υπηρεσιών σε ασθενείς. Πλεονέκτημα του συνδυασμού αυτών των δυο τεχνικών είναι ο μικρός όγκος δειγμάτων που απαιτείται και η δυνατότητα μέτρησης πολλών αναλυτών ταυτόχρονα σε πολύπλοκα βιολογικά υγρά. Πλεονεκτεί έναντι των ανοσοδοκιμασιών και βρίσκει μεγάλη εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένους αναλυτές δεν μπορούν να δημιουργηθούν. Η υψηλή ειδικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής και οφείλεται στην θραυσματοποίηση και την παρακολούθηση των ιόντων στα τετράπολα του φασματογράφου μάζας. Αυτό συμβάλει σημαντικά στο ζήτημα της διασταυρούμενης δραστηριότητας και στα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που μπορεί να προκύψουν κατά την ανάλυση με ανοσοδοκιμασίες. Επίσης παρέχει ευελιξία καθώς οι περισσότερες μέθοδοι LC-MS/MS αναπτύσσονται συνήθως από το ίδιο το εργαστήριο. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας όπως προαναφέρθηκε, η LC-MS/MS υπερτερεί στην ανάλυση πολικών, θερμικά ασταθών και μη πτητικών μορίων καθώς απλοποιείται και η προκατεργασία των δειγμάτων διότι παραλείπεται η διαδικασία της παραγωγοποίησης η οποία εφαρμόζεται σε αναλύσεις με GC-MS (Leung & Fong, 2014).



Εικόνα 1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας με φασματογραφία μάζας τριπλού τετραπόλου (<https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm>)

Έως σήμερα τα εργαστήρια κλινικής χημείας χρησιμοποιούν την φασματομετρία LC-MS/MS για ποσοτικοποίηση μορίων μικρού μοριακού βάρους σε δείγματα αίματος και ούρων. Πρωτεΐνες πεπτίδια και μεγάλα μόρια δυσχεραίνουν την ανάλυση γιατί είναι απαραίτητη η απομάκρυνση τους από το δείγμα με τις υπάρχουσες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων. Μερικά από τα πρόβλημα που δημιουργούν είναι το μπλοκάρισμα των στηλών HPLC και η δημιουργία θορύβου στο αποτέλεσμα της ανάλυσης (Vogeser & Kirchhoff, 2011). Η ευαισθησία και η ειδικότητα αποτελούν δυο πολύ σημαντικούς παράγοντες για την βιοανάλυση. Είναι ευρέως αποδεκτό πως η ποσοτικοποίηση μικρών μορίων με την χρήση LC-MS εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις η ανεπαρκής ευαισθησία που παρατηρείται εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης των αναλυτών στο βιολογικό δείγμα και οι κακές αποκρίσεις τους στον φασματογράφο μάζας αποτελούν ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Η εξαιρετική ειδικότητα είναι επίσης ένα κύριο χαρακτηριστικό της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ωστόσο οι παρεμβολές που παρατηρούνται από ισομερείς ενώσεις ή χημικούς θορύβους αποτελούν προβλήματα που θα πρέπει να αντιμετωπίζονται καθώς εμποδίζουν την ανίχνευση των μορίων-στόχων (S. Shen et al., 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΝΕΚΡΟΤΟΜΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

- ΑΙΜΑ
- ΟΥΡΑ
- ΞΗΡΑ ΚΗΛΙΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ
- ΙΔΡΩΤΑΣ
- ΣΑΛΙΟ
- ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ
- ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ



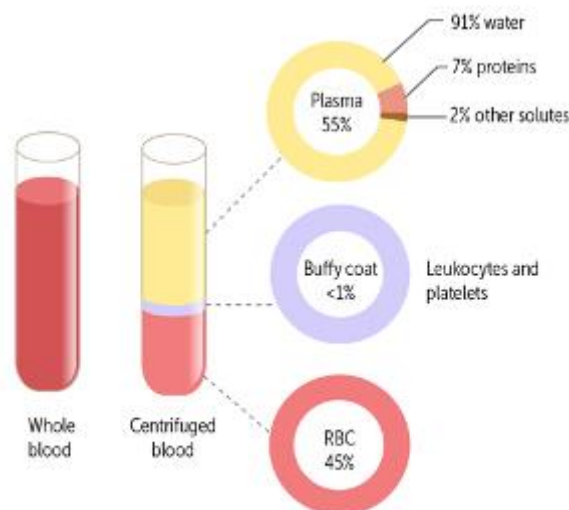
3.1 Αίμα

Ένα από τα σπουδαιότερα βιολογικά υλικά του ανθρωπίνου σώματος είναι το αίμα. Πρόκειται για το σημαντικότερο υγρό του οργανισμού και κυκλοφορεί στην καρδιά και στο αγγειακό σύστημα που περιλαμβάνει τις φλέβες, τις αρτηρίες και τα τριχοειδή αγγεία. Είναι ένα ελαφρώς βασικό και παχύρευστο υγρό με ιδιαίτερη οσμή το χρώμα του οποίου είναι έντονο κόκκινο στις αρτηρίες και σκούρο κόκκινο στις φλέβες. Το ανθρώπινο αίμα αποτελεί το 7,5-10% του σωματικού βάρους με όγκο περίπου 5 λίτρα και διακρίνεται σε δυο κατηγορίες.

- Τα έμμορφα συστατικά (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια)
- Το πλάσμα

Το πλάσμα αίματος είναι ένα υποκίτρινο υγρό και αποτελείται κατά 90% περίπου από νερό. Είναι το μέσο μεταφοράς διαφόρων ουσιών που χρησιμεύουν σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Μεταφέρει θερμότητα και περιλαμβάνει πρωτεΐνες, ορμόνες, ένζυμα, βιταμίνες και αντισώματα καθώς επίσης και προϊόντα καταβολισμού ουσιών με σκοπό την απομάκρυνση τους από τον οργανισμό (Ιωαννίδου- Φιλοκόστα & Βραχλής, 2012).

Ο ορός αίματος αποτελεί ίδιας σύστασης υγρό με το πλάσμα με την διαφορά ότι στερείται ινωδογόνο.



Εικόνα 2 Σύσταση αίματος (<https://usmle-rx.com/podcast/plasma-composition/>)

Το ολικό αίμα, το πλάσμα και ο ορός είναι από τα κυριότερα βιολογικά δείγματα που αναλύονται στα κλινικά εργαστήρια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο αίμα υπάρχει αφθονία λιπιδίων και πεπτιδίων σε αντίθεση με άλλα βιολογικά υγρά (Gika & Theodoridis, 2011). Πληροφορίες από την βάση δεδομένων ανθρωπίνου μεταβολισμού (Human Metabolome Database, HMDB) αναφέρουν πως στο αίμα ο αριθμός των μεταβολιτών ανέρχεται στους 40678. (*Human Metabolome Database: Browsing Metabolites*, n.d.; Wishart et al., 2022)

Σύμφωνα με τον Flanagan, στα τοξικολογικά εργαστήρια, είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά λόγω της εύκολης συλλογής του αίματος αλλά και λόγω του ότι είναι πιο χρήσιμο για ποσοτικές αναλύσεις που μπορεί να καταδεικνύουν το μέγεθος δηλητηριάσεων (Flanagan et al., 2008).

Σε παγκόσμιο επίπεδο το αίμα αποτελεί το προτιμότερο βιολογικό υλικό για τοξικολογική ανάλυση μεταθανάτιων περιστατικών όταν είναι εφικτή η συλλογή του και όσο το δυνατόν πιο σύντομα από την στιγμή του θανάτου. Αυτό παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ύπαρξη φαρμάκων στο σώμα και καταδεικνύει πιθανές φαρμακολογικές επιδράσεις του στον οργανισμό. Το ολικό αίμα προτιμάται έναντι του ορού ή του πλάσματος διότι στην βιβλιογραφία ιατροδικαστικής τοξικολογίας υπάρχουν περισσότερες αναφορές που σχετίζονται με αυτό το είδος δείγματος. Εν αντιθέσει ο ορός και το πλάσμα προτιμώνται κάποιες φορές διότι τα αποτελέσματα είναι πιο συγκρίσιμα με αποτελέσματα κλινικών περιστατικών.

Το μεταθανάτιο αίμα όταν υπάρχει η δυνατότητα πρέπει να συλλέγεται από περιφερικό σημείο όπως χέρι ή πόδι. Δείγμα αίματος από την καρδιά ή από κάποιο άλλο σημείο της κεντρικής κυκλοφορίας καλό είναι να αποφεύγεται διότι υπάρχει η πιθανότητα επιμόλυνσης από φάρμακα και ουσίες που διαχέονται μέσω της γαστρεντερικής οδού ή άλλων γειτονικών οργάνων. Το περιφερικό αίμα δεν είναι απίθανο να περιέχει ουσίες λόγω της διάχυσης που οφείλεται στο φαινόμενο της μεταθανάτιας ανακατανομής ωστόσο οι πιθανότητες είναι σημαντικά μικρότερες σε αντίθεση με το αίμα κεντρικής κυκλοφορίας. Κατά την συλλογή δείγματος και για να αποφευχθούν τα φαινόμενα αποσύνθεσης και πήξης του αίματος το αίμα πρέπει να συλλέγεται σε σωληνάρια με τουλάχιστον 1% w/v φθόριο (Drummer, 2010).



*Εικόνα 3 Σωληγάριο συλλογής αίματος BD Vacutainer με φθοριούχο νάτριο και οξαλικό κάλιο.
(<https://www.mtshs.com/vacutainer-blood-collection-tubes-5-ml-gray.html>)*

3.2 Ούρα

Τα ούρα είναι το σύνολο των υδατοδιαλυτών ουσιών που αποβάλλονται από το σώμα διάμεσου των νεφρών και των οργάνων του ουροποιητικού συστήματος. Είναι ένα βιολογικό υγρό υψηλής περιεκτικότητας σε νερό (περίπου 95%) (Helmenstine, n.d.). Αποτελείται κυρίως από ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και η ποσότητα πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων μεγάλων μορίων είναι σχετικά χαμηλή λόγω της σπειραματικής διήθησης. Η σύσταση τους δεν είναι σταθερή διότι επηρεάζεται από την πρόσληψη νερού στον οργανισμό και την σύσταση της τροφής. Φυσιολογικά περιέχουν κυρίως χλώριο, κάλιο, νάτριο, διάφορα άλατα και διάφορες άλλες οργανικές και ανόργανες ουσίες όπως ορμόνες, ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, παραπροϊόντα μεταβολισμού κα. Τα ούρα είναι ένα βιολογικό υλικό που προτιμάται περισσότερο για προσυμπτωματικό έλεγχο λόγω του μεγάλου διαθέσιμου όγκου δείγματος καθώς επίσης και της υψηλής συγκέντρωσης σε ξενοβιοτικά και μεταβολίτες που μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από ώρες έως αρκετές ημέρες μετά την έκθεση ή κατανάλωση αυτών. Εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης σε μακρομόρια η προκατεργασία των ούρων για ανάλυση με φασματομετρία LC-MS/MS συνήθως είναι απλούστερη. Η πιο κοινή, απλή και γρήγορη μέθοδος προκατεργασίας είναι η αραιώση. Η αραιώση γίνεται κυρίως με νερό ή ισχυρούς πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο (A. W. Jones, 2006; Kohler & Guillaume, 2014).

Στα πλεονεκτήματα ανάλυσης ούρων περιλαμβάνονται η ευκολία λήψης και μη παρεμβατική συλλογή του δείγματος. Επίσης προτιμάται λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων μητρικών ουσιών και των μεταβολιτών τους.

3.3 Ξηρά κηλίδα αίματος

Η τεχνική ανάλυσης ξηρών ή αποξηραμένων κηλίδων (Dried blood spot, DBS) αίματος χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση. Έχει εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία όπως τοξικοκινητικές και φαρμακοκινητικές μελέτες όπως επίσης και για διερεύνηση συγγενών μεταβολικών νοσημάτων και διαταραχών λυσοσωμικής αποθήκευσης. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ο μικρός όγκος δείγματος (10-50μl) και το χαμηλό κόστος όσο αναφορά την μεταφορά και αποθήκευση του δείγματος. Η συντήρηση των DBS κυμαίνεται από εβδομάδες μέχρι μήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή και μακροχρόνια σε συνθήκες κατάψυξης. Προϋπόθεση είναι η σωστή ξήρανση του δείγματος στο κατάλληλο διηθητικό χαρτί. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ένα αξιόλογο υλικό για μελέτη και διάγνωση νόσων όπως ο διαβήτης τύπου 2 με LC-MS/MS. Επιπρόσθετα στον κλάδο της τοξικολογίας έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι με την τεχνική αυτή για ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους όπως κοκαΐνη, μεθαδόνη, φαιντανύλη κα. γεγονός που καθιστά τις DBS ως ένα εναλλακτικό ή πρόσθετο βιολογικό υλικό για διερεύνηση μεταθανάτιων περιστατικών στην δικαστική τοξικολογία (Malsagova et al., 2020; Σαμανίδου, 2015a).



Εικόνα 4 Ξηρές κηλίδες αίματος σε κατάλληλο διηθητικό χαρτί (<https://www.bioanalysis-zone.com/spotlights/what-is-the-future-of-dried-blood-spots>)

3.4 Ιδρώτας

Ο ιδρώτας είναι ένα διαυγές και υπότονο υγρό που εκκρίνεται από τους εκκρίνεις και αποκρινείς ιδρωτοποιούς αδένες της επιφάνειας του σώματος. Έχει ελαφρώς όξινο pH (4-6.8) και αποτελείται κυρίως από νερό σε ποσοστό 99% καθώς και ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες, αμινοξέα και διάφορα ξενοβιοτικά. Παράγονται καθημερινά περίπου 300-700ml ιδρώτα ενώ σύμφωνα με έρευνα έχει αναφερθεί ο μέγιστος όγκος απέκκρισης να είναι περίπου 2 λίτρα σε υγιή άτομα και το διπλάσιο σε αθλητές.

Ως βιολογικό υγρό χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό χλωρίου για την διάγνωση της κυστικής ίνωσης. Σε έρευνες που έχουν γίνει για αναζήτηση μεταβολομικών βιοδεικτών με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας έχει δειχθεί ότι η ανάλυση μετά από αραίωση είναι αρκετή όπως και το ότι η προκατεργασία του δείγματος με την χρήση στηλών C18 SpinColumn SPE αυξάνει την ευαισθησία της ανάλυσης και μειώνει τις παρεμβολές (Calderón-Santiago et al., 2014). Μπορεί να συλλεχθεί εύκολα και μη επεμβατικά όχι όμως ποσοτικά πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να εφαρμόζεται για ποιοτική τοξικολογική ανάλυση. Λόγω της φαρμακοκινητικής, μικρές ποσότητες κυρίως βασικών φαρμάκων απεκκρίνονται με τον ιδρώτα και συσσωρεύονται εκεί περισσότερο απ ότι στο αίμα εξαιτίας της διαφοράς του pH των δυο αυτών βιολογικών υγρών. Η συλλογή του ιδρώτα γίνεται με ειδικά έμπλαστρα. Η μακροπρόθεσμη χρήση αυτών των επιθεμάτων επιτρέπει την ανίχνευση ουσιών έως και 4 εβδομάδες μετά την αρχική χορήγηση αυτών. Επιπλέον διάφορα μέταλλα τοξικά ή μη, μπορούν να εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία μέσω του δέρματος όπου εκεί διαλυτοποιούνται στον ιδρώτα. Αυτό σημαίνει ότι η ανάλυση σε δείγματα αίματος και ούρων μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν σωστά την δερματική απορρόφηση η οποία εκφράζεται καλύτερα στον ιδρώτα (Dinis-Oliveira et al., 2010; Luque De Castro, 2016).



Εικόνα 5 Επιθέματα ιδρώτα για ανίχνευση φαρμάκων (<https://www.alcopro.com/product/sweat-patch-drug-test-system/>)

3.5 Σίελος

Ο σίελος ή σάλιο είναι ένα βιολογικό υλικό που αποτελεί έκκριμα των μεγάλων σιελογόνων αδένων δηλαδή από τις παρωτίδες και τους υπογνάθιους και υπογλώσσσιους αδένες καθώς επίσης και από άλλους μικρότερους αδένες που βρίσκονται διάσπαρτοι στον βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας. Πρόκειται για ένα διαυγές υγρό με ελαφρώς όξινο pH (6.0-7.0) και ο μέσος παραγόμενος όγκος του καθημερινά είναι περίπου 1-1,5 λίτρα. Αποτελείται από νερό, ανόργανα συστατικά, ένζυμα, ορμόνες, αντισώματα, αυξητικούς παράγοντες, αντιμικροβιακά συστατικά αλλά και πρωτεΐνες που εισέρχονται στο σάλιο μέσω διακυτταρικών και παρακυτταρικών οδών. Σύμφωνα με έρευνες το σάλιο αντανακλά την κατάσταση υγείας και ασθένειας αφού οι διάφορες ενώσεις που βρίσκονται στο αίμα είναι παρούσες και στο σάλιο. Συγκριτικά με το αίμα οι συγκεντρώσεις των ενώσεων είναι σε χαμηλότερη συγκέντρωση από ότι στο σάλιο ωστόσο αυτός ο περιορισμός δεν υφίσταται πλέον λόγω της ανάπτυξης νέων και ιδιαίτερα ευαίσθητων τεχνικών (Lee & Wong, 2009).

Κύριο πλεονέκτημα αυτού του βιολογικού δείγματος είναι η εύκολη και μη επεμβατική δειγματοληψία. Η συλλογή, η αποθήκευση και η διαχείριση του σάλιου είναι ευκολότερη σε σύγκριση με τα δείγματα αίματος και ούρων. Άλλο ένα πλεονέκτημα είναι ο ασφαλέστερος χειρισμός του σάλιου από επαγγελματίες υγείας εφόσον μειώνονται οι πιθανότητες έκθεσής τους σε αιματογενείς ασθένειες.

Σήμερα αναλύσεις σάλιου χρησιμοποιούνται για παρακολούθηση ασθενειών όπως λοιμώξεις από HIV, ηπατίτιδες A, B και C, παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων και ανίχνευση ναρκωτικών. Επιπρόσθετα σε αναλύσεις με UHPLC-MS/MS μπορούν να προσδιοριστούν επίπεδα κορτιζόλης (Alvi & Hammami, 2019).

3.6 Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι ένα βιολογικό υλικό που κυκλοφορεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Πιο συγκεκριμένα γεμίζει τις κοιλίες του εγκεφάλου, τον υπαραχνοειδή χώρο του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Το ENY είναι άχρωμο και διαυγές υγρό. Παράγεται κυρίως από τα χοριοειδή πλέγματα των κοιλιών του εγκεφάλου και σε μικρότερο ποσοστό από τον διάμεσο

εγκέφαλο αλλά και από την εγκεφαλική ουσία μέσω των περιαγγειακών χώρων. Ο ρυθμός παραγωγής του κυμαίνεται από 400 έως 600 ml ημερησίως ενώ ο μέσος όγκος του είναι 150 ml , 125ml στον υπαραχνοειδή χώρο και 25ml στις κοιλίες (Sakka et al., 2011; Tashjian et al., 2019; Tumanı et al., 2017).

Οι κύριες λειτουργίες του είναι 4: (Πλαγεράς & Παπαϊωάννου, 2012)

- Φυσική υποστήριξη του ΚΝΣ
- Απεκκριτική λειτουργία
- Μεταφορά ουσιών μέσα στο ΚΝΣ
- Έλεγχος του χημικού περιβάλλοντος του ΚΝΣ

Ο όγκος του ΕΝΥ ανανεώνεται περίπου 3-5 φορές ημερησίως και τα συστατικά του προέρχονται κυρίως σε ποσοστό 80 % από το αίμα μέσω διήθησης και το υπόλοιπο 20 % είναι από μόρια ενδορραχιαίας και εγκεφαλικής προέλευσης

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται η φυσιολογική σύσταση του ΕΝΥ υπό φυσιολογικές συνθήκες.

ΣΥΣΤΑΣΗ	ΜΟΝΑΔΕ Σ	ΕΝΥ	ΠΛΑΣΜΑ	ΕΝΥ:ΠΛΑΣΜ Α
Οσμωτικότητα	mOsm/L	295	295	0
H ₂ O		99%	93%	
Na ⁺	mEq/L	138	138	1.0
K ⁺	mEq/L	2.8	4.5	0.6
Cl ⁻	mEq/L	119	102	1.2
Ca ⁺	mEq/L	2.1	4.8	0.4
pCO ₂	mmHg	47	41*	1.1
pH		7.33	7.41	
pO ₂	mmHg	43	104*	0.4
Σάκχαρο	mg/dL	60	90	0.67
Γαλακτικό	mEq/L	1.6	1.0*	1.6
Πυροσταφυλικό	mEq/L	0.08	0.11*	0.73
Ολική πρωτεΐνη†	mg/dL	35	7000	0.005
Αλβουμίνη	mg/dL	155	36600	0.004
IgG	mg/dL	12.3	9870	0.001

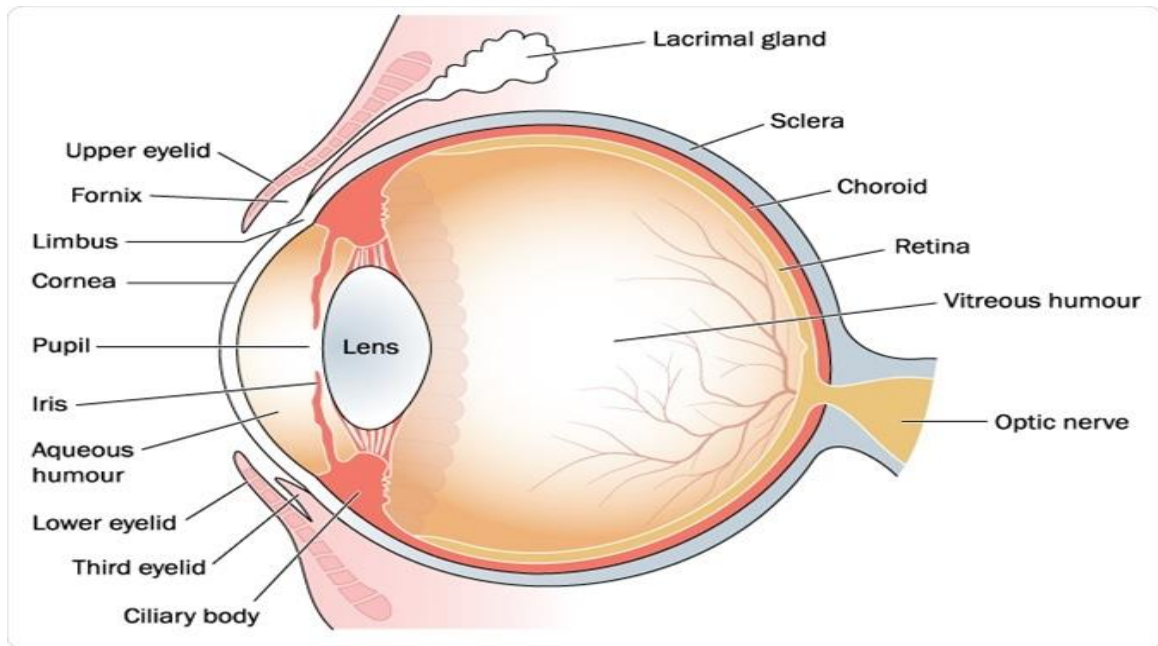
Εικόνα 6 Σύσταση ΕΝΥ (Fishman RA. *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company, 1980)

Στον κλάδο της τοξικολογίας το ENY αποτελεί χρήσιμο βιολογικό υπόστρωμα για την διερεύνηση ουσιών στο ΚΝΣ κατά την στιγμή του θανάτου όπως επίσης και για την μέτρηση αιθανόλης σε περίπτωση απουσίας άλλων δειγμάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ολικός όγκος του μεταβάλλεται περίπου 72 ώρες μετά τον θάνατο λόγω απορρόφησης τού από ιστούς που το περιβάλλουν (Flanagan et al., 2008; Σαμανίδου, 2015a) . Κατά την νεκροτομή συλλέγεται όλος ο όγκος του ENY μέσω παρακέντησης της παρεγκεφαλονωτιαίας δεξαμενής ή οσφυϊκής παρακέντησης. Επίσης μπορεί να ληφθεί και μετά από διατομή του εγκεφαλικού φλοιού (Garland et al., 2018).

3.7 Υαλοειδές υγρό

Το υαλοειδές υγρό εντοπίζεται στην περιοχή των ματιών και πιο συγκεκριμένα ανάμεσα από τον φακό του ματιού και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Είναι διαυγές, άχρωμο και παχύρευστο υγρό αποτελούμενο κατά 98% περίπου από νερό και μια μίξη από κολλαγόνο, άλατα, σάκχαρα και πρωτεΐνες. Η ποσότητα του υγρού αυτού που μπορεί να συλλεχθεί από κάθε οφθαλμό είναι περίπου 2-3 ml και πρέπει να τοποθετείται σε ξεχωριστά δοχεία συλλογής. Η απόσταση του από κοιλιακά και θωρακικά όργανα το καθιστά ένα βιολογικό υγρό που μπορεί να είναι χρήσιμο για διερεύνηση μεταθανάτιων περιστατικών. Εξαιτίας της περικλειστής θέσης στην οποία βρίσκεται είναι λιγότερο πιθανό να επηρεαστεί από σήψη, μόλυνση ή από το φαινόμενο μεταθανάτιας ανακατανομής. Το υαλοειδές υγρό μπορεί να είναι λιγότερο επιρρεπές στην μεταθανάτια παραγωγή αιθανόλης χρήσιμο όμως όταν υπάρχουν υποψίες για μεταβολές που οφείλονται σε σήψη (S. Jones et al., 2022).

Λαμβάνεται από πτώματα στα οποία έχει επέλθει σήψη η αποσύνθεση, σε καμένα πτώματα και σε περίπτωση απουσίας ουρών. Η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται και από τους δυο οφθαλμούς και θα πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την λήψη διότι με ακατάλληλους χειρισμούς μπορεί να υπάρξει αλλαγή στην συγκέντρωση των διαφόρων αναλυτών που περιέχει. Σύμφωνα με τον Flanagan η συντήρηση του δείγματος γίνεται με την προσθήκη 2% w/v φθοριούχου νατρίου. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση αλκοολών, διγοξίνης, λιθίου καθώς και για την διερεύνηση θανάτων που έχουν σχέση με τον διαβήτη και την ινσουλίνη. Διάφορες τοξικές ουσίες και οι μεταβολίτες τους μπορούν συχνά να εκχυλιστούν από το υαλοειδές υγρό όπως σαν να ήταν σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Flanagan et al., 2008).



Εικόνα 7 Σχεδιάγραμμα οφθαλμού όπου διακρίνεται η θέση του υαλοειδούς υγρού (<https://moodyeyes.com/what-is-included-in-an-eye-exam/>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η προαναλυτική επεξεργασία των βιολογικών υγρών αποτελεί μια πολύ σημαντική διαδικασία κατά την οποία τα δείγματα υφίστανται την κατάλληλη τροποποίηση και προετοιμασία με διάφορες τεχνικές με σκοπό την ανάλυση με φασματομετρία LC-MS/MS (Σαμανίδου, 2015b). Σήμερα η αυτοματοποίηση διαδικασία (online) στην προκατεργασία των δειγμάτων έχει συμβάλει στην ελαχιστοποίηση σφαλμάτων καθώς και στο κόστος και στον χρόνο εργασίας σε αντίθεση με offline διαδικασίες. Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με φασματομετρία LC-MS/MS σπανίως βρίσκονται σε κατάσταση που να αποδώσουν τα επιθυμητά αποτελέσματά. Οι αναλύτες που αναζητούνται συνυπάρχουν με άλλες ουσίες μέσα στα πολύπλοκα υποστρώματα των δειγμάτων κάτι που καθιστά αναγκαίο τον καθαρισμό του δείγματος και την προσυγκέντωση του.

Στόχοι της προετοιμασίας των δειγμάτων είναι η διαλυτοποίηση και η ομογενοποίηση των αναλυτών, η διάσπαση των πρωτεϊνικών δεσμών, η προσθήκη εσωτερικού προτύπου, και η αφαίρεση παρεμποδίσεων που υπάρχουν στο υπόστρωμα. Επίσης η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί με προσυγκέντωση ή αραιώση αντίστοιχα κάτι το οποίο οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας αλλά και στην επίτευξη χαμηλότερου ορίου ανίχνευσης. Κατά την εκχύλιση αναλυτών, τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αλλά και την ανίχνευση του αναλύτη σημαντικό ρόλο παίζει και η σταθεροποίηση, η αποσύνθεση ή η παραγωγοποίηση του (Flanagan et al., 2008).

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής για την προκατεργασία των δειγμάτων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη (η πολικότητα, το φορτίο, η θερμική σταθερότητα, το μοριακό βάρος). Η συγκέντρωση του αναλύτη ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικό και επιθυμητό LOQ και γνωστές αναλυτικές προκλήσεις όπως η ευαισθησία είναι στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή της τεχνικής που θα εφαρμοστεί. Επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ο όγκος της καθημερινής εργασίας και ο διαθέσιμος εξοπλισμός του εργαστηρίου (Shen et al., 2017).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μια κατηγοριοποίηση που μπορεί να γίνει στις τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων είναι σε τεχνικές για απομάκρυνση πρωτεϊνών, σε τεχνικές εκχύλισης και σε άμεσες βιοαναλυτικές τεχνικές.

Protocol	Analyte concentration ^a	Relative cost	Relative complexity	Relative matrix depletion
Dilution	No	Low	Simple	Less
Protein precipitation	No	Low	Simple	Least
Phospholipid removal	No	High	Relatively simple	More ^b
Liquid-liquid extraction	Yes	Low	Complex	More
Supported-liquid extraction	Yes	High	Moderately complex	More
AC Extraction Plate	Yes	High	Relatively simple	More
Solid-phase extraction	Yes	High	Complex	More
Online SPE	Yes	High	Complex	More

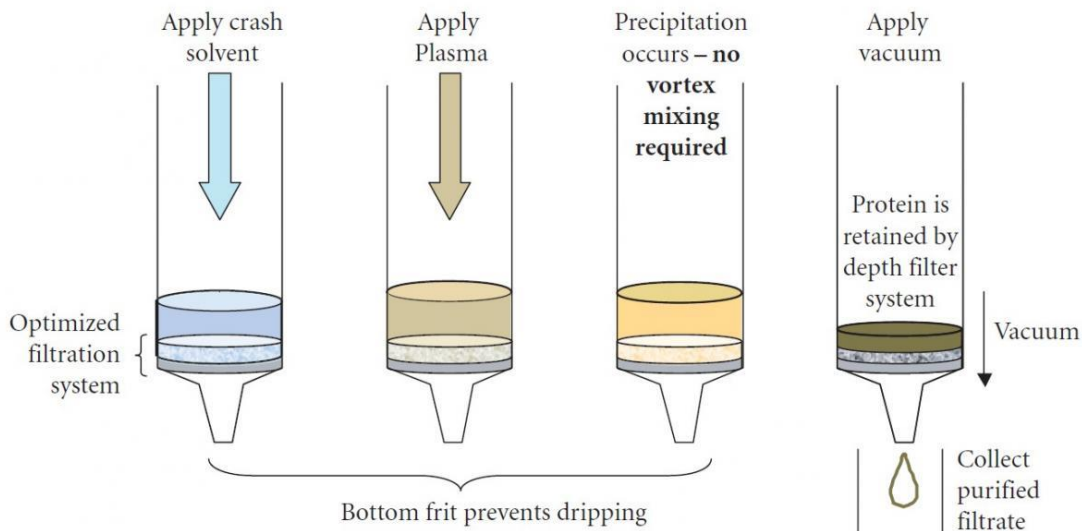
Εικόνα 8 Σύντομος οδηγός για την επιλογή τεχνικής προκατεργασίας δειγμάτων για ανάλυση με LC-MS/MS (A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology (<https://www.spectroscopyeurope.com/article/practical-guide-sample-preparation-liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry->))

4.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών

Η μετουσίωση πρωτεϊνών (Protein precipitation, PPT) είναι η πιο απλή μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων για βιολογικά υγρά, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη και έχει ως στόχο την απομάκρυνση των πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα όπως ούρα, πλάσμα ή ορός με σκοπό την ανάλυση τους με φασματομετρία LC-MS/MS. Οι δομές των πρωτεϊνών οι οποίες περιέχονται στα βιολογικά δείγματα, όταν έρχονται σε επαφή με έναν παράγοντα καταβύθισης μεταβάλλονται με αποτέλεσμα την συσσώρευση και την κατακρήμνιση τους. Αποτέλεσμα της μεταβολής αυτής είναι η απελευθέρωση στο διάλυμα των αναλυτών - στόχων οι οποίοι είναι προσδεμένοι στις πρωτεΐνες και η μεταφορά τους στην υπερκείμενη οργανική φάση με την βοήθεια της φυγοκέντρησης ή της διήθησης (W. Li et al., 2019).

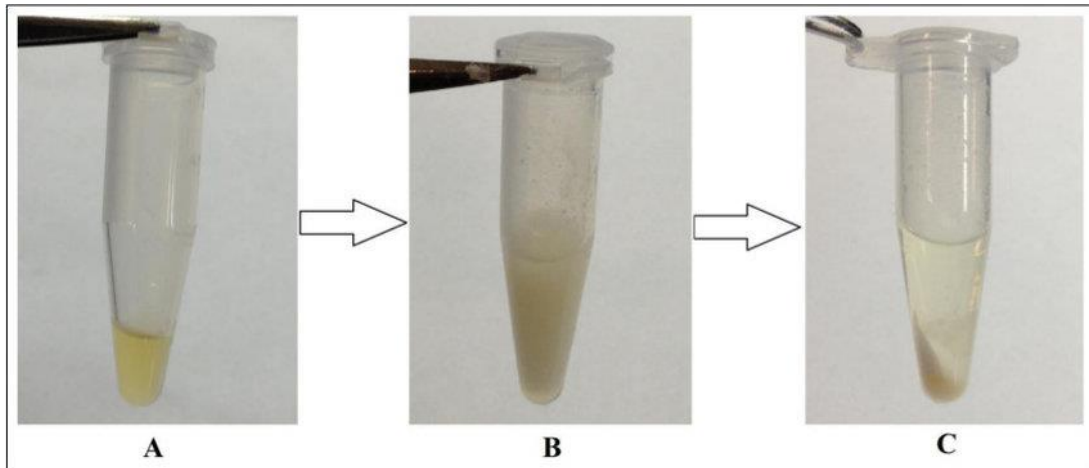
Κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έναντι άλλων όπως LLE ή SPE είναι η υψηλή ανάκτηση (θεωρητικά έως και 100%) που προσφέρει, αφού καταβυθίζονται οι πρωτεΐνες και οι διάφοροι αναλύτες παραμένουν στο διάλυμα. Η καταβύθιση πρωτεϊνών πραγματοποιείται κυρίως με οργανικούς διαλύτες αναμιξίμους με νερό. Μπορεί όμως να επιτευχθεί και με την προσθήκη οξέων, ιόντων μετάλλων και αλάτων. Οι χρησιμοποιούμενοι υδατοδιαλυτοί οργανικοί διαλύτες με σειρά αποτελεσματικότητας είναι το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, η αιθανόλη και η μεθανόλη με πιο συχνά χρησιμοποιούμενο το ακετονιτρίλιο. Το καθαρό ακετονιτρίλιο ως ισχυρός και γρήγορος παράγοντας καταβύθισης μπορεί να παρασύρει αναλύτες που είναι ισχυρά συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να καθιζάνουν με αποτέλεσμα χαμηλότερη ανάκτηση. Ωστόσο σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί ότι πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στον όγκο του διαλύτη που προστίθεται, γιατί η μεγαλύτερη ποσότητα ακετονιτρίλιου συγκριτικά με το πλάσμα που χρησιμοποιήθηκε οδήγησε σε υπερκείμενη φάση ουσιαστικά ελεύθερη από πρωτεΐνες (Wells, 2003). Με την προσθήκη κρύων οργανικών διαλυτών όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο σε συγκεκριμένη αναλογία καθώς έχει δείχτεί ότι η αναλογία 3:1 οργανικού διαλύτη και βιολογικού υγρού είναι αποτελεσματικότερη σε επίπεδο καθαρότητας δείγματος από ότι σε μικρότερη αναλογία (Gika & Theodoridis, 2011). Επιπρόσθετα αναλόγως με τον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιείται η καταβύθιση πρωτεϊνών αφαιρεί μέρος των φωσφολιπιδίων που υπάρχουν σε δείγματα ορού και πλάσματος. Σύμφωνα με έρευνες τα εκχυλίσματα με μεθανόλη περιέχουν 40% περισσότερα φωσφολιπίδια σε σύγκριση με εκχυλίσματα με ακετονιτρίλιο, όπως επίσης είναι λιγότερο καθαρά από εκχύλιση με τετραυδροφουράνιο ή

αιθανόλη. Η χρήση οξέων, θερμότητας καθώς και μεμβρανών υπερδιήθησης αποτελούν άλλους τρόπους για μετουσίωση πρωτεϊνών (Bylida et al., 2014a).



Εικόνα 9 Στάδια για καταβύθιση πρωτεϊνών([://www.proteinslides.cn/showMessage.shtml?message.id=351](http://www.proteinslides.cn/showMessage.shtml?message.id=351))

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα οξέα που έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη αποτελεσματικότητα για κατακρήμνιση πρωτεϊνών είναι το τριχλωροξικό (5–15%, TCA) και το υπερχλωρικό οξύ (6% PCA). Η οξίνιση του βιολογικού υποστρώματος μεταβάλλει δραστικά τις δομές των πρωτεϊνών με συνέπεια την δημιουργία συσσωματώματος το οποίο στην συνέχεια καθιζάνει. Το πλεονέκτημα της χρήσης οξέων είναι ότι μετά από φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση το υγρό που σχηματίζεται παραμένει αρκετά υδατικό ώστε να εγχυθεί απευθείας σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας. Αντίθετα λόγω του πολύ όξινου pH που προκύπτει στο δείγμα μπορεί να επηρεαστεί η σταθερότητα κάποιων αναλυόμενων ουσιών.



Εικόνα 10 Καταβύθιση πρωτεϊνών σε Eppendorf https://www.researchgate.net/figure/Formation-of-protein-pellet-during-protein-precipitation-step-A-100-l-of-human-plasma_fig5_264091174

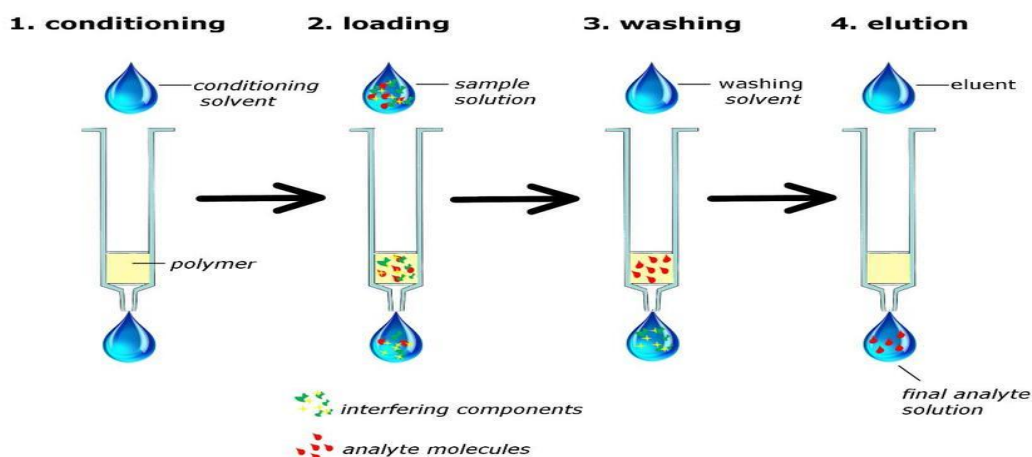
4.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE) αποτελεί μια τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που εφαρμόζεται ήδη από την δεκαετία του 1940 ενώ η εξέλιξη της σε διάφορες εφαρμογές σε πολλούς τομείς της επιστήμης ξεκίνησε από την δεκαετία του 1970 (Keçili et al., 2019).

Οι βασικές αρχές της SPE περιλαμβάνουν την ανακατανομή των προς εκχύλιση ουσιών ανάμεσα σε 2 φάσεις : α) την υγρή φάση (που αποτελεί το δείγμα) και την στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό. Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των ουσιών πρέπει αυτές να εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με τις ομάδες του στερεού υποστρώματος και η παραλαβή τους από το προσροφητικό υλικό γίνεται με την εφαρμογή των κατάλληλων διαλυτών. Η συγκράτηση και η έκλυση των αναλυτών εξαρτάται από τις διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ: α) των προς ανάλυση συστατικών, β) των ενεργών ομάδων της επιφάνειας του στερεού υποστρώματος, γ) της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος και δ) του διαλυτή. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τον εμπλουτισμό και τον καθαρισμό των αναλυτών στο προσροφητικό υλικό μέσω προσρόφησης από το διάλυμα (Σαμανίδου, 2015b).

Όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι 4:

1. Η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού της στήλης
2. Η φόρτωση του δείγματος στην στήλη
3. Η έκπλυση-καθαρισμός της στήλης για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσων ουσιών
4. Η έκλυση του δείγματος



Εικόνα 11 Στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης (https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE_fig2_320024643)

Οι μηχανισμοί της SPE χωρίζονται σε 4 κατηγορίες (Libretexts, n.d.)

- 1) SPE κανονικής φάσης
 - 2) SPE αντίστροφης φάσης
 - 3) SPE ιοντοανταλλαγής (κατιόντων, ανιόντων)
 - 4) SPE μικτής λειτουργίας
-
- 1) Η SPE κανονικής φάσης είναι τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως για αναλύτες με χαμηλή έως υψηλή πολικότητα ή είναι ουδέτεροι και βρίσκονται μέσα σε μη πολικό δείγμα. Οι στήλες περιέχουν ένα πολικό προσροφητικό όπως το διοξείδιο του πυριτίου. Ο διαχωρισμός των αναλυτών γίνεται με βάση την πολικότητα και οι λιγότερο πολικοί αναλύτες εκλύονται πρώτοι.
 - 2) Η SPE αντίστροφης φάσης εφαρμόζεται για αναλύτες με μέτρια έως χαμηλή πολικότητα και βρίσκονται σε υδατικό δείγμα. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση την υδροφοβικότητα και οι πιο πολικές ενώσεις εκλύονται πρώτες. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται συχνά διότι πολλοί αναλύτες είναι διαλυμένοι σε υδατικά δείγματα όπως πλάσμα και ούρα.
 - 3) Η SPE ιοντοανταλλαγής είναι μηχανισμός διαχωρισμού με βάση το φορτίο και εφαρμόζεται για αναλύτες που είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένοι. Οι αναλύτες

αυτοί είναι διαλυμένοι σε υδατικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος και εκλύονται πρώτοι οι πιο ασθενώς ιονισμένοι.

- 4) Η SPE μικτής λειτουργίας συνδυάζει ιδιότητες της SPE αντίστροφης φάσης και δεσμών υδρογόνων ή ιοντοανταλλαγής σε μια μόνο στήλη βελτιστοποιώντας τον διαχωρισμό. Πολλές φορές κατά τον καθαρισμό και την απομάκρυνση των παρεμποδίζουσων ουσιών απομακρύνονται και οι αναλύτες ενδιαφέροντος μειώνοντας έτσι την ανάκτηση. Η SPE μικτής λειτουργίας χρησιμοποιείται κυρίως για βασικές, όξινες ή ουδέτερες ενώσεις. Μπορεί να ενισχύσει την κατακράτηση των αναλυτών ή/και να μειώσει τις επιμολύνσεις από παρεμποδίζουσες ουσίες της μήτρας. Το συστατικό ιοντοανταλλαγής που βρίσκεται στο προσροφητικό υλικό επιτρέπει στις κατάλληλα φορτισμένες ουσίες να κατακρατούνται περισσότερο και ακολουθεί καθαρισμός του φυσιγγίου για απομάκρυνση ακαθαρσιών. Το pH του υγρού έκλουσης μπορεί να ρυθμιστεί για να μειωθεί το φορτίο στα μόρια των αναλυτών προκαλώντας την έκλουση τους. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός επιτρέπει και την αλλαγή της οργανικής συγκέντρωσης του διαλύτη έκλουσης και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επιλεκτική έκλουση.

Παραδείγματα SPE μικτής λειτουργίας είναι :

SPE αντίστροφης φάσης / ισχυρή ανταλλαγή κατιόντων

SPE αντίστροφης φάσης / ισχυρή ανταλλαγή ανιόντων

SPE αντίστροφης φάσης / ασθενής ανταλλαγή κατιόντων

SPE αντίστροφης φάσης / ασθενής ανταλλαγή ανιόντων

Προσροφητικά υλικά στην SPE. Τα συνήθη προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην SPE είναι άκαμπτα σωματίδια με ακανόνιστο σχήμα με σύνηθες μέγεθος από 40 μέχρι 60nm. Το μέγεθος αυτό επιτρέπει λογικούς ρυθμούς ροής κατά το στάδιο της φόρτωσης, της έκπλυσης και της έκλουσης σε αντίθεση με μικρότερα σωματίδια που απαιτούν μεγαλύτερη πίεση. Τα προσροφητικά υλικά διαμορφώνονται συνήθως είτε σε στήλη ή φυσίγγιο είτε σε μορφή πλακών. Στην περίπτωση όπου η προσροφητική επιφάνεια είναι σε μορφή πλακών, λόγω της μικρής διαδρομής που χρειάζεται το δείγμα να περάσει, απαιτείται συνολικά μικρότερη αντίσταση σε σύγκριση με αυτή των φυσιγγίων. Η χωρητικότητα ενός προσροφητικού υλικού στην SPE είναι ένα μικρό επί τοις 100 ποσοστό ενώσεων ανά μάζα προσροφητικού υλικού.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης οι στήλες που έχουν ως προσροφητικό υλικό το πυρίτιο παρουσιάζουν άριστη κατακράτηση φωσφολιπιδίων όταν η έκλουση γίνεται με 100% ακετονιτρίλιο ενώ με στάδιο πλύσης με διάλυμα μεθανόλης 50% ελήφθησαν επίσης καθαρά εκχυλίσματα το οποίο όμως επηρέασε την ανάκτηση πολικών αναλυτών. Σύμφωνα με έρευνα η έκλουση φωσφολιπιδίων με διάλυμα μεθανόλης 60,70,80% σε φαινύλιο, C8, C18 έδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με έρευνα που συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους προετοιμασίας δειγμάτων σε ότι αφορά την επίδραση της μήτρας του υποστρώματος και την ανάκτηση των αναλυτών μικτού τρόπου SPE ανταλλαγής ανιόντων είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με την LLE και την PPT για πολικούς και μη πολικούς αναλύτες στο πλάσμα. Συνολικά η SPE είναι πιο αποτελεσματική σε επίπεδο καθαρότητας δείγματος και έχει ευρύ φάσμα σε αναλύσεις LC-MS/MS.

4.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Microextraction, SPME) αποτελεί παραλλαγή της SPE. Εφαρμόζεται ως τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων από το 1990 και αναπτύχθηκε από τους (Arthur & Pawliszyn, 1990) με σκοπό να αντιμετωπιστούν μειονεκτήματα της SPE όπως η χρονοβόρα διαδικασία και η μεγάλη κατανάλωση διαλυτών (Hamidi et al., 2018). Με την SPME πτητικοί και μη πτητικοί αναλύτες σε διάφορα πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα μπορούν να προσυγκεντρωθούν και να διαχωριστούν ταυτόχρονα (Jalili et al., 2020; Zambonin & Aresta, 2021).

Κατά την τεχνική αυτή ένα υποστηρικτικό μέσο το οποίο φέρει την στατική φάση της εκχύλισης (επικαλυμμένη ίνα) εκτίθεται στο δείγμα για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ο προσδιοριζόμενος αναλύτης κατανέμεται ανάμεσα στην υδατική φάση (δείγμα) και στην στατική φάση ώσπου να επιτευχθεί μια ισορροπία προσρόφησης. Η ποσότητα της προσρόφησης αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο χρόνος προσρόφησης φτάνοντας μια σταθερή τιμή κατά την ισορροπία (Ouyang & Jiang, 2016).

Η δυναμική της απορρόφησης περιγράφεται από τον τύπο : (Σαμανίδου, 2015b)

$$n = [(K_{fs} \times V_f \times V_s) / (K_{fs} \times V_f + V_s)] C_o$$

όπου

n τα γραμμομόρια του αναλύτη που προσροφώνται από την στατική φάση

K_{fs} ο συντελεστής κατανομής ανάμεσα στην υδατική και την στατική φάση

V_s ο όγκος του δείγματος

V_f ο όγκος της ίνας

C_0 η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα

Η εξίσωση αυτή απαιτεί την ομοιογένεια του δείγματος και την μη απώλεια αναλυτών στην αέρια φάση. Επίσης βρίσκει εφαρμογή κυρίως για υγρή επίστρωση ίνας (όπως το PDMS) αλλά και για στερεές επιστρώσεις με την προϋπόθεση μικρών συγκεντρώσεων αναλυτών για την αποφυγή κορεσμού του πορώδους υλικού επίστρωσης.

Οι βασικοί τρόποι εφαρμογής της SPME είναι 3: (Jalili et al., 2020; Ouyang & Jiang, 2016)

1. Η εκχύλιση με απευθείας εμβάπτιση (Direct immersion- DI SPME) στην οποία η ίνα βυθίζεται στο δείγμα και οι προσδιοριζόμενες ουσίες μεταφέρονται απευθείας από το υπόστρωμα του δείγματος στο στατική φάση της ίνας.
2. Η εκχύλιση υπερκείμενου χώρου (Headspace-HS SPME) στην οποία οι πτητικές ή ημι-πτητικές ουσίες μεταφέρονται στην ίνα η οποία βρίσκεται στον χώρο πάνω από το δείγμα. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι παρεμβολές από μόρια μεγάλου μοριακού βάρους οδηγώντας σε καθαρότερα εκχυλίσματα και αυξημένη επιλεκτικότητα.
3. Η εκχύλιση προστατευόμενη από μεμβράνη (Membrane protected SPME) η οποία εφαρμόζεται για εκχύλιση μη πτητικών ενώσεων αλλά επίσης παρεμποδίζει την εκχύλιση μακρομορίων λόγω της επιλεκτικής πρόσβασης που έχει η μεμβράνη

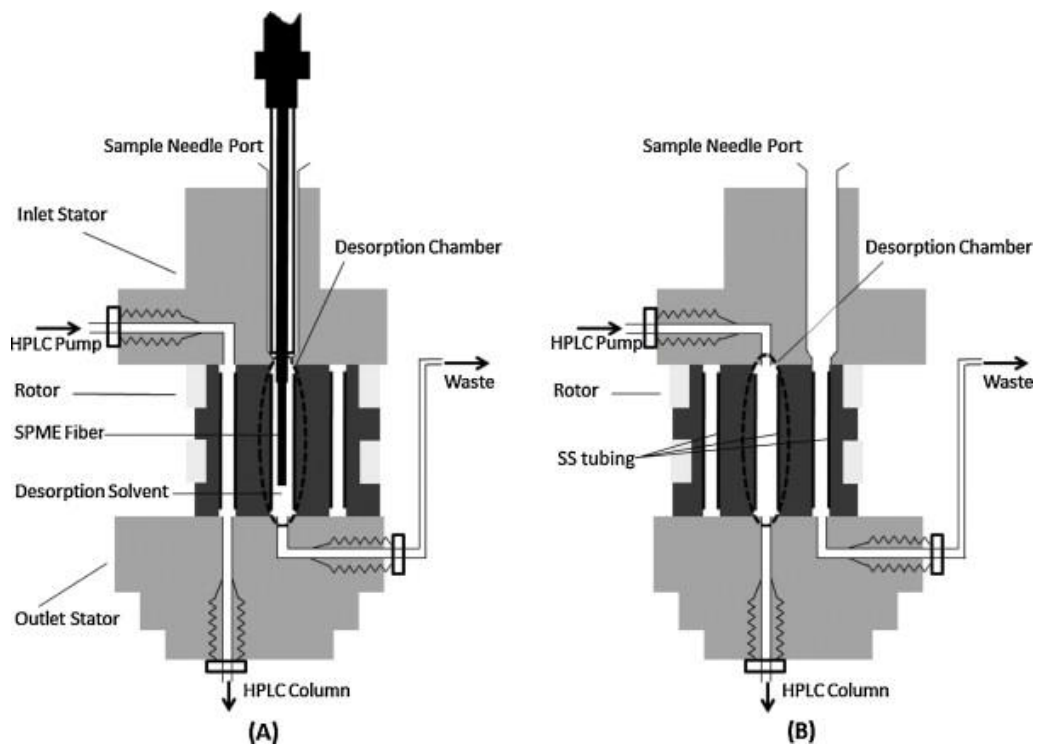
Τα πλεονεκτήματα της SPME με χρήση ίνας είναι: (Kataoka, 2015)

- Η απλή λειτουργία και ο εύκολος αυτοματισμός
- Η ταχύτητα
- Η εξάλειψη διαλυτών
- Η υψηλή ευαισθησία
- Ο μικρός όγκος δειγμάτων που απαιτείται
- Το χαμηλό κόστος

Τα μειονεκτήματα της SPME με χρήση ίνας είναι:

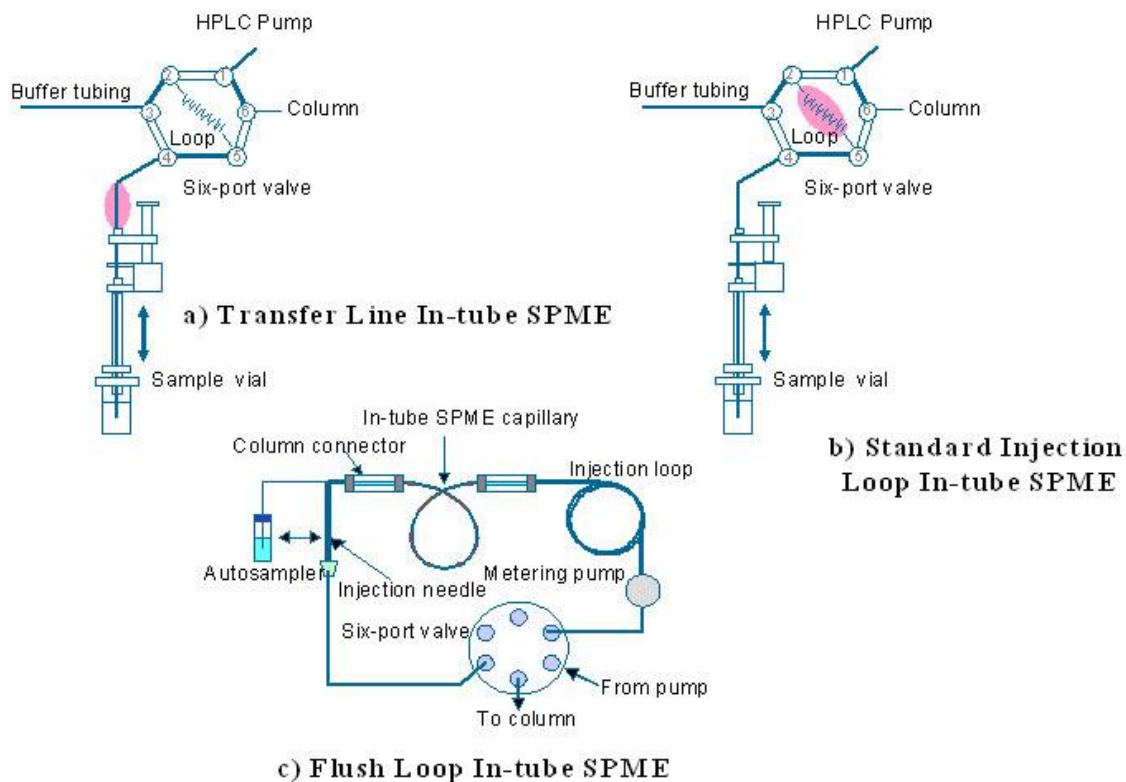
- Ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται ώστε να πραγματοποιηθεί κατάσταση ισορροπίας
- Η χαμηλή ανάκτηση
- Τα σφάλματα εκ μεταφοράς (carry over)
- Η ευθραυστότητα των ινών

Παρόλο που η SMPE εφαρμόστηκε αρχικά για αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία, μπορεί ωστόσο να συζευχθεί με υγρή χρωματογραφία μέσω διεπαφής που περιλαμβάνει ειδικό θάλαμο εκρόφησης (Rodrigues et al., 2019).



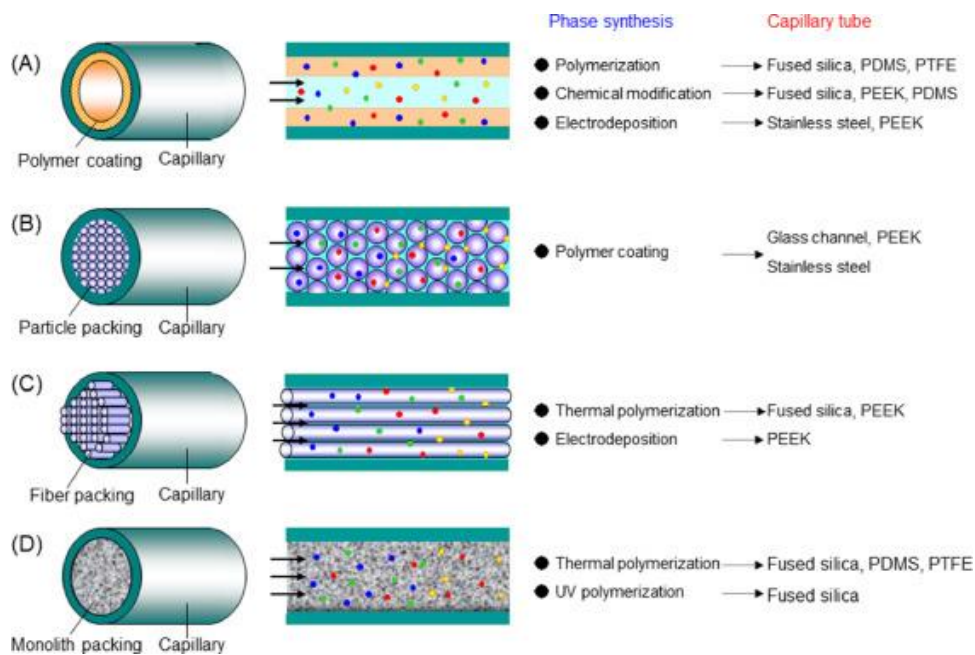
Εικόνα 12 Η διεπαφή SPME-LC στην λειτουργία φόρτωσης (A) και στην λειτουργία έγχυσης (B)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267014001421>

Το 1997 οι Ralf Eisert and Janusz Pawliszyn ανέπτυξαν μια παραλλαγή της SPME με χρήση ίνας. Η online μικροεξαγωγή σε σωλήνα (In tube SPME) αποτελεί μια αυτοματοποιημένη τεχνική η οποία δημιουργήθηκε με στόχο να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα τα οποία έχει η SPME σε ένα όπως η ευθραυστότητα των ινών και η χαμηλή ικανότητα προσρόφησης. Η συσκευή αποτελείται από μια τριχοειδή στήλη από τετρημένο πυρίτιο το εσωτερικό της οποίας καλύπτεται από υλικό το οποίο αποτελεί την στατική φάση. (Eisert & Pawliszyn, 1997; Manousi et al., 2020).



Εικόνα 13 Σχηματική αναπαράσταση των εφαρμογών της in tube SPME
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300005355#FIG14>

Διάφορα υλικά και επιστρώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την in tube SPME όπως μονολιθικές τριχοειδείς στήλες με μονόλιθους πυριτίου, οργανικούς πολυμερείς μονόλιθους και οργανικούς - ανόργανους υβριδικούς μονόλιθους. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί υλικά περιορισμένης πρόσβασης, ανοσοπροσροφητικά και μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή σε συνδυασμό με in tube SPME. Οι ίνες άνθρακα και οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα ως προσροφητικό για SPME εντός σωλήνα. Τα ζεολιθικά ιμιδαζολικά πλαίσια και τα μεταλλικά – οργανικά πλαίσια αποτελούν υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική των τριχοειδών με πολυμερή και μονολιθική επίστρωση πυριτίου (Manousi et al., 2020).



Εικόνα 14 Γεωμετρία και κατασκευή τριχοειδών για In tube SPME (In-tube solid-phase microextraction: Current trends and future perspectives)

4.4 Υγρή -υγρή εκχύλιση

Η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid extraction, LLE) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση αναλυτών από βιολογικά δείγματα, με το ολικό αίμα, το πλάσμα, τον ορό και τα ούρα να είναι τα συνηθέστερα. Αρχή της τεχνικής αυτής είναι η κατανομή των συστατικών ενός δείγματος με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες ανάμεσα σε δυο μη αναμιξιμες υγρές φάσεις : α) την υδατική φάση (βιολογικό δείγμα) και β) έναν οργανικό διαλύτη (W. Li et al., 2019).

$$K_D = \frac{C_o}{C_{aq}}$$

Όπου K_D : σταθερά κατανομής

C_o : συγκέντρωση του αναλύτη στην οργανική φάση

C_{aq} : συγκέντρωση του αναλύτη στην υδατική φάση

$$E = \frac{C_o V_o}{C_o V_o + C_{aq} V_{aq}} = \frac{K_D V}{1 + K_D V}$$

Όπου E: κλάσμα του αναλύτη εκχυλισμένο στην οργανική φάση

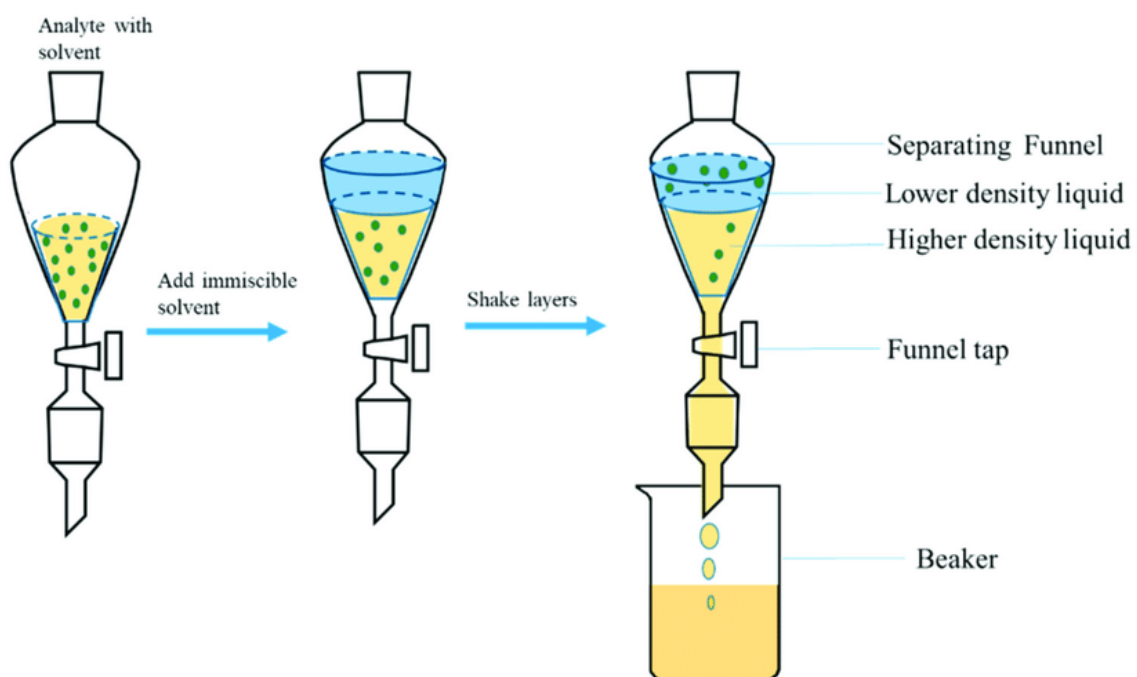
V: λόγος V_o/V_aq (Αρχοντάκη, 2008)

Στην υγρή-υγρή εκχύλιση κατά την κατανομή των αναλυτών από την υδατική φάση στην οργανική φάση λαμβάνουν μέρος διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του αναλύτη και των μορίων του διαλύτη με τις κυριότερες να είναι οι :

- Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις
- Αλληλεπιδράσεις διασποράς
- Διπολικές αλληλεπιδράσεις
- Αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου

Η υγρή-υγρή εκχύλιση έχει μεγάλη εφαρμογή σε ανάλυση φαρμακευτικών προϊόντων καθώς και τους μεταβολικές τους. Η συγκέντρωση των υπολειπόμενων φωσφολιπιδίων στο εκχύλισμα είναι συνήθως χαμηλότερη σε αντίθεση με άλλες τεχνικές όπως η SPE μικτής λειτουργίας όπως επίσης και η εκχύλιση πολικών αναλυτών. Η σωστή επιλογή του διαλύτη είναι πολύ σημαντική ώστε να μειωθούν οι παρεμβολές από συστατικά του υποστρώματος. Η χρήση διαλυτών όπως το χλωροφόρμιο ή το διχλωρομεθάνιο σε συνδυασμό με υδρόφιλους διαλύτες είναι πιο συνηθισμένη για εκχύλιση πολικών αναλυτών και λιπιδίων. Ενώ οι μη ιονισμένοι αναλύτες εκχυλίζονται αποτελεσματικότερα με οργανικούς διαλύτες σε σχέση με τα φορτισμένα είδη, έχει ιδιαίτερη προσοχή να ρυθμιστεί το pH του δείγματος πριν την υγρή-υγρή εκχύλιση. Ως γενικός κανόνας το pH για όξινους αναλύτες πρέπει να είναι μεταξύ pK_a και pK_a-2 ενώ για βασικούς αναλύτες μεταξύ pK_a και pK_a+2 για μεγαλύτερη ανάκτηση. Η εκχύλιση με MTBE έδειξε καλά αποτελέσματα αλλά χαμηλότερη ανάκτηση αναλυτών σε σύγκριση με την SPE και την PPT ειδικά για πολικούς αναλύτες. Μόνο ίχνη φωσφολιπιδίων βρέθηκαν μετά από χρήση MTBE ή η βουτυλοχλωριδίου σε δείγματα ορού ή πλάσματος. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη διαδικασία όταν συνδυάζονται διάφορα στάδια προετοιμασίας δείγματος. Τα καθαρά εκχυλίσματα που ελήφθησαν με MTBE για μη επεξεργασμένο ορό ή πλάσμα δείχνουν υψηλή ανάκτηση φωσφολιπιδίων εάν τα δείγματα περιέχουν υψηλό ποσοστό ακετονιτριλίου. Ο χρόνος εξαγωγής παίζει επίσης σημαντικό ρόλο για το συγκεκριμένο είδος εκχύλισης αναλυτών στόχων σε σύγκριση με τα συστατικά του υποστρώματος. Έρευνα έδειξε ότι ένας χρόνος εκχύλισης 5 λεπτών απέδωσε ένα καθαρότερο εκχύλισμα και καλύτερη ανάκτηση για την ένωση στόχο από 20 min, υποδεικνύοντας ότι οι ενώσεις του υποστρώματός διαχέονται πιο αργά στο διαλύτη εκχύλισης. Για τη βελτίωση

των χαμηλών ποσοστών ανάκτησης της LLE για έντονα υδρόφιλες ενώσεις, διαδικασίες εκχύλισης με αναμίξιμο με νερό έχουν ληφθεί υπόψη. Επίσης για τον διαχωρισμό φάσεων μεταξύ ορού και διαλύτη έχουν αναφερθεί πολύπλοκες μέθοδοι που χρησιμοποιούν θερμοκρασία κάτω του 0°C. Ένας πιο βολικός τρόπος για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός φάσεων είναι μεταξύ ενός υδατικού δείγματος και αναμίξιμου με νερό διαλύτη υποβοηθούμενο από SALLE όπου η πολικότητα της υδατικής φάσης αυξάνεται προσθέτοντας υψηλή συγκέντρωση αλατιού που οδηγεί σε διαχωρισμό φάσεων. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων από βιολογικά υγρά χρησιμοποιώντας LC ή LC-MS/MS.

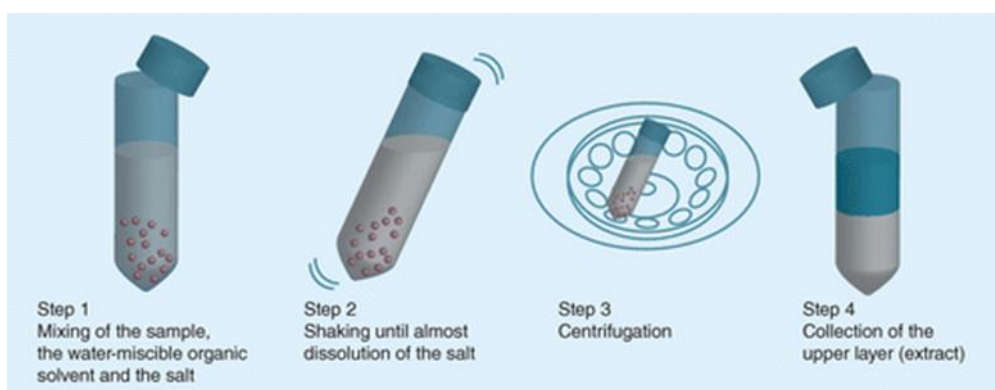


Εικόνα 15 Βήματα υγρής υγρής εκχύλισης (https://www.researchgate.net/figure/Diagrammatic-illustration-of-liquid-liquid-extraction-adapted-from-Nichols-100_fig1_353282886)

4.5 Εκχύλιση υγρού - υγρού με εξαλάτωση

Η εκχύλιση υγρού-υγρού με εξαλάτωση (Salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE) είναι μια τεχνική εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Matkovich και Christian το 1973 για τον διαχωρισμό της ακετόνης από το νερό.

Χρησιμοποιείται για την εκχύλιση οργανικών ουσιών και πραγματοποιείται με την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη αναμίξιμο με νερό σε ένα υδατικό διάλυμα και ακολουθεί η προσθήκη ενός ανόργανου άλατος. Έπειτα από ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση προκαλείται ο διαχωρισμός των φάσεων μεταξύ του οργανικού διαλύτη και της υδατικής φάσης εξαιτίας του φαινομένου εξαλάτωσης. Στην συνέχεια παραλαμβάνεται η οργανική φάση η οποία περιλαμβάνει τις προς ανάλυση ουσίες και μετά από μια απλή αραίωση με νερό ή ένα ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να εγχυθεί σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (Tang & Weng, 2013).



Εικόνα 16 Διαδικασία εκχύλισης υγρού υγρού με εξαλάτωση (<https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.15.142>)

Η συγκεκριμένη τεχνική έχει εφαρμογή για εκχύλιση ενώσεων με υψηλή πολικότητα και που είναι δύσκολο να εκχυλιστούν με τις συμβατικές LLE και SPE. Η SALLE πλεονεκτεί συγκριτικά με την συμβατική LLE καθώς η τελευταία απαιτεί μεγάλες ποσότητες δείγματος, και την χρήση εξαιρετικά τοξικών οργανικών διαλυτών. Επιπλέον σύμφωνα με τους (Tang & Weng, 2013) παραλείπεται η εκτενής και έντονη ανάδευση με σκοπό την ανάκτηση των αναλυτών επειδή ο οργανικός διαλύτης είναι καλά αναμιγμένος με το νερό. Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με την SALLE είναι συμβατά με διάφορα αναλυτικά συστήματα και ιδιαίτερα με την LC αντίστροφης φάσης και αυτό συνεπάγεται την αποφυγή της εξάτμισης του οργανικού διαλύτη και επαναιώρησης σε έναν διαλύτη κατάλληλο για ανάλυση όπως συμβαίνει στην παραδοσιακή LLE (Valente & Rodrigues, 2015).

Οι παράμετροι που θα πρέπει να μελετηθούν και να βελτιστοποιηθούν κατά την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας SALLE είναι ο οργανικός διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, το άλας που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και οι ποσότητες τους.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η ισοπροπυλική αλκοόλη, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο με το τελευταίο να εφαρμόζεται κυρίως για αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων. Το ακετονιτρίλιο προτιμάται λόγω της μικρότερης ποσότητας που απαιτείται για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των φάσεων αλλά και γιατί κατακρημνίζει πιο εύκολα τις πρωτεΐνες και επιτρέπει την ανάκτηση υδρόφιλων και υδρόφοβων ενώσεων σε καθαρά εκχυλίσματα με αυξημένη ευαισθησία. Άλλο ένα πλεονέκτημα της χρήσης ακετονιτριλίου είναι η καλύτερη συμβατότητα για άμεση ανάλυση με σύστημα υγρής χρωματογραφίας. Άλλοι διαλύτες αναμίξιμοι με νερό που έχουν χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό φάσεων σε υδατικά διαλύματα με την προσθήκη αλάτων είναι το διοξάνιο, το τετραϋδροφουράνιο και η 1-προπανόλη.

Όσο αναφορά την επιλογή του άλατος θα πρέπει να μελετάται πολύ προσεκτικά καθώς η επιλογή του μπορεί να έχει μεγαλύτερη επιρροή στα αποτελέσματα ακόμα μεγαλύτερη και από την επιλογή του οργανικού διαλύτη. Η διαλυτότητα του άλατος πρέπει να είναι πολύ υψηλή στη υδατική φάση και ελάχιστη στην οργανική. Μα αυτόν τον τρόπο θα μεγιστοποιηθεί η αλληλεπίδραση του άλατος με τα μόρια του νερού. Η επιλογή του άλατος επηρεάζεται επιπλέον και από άλλους παράγοντες όπως η χημική φύση των αναλυτών, ο τύπος του δείγματος αλλά και η ενόργανη αναλυτική τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί. Στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα άλατα όπως το :

- Θεικό μαγνήσιο ($MgSO_4$)
- Θεικό ασβέστιο ($CaSO_4$)
- Θεικό αμμώνιο [$(NH_4)_2SO_4$]
- Χλωριούχο νάτριο ($NaCl$)
- Χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$)
- Ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3)

4.6 Εκχύλιση σε αδρανές στερεό υπόστρωμα

Αν και η υγρή-υγρή εκχύλιση είναι πολύ αποτελεσματική μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων έχει περιορισμούς όπως οι πολλές εκχυλίσεις που συχνά απαιτούνται, ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται και τα γαλακτώματα που μπορεί να σχηματιστούν ανάμεσα στις υγρές φάσεις. Αυτοί οι περιορισμοί μπορούν να ξεπεραστούν με την χρήση της εκχύλισης σε αδρανές στερεό υπόστρωμα (Supported liquid extraction, SLE) όπου υδατικά δείγματα

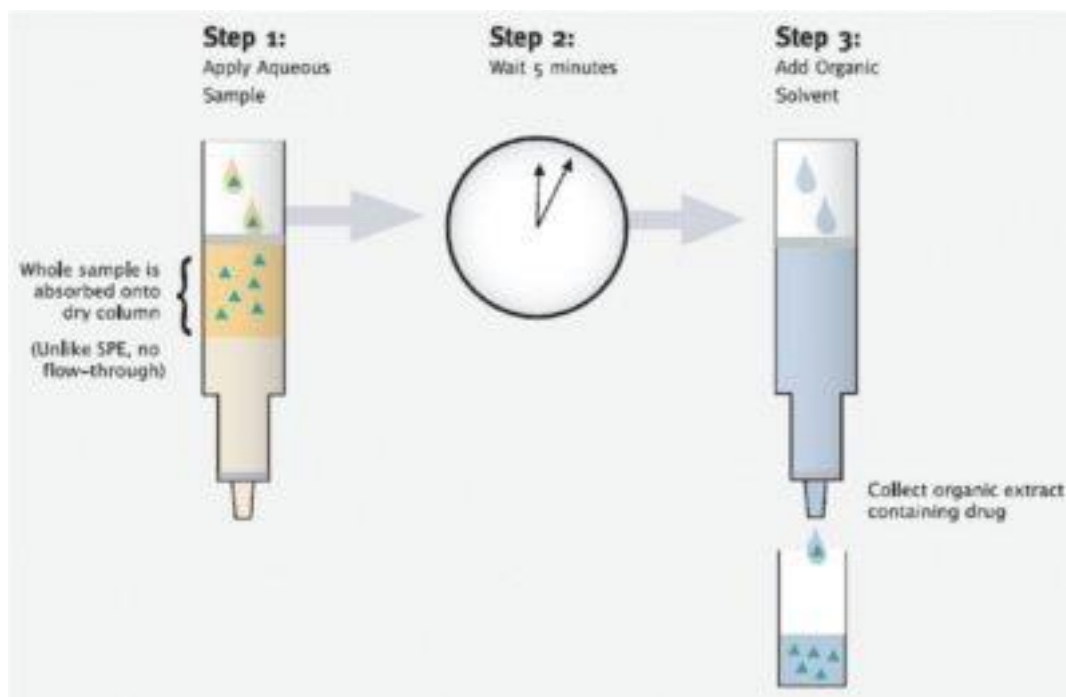
προσροφώνται πάνω σε στερεό πορώδες υλικό στήριξης πχ. γη διατόμων. Η γη διατόμων αποτελείται κυρίως από διοξείδιο του πυριτίου αλλά δεν αλληλοεπιδρά χημικά με το υδατικό δείγμα. Το υδατικό υλικό που περιέχει τις προς ανάλυση ουσίες απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του προσροφητικού υλικού το οποίο μπορεί να βρίσκεται είτε σε μορφή πλάκας είτε σε στήλη και γίνεται η έκλυση των αναλυτών με έναν οργανικό διαλύτη μη αναμίξιμο με νερό. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας πραγματοποιείται μια αποτελεσματική υγρή-υγρή εκχύλιση μεταξύ μιας πολύ λεπτής υδατικής στατικής μεμβράνης, που δημιουργείται στο προσροφητικό υλικό μετά από την φόρτωση του δείγματος, και του οργανικού διαλύτη. Η SLE είναι μια τεχνική ιδανική για πολικούς και μέτρια πολικούς αναλύτες. Σύμφωνα με έρευνες η ανάκτηση των αναλυτών με SLE είναι συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη από την LLE. Με βελτιστοποιήσεις συνθηκών στην μέθοδο SLE έχει δειχθεί ότι αφαιρείται η πλειονότητα των φωσφολιπιδίων.

Αρκετοί διαλύτες είναι αποτελεσματικοί όταν χρησιμοποιούνται μόνοι τους όπως το MTBE, ο οξικός αιθυλεστέρας και το διχλωρομεθάνιο ενώ η αποτελεσματικότητα μειώνεται σε συνδυασμό με ισοπροπανόλη. Ωστόσο η προσθήκη υδατοδιαλυτού διαλύτη πχ ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη οδήγησε σε μεγαλύτερο matrix effect για κάποιους αναλύτες. Ο συνδυασμός ισοπροπανόλης με διχλωρομεθάνιο αποδίδει χαμηλότερες συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων στο εκχύλισμα. Άλλοι οργανικοί διαλύτες μη αναμίξιμοι με νερό που έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση είναι το 1-χλωροβουτανιο και το χλωροφόρμιο. Η SLE έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μεθόδους για LC-MS/MS και είναι ιδιαίτερα ισχυρή σε συστήματα διαχωρισμού κανονικής φάσης αφού μεγάλο ποσοστό του οργανικού διαλύτη δεν χρειάζεται να εξατμιστεί πριν την εισαγωγή σε σύστημα LC-MS/MS (Cheng & Jiang, 2019).

Πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ο εύκολος αυτοματισμός, η αποτελεσματική διαδικασία εκχύλισης χωρίς σχηματισμό γαλακτωμάτων και με αποτελέσματα στα οποία το φαινόμενο επίδρασης της μήτρας του δείγματος είναι μειωμένο. Επιπρόσθετα η συμβατότητα πολλών διαλυτών είναι ένα χαρακτηριστικό που την κάνει ιδιαίτερα εύχρηστη καθότι δεν υπάρχει μεγάλος περιορισμός στην χρήση συγκεκριμένων διαλυτών.

Ωστόσο σε αντίθεση με τα πλεονεκτήματα υπάρχουν και περιορισμοί στην χρήση της τεχνικής αυτής. Η SLE δεν είναι κατάλληλη για εκχύλιση αναλυτών με υψηλή πολικότητα. Μεταβολίτες που δημιουργούνται κατά τον μεταβολισμό φαρμάκων έχουν αυξημένη υδροφιλικότητα ειδικά με αντιδράσεις όπως η γλυκουρονιδίωση και έτσι η ανάπτυξη μιας

μεθόδου για προσδιορισμό του φαρμάκου και του μεταβολίτη με αποτελεσματική ανάκτηση είναι μια πρόκληση.



Εικόνα 17 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας SLE (<https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/34786-Utilizing-Supported-Liquid-Extraction-in-a-Novel-Format-to-Improve-Productivity-in-the-Analytical-Laboratory/>)

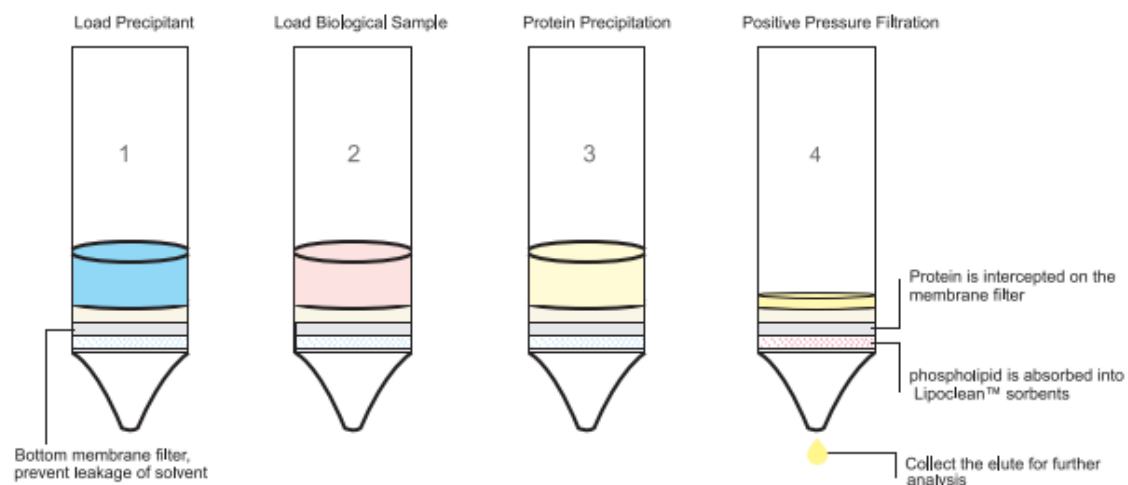
4.7 Πλάκες αφαίρεσης φωσφολιπιδίων

Τα φωσφολιπίδια είναι ενώσεις που αποτελούν δομικό συστατικό των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των κυττάρων. Στην ανάλυση βιολογικών υγρών με φασματομετρία LC-MS/MS προκαλούν προβλήματα τόσο στον χρωματογραφικό διαχωρισμό λόγω της κατακράτησης τους σε υδρόφοβες στήλες όσο και στον ιονισμό. Σημαντικός στόχος λοιπόν είναι η απομάκρυνση τους από τα βιολογικά δείγματα μειώνοντας έτσι το φαινόμενο επίδρασης της μήτρας του δείγματος (matrix effect) στην ανάλυση (Carmical & Brown, 2016).

Σήμερα υπάρχουν αρκετές εμπορικά διαθέσιμες πλάκες αφαίρεσης φωσφολιπιδίων όπως η Hybrid SPE™ (Sigma Aldrich), η Ostro™ (Waters), η Captiva™ ND (Agilent), η Phree™ (Phenomenex), η ISOLUTE® PLD+ (Biotage), η Copure® 96-well PPRP (Biocomma),

Microolute™ PLR (Porvair Sciences). Αυτές οι πλάκες έχουν δείξει πολύ αποτελεσματικές εκχυλίσεις φωσφολιπιδίων σε σύγκριση με την PPT.

Η στατική φάση των πλακών Hybrid SPE™ αποτελείται από πυρίτιο επικαλυμμένο με ιόντα ζirkονίου. Οι αλληλεπιδράσεις οξέος βάσης κατά Lewis μεταξύ των ιόντων ζirkονίου και των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων οδηγούν στην συγκράτηση τους. Το διάλυμα ακετονιτριλίου με 1% μυρμηκικό οξύ χρησιμοποιείται ως παράγοντας καθίζησης καθώς το μυρμηκικό οξύ έχει σημαντική επίδραση στο ανάκτηση των αναλυτών. Τα υβριδικά SPE εκχυλίσματα έχουν δείξει ότι περιέχουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων σε σύγκριση με την PPT. Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή Ostro Waters χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό PPT και εκχύλιση σε ένα προσροφητικό υλικό C18. Η πλάκα Corpure® 96-well PPRP η οποία διαθέτει ως προσροφητικό υλικό το Lipoclean® απομακρύνει τα φωσφολιπίδια και καθιζάνει πρωτεΐνες με την διαδικασία να φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 18 Στάδια λειτουργίας της πλάκας αφαίρεσης φωσφολιπιδίων (<https://www.biocomma.com/product/294.mhtml>)

Οι πλάκες αφαίρεσης φωσφολιπιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε συνδυασμό με UHPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό μεταβολιτών της αιθανόλης και πιο συγκεκριμένα του αιθυλογλυκουρονιδίου και του αιθυλοθεικού οξέος με σκοπό την διάκριση της προθανάτιας πρόσληψης αιθανόλης από την μεταθανάτια παραγωγή της (Hegstad et al., 2017; Santunione et al., 2018; Sidqey et al., 2021).

4.8 Τυρβώδης ροή

Η εκχύλιση τυρβώδους ροής (Turboflow) πραγματοποιείται συνήθως online πριν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και χρησιμοποιούνται στήλες με μεγάλα σωματίδια σε συνδυασμό με υψηλούς ρυθμούς ροής. Τα δείγματα μπορούν να εισαχθούν με απευθείας έγχυση μετά από αραίωση. Μερικές φορές απαιτείται ένα στάδιο καθίζησης πρωτεϊνών πριν από την έγχυση. Οι αναλύτες ενδιαφέροντος συγκρατούνται στους πόρους της στήλης, ενώ τα συστατικά του υποστρώματος διοχετεύονται και απορρίπτονται απευθείας στο δοχείο συλλογής αποβλήτων. Οι αναλύτες στη συνέχεια εκλούνται από τη στήλη χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγορη αλλά δυστυχώς μπορεί να εμφανίσει υψηλά αποτελέσματα μεταφοράς (carry over). Μια μελέτη ανέφερε ότι αυτή η τεχνική δεν είχε σημαντική επίδραση στην απομάκρυνση φωσφολιπιδίων από δείγματα ορού και πλάσματος και χρειαζόνταν ακόμη έναν χρωματογραφικό διαχωρισμό για καθαρισμό του δείγματος ώστε να αποφευχθούν τα matrix effects. Άλλοι ανέφεραν επιτυχημένη εφαρμογή για ποσοτικοποίηση διαφόρων ουσιών σε δείγματα ούρων, ορού και αποξηραμένης κηλίδας αίματος χρησιμοποιώντας μηχανισμούς αντίστροφης φάσης, ιοντοανταλλαγής ή μικτής λειτουργίας υλικά (Bylda et al., 2014a).



Εικόνα 19 Στήλες TurboFlow™ (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CH-953275>)

4.9 Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο

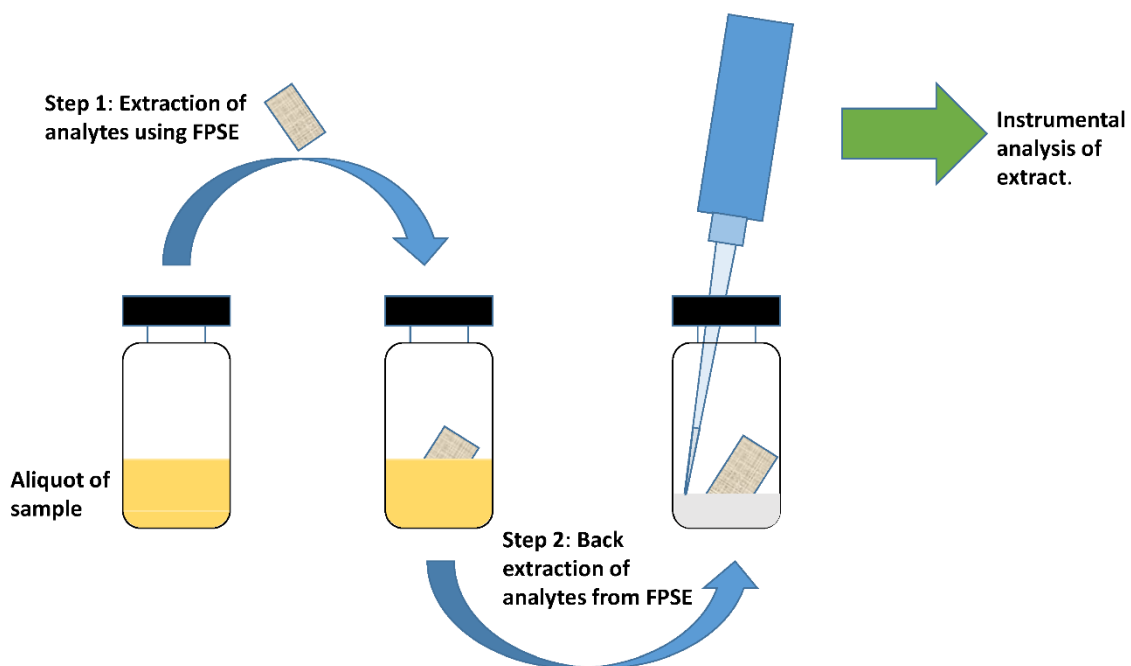
Η τεχνική εκχύλιση με προσρόφηση σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) είναι μια από τις πιο πρόσφατες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων και αναπτύχθηκε το 2014 από τους Kabir και Furton. Ως συσκευή εκχύλισης χρησιμοποιείται ένα φυσικό ή συνθετικό υπόστρωμα υφάσματος το οποίο τροποποιείται χημικά με την προσθήκη μιας λεπτής στρώσης ενός υβριδικού οργανικού - ανόργανου διαλύματος κολλοειδούς - γέλης (sol-gel). Μεταξύ του υποστρώματος του υφάσματος και του sol-gel υλικού αναπτύσσονται ισχυροί ομοιοπολικοί δεσμοί με αποτέλεσμα να προσδίδουν στις μεμβράνες FPSE υψηλή χημική, διαλυτική και θερμική σταθερότητα (Kabir et al., 2013; Kabir & Samanidou, 2021). Η FSPE πληροί όλα τα κριτήρια της πράσινης αναλυτικής χημείας (GAC).

Μετά την εκχύλιση αναλυτών με FPSE μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών για επανεκχύλιση με σκοπό την υψηλότερη προσυγκέντωση τους. (Kabir & Samanidou, 2021)

Τα πλεονεκτήματα της FPSE είναι :

- Η απλή λειτουργία

- Το χαμηλό κόστος της συσκευής
- Η γρήγορη προσρόφηση
- Η μηδαμινή κατανάλωση διαλυτών
- Η απευθείας εισαγωγή της συσκευής εκχύλισης στο φιαλίδιο με το δείγμα
- Η αύξηση της απόδοσης που επιτυγχάνεται με την χρήση υπέρηχων ή μαγνητικής ανάδευσης
- Για την έκλουση μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε οργανικός διαλυτής καθώς και όξινα ή βασικά διαλύματα
- Λιγότερα στάδια προκατεργασίας δειγμάτων με επακόλουθο μικρότερα σφάλματα και μικρότερο κόστος όσο αφορά την προκατεργασία
- Οι νέες sol-gel επικαλύψεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσροφητικά υλικά
- Οι υψηλοί παράγοντες προσυγκέντωσης των αναλυτών
- Η υψηλή χημική σταθερότητα που οφείλεται στον χημικό δεσμό μεταξύ του προσροφητικού υλικού και του υποστρώματος του υφάσματος (Kabir et al., 2017; Kazantzi & Anthemidis, 2017)



Εικόνα 20 Στάδια FPSE (<https://www.preprints.org/manuscript/201701.0085/v1>)

Στην παραπάνω εικόνα περιγράφεται η διαδικασία εκχύλισης FPSE. Αρχικά το δείγμα που περιέχει τις προς ανάλυση ουσίες τοποθετείται σε ένα γυάλινο σωληνάριο. Στην συνέχεια η συσκευή FSPE εισάγεται στο φιαλίδιο με το δείγμα μαζί με μια μαγνητική ράβδο ανάδευσης επικαλυμμένη με Teflon. Έπειτα πραγματοποιείται η προσρόφηση των αναλυτών με την βοήθεια ανάδευσης για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στην συνέχεια η συσκευή FSPE αφαιρείται και τοποθετείται σε ένα άλλο φιαλίδιο που περιέχει τον διαλυτή έκλυσης. Τέλος ο διαλυτής που παραλαμβάνεται προτού εγχυθεί σε ένα αναλυτικό σύστημα όπως η HPLC φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων (Kazantzi & Anthemidis, 2017).

Αξίζει να σημειωθεί πως η συσκευή FPSE μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλαπλές φορές. Το υλικό ξεπλένεται με οργανικούς διαλύτες για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και μετά με αφιονισμένο νερό για την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών. Ακολουθεί στέγνωμα και αποθήκευση σε αεροστεγές γυάλινο φιαλίδιο.

Τα βήματα που ακολουθούνται για την κατασκευή των μεμβρανών για την τεχνική FPSE είναι τα ακόλουθα : (Kabir & Furton, 2020)

1. Η επιλογή και προ επεξεργασία της μεμβράνης (τα πιο σημαντικά υποστρώματα υφάσματος είναι η κυτταρίνη, πολυεστέρας, υαλοβάμβακας, νάιλον και πολυαμίδιο)
2. Ο σχεδιασμός και η παρασκευή του κολλοειδούς διαλύματος για την επίστρωση του προσροφητικού υλικού sol-gel (εξαρτάται από την φύση των αναλυτών και του υποστρώματος του δείγματος)
3. Η επίστρωση του προσροφητικού υλικού sol-gel με χρήση της τεχνολογίας επίστρωσης με εμβάπτιση
4. Η παλαίωση, ο εγκλιματισμός και ο καθαρισμός της μεμβράνης του προσροφητικού υλικού sol-gel
5. Η περικοπή της μεμβράνης σε καταλληλά μεγέθη

Η εκχύλιση FSPE έχει εφαρμοστεί σε βιολογικά δείγματα και συγκεκριμένα σε

- ούρα για τον προσδιορισμό EE2, E2, BPA με χρήση FSPE-HPLC-FLD (Kumar et al., 2014),
- πλάσμα και ούρα για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων από 12 αντιμικροβιακά φάρμακα αζόλης με χρήση FPSE-HPLC-PDA (Locatelli et al., 2017),
- ορό αίματος για τον προσδιορισμό βενζοδιαζεπινών με χρήση FPSE-HPLC-DAD (Samanidou et al., 2015),

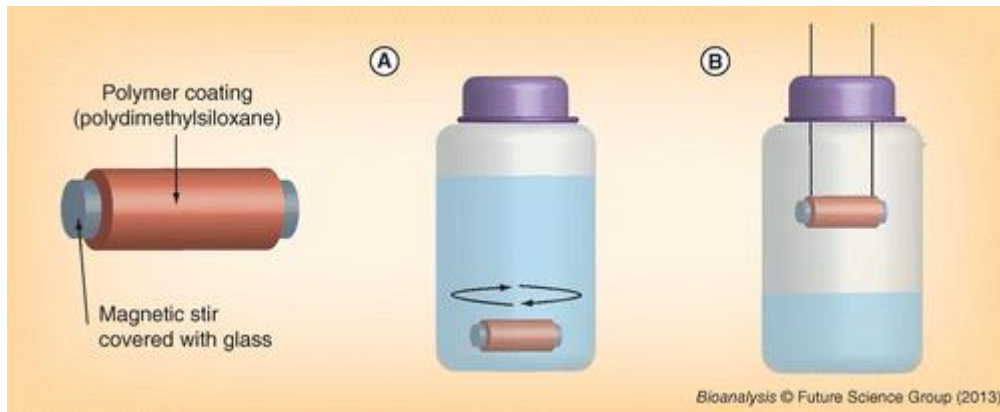
- ολικό αίμα, πλάσμα και ούρα για τον προσδιορισμό κορτιζόνης, σουλφασαλαζίνης και σιπροφλοξασίνης με χρήση FPSE-HPLC-PDA (Kabir et al., 2018)
- ορό αίματος για τον προσδιορισμό κλομιπραμίνης, αμιτριπτυλίνης, φλουοξετίνης, παροξετίνης και βενλαφαζίνης με χρήση FPSE-HPLC-DAD (Zilfidou et al., 2019)
- πλάσμα αίματος για τον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και συγκεκριμένα χρυσένιου, πυρένιου και βενζο [a] πυρένιου με χρήση FPSE-HPLC-FLD (Gazioglu et al., 2021)

ωστόσο ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρία μάζας σε σειρά έχει εφαρμοστεί σε

- ούρα για τον προσδιορισμό αντικών φαρμάκων και συγκεκριμένα μεμαντίνης, αμανταδίνης, ριμανταδίνης με χρήση FPSE-UPLC-MS/MS (Sidiropoulou et al., 2022a)
- ορό αίματος και ούρα για τον προσδιορισμό β- blockers και συγκεκριμένα ατενολόλης, ναδολόλης, μετοπρολόλης, οξπρενολόλης, λαβηταλόλης και προπρανολόλης με χρήση FPSE-UHPLC-MS/MS (Mazaraki et al., 2021a)

4.10 Εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης

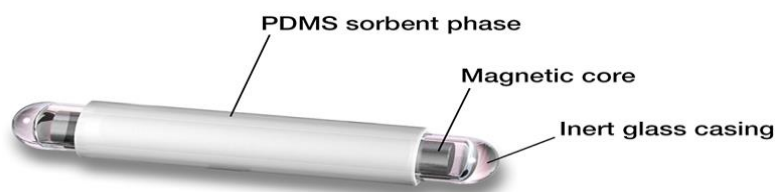
Η εκχύλιση μέσω προσροφητικής ανάδευσης (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) αποτελεί μια τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων η οποία αναπτύχθηκε το 1999 από τους (Baltussen et al., 1999). Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ισορροπία κατανομής των αναλυτών μεταξύ του υδατικού δείγματος και του υλικού επίστρωσης μιας ράβδου ανάδευσης. Εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό σύνθετων υποστρωμάτων όπως επίσης και για τον εμπλουτισμό των αναλυτών προτού αυτοί διαχωριστούν ή ανιχνευθούν (M. He et al., 2021).



Εικόνα 21 Βήματα SBSE (<https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.13.52>)

Η εκχύλιση μέσω προσροφητικής ανάδευσης αποτελεί μια παραλλαγή της SPME. Σημαντική διαφορά με την SPME είναι το μέγεθος του υλικού εκχύλισης καθώς στην SBSE είναι 50-250 φορές μεγαλύτερο με συνέπεια μεγαλύτερη χωρητικότητα δείγματος και υψηλότερα ποσοστά απόλυτης ανάκτησης. Έχουν αναφερθεί εφαρμογές στην βιοανάλυση ενώ ο αριθμός των εφαρμογών στην ιατροδικαστική τοξικολογική ανάλυση είναι περιορισμένος (M. He et al., 2021).

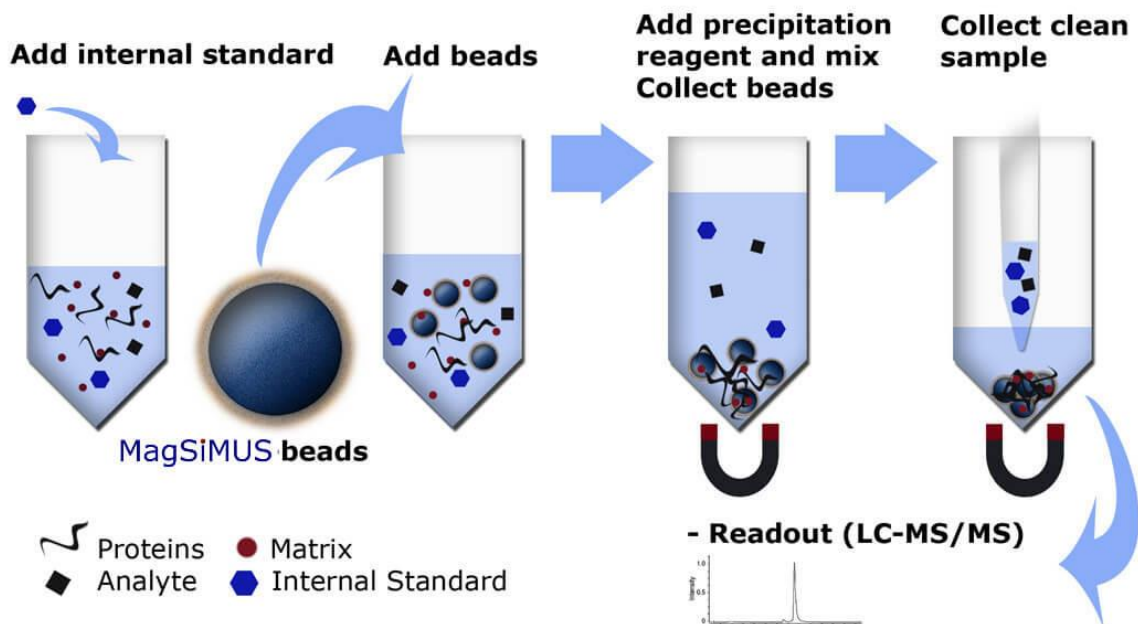
Κατά την συγκεκριμένη τεχνική μικροεκχύλισης οργανικές ενώσεις που βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα προσροφώνται σε ένα παχύ στρώμα πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) το οποίο είναι το υλικό επίστρωσης μιας μαγνητικής ράβδου επικαλυμμένης από γυαλί. Η εκχύλιση των ενώσεων πραγματοποιείται έπειτα από ανάδευση για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ακολουθεί η απομάκρυνση της ράβδου από το υδατικό δείγμα και η ξήρανση της σε μια μονάδα θερμικής εκρόφησης ή σε ένα σύστημα εκρόφησης διαλύτη ενώ οι ενώσεις που έχουν ανακτηθεί μπορούν να αναλυθούν με συστήματα υγρής χρωματογραφίας (M. He et al., 2021).



Εικόνα 22 Προσοφθητική ράβδος ανάδευσης (<http://laballiance.com.my/product/twister-stir-bar-sorptive-extraction-sbse/>)

4.11 Μαγνητικά σφαιρίδια

Τα μαγνητικά σωματίδια και τα νανοσωματίδια αποτελούν υλικά με μεγάλο ενδιαφέρον σε σχέση με την προκατεργασία και ανάλυση δειγμάτων. Στο εσωτερικό τους φέρουν έναν μαγνητικό πυρήνα ο οποίος είναι συνήθως κατασκευασμένος από οξείδιο του σιδήρου. Στην εξωτερική επιφάνεια ο πυρήνας επικαλύπτεται με ένα πολυμερές υλικό που μπορεί να τροποποιηθεί αναλόγως, με σκοπό την επιλεκτική εξαγωγή μορίων-στόχων από πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα. Τα βήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι παρόμοια με αυτά της SPE δηλαδή φόρτωση, έκπλυση και έκλουση. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των σφαιριδίων είναι ότι μετά την εκχύλιση του δείγματος τα σωματίδια έλκονται προς το τοίχωμα του σωληνάριου, το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και τα σωματίδια που είναι προσκολλημένα στο τοίχωμα εκπλένονται με κατάλληλο διαλύτη. Τα φορτωμένα σφαιρίδια στη συνέχεια επαναιωρούνται. Η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων προσφέρει ταχύτητα και απλότητα καθιστώντας την μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι παραδοσιακών τεχνικών προκατεργασίας δειγμάτων (Bylida et al., 2014a).



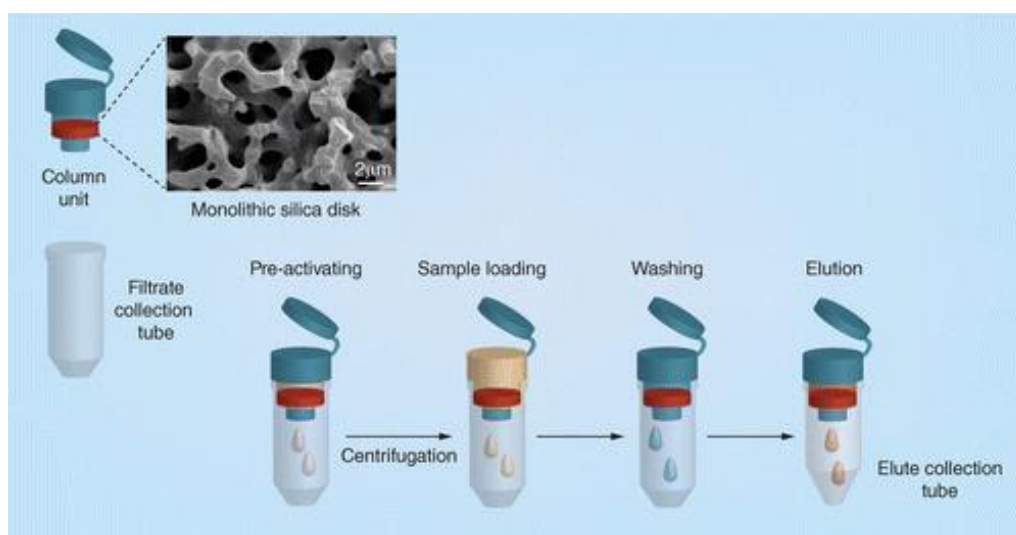
Εικόνα 23 Σχηματική απεικόνιση προκατεργασίας δειγμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια(<https://steinbrenner-laborsysteme.de/language/en/products/magsimus/>)

4.12 Εκχύλιση με περιστρεφόμενη στήλη μονόλιθου

Πρόκειται μια γρήγορη μέθοδος για προετοιμασία δείγματος που χρησιμοποιεί μια περιστροφική στήλη πληρωμένη με μονολιθικό πυρίτιο. Το δείγμα φορτώνεται στο προσροφητικό υλικό με φυγοκέντρωση. Η ίδια διαδικασία γίνεται και για τα στάδια πλύσης και έκλουσης. Αυτή η τεχνική απαιτεί μικρές ποσότητες διαλυτών έκλουσης (100μl) και επιτρέπει υψηλή πιστότητα και ακρίβεια. Πλεονέκτημα της χρήσης αυτού του είδους στηλών είναι η απλή λειτουργία και ο ταυτόχρονος χειρισμός πολλών δειγμάτων καθώς επίσης δεν απαιτείται η εξάτμιση του διαλυτή έκλουσης (Manousi et al., 2020).

Ο μηχανισμός μεταφοράς μάζας στους μονόλιθους, ο οποίος είναι παρόμοιος με αυτόν της SPE, εξαρτάται από την υδρόφοβη προσρόφηση στην επιφάνεια του προσροφητικού και τον συντελεστή κατανομής του μορίου στόχου στο λειτουργικό τμήμα της επιφάνειας. Η επιφάνεια, η μέση διάμετρος και ο όγκος των πόρων είναι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην προσρόφηση και την εκρόφηση των αναλυτών. Η επιφάνεια του υλικού, η οποία αρχικά ήταν μόνο 5–20 m² g⁻¹ ενώ σήμερα έως 1000m² g⁻¹, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην τεχνική αυτή διότι η ικανότητα προσρόφησης είναι ανάλογη με την επιφάνεια αυτή (Rodrigues et al., 2019).

Έχουν αναφερθεί διάφορες εφαρμογές στην ποσοτικοποίηση ουσιών σε ανθρώπινα δείγματα. Σε αναλύσεις με LC-MS/MS οι στήλες αυτές έχουν ως προσροφητικό υλικό μονολιθικό διοξείδιο του πυριτίου καθώς και μια πληθώρα άλλων υλικών όπως C18-C, CBA για προσδιορισμό φαρμάκων σε ορό αίματος (Namera & Saito, 2015).



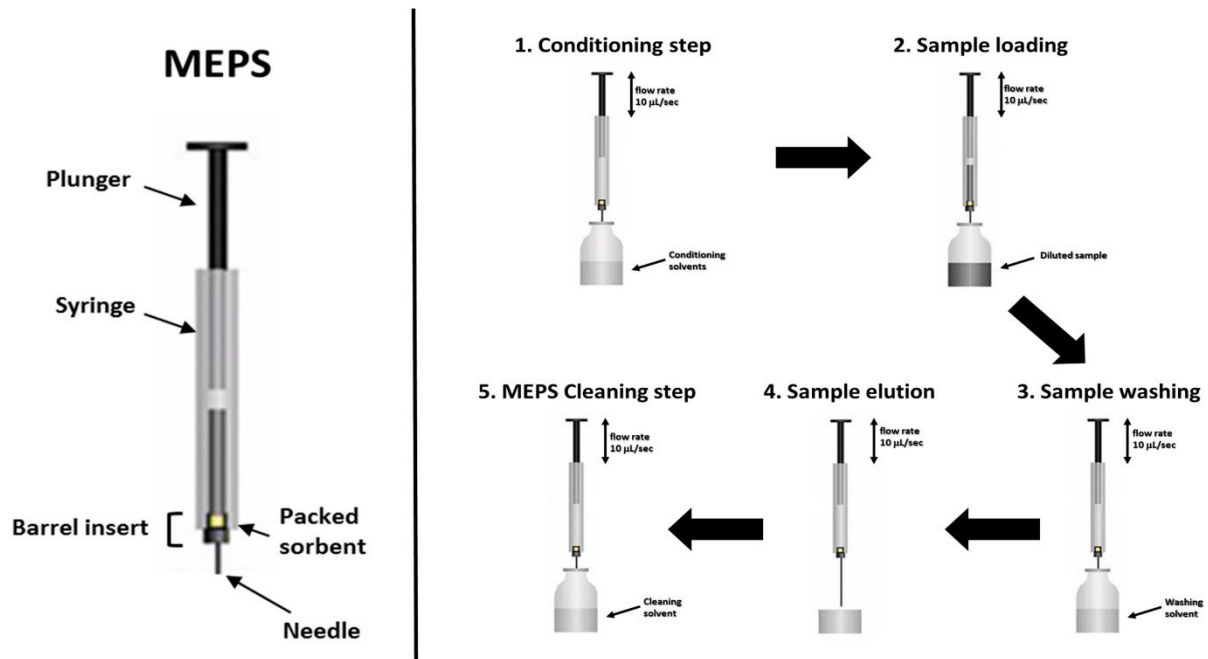
Εικόνα 24 Στάδια εκχύλισης με χρήση περιστρεφόμενων στήλων μονολιθίου

4.13 Μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό

Η μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό (Microextraction by packed sorbent, MEPS) πρόκειται για μια νεότερη τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που αποτελεί μικρογραφία της SPE. Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 2003 από τον Mohamed Abdel-Rehim και μπορεί να συνδεθεί online τόσο με GC/MS όσο και με LC-MS (Abdel-Rehim, 2004).

Πραγματοποιείται με εκχύλιση μέσα από μια κλειστά αεροστεγή σύριγγα, εφαρμόζεται για δείγματα με όγκο από 10 έως 1000 µl. Οι διαφορές με την SPE αφορούν την ευκολία στην χρήση, την ταχύτητα και τη πολύ χαμηλότερη κατανάλωση οργανικών διαλυτών. Επίσης το προσροφητικό υλικό της τεχνικής αυτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έως και 100 εκχυλίσεις. Τέτοια προσροφητικά υλικά είναι τα υλικά με βάση το πυρίτιο με επιπρόσθετη λειτουργία ιοντοανταλλαγής ή και μικτής λειτουργίας καθώς επίσης και υλικά RAM, HILIC, PS-DVB ή μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογές στην ποσοτικοποίηση φαρμακευτικών ουσιών σε βιολογικά υγρά συμπεριλαμβανομένων των

αντιψυχωσικών, καρδιακών, αντικαταθλιπτικών φαρμάκων αλλά και τοπικών αναισθητικών και ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (Bylida et al., 2014a).



Εικόνα 25 Συσκευή και διαδικασία εκχύλισης MEPS (<https://www.mdpi.com/2297-8739/4/4/36/html>)

Σε μια πρόσφατη μελέτη ο (Biagini et al., 2020) χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική εκχύλισης σε συνδυασμό με UHPLC-ESI-MS/MS για τον προσδιορισμό της 8-ισο προσταγλανδίνης F2α, της 8-ισο προσταγλανδίνης E2 και της προσταγλανδίνης E2 σε δείγματα ξηρών κηλίδων αίματος που λήφθηκαν από νεογνά.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι εφαρμογές των επιλεγμένων τεχνικών προκατεργασίας στα συγκεκριμένα βιολογικά υγρά που αναφέρονται στην παρούσα εργασία. Η πλειονότητα των βιοδεικτών που παρατίθενται αποτελούν συχνά προσδιοριζόμενες ενώσεις σε ένα κλινικό εργαστήριο.

Πίνακας 1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΆΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ADMA SDMA L-NMMA ΑΡΓΙΝΙΝΗ ΟΡΝΙΘΙΝΗ, ΗΟΜΟΑΡΓΙΝΙΝΕ, ΚΙΤΡΟΥΛΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Eryavuz Onmaz, Abusoglu, Yaglioglu, et al., 2021
2.	C-ΠΕΠΤΙΔΙΟ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	Owusu et al., 2021
3.	ΤΕΝΟΦΟΒΙΡΗ ΑΛΑΦΕΝΑΜΙΔΗ, ΤΕΝΟΦΟΒΙΡΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Qian et al., 2022
4.	ΑΤΣΑ	ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΑΙΜΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Nishio et al., 2022
5.	182 ΝΕΕΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Giorgetti et al., 2022
6.	3-ΧΛΩΡΟ-L-ΤΥΡΟΣΙΝΗ	ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΥΓΡΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Nishio et al., 2021
7.	ΑΛΛΟΠΡΕΓΝΑΝΟΛΟΝΗ ΠΡΕΓΝΑΝΟΛΟΝΗ ΕΠΙΠΡΕΓΝΑΝΟΛΟΝΗ ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΚΟΡΤΙΖΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Mayne et al., 2021
8.	5ΗΙΑΑ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΟΥΡΑ		Becker et al., 2021
9.	ΜΕΘΟΤΡΕΞΑΤΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		McTaggart & Keevil, 2021
10.	ΦΑΒΙΠΡΑΒΙΡΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Eryavuz Onmaz, Abusoglu, Onmaz, et al., 2021
11.	ΑΤΟΜΟΞΕΤΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Xia et al., 2021
12.	ΣΙΛΟΣΤΑΖΟΛΗ ΚΑΙ ΜΕΤΒΟΛΙΤΗΣ	ΠΛΑΣΜΑ		Yuting Shen et al., 2021
13.	ΓΚΑΜΠΑΠΕΝΤΙΝΗ, ΒΟΥΠΡΕΝΟΡΦΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Phillips et al., 2021
14.	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (ΒΟΣΟΥΤΙΝΙΜΠΗ, ΔΑΣΑΤΙΝΙΜΠΗ, GILTERITINIB, IBRUTINIB, IMATINIB, MIDOSTAURIN, NILOTINIB AND PONATINIB)	ΠΛΑΣΜΑ/ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Verougstraete et al., 2021
15.	ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Owen et al., 2013
16.	ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΟΡΦΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 1, 2	ΠΛΑΣΜΑ		Pratt et al., 2021

17.	ΘΕΙΚΗ ΟΙΣΤΡΟΝΗ, ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΕΔΙΟΝΗ, ΔΗΕΑΣ, ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΝΗ, 17-ΟΗΡ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Ankarberg-Lindgren et al., 2020
18.	15 ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΔΙΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ	ΟΥΡΑ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	R. Wang et al., 2021
19.	L-ΚΑΡΝΙΤΙΝΗ, ΑΚΕΤΥΛΟ-L-ΚΑΡΝΙΤΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Nie et al., 2021
20.	25(ΟΗ)D3 25(ΟΗ)D2 24,25(ΟΗ)2D3 25,26(ΟΗ)2D3	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	Zelzer et al., 2020
21.	ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Ying Shen et al., 2020
22.	ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ TRN171	ΠΛΑΣΜΑ		M. Zhang et al., 2020
23.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Rola et al., 2020
24.	4 ΑΝΔΡΟΓΟΝΑ, 17-ΟΗΡ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	Z. Cao et al., 2020
25.	8 ΑΝΤΪΨΥΧΩΣΙΚΑ (ΑΡΙΠΠΡΑΖΟΛΗ, ΚΛΟΖΑΠΙΝΗ, ΑΛΟΠΕΡΙΔΟΛΗ, ΟΛΑΝΖΑΠΙΝΗ, ΠΑΛΙΠΕΡΙΔΟΝΗ, ΚΟΥΕΤΙΑΠΙΝΗ, ΡΙΣΠΕΡΙΔΟΝΗ, ΚΑΙ ΖΙΠΡΑΣΙΔΟΝΗ)	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Y. Cao et al., 2020
26.	ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΠΛΑΣΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	Desmons et al., 2020
27.	14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΠΛΑΣΜΑ		Barco et al., 2020
28.	ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ FCN-411	ΠΛΑΣΜΑ		Liu et al., 2020
29.	ΡΕΤΙΝΟΛΗ ΚΑΙ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Peersman et al., 2020
30.	14 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΠΛΑΣΜΑ/ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ		Sun et al., 2022
31.	ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ, ΧΟΛΙΝΗ	ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ		Lamy et al., 2021
32.	12 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗΣ ΟΡΜΟΝΕΣ: ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗ, ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ, ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΕΔΙΟΝΗ, ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗ, 11-ΔΕΟΞΥΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, 17-ΥΔΡΟΞΥΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗ, 17-ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ, ΔΕΪΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΟΙΣΤΡΙΟΛΗ, ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΥΓΡΗ -ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	T. F. Yuan et al., 2020
33.	ΑΙΘΥΛΟΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΔΙΟ	ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ/ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΑΙΜΑ		Vezzoli et al., 2015
34.	24 ΟΥΣΙΕΣ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ	ΥΑΛΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ/ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ/ΠΛΑΣΜΑ		Arora et al., 2016
35.	ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΠΛΑΣΜΑ		Singh, 2008

Πίνακας 2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΡΑΒΔΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	11 ΜΟΝΟΪΔΡΟΞΥΛΙΩΜΕΝΟΙ ΡΑΗs	ΟΥΡΑ	Zhao et al., 2013
2.	THCA	ΟΥΡΑ	Goto et al., 2010
3.	ΦΛΟΥΟΞΕΤΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ	Fernandes et al., 2006
4.	ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΥΡΑ	Unceta et al., 2013

Πίνακας 3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΆΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ΙΣΤΑΜΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Hu et al., 2021
2.	ΚΟΤΙΝΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Dunlop et al., 2014
3.	PRA	ΠΛΑΣΜΑ		Owen et al., 2014
4.	3-ΝΙΤΡΟΤΥΡΟΣΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		X. Li et al., 2015
5.	ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟΙ ΝΕΥΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΟΥΡΑ		Baygildiev et al., 2019
6.	ΠΕΠΤΙΔΙΟ Ac-SDKP	ΠΛΑΣΜΑ		Inoue et al., 2012
7.	B- ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ	ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ		Seino et al., 2021
8.	ΤΕΝΟΦΟΒΙΡΗ	ΠΛΑΣΜΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Podany et al., 2015
9.	ΟΛΑΝΖΑΠΙΝΗ	ΣΑΛΙΟ		Dziurkowska et al., 2020
10.	1α,25-ΔΙΥΔΡΟΞΥ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Chan & Kaleta, 2015

11.	ΘΕΙΟΠΕΝΤΑΛΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Moosavi et al., 2016
12.	8-OHdG ΚΑΙ ΚΟΤΙΝΙΝΗ	ΟΥΡΑ		C.-Y. Chen et al., 2016
13.	ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΚΑΙ ΣΙΤΑΓΛΙΠΤΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Shah et al., 2016
14.	ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	ΟΥΡΑ		Andersen & Linnet, 2014
15.	6-ΑΚΕΤΥΛΟΜΟΡΦΙΝΗ	ΟΥΡΑ		Robandt et al., 2010
16.	THC-COOH	ΟΥΡΑ		Robandt et al., 2009
17.	THC, THC-OH, THC-COOH, CBN ΚΑΙ CBD	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Jagerdeo et al., 2009
18.	ΜΕΘΥΛΟΜΑΛΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΥΡΑ		Kirchhoff et al., 2010
19.	ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΣΑΛΙΟ		Mulet et al., 2020
20.	17 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ	ΠΛΑΣΜΑ		Merienne et al., 2018
21.	ΚΟΚΑΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Jagerdeo et al., 2008
22.	ΜΟΡΦΙΝΗ,ΚΩΔΕΙΝΗ, ΟΞΥΚΩΔΟΝΗ, ΥΔΡΟΚΩΔΟΝΗ, ΦΑΙΝΑΝΥΛΗ	ΞΗΡΑ ΚΗΛΙΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ		Verplaetse & Henion, 2016
23.	ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Savolainen et al., 2011
24.	ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Yue et al., 2008
25.	ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ		Adaway et al., 2015
26.	DRUGS OF ABUSE ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΥΡΑ		Feng et al., 2007

Πίνακας 4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ ΜΕ ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Α/Α	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΆΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	12 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	ΠΛΑΣΜΑ		Zhou et al., 2021
2.	ETHYL, ISOPROPYL, ISOBUTYL, CYCLOHEXYL, AND PINACOLYL METHYLPHOSPHONIC ACID	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΟΥΡΑ		Røen et al., 2014
3.	ΣΙΜΒΑΣΤΑΤΙΝΗ , ΟΞΥ ΣΙΜΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ	ΠΛΑΣΜΑ		J. Zhang et al., 2010
4.	ΑΤΟΡΒΑΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ		Yang et al., 2015

5.	ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ(JWH-018, JWH-073)	ΟΥΡΑ		Yanes & Lovett, 2012
6.	ΑΝΑΝΔΑΜΙΔΙΟ	ΠΛΑΣΜΑ		Xiong et al., 2015
7.	ΔΙΓΟΥΑΝΙΔΙΑ (ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ, ΦΕΝΦΟΡΜΙΝΗ, ΒΟΥΦΟΡΜΙΝΗ)	ΠΛΑΣΜΑ/ΟΥΡΑ		Alshishani et al., 2018
8.	ΤΑΚΡΟΛΙΜΟΥΣ, ΣΙΡΟΛΙΜΟΥΣ, ΕΒΕΡΟΛΙΜΟΥΣ, ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ Α	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Kvamsøe et al., 2020
9.	ΛΟΠΙΝΑΒΙΡΗ, ΡΙΤΟΝΑΒΙΡΗ	ΠΛΑΣΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Myasein et al., 2009
10.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D3	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	Alshabrawy et al., 2021
11.	THC, THC-COOH, 11-OH-THC, CBN, CBD	ΠΛΑΣΜΑ		da Silva et al., 2020

Πίνακας 5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	THC, 11-hydroxy-THC, THC-COOH, CBD, CBN	ΣΑΛΙΟ	Sergi et al., 2013
2.	ΝΤΟΠΑΜΙΝΗ, ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗ	ΟΥΡΑ	El-Beqqali et al., 2007
3.	9 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΟΠΠΟΕΙΔΗ	ΟΥΡΑ	da Cunha et al., 2020
4.	ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ, ΕΒΕΡΟΛΙΜΟΥΣ, ΣΙΡΟΛΙΜΟΥΣ ΚΑΙ ΤΑΚΤΟΛΙΜΟΥΣ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	Said et al., 2012
5.	ΚΥΚΛΟΦΟΣΦΑΜΙΔΗ	ΠΛΑΣΜΑ	Said et al., 2008

Πίνακας 6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΝ ΥΓΡΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	RGH-188 ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ/ΟΥΡΑ	Mészáros et al., 2008
2.	ΚΟΚΑΙΝΗ, ΒΕΝΖΟΥΛΕΚΓΟΝΙΝΗ, ΚΟΚΑΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ ΑΕΜΕ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	Takitane et al., 2018
3.	ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	J. Gugten et al., 2012
4.	ΚΛΟΖΑΠΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΟΥΡΑ	Wohlfarth et al., 2011
5.	ΝΤΟΠΑΜΙΝΗ	ΟΥΡΑ	Battal et al., 2021
6.	ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ (Ε2) ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΝΗ (Ε1)	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Bertelsen et al., 2020
7.	ΚΑΠΕΣΙΤΑΒΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ	Montange et al., 2010
8.	25(ΟΗ) ΒΙΤΑΜΙΝΗ D3 ΚΑΙ D2	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Højskov et al., 2010
9.	ΟΛΙΚΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Y. Wang et al., 2014
10.	ΚΑΜΠΟΖΑΝΤΙΝΙΒΗ, ΟΛΑΠΑΡΙΜΠΗ, ΠΑΛΜΠΟΣΙΚΛΙΜΠΗ, ΠΑΖΟΠΑΝΙΜΠΗ, ΣΟΡΑΦΕΝΙΜΠΗ, ΣΟΥΝΙΤΙΝΙΜΠΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ	Jolibois et al., 2019
11.	ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΕΔΙΟΝΗ, ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Gallagher et al., 2007

Πίνακας 7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΗ 8	ΟΥΡΑ	Mizuno & Kataoka, 2015
2.	ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΕΠΙΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΥΡΑ	Zhan et al., 2010
3.	ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΔΕΥΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΣΑΛΙΟ	Yasuhara et al., 2012
4.	ΤΕΣΤΟΣΤΡΟΝΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΔΕΥΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΣΑΛΙΟ	Kataoka et al., 2013
5.	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ (ΘΕΙΚΗ ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗ, ΘΕΙΚΗ ΔΕΥΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΘΕΙΚΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΘΕΙΚΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ)	ΣΑΛΙΟ	Kataoka & Nakayama, 2022
6.	7 ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	ΟΥΡΑ	Morisue Sartore et al., 2022

7.	8-OH-dGg, 8-oxo-dG	ΣΑΛΙΟ,ΟΥΡΑ	Kahremanoglu et al., 2020
----	--------------------	------------	---------------------------

Πίνακας 8 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΕ ΑΔΡΑΝΕΣ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ΑΡΙΠΠΙΡΖΟΛΗ, ΟΛΑΝΖΑΠΙΝΗ, ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗ, ΠΑΡΟΞΕΤΙΝΗ, ΡΙΣΠΕΡΙΔΟΝΗ, ΦΛΟΥΟΞΕΤΙΝΗ, ΜΟΚΛΟΒΕΜΙΔΗ, ΜΑΠΡΟΤΙΛΙΝΗ, ΠΙΡΟΝΙΑΖΙΔΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Zheng et al., 2021
2.	21 ΦΑΡΜΑΚΑ	ΣΑΛΙΟ		Valen et al., 2017
3.	ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	Meunier et al., 2015
4.	BENZOΔΙΑΖΕΠΙΝΕΣ	ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Sauve et al., 2012
5.	13 ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Ma et al., 2021
6.	16 ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		R. Chen et al., 2019
7.	ΦΛΟΥΟΞΕΤΙΝΗ ΝΟΡΦΛΟΥΟΞΕΤΙΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Y. Li et al., 2011
8.	ΜΕΘΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ, MDMA, THC	ΣΑΛΙΟ		Rositano et al., 2016
9.	ΡΕΤΙΝΟΛΗ, α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Hinchliffe et al., 2016
10.	ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΜΕΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΥΡΑ	ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ	Scheidweiler & Huestis, 2014
11.	28 ΝΑΡΚΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΟΥΡΑ		Maquille et al., 2009
12.	ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΠΛΑΣΜΑ		Owen & Keevil, 2013
13.	ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		J. G. Van Der Gugten et al., 2012

Πίνακας 9 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	β- BLOCKERS (ΑΤΕΝΟΛΟΛΗ, ΝΑΔΟΛΟΛΗ, ΜΕΤΟΠΡΟΛΟΛΗ, ΟΞΙΠΡΕΝΟΛΟΛΗ, ΛΑΒΗΤΑΛΟΛΗ ΚΑΙ ΠΡΟΠΡΑΝΟΛΟΛΗ)	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΟΥΡΑ	Mazaraki et al., 2021b

2.	BRORPHINE	ΣΑΛΙΟ	Florou et al., 2022
3.	ΑΝΤΙΠΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ (ΜΕΜΑΝΤΙΝΗ, ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗ, ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗ)	ΟΥΡΑ	Sidiropoulou et al., 2022b
4.	ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ, ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ, ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΕΔΙΟΝΗ	ΟΥΡΑ	Guedes-Alonso et al., 2016

Πίνακας 10 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΛΑΚΩΝ ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Α/Α	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΆΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	9 ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΤΡΩΚΤΙΚΟΚΤΟΝΑ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Guo et al., 2018
2.	ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ		Sørensen & Hasselstrøm, 2017
3.	ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Lindahl et al., 2018
4.	21 ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Gundersen et al., 2018
5.	ΑΙΘΥΛΟΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΔΙΟ, ΑΙΘΥΛΟΘΕΪΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Sidqey et al., 2021

Πίνακας 11 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΥΡΒΩΔΟΥΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Α/Α	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΆΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ΝΙΚΟΤΙΝΗ, ΚΟΤΙΝΙΝΗ, ΝΟΡΝΙΚΟΤΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	C. Yuan et al., 2013
2.	LSD, 2-ΟΞΟ-3-ΥΔΡΟΞΥ LSD	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΟΥΡΑ		Dolder et al., 2015

3.	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΙΝΑΣΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΠΛΑΣΜΑ		Couchman et al., 2012
4.	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΕΣ, ΒΕΝΖΟΥΛΕΚΓΟΝΙΝΗ, ΒΕΝΖΟΔΙΑΖΕΠΙΝΕΣ, ΟΠΙΟΥΧΑ, ΟΠΙΟΕΙΔΗ	ΟΥΡΑ		Schaefer et al., 2013
5.	ΣΙΤΑΛΟΠΡΑΜΗ, ΣΕΡΤΡΑΛΙΝΗ, ΒΟΥΠΡΟΠΙΟΝΗ, ΥΔΡΟΞΥΒΟΥΠΙΡΟΠΙΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Petrides et al., 2014
6.	ΔΗΕΑ, ΔΗΕΑΣ, 17Α-ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ, Δ4-ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΕΔΙΟΝΗ, ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Søeborg et al., 2013
7.	ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΟΡΤΙΖΟΝΗ	ΟΥΡΑ		Sánchez-Guijo et al., 2014
8.	ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΜΕΤΑΝΕΦΡΙΝΕΣ	ΠΛΑΣΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	X. He & Kozak, 2012
9.	ΜΕΘΟΤΡΕΞΑΤΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ (7-ΥΔΡΟΞΥ ΜΕΘΟΤΡΕΞΑΤΗ, ΔΑΜΡΑ)	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Schofield et al., 2015
10.	ΣΙΡΟΛΙΜΟΥΣ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	S. Wang & Miller, 2008
11.	ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ Α, ΤΑΚΡΟΛΙΜΟΥΣ, ΣΙΡΟΛΙΜΟΥΣ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Ceglarek et al., 2004
12.	ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ		Salameh et al., 2010
13.	8 ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΤΡΩΚΤΙΚΟΚΤΟΝΑ	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ/ ΟΥΡΑ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Fang et al., 2021
14.	ΜΕΤΑΛΟΤΙΝΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΝΗ	ΣΑΛΙΟ		Fustinoni et al., 2013
15.	20 ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥΣ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Sauvage et al., 2006
16.	25ΟΗΔ2, 25ΟΗΔ3	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	Bunch et al., 2009

Πίνακας 12 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΣΤΡΕΦΟΜΕΝΗ ΣΤΗΛΗ ΜΟΝΟΛΙΘΙΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	MAM-2201	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	Saito, Namera, et al., 2013
2.	ΕΠΕΡΙΖΟΝΗ, ΤΟΛΠΕΡΙΖΟΝΗ, ΤΙΖΑΝΙΔΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Miura et al., 2014
3.	ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΑΚΟΝΙΤΟΥ, ΚΟΛΧΙΚΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ ΟΥΡΑ	Saito et al., 2015
4.	ΤΕΤΡΟΔΟΤΟΞΙΝΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΟΥΡΑ	Saito et al., 2014
5.	ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ, ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Saito, Miura, et al., 2013
6.	ΚΕΤΟΥΞΙΜΑΜΠΗ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Shibata et al., 2017
7.	ΚΟΡΤΙΖΟΝΗ, ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ	ΟΥΡΑ	Matsumoto et al., 2017
8.	ΑΛΕΝΔΡΟΝΑΤΗ	ΠΛΑΣΜΑ	Yamada et al., 2018
9.	ΑΚΕΤΑΜΙΝΟΦΑΙΝΗ, ΑΜΙΤΡΙΠΤΥΛΙΝΗ, ΒΡΟΜΟΙΣΟΒΑΛΕΡΥΛΥΡΕΑ, ΔΙΦΑΙΝΥΔΡΑΜΙΝΗ, FENTROTΗΙΟΝ, ΜΑΛΑΤΗΙΟΝ, ΜΕΤΗΟΜΥΛ, ΝΙΤΡΑΖΕΠΑΜΗ, ΦΑΙΝΟΒΑΡΒΙΤΑΛΗ ΡΙΣΠΕΡΙΔΟΝΗ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	Usui et al., 2017

Πίνακας 13 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

A/A	ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1.	ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ (S-4, S-24, LGD2226) ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΔΕΛΤΑ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΥΣΩΜΑΤΩΝ (GW501615, GW0742, L165.041)	ΟΥΡΑ	Sukhanova et al., 2011
2.	ΙΤΡΑΚΟΝΑΖΟΛΗ	ΠΛΑΣΜΑ	Vogeser et al., 2008

3.	ΑΚΕΤΑΜΙΝΟΦΑΙΝΗ ΚΑΙ 9 ΔΟΜΙΚΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ/ΠΛΑΣΜΑ	Bylda et al., 2014b
4.	ΜΥΚΟΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΠΛΑΣΜΑ	Upadhyay et al., 2014

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΝΕΟΤΕΡΑ ΥΛΙΚΑ

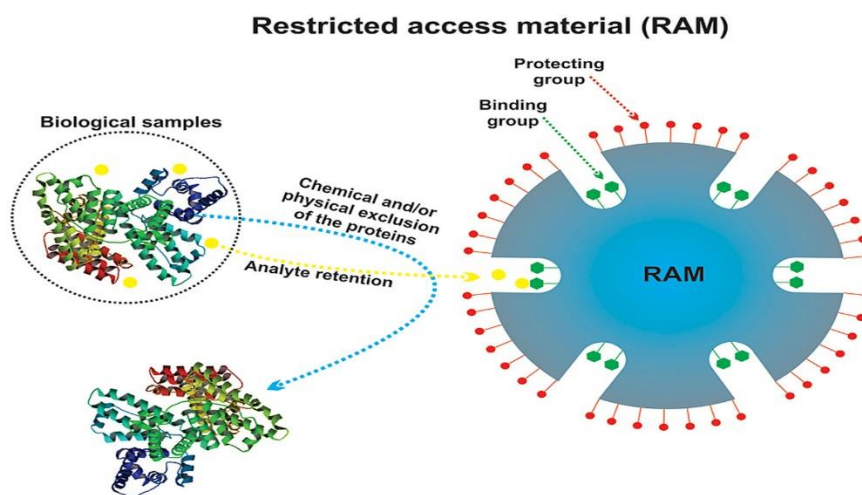
5.1 Νανοσωλήνες άνθρακα

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes, CNTs) διαθέτουν μεγάλες επιφάνειες και συνεπώς υψηλή ικανότητα προσρόφησης με ιδιότητα να συγκρατούν ουσίες από ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Γιαυτό τον λόγο έχει εφαρμογή για εκχυλίσεις αντίστροφης φάσης, ουσιών που είναι υδρόφιλες. Πρόκειται για κοίλους κυλίνδρους που αποτελούνται από ένα ή περισσότερα στρώματα γραφενίου. Έχουν υψηλή συγγένεια για αρωματικές ενώσεις και μπορούν να συσκευαστούν σε στήλες για SPE ή να χρησιμοποιηθούν σε εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (Matrix solid-phase dispersion -MSPD). Δεν έχουν αναφερθεί πολλές εφαρμογές σε βιολογικά υγρά ενώ συνηθισμένοι αναλύτες είναι μικρά υδρόφοβα μόρια που εκχυλίζονται από δείγματα νερού (Bylida et al., 2014a).

5.2 Υλικά περιορισμένης πρόσβασης

Τεχνική κατά την οποία τα υλικά περιορισμένης πρόσβασης (Restricted access materials, RAM) επιτρέπουν τον καθαρισμό βιολογικών δειγμάτων βασιζόμενα σε φυσικοχημικά εμπόδια διάχυσης. Αποτελούνται από περιοριστικό υδρόφιλο πορώδες υλικό το οποίο δεν συγκρατεί μεγάλα μόρια όπως πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια ενώ επιτρέπει την είσοδο μικρών μοριακά μορίων σε εσωτερικούς πόρους με υδρόφοβες επιφάνειες. Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η καταλληλότητα σχεδόν όλων των διαλυτών. Υπάρχουν 2 τύποι φάσεων RAM : α) υλικά εσωτερικής επιφάνειας που αποκλείουν την είσοδο των συστατικών του υποστρώματος στο εσωτερικό στρώμα, β) χημικά ημιδιαπερατές μεμβράνες που αποκλείουν συστατικά του υποστρώματος επικαλύπτοντας το εξωτερικό στρώμα με πολυμερή ή πρωτεΐνες. Και στις 2 περιπτώσεις το εσωτερικό στρώμα μπορεί να λειτουργήσει με τρόπο ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα της μεθόδου (Bylida et al., 2014a).

Τα RAM έχουν εφαρμοστεί στον ποσοτικό προσδιορισμό αντιμικροβιακών παραγόντων, αντικαταθλιπτικών αλλά και σε συνδυασμό με τα μαγνητικά σφαιρίδια για ποσοτικό προσδιορισμό θεραπευτικών φαρμάκων και στεροειδών σε βιολογικά δείγματα.



Εικόνα 26 Υλικά περιορισμένης πρόσβασης (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000326701730020X>)

5.3 Ανοσοπροσροφητικά

Βασική αρχή της τεχνικής είναι η συγγένεια αντιγόνου αντισώματος για κατακρήμνιση στοχευμένων ουσιών. Το επιθυμητό αντίσωμα συνδέεται σε στερεό υπόστρωμα ή gel και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως η SPE, η micro-SPE, η MEPS ή σε στήλες. (Augusto et al., 2013; Bylda et al., 2014a). Σύμφωνα με έρευνα η ικανότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι μεγαλύτερη από εκείνη των πολυκλωνικών. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί ως in-tube SPME για ποσοτικοποίηση ιντερφερόνης σε δείγμα πλάσματος όπως επίσης και ως SPE για εκχύλιση ProGRP και ωχρατοξίνης σε δείγματα ορού.

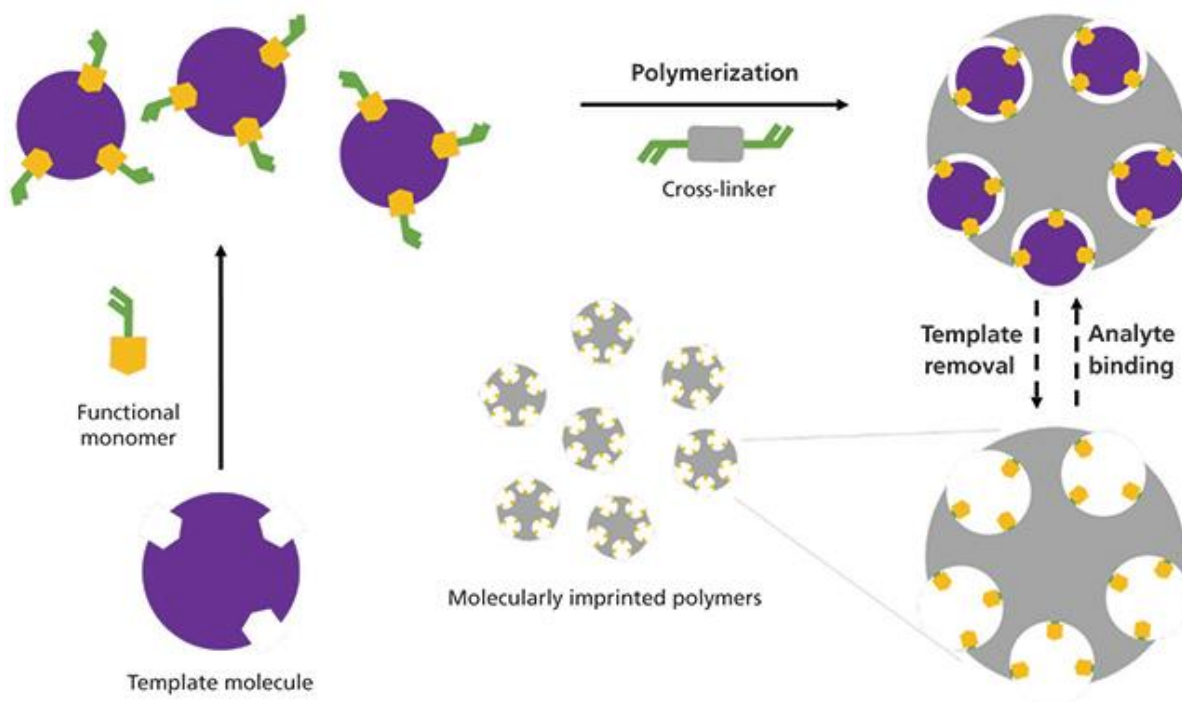
5.4 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή

Ένα πρότυπο μόριο αποτύπωσης (μόριο - στόχος) που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο αναμιγνύεται μαζί με ένα λειτουργικό μονομερές μέσα σε έναν συγκεκριμένο διαλύτη προκειμένου να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο. Στην συνέχεια παρουσία ενός κατάλληλου διασυνδέτη ξεκινάει ο πολυμερισμός. Μετά τον πολυμερισμό το πρότυπο μόριο αφαιρείται αφήνοντας μια τρισδιάστατη κοιλότητα συμπληρωματική με το πρότυπο ως προς το σχήμα, το μέγεθος και την λειτουργικότητα (Díaz-Álvarez & Martín-Esteban, 2019).

Το πρότυπο που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να φέρει στην δομή του χημικές ομάδες η οποίες όταν θα αλληλοεπιδράσουν με το λειτουργικό μονομερές θα σχηματιστεί ένα σταθερό

σύμπλοκο. Ο διαλύτης μέσα στον οποίο αναμιγνύεται το πρότυπο μόριο και το λειτουργικό μονομερές προτιμάται να είναι χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς ώστε να σταθεροποιηθούν οι δεσμοί υδρογόνου ή/και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο στοιχείων. Τέτοιοι διαλύτες είναι το χλωροφόρμιο και το τολουόλιο. Αντίθετα πρωτικοί διαλύτες, όπως το νερό και η μεθανόλη, αλλά και διαλύτες υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς όπως το ακετονιτρίλιο δεν συνιστώνται. Όσο αναφορά τους διασυνδέτες οι πιο συχνοί είναι διμεθυλακρυλική αιθυλενογλυκόλη (EGDMA), τριμεθακρυλικό τριμεθυλολοπροπάνιο (TRIM) και το διβινυλβενζένιο (DVB) (Díaz-Álvarez & Martín-Esteban, 2019).

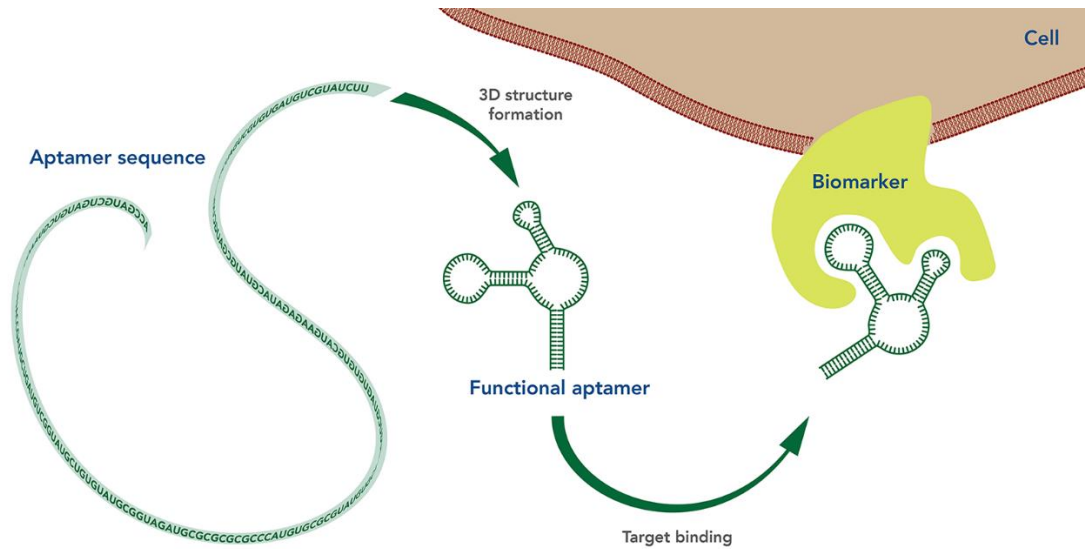
Πλεονέκτημα αυτών των πολυμερών είναι το χαμηλό κόστος, η ταχύτητα, και η αναπαραγωγιμότητα αλλά και η υψηλή ειδικότητα για εκχύλιση του αναλύτη και δομικά παρόμοιων ενώσεων από σύνθετα υποστρώματα. Η τεχνική έχει εφαρμοστεί για διαχωρισμό της τυλοσίνης, ναρβομυκίνης και τυρολακτίνης. Τόσο ο αναλύτης όσο και η δομικά παρόμοια ένωση εκχυλίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν χωρίς η παρεμβαίνουσα ουσία να δείξει συγγένεια προς το προσροφητικό υλικό. Τα MIPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για online αλλά και για offline διεργασίες όπως η εκχύλιση μοριακής αποτυπωμένης στερεάς φάσης (MISPE), η μαγνητική MIP, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), δυναμική μικροεκχύλιση υγρού-υγρού-στερεού (DLLSME) και εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης (MI-SBSE) η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για βενζοδιαζεπίνες στο πλάσμα, για νουκλεοσιδικούς αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης σε ορό, κοκαΐνη ή κεταμίνη σε δείγμα μαλλιών, τεστοστερόνη και βιοδείκτες σχετιζόμενους με καπνό σε δείγμα ούρων. Ίνες με επίστρωση MIP για μικροεκχύλιση στερεάς φάσης έχουν χρησιμοποιηθεί για λινεζολίδη σε βιολογικά υγρά με καλύτερα αποτελέσματα σε αντίθεση με την LLE ωστόσο λόγω μειονεκτημάτων χρειάζεται βελτίωση.



Εικόνα 27 Σχηματισμός μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (<https://www.chromatographyonline.com/view/molecular-imprinting-sample-preparation>)

5.5 Απταμερή

Τα απταμερή (Aptamers) αποτελούν συνθετικά μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, και διπολικές αλληλεπιδράσεις σχεδιασμένα ειδικά για συγκεκριμένο αναλύτη. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται συστηματική εξέλιξη των προσδεμάτων με εκθετική μέθοδο εμπλουτισμού (SELEX) απομονώνονται συγκεκριμένα νουκλεϊκά οξέα που έχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τον αναλύτη. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής έναντι των αντισωμάτων είναι ότι η σύνθεση τους γίνεται χωρίς την χρήση πειραματόζων. Επιπροσθέτως, η υψηλή ειδικότητα και η καλή σταθερότητα των απταμερών με τον αναλύτη, η ευκολία στην σύνθεση τους και η ελεγχόμενη τροποποίηση, το χαμηλό κόστος καθώς επίσης και απουσία τοξικότητας αποτελούν παράγοντες που χαρακτηρίζουν την τεχνική αυτή ως ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα στο πεδίο της βιοϊατρικής έρευνας (Du et al., 2019).



Εικόνα 28 Σχηματισμός απταμερών για δέσμευση σε συγκεκριμένους στόχους
 (<https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/planning-to-work-with-aptamers>)

Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για εκχύλιση κοκαΐνης και τετρακυκλινών σε συνδυασμό με φασματομετρία κινητικότητας ιόντων και έχει ποσοστά ανάκτησης έως και 90% ακόμα και σε σύνθετα υποστρώματα όπως το πλάσμα κάτι που επιβεβαιώνει την υψηλή ειδικότητα αλλά και για εκχύλιση θρομβίνης από δείγμα ορού μετά από καθήλωση των απταμερών σε πολυμερή νανοϊνες (Bylda et al., 2014a; Luzi et al., 2003).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βιοδείκτες είναι ουσίες που έχουν απασχολήσει την ιατρική κοινότητα εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Από την ανακάλυψη τους έως και τον προσδιορισμό τους σε βιολογικά υγρά, για εξετάσεις ρουτίνας, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αναλυτικές τεχνικές. Η ανάγκη για διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών, και η πρόβλεψη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών μεθόδων με σκοπό την παραγωγή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων, μια εκ των οποίων είναι η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.

Η προκατεργασία των δειγμάτων αποτελεί αναπόσπαστο μέρος μιας ανάλυσης στον χώρο των κλινικών εργαστηρίων και αυτό το οποίο καταλαμβάνει συνήθως το μεγαλύτερο χρονικά μέρος μέχρι και την απόδοση των αποτελεσμάτων.

Οι τεχνικές προκατεργασίας που υπάρχουν και εφαρμόζονται με επιτυχία στην βιοανάλυση, σήμερα, περιλαμβάνουν:

- τις παραδοσιακές τεχνικές (όπως η καταβύθιση πρωτεϊνών, η υγρή-υγρή εκχύλιση και η εκχύλιση στερεάς φάσης)
- νέες τεχνικές,
- αλλά και εξέλιξη κλασικών

ώστε να επιτρέπουν την ανάλυση μικρότερων όγκων δείγματος, ταχύτερα και με μικρότερο κόστος. Αυτό επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη νέων πληρωτικών υλικών και τεχνολογιών που προσφέρουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και οικολογικότερη προσέγγιση στην χρήση διαλυτών.

Συμπερασματικά η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής για προκατεργασία βιολογικών υγρών προκειμένου να προσδιοριστούν οι βιοδείκτες που ενδιαφέρουν το εκάστοτε εργαστήριο, πρέπει να αξιολογεί παράγοντες, όπως, τις χημικές ιδιότητες των βιοδεικτών, το εύρος των συγκεντρώσεων τους που θα αποδώσουν κλινική αξία, τον διαθέσιμο εργαστηριακό εξοπλισμό του εργαστηρίου, τον καθημερινό όγκο εργασίας, καθώς και το απαιτούμενο κόστος για την ανάπτυξη και την εφαρμογή τους στην ρουτίνα του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοδείκτες είναι μόρια ο προσδιορισμός των οποίων στα κλινικά εργαστήρια έχει μεγάλη διαγνωστική και κλινική αξία. Ο προσδιορισμός βιοδεικτών μπορεί να γίνει σε διάφορα βιολογικά υγρά, με το αίμα και τα ούρα να είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα. Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) αποτελεί μια από τις ευρύτερα εφαρμοζόμενες αναλυτικές τεχνικές στην ανάλυση βιοδεικτών, με πλεονεκτήματα όπως ανάλυση μικρού όγκου δειγμάτων, την ταχύτητα ανάλυσης, τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών αναλυτών, τη μεγάλη εξειδίκευση, τον προσδιορισμό θερμικά ασταθών και μη πτητικών ενώσεων, την αποφυγή παραγωγοποίησης των αναλυτών κλπ.

Η προαναλυτική επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων για προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών σε ένα κλινικό εργαστήριο αποτελεί απαραίτητο στάδιο που προηγείται της ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας. Η σημασία της είναι καθοριστική, και εξασφαλίζει αξιόπιστα αποτελέσματα για την σωστή διάγνωση, πρόβλεψη, παρακολούθηση ασθενειών και προσδιορισμό επιπέδων φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανασκόπηση και παρουσίαση επιλεγμένων τεχνικών προκατεργασίας βιολογικών υγρών για την ανάλυση βιοδεικτών, με εφαρμογή της μεθοδολογίας LC-MS/MS.

Η καταβύθιση πρωτεϊνών, η εκχύλιση στερεάς φάσης και η υγρή-υγρή εκχύλιση αποτελούν τις βασικές τεχνικές προκατεργασίας. Εκτός από αυτές, σήμερα χρησιμοποιούνται τεχνικές οι οποίες αποτελούν νέες τεχνικές ή εξέλιξη των κλασσικών τεχνικών ώστε να επιτρέπουν ανάλυση μικρότερων όγκων βιολογικών υγρών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, η εκχύλιση υγρού – υγρού με εξαλάτωση, η εκχύλιση σε αδρανές στερεό υπόστρωμα, η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο, η εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης, η μικροεκχύλιση με πακτωμένο προσροφητικό υλικό και η εκχύλιση με περιστρεφόμενη στήλη μονολιθίου. Επιπλέον τεχνολογίες όπως οι πλάκες αφαίρεσης φωσφολιπιδίων, τα μαγνητικά σφαιρίδια, η εκχύλιση τυρβώδους ροής καθώς και η χρήση νεότερων υλικών όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, υλικά περιορισμένης πρόσβασης, ανοσοπροσροφητικά, μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή και απταμερή επιτρέπουν μεγαλύτερη ανάκτηση των αναλυτών και απομάκρυνση των παρεμποδίζουσων ουσιών και συμβάλλουν

στην επίτευξη αποτελεσμάτων με μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία. Για την εκτέλεση αυτών των τεχνικών χρησιμοποιούνται διάφορα προσροφητικά υλικά και διαλυτές έκλυσης.

Συμπέρασμα της εργασίας αυτής είναι ότι για την επιλογή μιας τεχνικής προκατεργασίας δείγματος για προσδιορισμό ενός βιοδείκτη, πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν παράμετροι όπως οι χημικές ιδιότητες του βιοδείκτη, το κόστος και ο χρόνος που απαιτείται για την διενέργεια την συγκεκριμένης ανάλυσης καθώς και ο εργαστηριακός εξοπλισμός που διαθέτει κάθε εργαστήριο. Τέλος, η απόδοση που προσφέρει η εκάστοτε τεχνική σε επίπεδο ευαισθησίας και ειδικότητας είναι ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας που θα οδηγήσει στην επιλογή της τεχνικής που θα εφαρμοστεί για αναλύσεις ρουτίνας του εργαστηρίου.

ABSTRACT

Biomarkers are molecules whose determination in clinical laboratories has great diagnostic and clinical value. The determination of biomarkers can be performed in various biological fluids, with blood and urine being the most widely used. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) is one of the most widely applied analytical techniques in biomarker analysis, due to its advantages over others, such as high specificity and sensitivity, speed, small sample volume, simultaneous determination of multiple analytes, determination of thermally unstable and non-volatile compounds, the avoidance of derivatization of the analytes, etc.

The pre-analytical processing of biological samples is a mandatory step for the determination of various biomarkers by liquid chromatography-mass spectrometry. Its importance is decisive, and ensures reliable results for the correct diagnosis, prediction, monitoring of diseases and determination of drug levels.

The purpose of this work is to review and present selected sample preparation techniques of biological fluids suitable for the analysis of biomarkers, applying the LC-MS/MS methodology.

Protein precipitation, solid phase extraction and liquid-liquid extraction are the mainly used pretreatment techniques. Moreover, new techniques or evolution of classic techniques are used today, allowing the analysis of smaller volumes of biological fluids by using smaller volumes of elution solvents. These include solid phase microextraction, salting-out assisted liquid-liquid extraction, supported liquid extraction, fabric phase sorptive extraction, stir bar sorptive extraction, microextraction by packed sorbent and monolithic spin column extraction. Additional technologies, such as phospholipid removal plates, magnetic beads, turbulent flow extraction, as well as, the use of newer materials, such as carbon nanotubes, restricted access materials, immunosorbents, molecularly imprinted polymers and aptamers, enable greater recovery of analytes and removal of interfering substances, and resulting to more specific and sensitive biomarkers identification and quantification.

In conclusion, the selection of the most suitable sample preparation technique for the determination of specific biomarker, should be based on the evaluation of the following parameters: the chemical properties of the biomarker, the cost and the time required to perform the specific analysis as well as the available laboratory equipment. Furthermore, the

performance offered by each technique in terms of sensitivity and specificity is probably the most important factor that will affect the choice of the applied technique for routine laboratory analyses.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Rehim, M. (2004). New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 801(2), 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.042>
- Adaway, J. E., Peitzsch, M., & Keevil, B. G. (2015). A novel method for the measurement of plasma metanephrines using online solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 52(3), 361–369. <https://doi.org/10.1177/0004563214546560>
- Alshabrawy, A. K., Bergamin, A., Sharma, D. K., Hickey, S. M., Brooks, D. A., O’Loughlin, P., Wiese, M. D., & Anderson, P. H. (2021). LC-MS/MS analysis of vitamin D3 metabolites in human serum using a salting-out based liquid-liquid extraction and DAPTAD derivatization. *Journal of Chromatography B*, 1173, 122654. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122654>
- Alshishani, A., Salhimi, S. M., & Saad, B. (2018). Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. *Journal of Chromatography B*, 1073, 51–59. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.12.013>
- Alvi, S. N., & Hammami, M. M. (2019). A Simple Ultrapformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 4909352. <https://doi.org/10.1155/2019/4909352>
- Amaravadi, L. (2016). Biomarker measurements: How far have we come and where are we heading? *Bioanalysis*, 8(23), 2383–2386. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-4987>
- Andersen, D. W., & Linnet, K. (2014). Screening for Anabolic Steroids in Urine of Forensic Cases Using Fully Automated Solid Phase Extraction and LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(9), 637–644. <https://doi.org/10.1093/jat/bku098>
- Ankarberg-Lindgren, C., Andersson, M. X., & Dahlgren, J. (2020). Determination of estrone sulfate, testosterone, androstenedione, DHEAS, cortisol, cortisone, and 17 α -

- hydroxyprogesterone by LC-MS/MS in children and adolescents. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 80(8), 672–680.
<https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1829699>
- Arora, B., Velpandian, T., Saxena, R., Lalwani, S., Dogra, T. D., & Ghose, S. (2016). Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. *Drug Testing and Analysis*, 8(1), 86–97.
<https://doi.org/10.1002/DTA.1797>
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148.
<https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Augusto, F., Hantao, L. W., Mogollón, N. G. S., & Braga, S. C. G. N. (2013). New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.08.012>
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). *BR1418.pdf*. 737–747.
- Barco, S., Mesini, A., Barbagallo, L., Maffia, A., Tripodi, G., Pea, F., Saffioti, C., Castagnola, E., & Cangemi, G. (2020). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: Application to critically ill pediatric patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 186, 113273.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113273>
- Battal, D., Aktaş Şüküroğlu, A., Alkas, F., & Unlusayın, İ. (2021). A Rapid, Precise, And Sensitive LC–MS/MS Method for Quantitative Determination of Urinary Dopamine by Simple Liquid-liquid Extraction Technique. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.60486>
- Baygildiev, T., Vokuev, M., Ogorodnikov, R., Braun, A., Rybalchenko, I., & Rodin, I. (2019). Simultaneous determination of organophosphorus nerve agent markers in urine by IC-MS/MS using anion-exchange solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 1132, 121815. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121815>
- Becker, A., Schalin-Jäntti, C., & Itkonen, O. (2021). Comparison of Serum and Urinary 5-Hydroxyindoleacetic Acid as Biomarker for Neuroendocrine Neoplasms. *Journal of the Endocrine Society*, 5(8), bvab106. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab106>

- Bertelsen, B.-E., Kellmann, R., Viste, K., Bjørnevik, A. T., Eikesdal, H. P., Lønning, P. E., Sagen, J. V., & Almås, B. (2020). An Ultrasensitive Routine LC-MS/MS Method for Estradiol and Estrone in the Clinically Relevant Sub-Picomolar Range. *Journal of the Endocrine Society*, 4(6), bvaa047. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa047>
- Biagini, D., Antoni, S., Lomonaco, T., Ghimenti, S., Salvo, P., Bellagambi, F. G., Scaramuzza, R. T., Ciantelli, M., Cuttano, A., Fuoco, R., & Di Francesco, F. (2020). Micro-extraction by packed sorbent combined with UHPLC-ESI-MS/MS for the determination of prostanoids and isoprostanoids in dried blood spots. *Talanta*, 206(August 2019), 120236. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120236>
- Bunch, D. R., Miller, A. Y., & Wang, S. (2009). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for serum 25-hydroxyvitamin D2/D3 using a turbulent flow online extraction technology. 47(12), 1565–1572. <https://doi.org/doi:10.1515/CCLM.2009.342>
- Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U., & Volmer, D. A. (2014a). Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, 139(10), 2265–2276. <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>
- Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U., & Volmer, D. A. (2014b). Simultaneous quantification of acetaminophen and structurally related compounds in human serum and plasma. *Drug Testing and Analysis*, 6(5), 451–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.1527>
- Calderón-Santiago, M., Priego-Capote, F., Jurado-Gámez, B., & Luque de Castro, M. D. (2014). Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of Chromatography A*, 1333, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.071>
- Califf, R. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243, 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Cao, Y., Zhao, F., Chen, J., Huang, T., Zeng, J., Wang, L., Sun, X., Miao, Y., Wang, S., & Chen, C. (2020). A simple and rapid LC-MS/MS method for the simultaneous determination of eight antipsychotics in human serum, and its application to therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, 1147, 122129. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2020.122129>

- Cao, Z., Lu, Y., Cong, Y., Liu, Y., Li, Y., Wang, H., Zhang, Q., Huang, W., Liu, J., Dong, Y., Tang, G., Luo, Y. R., Yin, C., & Zhai, Y. (2020). Simultaneous quantitation of four androgens and 17-hydroxyprogesterone in polycystic ovarian syndrome patients by LC-MS/MS. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *34*(12), e23539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcla.23539>
- Carmical, J., & Brown, S. (2016). The impact of phospholipids and phospholipid removal on bioanalytical method performance. *Biomedical Chromatography*, *30*(5), 710–720. <https://doi.org/10.1002/bmc.3686>
- Ceglarek, U., Lembcke, J., Fiedler, G. M., Werner, M., Witzigmann, H., Hauss, J. P., & Thiery, J. (2004). Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, *346*(2), 181–190. <https://doi.org/10.1016/J.CCCN.2004.03.017>
- Chan, N., & Kaleta, E. J. (2015). *Quantitation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS using solid-phase extraction and fixed-charge derivitization in comparison to immunoextraction*. *53*(9), 1399–1407. <https://doi.org/doi:10.1515/cclm-2014-0884>
- Chauhan, A. (2014). GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, *5*(6). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000222>
- Chen, C.-Y., Jhou, Y.-T., Lee, H.-L., & Lin, Y.-W. (2016). Simultaneous, rapid, and sensitive quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cotinine in human urine by on-line solid-phase extraction LC-MS/MS: correlation with tobacco exposure biomarkers NNAL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(23), 6295–6306. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9741-3>
- Chen, R., Ning, Z., Zheng, C., Yang, Y., Zhang, C., Ou, X., Chen, K., Yu, H., Wei, X., Zhao, Q., & He, J. (2019). Simultaneous determination of 16 alkaloids in blood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with supported liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, *1128*, 121789. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121789>
- Cheng, Z., & Jiang, H. (2019). Supported liquid extraction (SLE) in LC-MS bioanalysis. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*, 76–84.

<https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch6>

Cook-Botelho, J. C., Bachmann, L. M., & French, D. (2017). Chapter 10 - Steroid hormones. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3/00010-9>

Couchman, L., Birch, M., Ireland, R., Corrigan, A., Wickramasinghe, S., Josephs, D., Spicer, J., & Flanagan, R. J. (2012). An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(6), 1685–1695. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5970-2>

Cross, T., & Hornshaw, M. (2016). Can LC and LC-MS ever replace immunoassays? EXPERT OPINION. *Journal of Applied Bioanalysis*, 2, 108–116.

<https://doi.org/10.17145/jab.16.015>

da Cunha, K. F., Rodrigues, L. C., Huestis, M. A., & Costa, J. L. (2020). Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed sorbent and liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1624, 461241. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461241>

da Silva, C. P., Dalpiaz, L. P. P., Gerbase, F. E., Muller, V. V., da Silva, A., Lizot, L. F., Hahn, R. Z., da Costa, J. L., Antunes, M. V., & Linden, R. (2020). Determination of cannabinoids in plasma using salting-out-assisted liquid–liquid extraction followed by LC–MS/MS analysis. *Biomedical Chromatography*, 34(12), e4952.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.4952>

Desmons, A., Thioulouse, E., Hautem, J. Y., Saintier, A., Baudin, B., Lamazière, A., Netter, C., & Moussa, F. (2020). Direct liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of amino acids in human plasma. *Journal of Chromatography A*, 1622, 461135.

<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461135>

Díaz-Álvarez, M., & Martín-Esteban, A. (2019). Sample Preparation via Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in LC-MS Bioanalysis. In *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* (pp. 139–151). John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch11>

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology.

- Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(7), 363–414.
<https://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>
- Dolder, P. C., Liechti, M. E., & Rentsch, K. M. (2015). Development and validation of a rapid turboflow LC-MS/MS method for the quantification of LSD and 2-oxo-3-hydroxy LSD in serum and urine samples of emergency toxicological cases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(6), 1577–1584. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8388-1>
- Dong, M. (2019a). HPLC/UHPLC Instrumentation and Trends. In *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists* (pp. 81–115). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119313786.ch4>
- Dong, M. (2019b). Introduction. In *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists* (pp. 1–13). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119313786.ch1>
- Drummer, O. H. (2010). Forensic toxicology. In A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology* (pp. 579–603). Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_18
- Du, F., Wei, Z., Zeng, Q., & Ruan, G. (2019). Aptamer-based Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis. In *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* (pp. 174–187). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch14>
- Dunlop, A. J., Clunie, I., Stephen, D. W. S., & Allison, J. J. (2014). Determination of Cotinine by LC–MS–MS with Automated Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 52(4), 351–356. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt038>
- Dutta Sanchari Sinha. (2018). *What are Immunoassays?* <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Immunoassays.aspx>
- Dziurkowska, E., Jiménez-Morigosa, C., López-Rivadulla, M., & Wesolowski, M. (2020). Development and validation of solid-phase extraction coupled with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of olanzapine in saliva. *Journal of Chromatography B*, 1136, 121896.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121896>
- Eisert, R., & Pawliszyn, J. (1997). Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 69(16), 3140–3147. <https://doi.org/10.1021/ac970319a>

- El-Beqqali, A., Kussak, A., & Abdel-Rehim, M. (2007). Determination of dopamine and serotonin in human urine samples utilizing microextraction online with liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 30(3), 421–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.200600369>
- Eryavuz Onmaz, D., Abusoglu, S., Onmaz, M., Yerlikaya, F. H., & Unlu, A. (2021). Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS / MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. *Journal of Chromatography B*, 1176, 122768. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122768>
- Eryavuz Onmaz, D., Abusoglu, S., Yaglioglu, H., Abusoglu, G., & Unlu, A. (2021). Developing a robust, fast and reliable measurement method for the analysis of methylarginine derivatives and related metabolites. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, 19, 34–45. <https://doi.org/10.1016/J.JMSACL.2021.02.002>
- Fang, L., Qiu, F., Yu, X., Yan, J., & Zhu, Y. (2021). Rapid measurement of anticoagulant rodenticides in human blood and urine using online turbulent flow chromatography coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, 33(4), 361–370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1556/1326.2020.00846>
- Feng, J., Wang, L., Dai, I., Harmon, T., & Bernert, J. T. (2007). Simultaneous Determination of Multiple Drugs of Abuse and Relevant Metabolites in Urine by LC-MS-MS*. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(7), 359–368. <https://doi.org/10.1093/jat/31.7.359>
- Fernandes, C., Jiayu, P., Sandra, P., & Lancas, F. (2006). Stir Bar Sorptive Extraction-LC-MS for the Analysis of Fluoxetine in Plasma. *Chromatographia*, 64, 517–521. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0078-5>
- Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., & Whelpton, R. (2008). *Fundamentals of Analytical Toxicology*.
- Florou, D., Vlachou, T., Sakkas, V., & Boumba, V. (2022). Application of Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) Engaged to Tandem LC-MS/MS for Quantification of Brorphine in Oral Fluid. *Journal of Xenobiotics*, 12(4), 356–364. <https://doi.org/10.3390/jox12040025>
- Fustinoni, S., Polledri, E., & Mercadante, R. (2013). High-throughput determination of cortisol, cortisone, and melatonin in oral fluid by on-line turbulent flow liquid

chromatography interfaced with liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM, 27, 1450–1460.

<https://doi.org/10.1002/rcm.6601>

Gallagher, L. M., Owen, L. J., & Keevil, B. G. (2007). Simultaneous determination of androstenedione and testosterone in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 44(1), 48–56.

<https://doi.org/10.1258/000456307779595922>

Garland, J., Philcox, W., Keshu, K., Morrow, P., Lam, L., Spark, A., Palmiere, C., Elstub, H., Cala, A. D., Stables, S., & Tse, R. (2018). Differences in Sampling Site on Postmortem Cerebrospinal Fluid Biochemistry: A Preliminary Study. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 39(4), 304–308.

<https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000420>

Gazioglu, I., Kabir, A., Zengin, O. S., Kepekci Tekkeli, E., Furton, K. G., Tartaglia, A., & Locatelli, M. (2021). Development of sol-gel phenyl/methyl/poly (dimethylsiloxane) sorbent coating for fabric phase sorptive extraction and its application in monitoring human exposure to selected polycyclic aromatic hydrocarbons using high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 1163, 122520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122520>

Gika, H., & Theodoridis, G. (2011). Sample preparation prior to the LC–MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples. *Bioanalysis*, 3(14), 1647–1661.

<https://doi.org/10.4155/bio.11.122>

Gil, F., & Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 21(4), 245–255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jat.769>

Giorgetti, A., Barone, R., Pelletti, G., Garagnani, M., Pascali, J., Haschimi, B., & Auwärter, V. (2022). Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Testing and Analysis*, 14(2), 202–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.3170>

Goto, Y., Araki, T., Fuchigami, T., & Arizono, K. (2010). Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine by LC-MS-MS after stir-bar sorptive extraction and liquid desorption. *Forensic Toxicology*, 28(1), 38–42. <https://doi.org/10.1007/s11419-009-0081-2>

- Guedes-Alonso, R., Ciofi, L., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Del Bubba, M., Kabir, A., & Furton, K. G. (2016). Determination of androgens and progestogens in environmental and biological samples using fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1437*, 116–126. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2016.01.077>
- Gugten, J., Dubland, J., Liu, H.-F., Wang, A., Joseph, C., & Holmes, D. (2012). Determination of serum aldosterone by liquid chromatography and tandem mass spectrometry: A liquid-liquid extraction method for the ABSCIEX API-5000 mass spectrometry system. *Journal of Clinical Pathology*, *65*, 457–462. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200564>
- Gundersen, P. O. M., Helland, A., Spigset, O., & Hegstad, S. (2018). Quantification of 21 antihypertensive drugs in serum using UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, *1089*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2018.04.038>
- Guo, H., Wang, J., Wu, Y., Liu, W., Bu, J., & Zhao, Q. (2018). Sensitive and simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in human blood by UPLC–MS-MS with phospholipid removal pretreatment. *Journal of Analytical Toxicology*, *42*(7), 459–466. <https://doi.org/10.1093/jat/bky024>
- Hamidi, S., Alipour-Ghorbani, N., & Hamidi, A. (2018). Solid Phase Microextraction Techniques in Determination of Biomarkers. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *48*(4), 239–251. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1396885>
- He, M., Wang, Y., Zhang, Q., Zang, L., Chen, B., & Hu, B. (2021). Stir bar sorptive extraction and its application. *Journal of Chromatography A*, *1637*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461810>
- He, X., & Kozak, M. (2012). Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephrines with ion-pairing turbulent flow online extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(9), 3003–3010. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5768-2>
- Hegstad, S., Kristoffersen, L., Liane, V. H., & Spigset, O. (2017). EtG and EtS in autopsy blood samples with and without putrefaction using UPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, *41*(2), 107–113. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw123>
- Helmenstine, A. M. (n.d.). *What Is the Chemical Composition of Urine?*

<https://www.thoughtco.com/the-chemical-composition-of-urine-603883>

- Hinchliffe, E., Rudge, J., & Reed, P. (2016). A novel high-throughput method for supported liquid extraction of retinol and alpha-tocopherol from human serum and simultaneous quantitation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, *53*(4), 434–445. <https://doi.org/10.1177/0004563215596024>
- Højskov, C. S., Heickendorff, L., & Møller, H. J. (2010). High-throughput liquid–liquid extraction and LCMSMS assay for determination of circulating 25(OH) vitamin D3 and D2 in the routine clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, *411*(1–2), 114–116. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2009.10.010>
- Hu, X., Bian, X., Gu, W. Y., Sun, B., Gao, X., Wu, J. L., & Li, N. (2021). Stand out from matrix: Ultra-sensitive LC–MS/MS method for determination of histamine in complex biological samples using derivatization and solid phase extraction. *Talanta*, *225*, 122056. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.122056>
- Human Metabolome Database: Browsing metabolites*. (n.d.). Retrieved July 1, 2022, from <https://hmdb.ca/metabolites?utf8=✓&csf=1&filter=true>
- Inoue, K., Ikemura, A., Tsuruta, Y., Tsutsumiuchi, K., Hino, T., & Oka, H. (2012). On-line solid-phase extraction LC-MS/MS for the determination of Ac-SDKP peptide in human plasma from hemodialysis patients. *Biomedical Chromatography*, *26*(2), 137–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.1636>
- Jagerdeo, E., Montgomery, M. A., LeBeau, M. A., & Sibum, M. (2008). An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood. *Journal of Chromatography B*, *874*(1–2), 15–20. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2008.08.026>
- Jagerdeo, E., Schaff, J. E., Montgomery, M. A., & LeBeau, M. A. (2009). A semi-automated solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the analysis of tetrahydrocannabinol and metabolites in whole blood. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *23*(17), 2697–2705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.4174>
- Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, *152*(October

- 2019), 104319. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104319>
- Jolibois, J., Schmitt, A., & Royer, B. (2019). A simple and fast LC-MS/MS method for the routine measurement of cabozantinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, sorafenib, sunitinib and its main active metabolite in human plasma. *Journal of Chromatography B*, *1132*, 121844. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121844>
- Jones, A. W. (2006). Urine as a biological specimen for forensic analysis of alcohol and variability in the urine-to-blood relationship. *Toxicological Reviews*, *25*(1), 15–35. <https://doi.org/10.2165/00139709-200625010-00002>
- Jones, S., McGowan, C., Boyle, S., Ke, Y., Chan, C. H. M., & Hwang, H. (2022). An overview of sample preparation in forensic toxicology. *WIREs Forensic Science*, *4*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1436>
- Kabir, A., & Furton, K. G. (2020). 13 - Fabric phase sorptive extraction: a new generation, green sample preparation approach. In C. F. Poole (Ed.), *Solid-Phase Extraction* (pp. 355–386). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00013-3>
- Kabir, A., Furton, K. G., & Malik, A. (2013). Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *45*, 197–218. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.11.014>
- Kabir, A., Furton, K., Tinari, N., Grossi, L., Innosa, D., macerola, daniela, Tartaglia, A., Donato, V., D'Ovidio, C., & Locatelli, M. (2018). Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array Detection Method for Simultaneous Monitoring of Three Inflammatory Bowel Disease Treatment Drugs in Whole Blood, Plasma and Urine. *Journal of Chromatography B*, *1084*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.028>
- Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J., & Furton, K. G. (2017). Fabric Phase Sorptive Extraction Explained. *Separations*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/separations4020021>
- Kabir, A., & Samanidou, V. (2021). Fabric phase sorptive extraction: A paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation. *Molecules*, *26*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>
- Kahremanoglu, K., Temel, E. R., Korkut, T. E., Nalbant, A. A., Azer, B. B., Durucan, C., Volkan, M., & Boyaci, E. (2020). Development of a solid-phase microextraction LC–

- MS/MS method for determination of oxidative stress biomarkers in biofluids. *Journal of Separation Science*, 43(9–10), 1925–1933.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.202000211>
- Kataoka, H. (2015). SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis*, 7(17), 2135–2144. <https://doi.org/10.4155/bio.15.145>
- Kataoka, H., Ehara, K., Yasuhara, R., & Saito, K. (2013). Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 331–340.
<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6479-4>
- Kataoka, H., & Nakayama, D. (2022). Online In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Automated Analysis of Four Sulfated Steroid Metabolites in Saliva Samples. *Molecules*, 27(10).
<https://doi.org/10.3390/molecules27103225>
- Kazantzi, V., & Anthemidis, A. (2017). Fabric Sol–gel Phase Sorptive Extraction Technique: A Review. *Separations*, 4(20), 1–20. <https://doi.org/10.3390/separations4020020>
- Keçili, R., Büyüktiryaki, S., Dolak, I., & Hussain, C. M. (2019). The use of magnetic nanoparticles in sample preparation devices and tools. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis*, 75–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00005-0>
- Kirchhoff, F., Lorenzl, S., & Vogeser, M. (2010). An on-line solid phase extraction procedure for the routine quantification of urinary methylmalonic acid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. 48(11), 1647–1650.
<https://doi.org/doi:10.1515/CCLM.2010.310>
- Kohler, I., & Guillarme, D. (2014). Multi-target screening of biological samples using LC-MS/MS: Focus on chromatographic innovations. *Bioanalysis*, 6(9), 1255–1273.
<https://doi.org/10.4155/bio.14.80>
- Kumar, R., Gaurav, Heena, Malik, A. K., Kabir, A., & Furton, K. G. (2014). Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1359, 16–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.013>

- Kupiec, T., Slawson, M., Pragst, F., & Herzler, M. (2013). High-performance liquid chromatography. In *Clarkes's Forensic Toxicology* (Second edi, pp. 529–551).
- Kvamsøe, M. M., Hansen, K. R., Skadberg, Ø., Vethe, N. T., & Brede, C. (2020). Salting Out-Assisted Liquid–Liquid Extraction for Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Measurement of Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, and Cyclosporine a in Whole Blood. *Therapeutic Drug Monitoring*, 42(5). https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2020/10000/Salting_Out_Assisted_Liquid_Liquid_Extraction_for.8.aspx
- Lamy, E., Pilyser, L., Paquet, C., Bouaziz-Amar, E., & Grassin-Delyle, S. (2021). High-sensitivity quantification of acetylcholine and choline in human cerebrospinal fluid with a validated LC-MS/MS method. *Talanta*, 224, 121881. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121881>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248.
- Leung, K. S. Y., & Fong, B. M. W. (2014). LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(9–10), 2289–2301. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7542-5>
- Li, W., Jian, W., & Fu, Y. (2019). Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis. In *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* (pp. 1–30). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch1>
- Li, X., Li, S., & Kellermann, G. (2015). A novel mixed-mode solid phase extraction coupled with LC–MS/MS for the re-evaluation of free 3-nitrotyrosine in human plasma as an oxidative stress biomarker. *Talanta*, 140, 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.02.053>
- Li, Y., Emm, T., & Yeleswaram, S. (2011). Simultaneous determination of fluoxetine and its major active metabolite norfluoxetine in human plasma by LC-MS/MS using supported liquid extraction. *Biomedical Chromatography*, 25(11), 1245–1251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.1597>
- Libretexts, C. (n.d.). *Solid-Phase Extraction*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextu](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextu)

- Lindah, S., Dyrkorn, R., Spigset, O., & Hegstad, S. (2018). Quantification of Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Serum by UHPLC-MS/MS—Method Development, Validation, and Application. *Therapeutic Drug Monitoring*, *40*(3). https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2018/06000/Quantification_of_Apixaban,_Dabigatran,_Edoxaban,.13.aspx
- Liu, S., Song, Y., Wu, D., Lin, L., Shi, Y., & Han, X. (2020). A validated ultra-performance LC–MS/MS method for quantifying a novel oral EGFR inhibitor FCN-411 in human plasma. *Bioanalysis*, *12*(5), 295–304. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0290>
- Locatelli, M., Kabir, A., Innosa, D., Lopatriello, T., & Furton, K. G. (2017). A fabric phase sorptive extraction-High performance liquid chromatography-Photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, *1040*, 192–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.045>
- Luque De Castro, M. D. (2016). Sweat as a clinical sample: What is done and what should be done. *Bioanalysis*, *8*(2), 85–88. <https://doi.org/10.4155/bio.15.229>
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., & Mascini, M. (2003). New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *22*(11), 810–818. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01208-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01208-1)
- Ma, W., Gao, X., Guo, H., & Chen, W. (2021). Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment. *Journal of Chromatography B*, *1171*, 122608. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122608>
- Malsagova, K., Kopylov, A., Stepanov, A., Butkova, T., Izotov, A., & Kaysheva, A. (2020). Dried blood spot in laboratory: Directions and prospects. *Diagnostics*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>
- Manousi, N., Tzanavaras, P. D., & Zacharis, C. K. (2020). Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid. *Molecules*, *25*(9), 2096.
- Maquille, A., Guillarme, D., Rudaz, S., & Veuthey, J.-L. (2009). High-Throughput Screening of Drugs of Abuse in Urine by Supported Liquid–Liquid Extraction and UHPLC

- Coupled to Tandem MS. *Chromatographia*, 70, 1373–1380.
<https://doi.org/10.1365/s10337-009-1337-z>
- Matsumoto, A., Shimanoe, C., Tanaka, K., Ichiba, M., & Hara, M. (2017). Development of suitable method for large-scale urinary glucocorticoid analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1057, 62–69.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.04.031>
- Mayne, G., De Bloois, E., Dabelea, D., & Christians, U. (2021). Development and validation of an LC-MS/MS assay for the quantification of allopregnanolone and its progesterone-derived isomers, precursors, and cortisol/cortisone in pregnancy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(21), 5427–5438. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03523-0>
- Mazaraki, K., Kabir, A., Furton, K. G., Fytianos, K., Samanidou, V. F., & Zacharis, C. K. (2021a). Fast fabric phase sorptive extraction of selected β -blockers from human serum and urine followed by UHPLC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 199, 114053. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114053>
- Mazaraki, K., Kabir, A., Furton, K. G., Fytianos, K., Samanidou, V. F., & Zacharis, C. K. (2021b). Fast fabric phase sorptive extraction of selected β -blockers from human serum and urine followed by UHPLC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 199, 114053. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114053>
- McTaggart, M. P., & Keevil, B. G. (2021). A rapid LC-MS/MS assay for the measurement of serum methotrexate in patients who have received high doses for chemotherapy. *Annals of Clinical Biochemistry*, 58(6), 599–604. <https://doi.org/10.1177/00045632211031284>
- Merienne, C., Rousset, M., Ducint, D., Castaing, N., Titier, K., Molimard, M., & Bouchet, S. (2018). High throughput routine determination of 17 tyrosine kinase inhibitors by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 112–120.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.11.060>
- Mészáros, G. P., Ágai-Csongor, É., & Kapás, M. (2008). Sensitive LC–MS/MS methods for the quantification of RGH-188 and its active metabolites, desmethyl- and didesmethyl-RGH-188 in human plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2), 388–397. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2007.12.016>
- Meunier, C., Blondelle, D., Faure, P., Baguet, J. P., Le Goff, C., Chabre, O., & Ducros, V.

- (2015). Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*, 447, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2015.05.007>
- Miura, N., Saito, T., Taira, T., Yamagiwa, T., Morita, S., & Inokuchi, S. (2014). Rapid Simultaneous Determination of Eperisone, Tolperisone, and Tizanidine in Human Serum by Using a MonoSpin® C18 Extraction Column and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 97(6), 1546–1551. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-295>
- Mizuno, K., & Kataoka, H. (2015). Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112, 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2015.04.020>
- Montange, D., Bérard, M., Demarchi, M., Muret, P., Piédoux, S., Kantelip, J. P., & Royer, B. (2010). An APCI LC-MS/MS method for routine determination of capecitabine and its metabolites in human plasma. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(6), 670–677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.1759>
- Moosavi, S. M., Shekar, K., Fraser, J., Smith, M. T., & Ghassabian, S. (2016). High-throughput assay for quantification of the plasma concentrations of thiopental using automated solid phase extraction (SPE) directly coupled to LC–MS/MS instrumentation. *Journal of Chromatography B*, 1038, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.10.038>
- Morisue Sartore, D., Costa, J. L., Lanças, F. M., & Santos-Neto, Á. J. (2022). Packed in-tube SPME-LC-MS/MS for fast and straightforward analysis of cannabinoids and metabolites in human urine. *Electrophoresis*, 43(15), 1555–1566. <https://doi.org/10.1002/elps.202100389>
- Mulet, C. T., Tarifa, A., & DeCaprio, A. P. (2020). Comprehensive analysis of synthetic cannabinoids and metabolites in oral fluid by online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(28), 7937–7953. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02926-9>

- Myasein, F., Kim, E., Zhang, J., Wu, H., & El-Shourbagy, T. A. (2009). Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC–MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, *651*(1), 112–116. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2009.08.010>
- Namera, A., & Saito, T. (2015). Spin column extraction as a new sample preparation method in bioanalysis. *Bioanalysis*, *7*(17), 2171–2176. <https://doi.org/10.4155/bio.15.146>
- Nie, L.-J., Liang, J., Shan, F., Xu, Y.-Y., Yan, C.-Y., Zhou, X., Cheng, Z.-Y., & Xia, Q.-R. (2021). A UPLC–MS/MS method for determination of endogenous l-carnitine and acetyl-l-carnitine in serum of patients with depression. *Biomedical Chromatography*, *35*(3), e4991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.4991>
- Nishio, T., Toukairin, Y., Hoshi, T., Arai, T., & Nogami, M. (2021). Development of an LC–MS/MS method for quantification of 3-chloro-L-tyrosine as a candidate marker of chlorine poisoning. *Legal Medicine*, *53*, 101939. <https://doi.org/10.1016/J.LEGALMED.2021.101939>
- Nishio, T., Toukairin, Y., Hoshi, T., Arai, T., & Nogami, M. (2022). Quantification of 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid as a reliable marker of cyanide exposure using chemical derivatization followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *207*, 114429. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114429>
- Oliver Fiehn. (2017). Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. In *Curr Protoc Mol Biol*. (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Ouyang, G., & Jiang, R. (2016). Solid phase Microextraction: Recent Developments and Applications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Owen, L. J., Adaway, J. E., Davies, S., Neale, S., El-Farhan, N., Ducroq, D., Evans, C., Rees, D. A., MacKenzie, F., & Keevil, B. G. (2013). Development of a rapid assay for the analysis of serum cortisol and its implementation into a routine service laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*, *50*(4), 345–352. <https://doi.org/10.1177/0004563212473448>
- Owen, L. J., Adaway, J., Morris, K., Lockhart, S., & Keevil, B. G. (2014). A widely applicable plasma renin activity assay by LC-MS/MS with offline solid phase extraction.

Annals of Clinical Biochemistry, 51(3), 409–411.

<https://doi.org/10.1177/0004563214524558>

Owen, L. J., & Keevil, B. G. (2013). Supported liquid extraction as an alternative to solid phase extraction for LC-MS/MS aldosterone analysis? *Annals of Clinical Biochemistry*, 50(5), 489–491. <https://doi.org/10.1177/0004563213480758>

Owusu, B. Y., Pflaum, H., Garner, R., Foulon, N., Laha, T. J., & Hoofnagle, A. N. (2021). Development and validation of a novel LC-MS/MS assay for C-peptide in human serum. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, 19, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.JMSACL.2020.12.001>

Peersman, N., Elslande, J. Van, Lepage, Y., De Amicis, S., Desmet, K., & Vermeersch, P. (2020). UPLC-MS/MS method for determination of retinol and α -tocopherol in serum using a simple sample pretreatment and UniSpray as ionization technique to reduce matrix effects. 58(5), 769–779. <https://doi.org/doi:10.1515/cclm-2019-1237>

Petrides, A. K., Moskowitz, J., Johnson-Davis, K. L., Jannetto, P. J., Langman, L. J., Clarke, W., & Marzinke, M. A. (2014). The development and validation of a turbulent flow-liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of citalopram, sertraline, bupropion and hydroxybupropion in serum. *Clinical Biochemistry*, 47(15), 73–79. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2014.07.018>

Phillips, S., Oliveto, A., Mancino, M., & Hendrickson, H. (2021). Development and Validation of a Rapid LC-MS/MS based Method to Quantitate Gabapentin and Buprenorphine in Human Serum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35. <https://doi.org/10.1002/rcm.9104>

Podany, A. T., Sheldon, C., Grafelman, D., & Ohnmacht, C. M. (2015). Assay development for determination of tenofovir in human plasma by solid phase analytical derivatization and LC–MS/MS. *Bioanalysis*, 7(24), 3085–3095. <https://doi.org/10.4155/bio.15.220>

Pratt, M. S., van Faassen, M., Remmelts, N., Bischoff, R., & Kema, I. P. (2021). An antibody-free LC-MS/MS method for the quantification of intact insulin-like growth factors 1 and 2 in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(8), 2035–2044. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03185-y>

Qian, X., Chen, Q., Chen, Y., Ji, S., Wang, Y., Sun, Y., Qi, H., Zhong, K., Jiang, J., Chen, X.,

- Huang, L., & Yang, Y. (2022). A simple and fast LC–MS/MS method for the simultaneous determination of tenofovir alafenamide and tenofovir in human plasma. *Biomedical Chromatography*, *36*(3), e5273.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.5273>
- Ramos-Payán, M., Ocaña-Gonzalez, J. A., Fernández-Torres, R. M., Llobera, A., & Bello-López, M. Á. (2018). Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review. *ELECTROPHORESIS*, *39*(1), 111–125.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.201700269>
- Ren, J. L., Zhang, A. H., Kong, L., & Wang, X. J. (2018). Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Advances*, *8*(40), 22335–22350. <https://doi.org/10.1039/c8ra01574k>
- Robandt, P. V, Bui, H. M., Scancella, J. M., & Klette, K. L. (2010). Automated Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of 6-Acetylmorphine in Human Urine Specimens: Application for a High-Throughput Urine Analysis Laboratory*. *Journal of Analytical Toxicology*, *34*(8), 470–475.
<https://doi.org/10.1093/jat/34.8.470>
- Robandt, P. V, Klette, K. L., & Sibum, M. (2009). Automated Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Human Urine Specimens: Application to a High-Throughput Urine Analysis Laboratory*. *Journal of Analytical Toxicology*, *33*(8), 456–460. <https://doi.org/10.1093/jat/33.8.456>
- Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., & Alves, G. (2019). Microextraction Techniques in LC-MS Bioanalysis. In *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* (pp. 98–116). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch8>
- Røen, B. T., Sellevåg, S. R., & Lundanes, E. (2014). Quantification of Nerve Agent Biomarkers in Human Serum and Urine. *Analytical Chemistry*, *86*(23), 11833–11840.
<https://doi.org/10.1021/ac503408x>
- Rola, R., Kowalski, K., Bieńkowski, T., & Studzińska, S. (2020). Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *190*, 113529.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113529>

- Rositano, J., Harpas, P., Kostakis, C., & Scott, T. (2016). Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. *Forensic Science International*, 265, 125–130. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2016.01.017>
- Routledge, P. A., & Hutchings, A. D. (2013). Chapter 9.22 - Therapeutic Drug Monitoring (TDM). In D. Wild (Ed.), *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)* (Fourth Edition, pp. 945–962). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00076-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00076-2)
- Said, R., Hassan, Z., Hassan, M., & Abdel-Rehim, M. (2008). Rapid and Sensitive Method for Determination of Cyclophosphamide in Patients Plasma Samples Utilizing Microextraction by Packed Sorbent Online with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(5), 683–694. <https://doi.org/10.1080/10826070701853867>
- Said, R., Pohanka, A., Abdel-Rehim, M., & Beck, O. (2012). Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC–MS/MS allowing automated sample work-up and analysis. *Journal of Chromatography B*, 897, 42–49. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2012.04.006>
- Saito, T., Miura, N., Namera, A., Miyazaki, S., Ohta, S., Oikawa, H., & Inokuchi, S. (2013). Rapid Determination of Polar and Non-Polar Pesticides in Human Serum, Using Mixed-Mode C-C18 Monolithic Spin Column Extraction and LC–MS/MS. *Chromatographia*, 76. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2482-y>
- Saito, T., Miura, N., Namera, A., Ota, S., Miyazaki, S., & Inokuchi, S. (2014). A Rapid Sample Preparation Procedure Using MonoSpin CBA and Amide Columns for Tetrodotoxin Detection in Serum and Urine Using LC–MS/MS Analysis. *Chromatographia*, 77, 687–693. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2663-3>
- Saito, T., Namera, A., Miura, N., Ohta, S., Miyazaki, S., Osawa, M., & Inokuchi, S. (2013). A fatal case of MAM-2201 poisoning. *Forensic Toxicology*, 31(2), 333–337. <https://doi.org/10.1007/s11419-013-0190-9>
- Saito, T., Umebachi, R., Namera, A., Oikawa, H., Miyazaki, S., Fujita, Y., & Inokuchi, S. (2015). Identification and Quantification of Aconitines and Colchicine in Serum, Urine, and Plants using MonoSpin C18 and LC-MS/MS. *Chromatographia*, 78, 1041–1048.

<https://doi.org/10.1007/s10337-015-2921-z>

- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
- Salameh, W. A., Redor-Goldman, M. M., Clarke, N. J., Reitz, R. E., & Caulfield, M. P. (2010). Validation of a total testosterone assay using high-turbulence liquid chromatography tandem mass spectrometry: Total and free testosterone reference ranges. *Steroids*, 75(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2009.11.004>
- Samanidou, V., Kaltzi, I., Kabir, A., & Furton, K. (2015). Simplifying Sample Preparation Using Fabric Phase Sorptive Extraction Technique for the Determination of Benzodiazepines in Blood Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography*, 30. <https://doi.org/10.1002/bmc.3615>
- Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M. F., Shi, L., Remer, T., & Wudy, S. A. (2014). Determination of free cortisol and free cortisone in human urine by on-line turbulent flow chromatography coupled to fused-core chromatography–tandem mass spectrometry (TFC–HPLC–MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(3), 793–801. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7505-x>
- Santunione, A. L., Verri, P., Marchesi, F., Rustichelli, C., Palazzoli, F., Vandelli, D., Licata, M., & Silingardi, E. (2018). The role of ethyl glucuronide in supporting medico-legal investigations: Analysis of this biomarker in different postmortem specimens from 21 selected autopsy cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 53, 25–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.10.009>
- Sastre Toraño, J., Ramautar, R., & de Jong, G. (2019). Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *Journal of Chromatography B*, 1118–1119, 116–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.020>
- Sauvage, F. L., Gaulier, J. M., Lachâtre, G., & Marquet, P. (2006). A Fully Automated Turbulent-Flow Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technique for Monitoring Antidepressants in Human Serum. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28(1). https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2006/02000/A_Fully_Automated_Turbulent_Flow_Liquid.25.aspx
- Sauve, E. N., Langødegård, M., Ekeberg, D., & Øiestad, A. M. L. (2012). Determination of

benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 883–884, 177–188. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2011.10.033>

Savolainen, K., Kiimamaa, R., & Halonen, T. (2011). *High-throughput analysis of testosterone in serum samples by on-line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 49(11), 1845–1848. <https://doi.org/doi:10.1515/cclm.2011.663>

Schaefer, N., Peters, B., Schmidt, P., & Ewald, A. H. (2013). Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6458-9>

Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2014). Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1327, 105–117. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.12.067>

Schofield, R. C., Ramanathan, L. V., Murata, K., Grace, M., Fleisher, M., Pessin, M. S., & Carlow, D. C. (2015). Development and validation of a turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry method for the quantitation of methotrexate and its metabolites 7-hydroxy methotrexate and DAMPA in serum. *Journal of Chromatography B*, 1002, 169–175. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2015.08.025>

Seino, Y., Nakamura, T., Harada, T., Nakahata, N., Kawarabayashi, T., Ueda, T., Takatama, M., & Shoji, M. (2021). Quantitative Measurement of Cerebrospinal Fluid Amyloid- β Species by Mass Spectrometry. *Journal of Alzheimer's Disease*, 79(2), 573–584. <https://doi.org/10.3233/JAD-200987>

Sergi, M., Montesano, C., Odoardi, S., Mainero Rocca, L., Fabrizi, G., Compagnone, D., & Curini, R. (2013). Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. *Journal of Chromatography A*, 1301, 139–146. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.05.072>

- Shah, P. A., Shah, J. V., Sanyal, M., & Shrivastav, P. S. (2016). LC–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of metformin and sitagliptin in human plasma after ion-pair solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *131*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2016.08.011>
- Shen, S., An, B., & Qu, J. (2017). Sample Preparation Methods for Targeted Biomarker Quantification by LC-MS. *Targeted Biomarker Quantitation by LC-MS*, 79–106. <https://doi.org/10.1002/9781119413073.ch6>
- Shen, Ying, Luo, X., Li, H., Chen, Z., Guan, Q., & Cheng, L. (2020). Simple and reliable serotonin assay in human serum by LC-MS/MS method coupled with one step protein precipitation for clinical testing in patients with carcinoid tumors. *Journal of Chromatography B*, *1158*, 122395. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2020.122395>
- Shen, Yuting, Jiang, B., Hu, X., Chen, J., Xu, Y., Ruan, Z., Yang, D., & Lou, H. (2021). A new simple method for quantification of cilostazol and its active metabolite in human plasma by LC–MS/MS: Application to pharmacokinetics of cilostazol associated with CYP genotypes in healthy Chinese population. *Biomedical Chromatography*, *35*(10), e5150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.5150>
- Shibata, K., Naito, T., Okamura, J., Hosokawa, S., Mineta, H., & Kawakami, J. (2017). Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *146*, 266–272. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.08.012>
- Sidiropoulou, G., Kabir, A., Furton, K., Kika, F., Fytianos, K., Tzanavaras, P., & Zacharis, C. (2022a). Combination of fabric phase sorptive extraction with UHPLC-ESI-MS/MS for the determination of adamantane analogues in human urine. *Microchemical Journal*, *176*, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107250>
- Sidiropoulou, G., Kabir, A., Furton, K., Kika, F., Fytianos, K., Tzanavaras, P., & Zacharis, C. (2022b). Combination of fabric phase sorptive extraction with UHPLC-ESI-MS/MS for the determination of adamantane analogues in human urine. *Microchemical Journal*, *176*, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107250>
- Sidqey, D., Liane, V. H., & Kristoffersen, L. (2021). Quantitative Determination of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Postmortem and Antemortem Whole Blood Using Phospholipid Removal 96-Well Plate and UHPLC–MS-MS. *Journal of Analytical*

Toxicology, 45(4), 378–388. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa108>

Singh, R. J. (2008). Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Steroids*, 73(13), 1339–1344. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2008.07.006>

Søeborg, T., Frederiksen, H., Fruekilde, P., Johannsen, T. H., Juul, A., & Andersson, A. M. (2013). Serum concentrations of DHEA, DHEAS, 17 α -hydroxyprogesterone, Δ 4-androstenedione and testosterone in children determined by TurboFlow-LC–MS/MS. *Clinica Chimica Acta*, 419, 95–101. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2013.01.019>

Sørensen, L. K., & Hasselstrøm, J. B. (2017). Sensitive Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC–MS-MS After Rapid Removal of Phospholipids by Filtration. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(5), 382–391. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx030>

Sukhanova, I. I., Dikunets, M. A., Viryus, E. D., & Rodchenkov, G. M. (2011). Magnetic separation as a new method for the extraction of small molecules from biological fluids of humans. *Journal of Analytical Chemistry*, 66(9), 807–814. <https://doi.org/10.1134/S1061934811090164>

Sun, H., Xing, H., Tian, X., Zhang, X., Yang, J., & Wang, P. (2022). UPLC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of 14 Antimicrobials in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7048605>

Takitane, J., Leyton, V., Andreuccetti, G., Gjerde, H., Vindenes, V., & Berg, T. (2018). Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid–liquid extraction and UHPLC–MS/MS. *Forensic Science International*, 289, 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2018.05.030>

Tang, Y. Q., & Weng, N. (2013). Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*, 5(12), 1583–1598. <https://doi.org/10.4155/bio.13.117>

Tashjian, R. S., Vinters, H. V., & Yong, W. H. (2019). Biobanking of cerebrospinal fluid. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 107–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_11

Tumani, H., Huss, A., & Bachhuber, F. (2017). The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. *Handbook of Clinical Neurology*, 146, 3–20.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804279-3.00002-2>

- Unceta, N., Gómez-Caballero, A., García, D., Díaz, G., Guerreiro, A., Piletsky, S., Aránzazu Goicolea, M., & Barrio, R. J. (2013). Enantioselective extraction of (+)-(S)-citalopram and its main metabolites using a tailor-made stir bar chiral imprinted polymer for their LC-ESI-MS/MS quantitation in urine samples. *Talanta*, *116*, 448–453. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.07.004>
- Upadhyay, V., Trivedi, V., Shah, G., Yadav, M., & Shrivastav, P. S. (2014). Determination of mycophenolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *4*(3), 205. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2013.06.001>
- Usui, K., Mori, H., Tachi, T., Matsumura, T., Mori, K., Takeda, A., Noguchi, Y., Yoshimura, T., & Teramachi, H. (2017). A rapid method to screen poisoning causative agents in an acute care hospital in Japan. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, *42*(4), 454–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcpt.12532>
- Valen, A., Leere Øiestad, Å. M., Strand, D. H., Skari, R., & Berg, T. (2017). Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, *9*(5), 808–823. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.2045>
- Valente, I. M., & Rodrigues, J. A. (2015). Recent advances in salt-assisted LLE for analyzing biological samples. *Bioanalysis*, *7*(17), 2187–2193. <https://doi.org/10.4155/bio.15.142>
- Van Der Gugten, J. G., Crawford, M., Grant, R. P., & Holmes, D. T. (2012). Supported liquid extraction offers improved sample preparation for aldosterone analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Clinical Pathology*, *65*(11), 1045. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200990>
- Verougstraete, N., Stove, V., Verstraete, A. G., & Stove, C. (2021). Quantification of eight hematological tyrosine kinase inhibitors in both plasma and whole blood by a validated LC-MS/MS method. *Talanta*, *226*, 122140. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2021.122140>
- Verplaetse, R., & Henion, J. (2016). Quantitative determination of opioids in whole blood using fully automated dried blood spot desorption coupled to on-line SPE-LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, *8*(1), 30–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.1927>

- Vezzoli, S., Bernini, M., & De Ferrari, F. (2015). Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. *Ann Ist Super Sanità*, 51(1), 19–27. https://doi.org/10.4415/ANN_15_01_05
- Vogeser, M., Geiger, A., Herrmann, R., & Kobold, U. (2008). Sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using functionalized ferromagnetic micro-particles. *Clinical Biochemistry*, 41(16–17), 1417–1419. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2008.08.001>
- Vogeser, M., & Kirchhoff, F. (2011). Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.005>
- Wang, R., Hartmann, M. F., & Wudy, S. A. (2021). Targeted LC–MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 205, 105774. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2020.105774>
- Wang, S., & Miller, A. (2008). A rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of whole blood sirolimus using turbulent flow technology for online extraction. 46(11), 1631–1634. <https://doi.org/doi:10.1515/CCLM.2008.303>
- Wang, Y., Gay, G. D., Botelho, J. C., Caudill, S. P., & Vesper, H. W. (2014). Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*, 436, 263–267. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.06.009>
- Wätzig, H., & Günter, S. (2003). Capillary electrophoresis - A high performance analytical separation technique. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(6), 724–738. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.112>
- Wells, D. A. (Ed.). (2003). Chapter 6 Protein precipitation: High throughput techniques and strategies for method development. In *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation* (Vol. 5, pp. 199–254). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1464-3456\(03\)80008-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1464-3456(03)80008-X)
- Wishart, D. S., Guo, A. C., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., Dizon, R., Sayeeda, Z., Tian, S., Lee, B. L., Berjanskii, M., Mah, R., Yamamoto, M., Jovel, J., Torres-Calzada, C., Hiebert-Giesbrecht, M., Lui, V. W., Varshavi, D., Varshavi, D., ... Gautam, V. (2022). HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids*

Research, 50(D1), D622–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>

- Wohlfarth, A., Toepfner, N., Hermanns-Clausen, M., & Auwärter, V. (2011). 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(3), 737–746. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4831-8>
- Xia, Y., Guo, H.-L., Hu, Y.-H., Long, J.-Y., Chen, J., Chen, F., & Ji, X. (2021). Determination of atomoxetine levels in human plasma using LC-MS/MS and clinical application to Chinese children with ADHD based on CPIC guidelines. *Anal. Methods*, 13(21), 2434–2441. <https://doi.org/10.1039/D1AY00521A>
- Xiong, X., Zhang, L., Cheng, L., & Mao, W. (2015). High-throughput salting-out assisted liquid–liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 29(9), 1317–1324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.3425>
- Yamada, M., Lee, X. P., Fujishiro, M., Iseri, K., Watanabe, M., Sakamaki, H., Uchida, N., Matsuyama, T., Kumazawa, T., Takahashi, H., Ishii, A., & Sato, K. (2018). Highly sensitive determination of alendronate in human plasma and dialysate using metal-free HPLC-MS/MS. *Legal Medicine*, 30, 14–20. <https://doi.org/10.1016/J.LEGALMED.2017.11.003>
- Yanes, E. G., & Lovett, D. P. (2012). High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 909, 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2012.10.013>
- Yang, Y., Xu, Q., Zhou, L., Zhong, D., & Chen, X. (2015). High-throughput salting-out-assisted liquid–liquid extraction for the simultaneous determination of atorvastatin, ortho-hydroxyatorvastatin, and para-hydroxyatorvastatin in human plasma using ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 38(6), 1026–1034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.201401227>
- Yasuhara, R., Ehara, K., Saito, K., & Kataoka, H. (2012). Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled

- with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, 4(11), 3625–3630. <https://doi.org/10.1039/C2AY25752A>
- Yuan, C., Kosewick, J., & Wang, S. (2013). A simple, fast, and sensitive method for the measurement of serum nicotine, cotinine, and nornicotine by LC–MS/MS. *Journal of Separation Science*, 36(15), 2394–2400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.201300220>
- Yuan, T. F., Le, J., Wang, S. T., & Li, Y. (2020). An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples. *Journal of Lipid Research*, 61(4), 580–586. <https://doi.org/10.1194/JLR.D119000591>
- Yue, B., Rockwood, A. L., Sandrock, T., La'ulu, S. L., Kushnir, M. M., & Meikle, A. W. (2008). Free Thyroid Hormones in Serum by Direct Equilibrium Dialysis and Online Solid-Phase Extraction–Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 54(4), 642–651. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.098293>
- Zambonin, C., & Aresta, A. (2021). Recent applications of solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Separations*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS8030034>
- Zelzer, S., Meinitzer, A., Enko, D., Simstich, S., Le Goff, C., Cavalier, E., Herrmann, M., & Goessler, W. (2020). Simultaneous determination of 24,25- and 25,26-dihydroxyvitamin D3 in serum samples with liquid-chromatography mass spectrometry – A useful tool for the assessment of vitamin D metabolism. *Journal of Chromatography B*, 1158, 122394. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2020.122394>
- Zhan, Y., Musteata, F. M., Basset, F. A., & Pawliszyn, J. (2010). Determination of free and deconjugated testosterone and epitestosterone in urine using SPME and LC–MS/MS. *Bioanalysis*, 3(1), 23–30. <https://doi.org/10.4155/bio.10.177>
- Zhang, J., Rodila, R., Gage, E., Hautman, M., Fan, L., King, L. L., Wu, H., & El-Shourbagy, T. A. (2010). High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 661(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2009.12.023>
- Zhang, M., Liu, H., He, J., Gui, Y., Qian, H., Jia, J., Yu, C., Wang, Z., Shen, J. S., & Liu, G. (2020). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for TPN171 in human

- plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 191, 113634.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113634>
- Zhao, G., Chen, Y., Wang, S., Yu, J., Wang, X., Xie, F., Liu, H., & Xie, J. (2013). Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta*, 116, 822–826. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.07.071>
- Zheng, M., Zhang, C., Wang, L., Wang, K., Kang, W., Lian, K., & Li, H. (2021). Determination of nine mental drugs in human plasma using solid-phase supported liquid-liquid extraction and HPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 160, 105647.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2020.105647>
- Zhou, L., Wang, S., Chen, M., Huang, S., Zhang, M., Bao, W., Bao, A., Zhang, P., Guo, H., Liu, Z., Xie, G., Gao, J., Wu, Z., Lou, Y., & Fan, G. (2021). Simultaneous and rapid determination of 12 tyrosine kinase inhibitors by LC-MS/MS in human plasma: Application to therapeutic drug monitoring in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Chromatography B*, 1175, 122752.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122752>
- Zilfidou, E., Kabir, A., Furton, K. G., & Samanidou, V. (2019). An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography B*, 1125, 121720.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121720>
- Αρχοντάκη, Ε. (2008). Προκατεργασία Δείγματος Για Αναλύσεις Με Ηplc. *Αθήνα*.
- Ζώτου, Α. Σ. (2015). Κεφάλαιο 9 : Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση. In *Βιοαναλυτική χημεία* (pp. 136–172).
- Θεοδωρίδης, Γ. (2015a). Κεφάλαιο 12 : Φασματομετρία Μάζας. In *Βιοαναλυτική Χημεία* (pp. 203–215).
- Θεοδωρίδης, Γ. (2015b). Κεφάλαιο 8 : Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης. In *Βιοαναλυτική Χημεία* (pp. 123–135).
- Ιωαννίδου- Φιλοκόστα, Ε., & Βραχνής, Ν. (2012). *ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ Ι*.
- Πλαγεράς, Π., & Παπαϊωάννου, Α. (2012). *Εξειδικευμένα θέματα κλινικής χημείας*.

ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.

Σαμανίδου, Β. (2015a). Κεφάλαιο 4: Βιολογικά Υποστρώματα. In *Βιοαναλυτική Χημεία* (pp. 51–60).

Σαμανίδου, Β. (2015b). Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων. In *Βιοαναλυτική Χημεία* (pp. 77–94).