



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ"

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό της
ασεναπίνης σε εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα με τη χρήση
Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).»**

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ :

ΤΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΣ του ΗΡΑΚΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΥ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ, 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**"ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ"**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό της
ασεναπίνης σε εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα με τη χρήση
Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).»**

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ :

ΤΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΣ του ΗΡΑΚΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΥ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κα. ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ ΒΙΚΤΩΡΙΑ

κ. ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ

κα. ΚΟΒΑΤΣΗ ΛΗΔΑ

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Την παρούσα εργασία θα ήθελα να αφιερώσω στην οικογένειά μου, που με τη δική της αγάπη, την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη με βοήθησαν να φτάσω εδώ που είμαι σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας απλής μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) για τον προσδιορισμό ενός άτυπου αντιψυχωσικού φαρμάκου, της ασεναπίνης, παρουσία εσωτερικού προτύπου για πρώτη φορά σε εναλλακτικά βιολογικά δείγματα, όπως είναι οι τρίχες και οι όνυχες.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό της προσδιοριζόμενης αντιψυχωσικής ένωσης στις τρίχες και στους όνυχες ήταν η Inertsil C₈, (250 × 4.0 mm) 5 μm (MZ AnalysenTechnik, Mainz, Germany)). Η ροή και η πίεση του συστήματος ήταν 1 mL/min και 151 bar αντίστοιχα, ενώ η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5 / MeOH και ACN σε αναλογία όγκων 50:40:10% v/v. Η ανίχνευση της ένωσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός της πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή UV-Vis και ανίχνευση σε μήκος κύματος 270 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της επιθυμητής ένωσης, τόσο στα πρότυπα διαλύματα, όσο και στα δείγματα τριχών και ονύχων επιλέχτηκε η τεχνική του εσωτερικού προτύπου και ως καταλληλότερη βρέθηκε η σουλφαδιμεθοξίνη σε συγκέντρωση 1 ng/μL.

Αρχικά η μέθοδος αναπτύχθηκε σε πρότυπα διαλύματα ασεναπίνης εσωτερικού προτύπου και ελέγχθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ευαισθησία και την ακρίβειά της. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης για την ασεναπίνη στα πρότυπα διαλύματα ήταν 0,55 και 1,65 ng/μL αντίστοιχα.

Ο συνολικός χρόνος έκλουσης, στον οποίο επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του αντιψυχωσικού φαρμάκου ήταν περίπου τα 5 min. Ειδικότερα το εσωτερικό πρότυπο σουλφαδιμεθοξίνη εκλύεται πρώτο στα 3,7 min ενώ η προσδιοριζόμενη ένωση στα 5 min.

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε σε βιολογικά υποστρώματα μετά από εμβολιασμό τους με την κατάλληλη ποσότητα μίγματος της ένωσης. Καθώς δοκιμάστηκαν πολλά πρωτόκολλα με διάφορα εκλουστικά μέσα, καταλληλότερο πρωτόκολλο και με τα μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης βρέθηκε εκείνο που είχε ως διαλύτη τη μεθανόλη.

Το πρώτο βιολογικό υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν οι ανθρώπινες τρίχες. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά η πλύση και ο τεμαχισμός των τριχών και στη συνέχεια ο εμβολιασμός των δειγμάτων με μίγμα του αντιψυχωσικού φαρμάκου. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 1 mL μεθανόλης και 1 mL κινητής φάσης και αφέθηκαν για 10 min στο σύστημα υπερήχων. Τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη και εισήχθηκαν στην HPLC. Από τα χρωματογραφήματα και τις καμπύλες αναφοράς υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης, τα οποία βρέθηκαν για την ασεναπίνη 3,8 ng/mg και 11,4 ng/mg. Έλεγχος, επίσης διεξάχθηκε για την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της μεθόδου και τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλά. Πιο συγκεκριμένα, η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για τις μετρήσεις τις ίδιας ημέρας κυμαινόταν από 1,5% μέχρι 14,6%, ενώ οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 95,0% μέχρι 102,5%. Μετρήσεις, επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια 5 ημερών και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν από 1,7% μέχρι 7,3%, ενώ οι ανακτήσεις από 99,2% μέχρι 102,5.

Το δεύτερο βιολογικό υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν οι ανθρώπινοι όνυχες. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά η πλύση και ο τεμαχισμός των ονύχων και στη συνέχεια ο εμβολιασμός των δειγμάτων με μίγμα του αντιψυχωσικού φαρμάκου. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 1 mL μεθανόλης και 1 mL κινητής φάσης και αφέθηκαν για 10 min στους 50 °C στο σύστημα υπερήχων. Τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη και εισήχθηκαν στην HPLC. Από τα χρωματογραφήματα και τις καμπύλες αναφοράς υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης, τα οποία βρέθηκαν για την ασεναπίνη 2,0 ng/mg και 6,1 ng/mg. Έλεγχος, επίσης διεξάχθηκε για την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της μεθόδου και τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλά. Πιο συγκεκριμένα, η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για τις μετρήσεις τις ίδιας ημέρας κυμαινόταν από 1,5% μέχρι 5,1%, ενώ οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 98,8% μέχρι 103,0%. Μετρήσεις, επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια 5 ημερών και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν από 1,4% έως 3,9% και οι ανακτήσεις από 102,0% μέχρι 105,0%.

Τέλος, ελέγχθηκε η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης και βρέθηκε πως είναι σταθερή σε διάρκεια 3 εβδομάδων, τόσο σε δείγματα ονύχων, όσο και σε τρίχες σε θερμοκρασία ψύξης 4 °C. Συνοψίζοντας, λοιπόν μπορούμε να καταλήξουμε πως η μέθοδος για το διαχωρισμό και προσδιορισμό του προσδιοριζόμενου αντιψυχωσικού φαρμάκου σε δείγματα τρίχας και ονύχων είναι:

- Ταχεία, λόγω των μικρών χρόνων ανάλυσης, αλλά και προκατεργασίας του δείγματος.
- Απλή.
- Οικονομική.
- Αποτελεσματική.
- Επαναλήψιμη.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, μπορεί η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε να αποτελέσει ένα εργαλείο στη τοξικολογία για τη διερεύνηση της αιτίας θανάτου ή την επιβεβαίωση χρόνιας λήψης ενός αντίστοιχου αντιψυχωσικού φαρμάκου.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ASENAPINE, AN ATYPICAL ANTIPSYCHOTIC DRUG FOR THE FIRST TIME IN HUMAN HAIR AND NAIL SAMPLES.

In the present study a simple, rapid, accurate HPLC method was developed and validated for the determination of the atypical antipsychotic drug, asenapine, for the first time in alternative biological matrices as human hair and nails. A reversed-phase analytical column, Inertsil C₈, (250 × 4.0 mm) 5 μm (MZ AnalysenTechnik, Mainz, Germany)), was operated at ambient temperature, with a mobile phase consisting of a buffer of CH₃COOH/CH₃COONa pH4,5 / MeOH και ACN in a rate of 50:40:10% v/v. Separation was carried out isocratically at a flow rate 1 mL/min. Quantification was performed at 270 nm with a UV-Vis detector.

The limit of detection was 0,55 ng/μL, while linearity held up to 15 ng/μL. Sulfadimethoxine was used as internal standard at a concentration of 0,5 ng/μL. Validation of the method was performed in terms of accuracy and precision: intra-day (n=5) and inter-day (n=3 × 5) and was found to be satisfactory, with high accuracy and precision results.

The antipsychotic drug was checked for the stability and was found to be stable for 3 weeks.

The method was successfully applied to hair and nail samples after an easy preparation. Recovery rates in hair samples ranged between 95.0% and 102.5%. In nail samples the recovery rates ranged between 99.2% and 102.5.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σχιζοφρένεια αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μορφές ψυχιατρικής νόσου, επειδή επηρεάζει κυρίως νεαρούς ανθρώπους, συχνά είναι χρόνια και συνήθως προκαλεί ακραία αναπηρία. Η σχιζοφρένεια εκτιμάται ότι επηρεάζει περίπου το 1% του πληθυσμού.

Η αιτιολογία της νόσου ποικίλλει, με κύριο ρόλο να διαμορφώνει ένας ισχυρός κληρονομικός παράγοντας, ενώ υπάρχουν ενδείξεις που υποδεικνύουν μία θεμελιώδη βιολογική διαταραχή.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ένα αντιψυχωσικό φάρμακο δεύτερης γενιάς, η ασεναπίνη. Ο στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μίας απλής και γρήγορης μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του άτυπου αντιψυχωσικού φαρμάκου παρουσία εσωτερικού προτύπου σε δύο εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, σε δείγμα ανθρώπινης τρίχας και ονύχων, μετά από κατάλληλη προκατεργασία με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Η εργασία αποτελείται από δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα δίνεται η θεωρητική προσέγγιση του θέματος, με γενικές πληροφορίες για την ένωση που μελετήθηκε, για την αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και μία βιβλιογραφική επισκόπηση. Η δεύτερη ενότητα, αποτελεί το πειραματικό μέρος με αναλυτική περιγραφή όλων των σταδίων ανάπτυξης της μεθόδου. Παρουσιάζονται οι δοκιμές που έγιναν στο στάδιο βελτιστοποίησης της μεθόδου. Όσον αφορά στην επικύρωση της μεθόδου, έγινε έλεγχος της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας και της πιστότητας σε διαφορετικές μέρες, σε υποστρώματα βιολογικών υλικών που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με πρότυπα διαλύματα. Τα αποτελέσματα λήφθηκαν μέσω στατιστικής επεξεργασίας. Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα τριχών και ονύχων, με σκοπό την εύρεση και την ποσοτικοποίηση της ασεναπίνης σε αυτά.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο πλαίσιο συνεργασίας με το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και

Περιβαλλοντική Υγιεινή», όπου και υπάγεται η συγκεκριμένη εργασία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Θεσσαλίας κ. Α. Τσακάλωφ, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την υπόδειξη του θέματος. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Β. Φ. Σαμανίδου, χωρίς τη συμβολή και καθοδήγηση της οποίας θα ήταν δύσκολη η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Α. Κοβάτση για τη χορήγηση του φαρμακευτικού σκευάσματος, στα οποία έγινε εφαρμογή της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υποψήφιους διδάκτορες, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και το προσωπικό του Εργαστηρίου, για το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια μου, που με τη δική της αγάπη, την ηθική και ψυχολογική συμπαράσταση με βοήθησαν να φτάσω εδώ που είμαι σήμερα.

Λάρισα, Ιούνιος 2014

Αλεξάνδρα Η. Τιτοπούλου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ.	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	σελ.	ii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	σελ.	iii
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ.	1
1. ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΠΟΛΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ...	σελ.	2
A. Γενικά για την σχιζοφρένεια	σελ.	2
1.α.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	σελ.	2
1.α.2 Μηχανισμός	σελ.	3
1.α.3 Κλινική εικόνα και διαγνωστικά κριτήρια για τη σχιζοφρένεια	σελ.	4
B. Διπολική Διαταραχή	σελ.	6
1.β.1 Γενικά για την διπολική διαταραχή	σελ.	6
1.β.2 Τύποι της διπολικής διαταραχής	σελ.	6
1.β.3 Μηχανισμός και αιτία	σελ.	6
1.β.4 Θεραπεία της διπολικής διαταραχής	σελ.	8
2. ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	σελ.	9
2.1. Γενικά για τα Αντιψυχωσικά Φάρμακα	σελ.	9
2.2. Ιστορία των Αντιψυχωσικών Φαρμάκων	σελ.	11
2.3. Διάκριση και χημική δομή των αντιψυχωσικών φαρμάκων ...	σελ.	13
2.4. Παρενέργειες αντιψυχωσικών φαρμάκων	σελ.	15

2.5.	Μηχανισμός δράσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων	σελ.	16
2.6.	Φαρμακοκινητική	σελ.	21
3.	ΑΣΕΝΑΠΙΝΗ	σελ.	21
3.1.	Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες	σελ.	23
4.	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)	σελ.	28
4.1.	Εισαγωγή στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)	σελ.	28
4.2.	Πλεονεκτήματα της HPLC	σελ.	29
5.	ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	σελ.	30
6.	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	σελ.	32
6.1.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	σελ.	32
6.2.	ΤΡΙΧΕΣ	σελ.	33
6.3.	ΟΝΥΧΕΣ	σελ.	36
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ.....	σελ.	37
8.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	σελ.	39
 <i>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>			
9.	ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	σελ.	41
9.1.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	σελ.	41
9.2.	ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	σελ.	42
9.3.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	σελ.	42
10.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	σελ.	43
10.1.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	σελ.	43

10.2.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΕΚΔΟΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	σελ.	43
10.3.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ	σελ.	45
10.4.	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	σελ.	47
10.5.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	σελ.	49
11.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	σελ.	50
11.1.	Κοινά κριτήρια επίδοσης και απαιτήσεις των αναλυτικών τεχνικών	σελ.	50
11.2.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	σελ.	51
11.2.1.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	σελ.	51
11.3.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	σελ.	52
11.4.	ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ	σελ.	54
12.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΣΕΝΑΠΙΝΗΣ (ASE) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΤΡΙΧΩΝ.....	σελ.	56
12.1.	ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΡΙΧΑΣ.....	σελ.	56
12.2.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΤΡΙΧΑΣ.....	σελ.	59
12.3.	ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ.....	σελ.	61
12.4.	ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΙΧΑΣ (WITHIN-DAY REPEATABILITY)	σελ.	62
12.5.	ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΙΧΑΣ ΣΕ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΝΤΕ ΗΜΕΡΩΝ (BETWEEN-DAY PRECISION)	σελ.	64
13.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΣΕΝΑΠΙΝΗΣ (ASE) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΝΥΧΩΝ.....	σελ.	66

13.1. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΝΥΧΩΝ.....	σελ. 66
13.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΝΥΧΟΣ.....	σελ. 69
13.3. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ.....	
13.4. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΝΥΧΩΝ (WITHIN-DAY REPEATABILITY)	σελ. 71
13.5. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΝΥΧΩΝ ΣΕ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΝΤΕ ΗΜΕΡΩΝ (BETWEEN-DAY PRECISION).....	σελ. 71
	σελ. 73
14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ. 74
15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ. 76

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	Σελίδα
Σχήμα 2.1: Περιοχές του εγκεφάλου με τις κυριότερες λειτουργίες.	10
Σχήμα 2.2: Διάκριση αντιψυχωσικών πρώτης γενιάς και ενδεικτικές εμπορικές ονομασίες.	13
Σχήμα 2.3.: Αντιψυχωσικά φάρμακα δεύτερης και τρίτης γενιάς με ενδεικτικές εμπορικές ονομασίες τους.	15
Σχήμα 2.4: Απεικόνιση νευρώνα και των κυριότερων μερών του.	17
Σχήμα 2.5: Απεικόνιση νευρώνων, δενδριτών, αξόνων και συνάψεων.	18
Σχήμα 3.1: Χημική και Τρισδιάστατη δομή της ασεναπίνης	22
Σχήμα 4.1: Τυπική διάταξη HPLC	29
Σχήμα 6.1: Δομή τρίχας.	35
Σχήμα 6.2: Δομή του όνυχα.	36
Σχήμα 9.1: Διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης που χρησιμοποιήθηκε.	41
Σχήμα 10.1: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ασεναπίνης (5 ng/μL) παρουσία εσωτερικού προτύπου (1 ng/ μL), σύμφωνα με τις χρωματογραφικές συνθήκες του πίνακα 10.2.	48
Σχήμα 12.1: Χρωματογραφήματα (A) λευκού δείγματος τρίχας και (B)εμβολιασμένου δείγματος με την προσδιοριζόμενη ένωση και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 5 ng/μL και 1 ng/μL αντίστοιχα. Βρέθηκαν, 1-I.S :.3.8 min, 2-ASE 4.9 min.	58
Σχήμα 13.1. Χρωματογραφήματα (A) λευκού δείγματος νυχιού και (B)εμβολιασμένου δείγματος με την προσδιοριζόμενη ένωση και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 5 ng/μL και 1 ng/μL αντίστοιχα. Βρέθηκαν, 1-I.S :.3.8 min, 2-ASE 4.9 min.	68

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Σελίδα

Πίνακας 10.1: Δοκιμές ενώσεων για την εύρεση της καταλληλότερης για να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο.	46
Πίνακας 10.2: Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν για το προσδιορισμό του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου ASE.	47
Πίνακας 11.1: Καμπύλες αναφοράς της ασεναπίνης σε πρότυπα διαλύματα παρουσία εσωτερικού προτύπου.	51
Πίνακας 11.2: Όρια ανίχνευσης, ποσοτικής αποτίμησης και ανώτατα όρια γραμμικής περιοχής της προσδιοριζόμενης ένωσης σε πρότυπα διαλύματα.	55
Πίνακας 12.1: Καμπύλες αναφοράς της ασεναπίνης, σε εμβολιασμένα δείγματα τρίχας.	60
Πίνακας 12.2: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής για την ασεναπίνη.	61
Πίνακας 12.3: Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας εμβολιασμένα με μίγμα της προσδιοριζόμενης ένωσης για 5 μετρήσεις.	64
Πίνακας 12.4: Η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας εμβολιασμένα με μίγμα ασεναπίνης και εσωτερικού προτύπου, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών και για τρεις μετρήσεις ημερησίως.	65
Πίνακας 13.1: Καμπύλη αναφοράς της ασεναπίνης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινων ονύχων.	70
Πίνακας 13.2: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής για την	71

προσδιοριζόμενη αντιψυχωσική ένωση.

Πίνακας 13.3: Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ανθρώπινων ονύχων εμβολιασμένα με μίγμα της προσδιοριζόμενης ένωσης. 72

Πίνακας 13.4: Η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ανθρώπινων ονύχων εμβολιασμένα με μίγμα της προσδιοριζόμενης ένωσης, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών και για τρεις μετρήσεις ημερησίως. 73

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΠΟΛΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

A. Γενικά για τη σχιζοφρένεια

Ιστορικά η έννοια της σχιζοφρένειας εμφανίζεται ταυτόσημη με την έννοια της παραφροσύνης. Και ο όρος σχιζοφρένεια (ψυχοπαθολογική συμπεριφορά) εισάγεται στην ψυχιατρική στα τέλη του προπερασμένου αιώνα, λαμβάνοντας κατά καιρούς διάφορες ονομασίες, όπως φρενοβλάβεια, βλακεία, παράνοια.

Η ψυχιατρική περίθαλψη μέχρι το 1980 περιλάμβανε κυρίως την εισαγωγή των ασθενών με ψυχιατρικά νοσήματα σε ιδρύματα. Για τη βελτίωση όμως της ποιότητας ζωής των ασθενών αυτών, κρίθηκε αναγκαία η μη εισαγωγή τους σε ιδρύματα και η ένταξή τους σε ψυχιατρικά προγράμματα αποκατάστασης σε συνδυασμό με την εξέλιξη των αντιψυχωσικών φαρμάκων, επιφέροντας σημαντικά οφέλη στην ψυχιατρική φροντίδα, στην κοινωνική απομόνωση και στις καλύτερες συνθήκες διαβίωσης. Η συμβολή της ψυχιατρικής είναι σημαντική και έρχεται να περιορίσει σε μεγάλο βαθμό τους παράγοντες που επιδρούν αρνητικά στην υγεία του ασθενή με ψυχιατρικά προβλήματα. (Castle et al., 2003), (Julien, 2003)

1.α.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Η σχιζοφρένεια βρίσκεται παντού, σε κάθε μέρος του κόσμου και σε κάθε πολιτισμό. Η επίπτωσή (ο επιπολασμός της είναι περίπου σταθερός σε διάφορους πληθυσμούς) της είναι περίπου σταθερή και μελέτες σε διάφορα μέρη του κόσμου την υπολογίζουν από 0,5 % έως 1%. Η πιθανότητα νόσησης από σχιζοφρένεια καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής κυμαίνεται μεταξύ 1%-1,5% και περίπου το 0,025% έως το 0,05% του συνολικού πληθυσμού ανά έτος υπόκεινται σε θεραπεία για σχιζοφρένεια. Η συχνότητα, η

νοσηρότητα και η βαρύτητα της πάθησης φαίνονται να είναι υψηλότερες στις αστικές και εκβιομηχανισμένες περιοχές απ' ότι στις αγροτικές και μη εκβιομηχανισμένες. Επίσης, η επίπτωση της σχιζοφρένειας είναι η ίδια σε όλες τις κοινωνικοοικονομικές ομάδες, ενώ ο επιπολασμός της είναι αυξημένος στις χαμηλότερες, πιθανότατα καθώς οι πάσχοντες διολισθαίνουν σε αυτές, λόγω της προοδευτικής έκπτωσης της λειτουργικότητας τους. Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι μεταξύ 15 και 35 ετών, σπάνια προ των 10 ή μετά των 40 ετών, και παρότι η αναλογία μεταξύ ανδρών και γυναικών θεωρείται ότι είναι ίση, η νόσος φαίνεται να εκδηλώνεται νωρίτερα στους άνδρες. Σημαντική είναι και η διαφορά ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες με σχιζοφρένεια, όσον αφορά στην πορεία της ασθένειάς τους. Κατά την πρώτη δεκαετία οι άνδρες αντιμετωπίζουν μια βαριά εκδήλωση της ασθένειας και όσο περνάνε τα χρόνια τα συμπτώματα μειώνονται. Αντίθετα στις γυναίκες η ασθένεια εκδηλώνεται με μια ήπια μορφή και με τα χρόνια η κατάστασή τους χειροτερεύει.

Στη χώρα μας το ποσοστό νοσηλευτικής νοσηρότητας των ανδρών κυμαίνεται από 55/100.000 το 1978 έως 50/100.000 το 1992 και των δε γυναικών από 29,5/100.000 το 1978 έως 24/100.000 το 1992. Το ποσοστό της πραγματικής επικράτησης της σχιζοφρένειας για την Ελλάδα τη δεκαετία του 1980 κυμαίνεται από 1,2% σε τυχαίο δείγμα γενικού πληθυσμού ενηλίκων έως 0,8% σε δείγμα υπερηλίκων. Στη χώρα μας ο υπολογιζόμενος αριθμός σχιζοφρενικών αρρώστων ηλικίας 15-64 ετών ανέρχεται στις 100.000. Από τους αρρώστους αυτούς εκτιμάται ότι το 10% (10.000) έχουν ανάγκη ειδικών προγραμμάτων ψυχοκοινωνικής αποκατάστασης. **(Μαδιανός, 2004)**

1.α.2 Μηχανισμός

Σύμφωνα με τις σύγχρονες προσεγγιστικές μεθόδους, η σχιζοφρένεια αποτελεί μια βιολογική διαταραχή, αν και στην αιτιοπαθογένειά της εμπλέκονται παράγοντες ψυχολογικοί, κοινωνικοί, αλλά και περιβαλλοντικοί. Πρόκειται κατά συνέπεια για παράγοντες κινδύνου που χωρίς να αποτελούν τις τεκμηριωμένες αιτίες, συνεργάζονται για την κινητοποίηση της ψυχοπαθολογικής διεργασίας που οδηγεί προοδευτικά στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου. Σε νευροχημικό επίπεδο τα ψυχωσικά συμπτώματα είναι αποτέλεσμα αυξημένης ντοπαμινεργικής δραστηριότητας (υπόθεση ντοπαμίνης). Με βάση αυτή τη θεωρία, η διαταραχή προκαλείται από δυσλειτουργία, σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές του ντοπαμινεργικού συστήματος, και τα αντιψυχωσικά φάρμακα δρουν ως ανταγωνιστές του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη. Η παραδοσιακή άποψη της δραστηριότητας των αντιψυχωσικών φαρμάκων (τουλάχιστον, ενάντια στη θετική συμπτωματολογία) σχετίζεται με αποκλεισμό των D₂ υποδοχέων της ντοπαμίνης. **(Sinacola & Petters-Strickland, 2008)**

1.α.3 Κλινική εικόνα και διαγνωστικά κριτήρια για τη σχιζοφρένεια

Η διάγνωση της σχιζοφρένειας είναι κλινική και βασίζεται στην παρατήρηση και στην περιγραφή του ασθενούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρούνται διαταραχές περισσότερων ψυχικών λειτουργιών. **(Sadock B.J. & Sadock V.A., 2001)**

Η κλινική εικόνα της νόσου παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και χαρακτηρίζεται από θετικά και αρνητικά συμπτώματα, διαταραχές των γνωστικών λειτουργιών, του συναισθήματος, και της συμπεριφοράς

Στα θετικά συμπτώματα περιλαμβάνονται οι παραληρητικές ιδέες, οι αντιληπτικές διαταραχές (παραισθήσεις, ψευδαισθήσεις), η παραποίηση ή υπερβολή στο λόγο και στην επικοινωνία, η αποδιοργάνωση του λόγου, η αποδιοργάνωση της συμπεριφοράς, η κατατονική συμπεριφορά και η διέγερση.

Στα αρνητικά συμπτώματα περιλαμβάνονται η συναισθηματική απόσυρση, η άμβλυωση του συναισθήματος, η πτωχή συναισθηματική επαφή, η παθητικότητα, η απαθής κοινωνική απόσυρση, η δυσκολία θεωρητικής σκέψης, η έλλειψη αυθορμητισμού, η στερεοτυπία της σκέψης, η αλογία, η αβουλία, η ανηδονία και η έκπτωση της προσοχής.

Οι γνωστικές διαταραχές αναφέρονται σε διαταραχές σκέψης, χάλαση του συνειρμού, ασυναρτησία, νεολογισμούς, έκπτωση προσοχής, έκπτωση επεξεργασίας πληροφοριών. Επίσης, η διαταραχή της ευχέρειας του λόγου, η έκπτωση της μάθησης κατά σειρά (μιας σειράς αντικειμένων ή αλληλουχίας γεγονότων), η έκπτωση της εγρήγορσης στην εκτελεστική λειτουργικότητα είναι ορισμένες από τις πιο σοβαρές γνωστικές διαταραχές στη σχιζοφρένεια.

Στις διαταραχές του συναισθήματος περιλαμβάνονται η καταθλιπτική διάθεση, η αγχώδης διάθεση, η ενοχή, η ένταση, η ευερεθιστότητα, η ανησυχία, χωρίς η παρουσία τους να σημαίνει απαραίτητως τη συνύπαρξη μιας συναισθηματικής ή αγχώδους διαταραχής.

Στις διαταραχές της συμπεριφοράς περιλαμβάνονται η εχθρικότητα, η λεκτική ή/και η σωματική επιθετικότητα, η αυτοκαταστροφική συμπεριφορά (συμπεριλαμβανομένης της αυτοκτονίας) και η παρορμητικότητα. **(Stahl, 2000)**

Στη σημερινή εποχή, η διάγνωση της σχιζοφρένειας τίθεται με βάση τα κριτήρια του ταξινομικού συστήματος ICD-10 της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (World Health Organisation. The International Classification of Diseases, 1992) ή του ταξινομικού συστήματος DSM-IV-TR της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρείας . (American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 2000), και τα δύο ταξινομικά συστήματα αναγνωρίζουν έναν αριθμό υποτύπων στη σχιζοφρένεια.

B. Διπολική Διαταραχή

1.β.1 Γενικά για την διπολική διαταραχή

Διπολική ή μανιοκαταθλιπτική διαταραχή είναι μία διαταραχή της διάθεσης που προκαλεί έντονες συναισθηματικές αλλαγές και διακυμάνσεις της διάθεσης από τα μανιακά «ψηλά» στα καταθλιπτικά «χαμηλά». Η πλειοψηφία των διπολικών ασθενών βιώνουν εμπειρίες με εναλλασσόμενα επεισόδια μανίας και κατάθλιψης.

Στις ΗΠΑ σε περισσότερους από δύο εκατομμύρια ανθρώπους έχει διαγνωστεί διπολική διαταραχή. Αυτή είναι η έκτη κατά σειρά αιτία ανικανότητας σε παγκόσμια κλίμακα. Η μέση ηλικία έναρξης είναι από την εφηβεία μέχρι τα μέσα της τρίτης δεκαετίας. Όμως εξαιτίας της περιπλοκότητας της διαταραχής η σωστή διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει για πολλά χρόνια.

1.β.2 Τύποι της διπολικής διαταραχής

Η **Διπολική διαταραχή τύπου 1** χαρακτηρίζεται από την παρουσία μανιακών επεισοδίων στη ζωή του ανθρώπου. Συγκεκριμένα ένα άτομο με μανιακό επεισόδιο συχνά έχει αισθήματα υπερεκτίμησης του εαυτού και ευφορίας, γίνεται έντονα ομιλητικό (λογορροϊκό), χαρακτηρίζεται από έντονη κοινωνική συνδιαλλαγή και εξωστρέφεια με ταυτόχρονα ανεπαρκή έλεγχο των αναστολών του, παράλληλη απασχόληση με πολλαπλές δραστηριότητες ταυτόχρονα με ευερεθιστότητα, ανυπομονησία, μειωμένη ανάγκη για ύπνο. Σε σοβαρές περιπτώσεις μπορεί το άτομο να έχει ψευδαισθήσεις και παραληρητικές ψυχωτικές σκέψεις που συνηθέστερα υποκρύπτουν αίσθηση μεγαλείου.

Συνήθως, η μανιακή φάση ακολουθείται από περίοδο κατάθλιψης. Μικτές καταστάσεις όπου μανιακά και καταθλιπτικά συμπτώματα συμβαίνουν ταυτόχρονα, συναντώνται σχετικά συχνά σε διπολικούς ασθενείς.

Η **Διπολική διαταραχή τύπου 2** χαρακτηρίζεται από μείζονα καταθλιπτικά επεισόδια εναλλασσόμενα με επεισόδια υπομανίας, μία πιο ήπια μορφή μανίας.

Η **διπολική κατάθλιψη** ίσως είναι δύσκολο να διακριθεί από ένα αμιγές (μονοπολικό) καταθλιπτικό επεισόδιο. Ασθενείς με διπολική κατάθλιψη συνήθως παρουσιάζουν εξαιρετικά μειωμένη ενεργητικότητα, αίσθημα απελπισίας, επιβραδυνόμενη συναισθηματική και σωματική δραστηριότητα και πολύ έντονο το αίσθημα της κόπωσης, συνήθως περισσότερο απ' ό,τι συμβαίνει σε αμιγώς καταθλιπτικούς.

Η **Κυκλοθυμία** αναφέρεται στην εναλλαγή υπομανιακών επεισοδίων με κατάθλιψη που όμως δε φτάνει να πάρει τις διαστάσεις μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής. Το ένα τρίτο ασθενών με κυκλοθυμία θα αναπτύξουν διπολική διαταραχή τύπου 1 ή τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους.

1.β.3 Μηχανισμός και αιτία

Η αιτία της διπολικής διαταραχής δεν έχει απόλυτα ξεκαθαριστεί. Επειδή δύο τρίτα των διπολικών ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό συναισθηματικών διαταραχών, οι ερευνητές έχουν ψάξει για πιθανή γενετική συσχέτιση με την προδιάθεση για τη διπολική διαταραχή. Υποθέσεις έχουν διατυπωθεί και αφορούν στην ατελή κατασκευή της μυελίνης (ουσία που περιβάλλει τους άξονες των νευρικών κυττάρων, με σκοπό την προστασία και την μόνωσή τους), την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων ασβεστίου στα νευρικά εγκεφαλικά κύτταρα, τη ντοπαμίνη και άλλες χημικές ουσίες-νευροδιαβιβαστές, μέσω των οποίων επικοινωνούν τα νευρικά κύτταρα.

Η κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών, άλλες οργανικές παθολογικές καταστάσεις, όπως νοσήματα του θυρεοειδούς, φάρμακα που χορηγούνται για άλλα νοσήματα όπως η κορτιζόνη, μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση μανιακών επεισοδίων.

1.β.4 Θεραπεία της διπολικής διαταραχής

Η θεραπεία της διπολικής διαταραχής συνηθέστερα επιτυγχάνεται με φαρμακευτική αγωγή. Συνδυασμός **θυμοσταθεροποιητικών** φαρμάκων με **αντικαταθλιπτικά**, και **αντιψυχωσικά** χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν τα μανιακά και τα καταθλιπτικά επεισόδια.

Θυμοσταθεροποιητικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τα «ανεβάσματα» και «κατεβάσματα» της διπολικής διαταραχής είναι το **λίθιο**, η **καρβαμαζεπίνη**, το **βαλπροικό** και η **λαμοτριγίνη**.

Εκτός από τα αμιγώς θυμοσταθεροποιητικά φάρμακα, χρησιμοποιούνται ευρέως και αντιψυχωσικά (νευροληπτικά) φάρμακα, διότι φαίνεται να βοηθούν στην ρύθμιση των δύο πόλων μανίας και κατάθλιψης.

Η θεραπεία της κατάθλιψης που συνδέεται με τη διπολική διαταραχή έχει αρκετές δυσκολίες σε σχέση με την αμιγή(μονοπολική) κατάθλιψη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα καταθλιπτικά επεισόδια στα πλαίσια μιας διπολικής διαταραχής είναι πιο έντονα και ανθιστάμενα στη φαρμακευτική παρέμβαση. Επιπλέον η ανεξέλεγκτη χορήγηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων μπορεί να αντιστρέψει τον πόλο της νόσου και να πυροδοτήσει έτσι ένα μανιακό επεισόδιο.

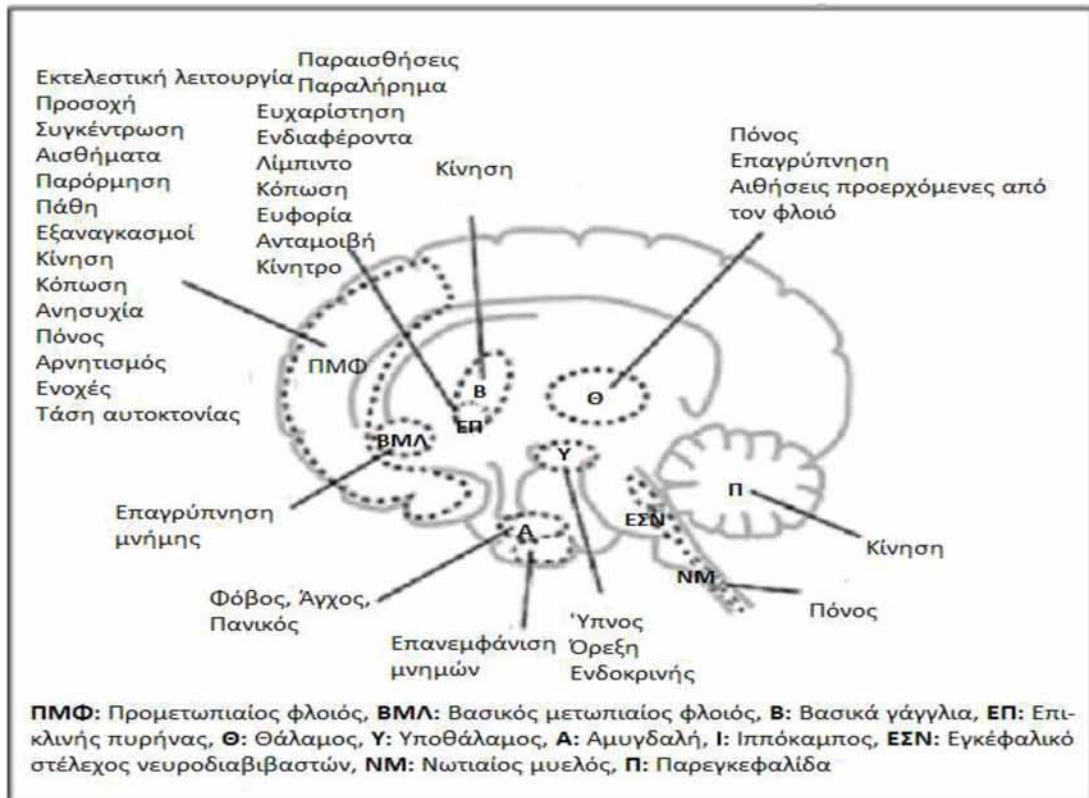
(<http://www.ekaranikas.gr/psyhealth/psydis/bipdis/> Προσπέλαση 12-3-2014)

2. ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1. Γενικά για τα αντιψυχωσικά φάρμακα

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την αντιμετώπιση των ψυχώσεων, αλλά και για την αντιμετώπιση γενικότερα ψυχικών διαταραχών, όπως δυσλειτουργίες στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως αυτές απεικονίζονται στο σχήμα 2.1. Θεωρείται ότι οι ψυχιατρικές διαταραχές, προκαλούνται από μεταβολές των νευροδιαβιβαστών στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, οπότε ανάλογα με την περιοχή έχουμε και την εμφάνιση των διαφόρων ψυχικών παθήσεων. **(Stahl & Mignon, 2010)**

Εκτός από τις ψυχώσεις, άλλες ενδείξεις χορήγησης αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι η μανία, οι παραληρητικές μορφές κατάθλιψης (με ταυτόχρονη χορήγηση αντικαταθλιπτικών), η δυσκολία στη συγκέντρωση, οι έμμονες σκέψεις, η αποδιοργάνωση, η ευερεθιστότητα, η δυσκολία στις σχέσεις με τους άλλους, οι ακουστικές ψευδαισθήσεις (<http://www.psynet.gr/index.php/mainmenu-35/34-17>), χρόνιες παραληρητικές διαταραχές, οι παραισθήσεις και οι διαταραχές σκέψης ιδιαίτερα στη σχιζοφρένεια και στις διπολικές διαταραχές.



Σχήμα 2.1: Περιοχές του εγκεφάλου με τις κυριότερες λειτουργίες (Stahl & Mignon, 2010)

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα βελτιώνουν τις διαταραχές της σκέψης, της αντίληψης, του συναισθήματος, την υπερκινητική συμπεριφορά και επηρεάζουν θετικά την επανασύνδεση του ασθενούς με το περιβάλλον του, καθώς και την οργάνωση της σκέψης και της ομιλίας. Επίσης, βοηθούν στην αντιμετώπιση των αρνητικών συμπτωμάτων. Αυτά περιλαμβάνουν την απόσυρση και την απομόνωση, την αδυναμία έκφρασης συναισθημάτων, ή την έντονη δυσκολία στη λήψη αποφάσεων (<http://www.psynet.gr/index.php/mainmenu-35/34-17>).

2.2. Ιστορία των Αντιψυχωσικών Φαρμάκων

Η σημασία τόσο της σχιζοφρένειας, όσο και της κατάθλιψης δεν έγκειται μόνο στο μεγάλο αριθμό των ανθρώπων που υποφέρουν. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η

εξαιρετικά δυσάρεστη κατάσταση των προσώπων του άμεσου περιβάλλοντός τους, καθώς και οι οικονομικές επιπτώσεις τους στην κοινωνία και στις υπηρεσίες παροχής μέριμνας για την υγεία. Καταφαίνονται λοιπόν οι ισχυροί λόγοι που συνηγορούν υπέρ του ότι επιβάλλεται να δοθεί περισσότερη προσοχή και να παρασχεθούν περισσότερα μέσα στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης και της σχιζοφρένειας από όσο συμβαίνει σήμερα. **(Marder et al., 2005)**

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στην κλινική ιατρική σχεδόν από το 1950. Η συμβολή τους στην ψυχιατρική, συγκεκριμένα στη θεραπεία της σχιζοφρένειας, υπήρξε τεράστια. Πρώτον, μείωσαν αξιοσημείωτα τον αριθμό των χρόνιων ασθενών που νοσηλεύονταν σε κέντρα για άτομα με διανοητικά προβλήματα. Δεύτερον, συνεισέφεραν σημαντικά στην μεταβολή του ψυχιατρικού τρόπου σκέψης σε μια βιολογική βάση. Δυστυχώς, καμία από τις παραπάνω αλλαγές δεν ήταν τόσο αποδοτική, όσο αναμενόταν αρχικά εξαιτίας των ανεπιθύμητων ενεργειών και του γεγονότος ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα δεν παρέχουν μόνιμη ίαση, αλλά θα πρέπει να λαμβάνονται εφόρου ζωής για την μετρίαση των ψυχωσικών συμπτωμάτων.

Πριν τη δεκαετία του '50, δεν υπήρχαν αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία των ψυχωσικών ασθενών και οι ψυχωσικοί ασθενείς βρίσκονταν συνήθως μόνιμα ή σχεδόν μόνιμα σε άσυλα. Το 1956 ξεκίνησε μια δραματική και σταθερή ανατροπή αυτής της τάσης. Και μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι άνθρωποι με σχιζοφρένεια συνήθως σταθεροποιούνταν με την φαρμακευτική αγωγή και έπαιρναν εξιτήριο από τα ιδρύματα πάρα πολύ γρήγορα. Για αυτή τη δραματική αλλαγή υπεύθυνη είναι μια ομάδα φαρμάκων που καλούνται *φαινοθειαζίνες*.

Οι πρώτες φαινοθειαζίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *προμεθαζίνη* και η *χλωροπρομαζίνη* για να επιτύχουν Γάλλοι ερευνητές μια πιο βαθειά αναισθησία σε περιπτώσεις εγχειρήσεων και παράλληλα να μετριάσουν τον φόβο και το άγχος των ασθενών (έτος 1952). Η χορήγηση χλωροπρομαζίνης προκαλεί ηρεμία, καταστολή χωρίς απώλεια της συνείδησης και αδιαφορία για τα εξωτερικά ερεθίσματα. Έτσι, αποτέλεσε το πρώτο νευροληπτικό φάρμακο που σε συνδυασμό με την υποστηρικτική θεραπεία βελτίωσε σημαντικά την ποιότητα ζωής των ψυχωσικών ασθενών, μολονότι η κατάστασή τους δεν ήταν τόσο ικανοποιητική, όσο θα θέλαμε. Εναλλακτική λύση στις φαινοθειαζίνες αποτέλεσαν η *ρεσπερίνη* και στη συνέχεια οι *βουτυροφαινόνες* (η

αλοπεριδόλη και η δροπεριδόλη) που όμως λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρό βαθμό. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 κυκλοφόρησαν και άλλα φάρμακα, όπως η λοξαπίνη και η μολινδόλη.(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Προσπέλαση την 10-3-2014)

Η νευροληπτική αγωγή με τα τυπικά αντιψυχωσικά τεκμηριώνεται ως αποτελεσματική για τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας (παραλήρημα, ψευδαισθήσεις, διεγέρσεις, αποδιοργάνωση της σκέψης), αλλά με χαμηλή αποτελεσματικότητα και επίδραση στα λεγόμενα αρνητικά συμπτώματα (αδράνεια, απόσυρση, κοινωνική απομόνωση, αρνητισμός). Για τους λόγους αυτούς τον 21ο αιώνα ακολούθησε ραγδαία ανάπτυξη στην παρασκευή άτυπων αντιψυχωσικών φαρμάκων, όπως η ολανζαπίνη, η ρισπεριδόνη, η κουετιαπίνη, η ζιπρασιδόνη, η αριπιπραζόλη, η κλοζαπίνη κ.α. Τα φάρμακα αυτά έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα με τα τυπικά σε ότι αφορά στα θετικά συμπτώματα, αλλά προκαλούν ελάχιστες ή καθόλου εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειες (δυστονία, παρκινσονισμό, ακαθισία και όψιμη δυσκινησία). Στα πλεονεκτήματα των άτυπων αντιψυχωσικών συγκριτικά με τα κλασικά αντιψυχωσικά περιλαμβάνονται:

Οι ελάχιστες εξωπυραμιδικές ανεπιθύμητες ενέργειες

Η αποτελεσματικότητα στα θετικά συμπτώματα (τουλάχιστον ίση με αυτή των κλασικών αντιψυχωσικών)

Καλύτερη αποτελεσματικότητα στα αρνητικά συμπτώματα

Βελτιωμένες γνωστικές λειτουργίες

Βελτιωμένη διάθεση.

(Marder et al., 2005), (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Προσπέλαση την 10-3-2014)

2.3. Διάκριση και χημική δομή των αντιψυχωσικών φαρμάκων

Σήμερα, τα αντιψυχωσικά φάρμακα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα του τρόπου δράσης τους και ομαδοποιούνται περαιτέρω, ανάλογα της χημικής τους δομής, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.2.

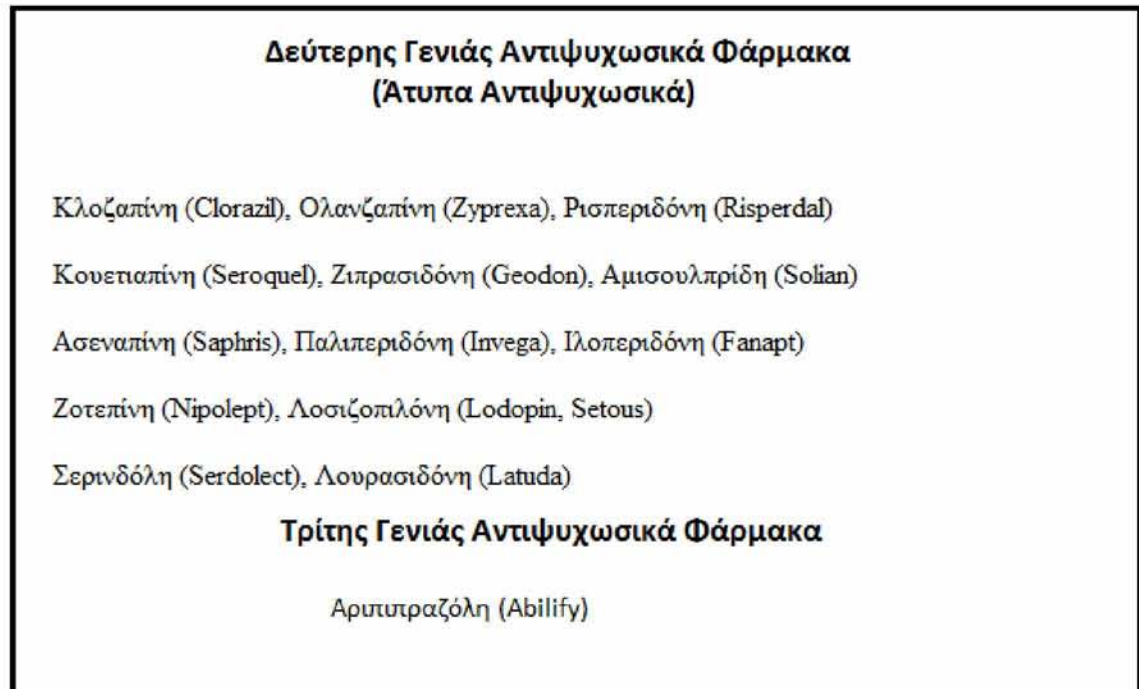
Πρώτης Γενιάς Αντιψυχωσικά Φάρμακα (Τυπικά Αντιψυχωσικά)		
Βουτυροφαινόνες	Φαινοθειαζόνες	Θειοξανθίνες
Αλοπεριδόλη (Haldol, Serepax)	Χλωροπρομαζίνη (Therazine, Largactil)	Χλωροπροθιξένιο (Cloxan, Taractam, Trulax)
Δροπεριδόλη (Droleptan)	Φλουφαιναζίνη (Prolixin)	Κλοπενθιζόλη (Sordinol)
	Προχλωροπεραζίνη (Compazine)	Φθοροπενθιζόλη (Dorixol, Fluaxhol)
	Θειοριδαζίνη (Mellaril, Melleril)	Θειοθιξένιο (Navane)
	Τριφθοριοπεραζίνη (Stelazine)	Ζουκλοπενθιζόλη
	Μεσοριδαζίνη, Περικυαζίνη	
	Τριφθοροπρομαζίνη (Vesprin), Προμαζίνη	
	Λεβομεπρομαζίνη (Nozinan)	
	Προμεθαζίνη (Phenergan), Περφαιναζίνη (Cisordinol, Clorixol, Triafon)	
	Κυαμεναζίνη (Tercian)	
Διβενζοεξαζεπίνες	Διυδροινδόλες	Διφαίνυλοβουτυλοπιπεριδίνες
Λοξαπίνη (Loxapac, Loxitane)	Μολινδόνη (Moban)	Πιμοζίδη (Orap)

Σχήμα 2.2: Διάκριση αντιψυχωσικών πρώτης γενιάς και ενδεικτικές εμπορικές ονομασίες.

Οι ανταγωνιστές υποδοχέων της ντοπαμίνης ή αλλιώς τα αντιψυχωσικά φάρμακα πρώτης γενιάς ή τυπικά αντιψυχωσικά, είναι η πρώτη κατηγορία των αντιψυχωσικών και περιλαμβάνει τα φάρμακα εκείνα που περιέχουν τις εξής χημικές ομάδες: φαινοθειαζίνες, βουτυροφαινόνες, θειοξανθίνες, διβενζοεξαζεπίνες, διυδροινδόλες, και διφαίνυλοβουτυλοπιπεριδίνες. Τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς συνεχίζουν να συνταγογραφούνται ευρέως σε πολλά μέρη του κόσμου, παρά την αντικατάστασή τους από νεότερα. Είναι αποτελεσματικά για αρκετές ψυχωτικές διαταραχές, αλλά μπορούν να προκαλέσουν και χρόνια νευρολογικά προβλήματα, ενώ μπορεί να είναι μερικώς αποτελεσματικά για ένα ποσοστό ψυχοσθενών και είναι σχετικά μη αποτελεσματικά, όσον αφορά στα συμπτώματα της σχιζοφρένειας (Marder et al., 2005).

Τα άτυπα αντιψυχωσικά ή αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς (σχήμα 2.3.) αποτελούν τη νέα, βελτιωμένη γενιά αντιψυχωσικών φαρμάκων. Η κυριότερη διαφορά με τα τυπικά, έγκειται στο γεγονός ότι τα άτυπα αντιψυχωσικά δούν ως ανταγωνιστές, όχι μόνο της ντοπαμίνης, αλλά και της σεροτονίνης. Επιπλέον, εμφανίζουν λιγότερες εξωπυραμιδικές παρενέργειες σε σχέση με τα τυπικά αντιψυχωσικά. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται και σε περισσότερες παθήσεις, όπως οι διπολικές διαταραχές, διαταραχές συμπεριφοράς, κατάθλιψη, αυτισμός κλπ (Marder et al., 2005). Τα άτυπα αντιψυχωσικά χαρακτηρίζονται από ποικιλότητα ως προς τη χημική τους δομή και δε μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω, όπως συμβαίνει με τα τυπικά.

Τέλος, αναφέρεται βιβλιογραφικά και η διάκριση τρίτης γενιάς αντιψυχωσικών φαρμάκων με μοναδικό αντιπρόσωπο την αριπιπραζόλη. Αυτή δρα διαφορετικά από τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, καθώς λειτουργεί ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων της ντοπαμίνης D2 και της σεροτονίνης 5HT1 και ανταγωνιστής των υποδοχέων της σεροτονίνης 5HT2A, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι λειτουργεί ως σταθεροποιητής της ντοπαμίνης. (Keltner & Johnson, 2002)



Σχήμα 2.3.: Αντιψυχωσικά φάρμακα δεύτερης και τρίτης γενιάς με ενδεικτικές εμπορικές ονομασίες τους.

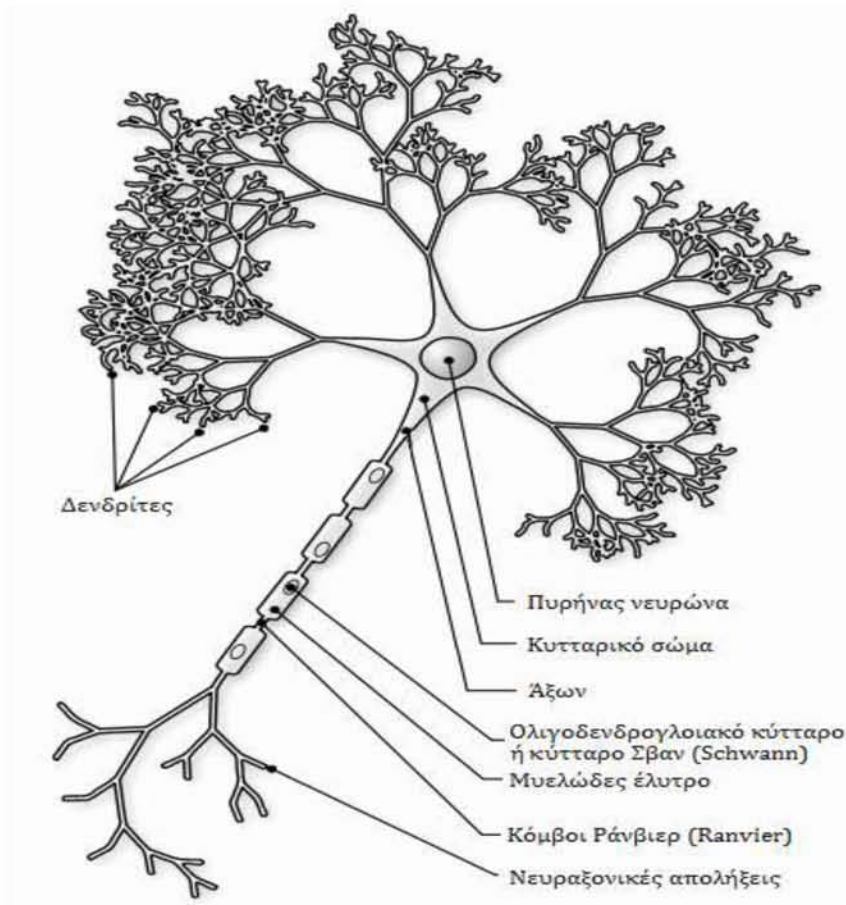
2.4. Παρενέργειες αντιψυχωσικών φαρμάκων

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιψυχωσικών φαρμάκων περιλαμβάνονται (**Rang & Dale, 2007**):

- Οξείες νευρολογικές διαταραχές: οξεία δυστονία, παρκινσονισμός.
- Αύξηση βάρους.
- Χρόνιες νευρολογικές διαταραχές: όψιμη δυσκινησία, όψιμη δυστονία.
- Νευροενδοκρινικές διαταραχές: αμηνόρροια, γαλακτόρροια, στειρότητα.
- Ιδιοσυγκρασιακές διαταραχές: κακοήθης νευροληπτικό σύνδρομο.
- Αντισταμινεργικές διαταραχές: καταστολή.
- Αντιαδρενεργικές διαταραχές: υπόταση, αρρυθμία.
- Φωτοευαισθησία, ευαισθησία στη θερμότητα, χολοστασικός ίκτερος, μελάγχρωση αμφιβληστροειδούς.

2.5. Μηχανισμός δράσης των αντιψυχωσικών φαρμάκων

Ο εγκέφαλος περιέχει δισεκατομμύρια νευρικών κυττάρων. Η πρωταρχική δομική και λειτουργική μονάδα των νευρικών κυττάρων είναι ο νευρώνας (σχήμα 2.4.), και επιτυγχάνει να συντονίζει τη σκέψη, τα συναισθήματα, τη συμπεριφορά, την κίνηση, και την αίσθηση, επιτρέποντας τη διαβίβαση ηλεκτροχημικών σημάτων. Οι νευρώνες αποτελούνται από τέσσερα μέρη, κυρίως σώμα, δενδρίτες, άξονα και τις απολήξεις του άξονα (<http://psi-gr.tripod.com/> 02/03/2014)



Σχήμα 2.4: Απεικόνιση νευρώνα και των κυριότερων μερών του. (<http://psi-gr.tripod.com/02/03/2014>)

Η εξειδικευμένη επαφή μεταξύ των δυο νευρώνων, όπου ο ένας επηρεάζει τη λειτουργία του άλλου επιτρέποντας την διαβίβαση ηλεκτροχημικών σημάτων, ώστε να επιτευχθεί η αποστολή τους, ονομάζεται σύναψη (σχήμα 2.5). Εκεί, διαρθρώνεται η απόληξη του άξονα ενός νευρώνα, με έναν δενδρίτη άλλου νευρώνα.



Σχήμα 2.5: Απεικόνιση νευρώνων, δενδριτών, αξόνων και συνάψεων. (<http://psi-gr.tripod.com/> 02/03/2014)

Στη σύναψη πραγματοποιείται η ηλεκτροχημική διαβίβαση από την προσυναπτική μεμβράνη στη μετασυναπτική, μέσω της πολύ λεπτής σχισμής που τα χωρίζει και που ονομάζεται “συναπτικό χάσμα” (Rollanhagen & Joachim, 2006).

Στη σύναψη, υπάρχουν συναπτικά κυστίδια, τα οποία περιέχουν χημικές ουσίες που ονομάζονται νευροδιαβιβαστές. Αυτοί συντελούν στη διαβίβαση του νευρικού σήματος –νευρικής ώσης-, που είναι ένα ηλεκτρικό σήμα, με τη λειτουργία της χημικής διαδικασίας. Οι νευροδιαβιβαστές, για να επιτύχουν τον σκοπό τους, συνδέονται με κατάλληλους υποδοχείς που υπάρχουν στη μετασυναπτική μεμβράνη ακολουθώντας τη θεωρία του «κλειδιού-κλειδαριάς». Κάθε νευροδιαβιβαστής δηλαδή, συνδέεται με συγκεκριμένο υποδοχέα και ταιριάζει μόνο μ’ αυτόν.

Ένας από τους νευροδιαβιβαστές είναι και η ντοπαμίνη. Τα αντιψυχωσικά φάρμακα θεωρείται ότι περιορίζουν τα ψυχωσικά συμπτώματα ελαττώνοντας τη δράση της ντοπαμίνης, σύμφωνα με την σχετική θεωρία της ντοπαμίνης. Η θεωρία γι' αυτόν το μηχανισμό δράσης προτάθηκε αρχικά από το Σουηδό Arvid Carlsson και άλλους επιστήμονες, που παρατήρησαν ότι η αλοπεριδόλη και η χλωροπρομαζίνη είχαν την ικανότητα να αυξάνουν τα επίπεδα των μεταβολιτών της ντοπαμίνης, σε πλούσιες σε ντοπαμίνη περιοχές στον εγκέφαλο των ποντικών, ενώ είχαν αντιφατικά αποτελέσματα σε άλλους νευροδιαβιβαστές. Μεταφράζοντας τα ευρήματα, κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι οι δυο αυτές ενώσεις δρούσαν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων της ντοπαμίνης και ότι τα αυτορυθμιζόμενα συστήματα αντιστάθμισαν το γεγονός αυτό, με αύξηση της παραγωγής της ντοπαμίνης.

Άλλα στοιχεία που ενισχύουν την ορθότητα της θεωρίας της ντοπαμίνης και του ρόλου της στις ψυχώσεις, προέρχονται από το γεγονός, ότι όλα τα φάρμακα που μειώνουν τα συμπτώματα των ψυχώσεων, λειτουργούν επίσης ως ανταγωνιστές υποδοχέων της ντοπαμίνης.

Υπάρχουν τέσσερις οδοί της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο που επηρεάζουν και καθορίζουν τα θεραπευτικά αποτελέσματα, αλλά και τις παρενέργειες που έχει η χρήση των αντιψυχωσικών φαρμάκων. Αυτές είναι, η μελαινοραβδωτή οδός (Nigrostriatal pathway), η μεσορινεγκεφαλική οδός (Mesolimbic pathway), η μεσοφλοιική οδός (Mesocortical pathway), η φυματοχοανική οδός (Tuberoinfundibular pathway). Η λειτουργία κάθε μιας οδού έχει μοναδικές φυσικές, γνωσιακές και ψυχολογικές επιπτώσεις στον άνθρωπο. Γι' αυτό, είναι πιθανός ο αποκλεισμός των υποδοχέων της ντοπαμίνης D2 να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη μία οδό και να προκαλεί προβλήματα σε κάποια άλλη. **(Stahl 2003)**

Αν και υπάρχουν πέντε είδη υποδοχέων ντοπαμίνης – D1, D2, D3, D4, D5-τόσο της πρώτης γενιάς αντιψυχωσικά φάρμακα (ΠΓΑ), όσο και αυτά της δεύτερης γενιάς (ΔΓΑ), ενεργούν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων D2 μην επιτρέποντας τη σύνδεση τους με την ντοπαμίνη.

Πολλά από τα πρώτης γενιάς αντιψυχωσικά φάρμακα, μπορούν να συνδεθούν επίσης και σε α 1-αδρενεργικούς, M1-μουσκαρινικούς και H1-ισταμινικούς υποδοχείς

αποκλείοντας τους, ενώ λίγα από αυτά μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς 5-HT_{2A}, όπως τα αντιψυχωσικά φάρμακα δεύτερης γενιάς.

Τα δεύτερης γενιάς αντιψυχωσικά φάρμακα διαφέρουν από της πρώτης γενιάς σε δύο σημεία. Πρώτον, έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με τους υποδοχείς της σεροτονίνης 5-HT_{2A} μπλοκάροντας τη δράση της και δεύτερον να συνδέονται με τους υποδοχείς της ντοπαμίνης πιο χαλαρά από της πρώτης γενιάς. Αυτή η χαλαρή σύνδεση επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση από τον υποδοχέα της ντοπαμίνης και την εκ νέου σύνδεση του υποδοχέα με τη ντοπαμίνη (σχήμα 1.15). Αυτός πιστεύεται είναι και ο λόγος που τα δεύτερης γενιάς αντιψυχωσικά έχουν λιγότερες εξωπυραμιδικές παρενέργειες σε σχέση με αυτά της πρώτης γενιάς, γιατί στην ουσία ρυθμίζουν την ποσότητα της ντοπαμίνης που θα συνδεθεί στους υποδοχείς και δεν την εμποδίζουν ολοκληρωτικά **(Stahl 2003)**.

Επίσης ορισμένα από τα δεύτερης γενιάς αντιψυχωσικά φάρμακα έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται και με άλλους υποδοχείς, όπως είναι οι 5HT_{1A}, 5HT_{1C}, 5HT_{1D} και να δρουν ως ανταγωνιστές σε υποδοχείς α₁-αδρενεργικούς, M₁ μουσκαρινικούς και H₁-ισταμινικούς.

Η αριπιπραζόλη κατατάσσεται στα αντιψυχωσικά φάρμακα τρίτης γενιάς. Διαφέρει από τα ΠΓΑ και ΔΓΑ, καθώς ελέγχει τα συμπτώματα της ψύχωσης με λίγες παρενέργειες, ενώ δε συντελεί στην αύξηση της προλακτίνης, διατηρώντας σε σταθερά επίπεδα στον ορό του αίματος.

Δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων της ντοπαμίνης D₂ στη μετασυναπτική μεμβράνη και ως ανταγωνιστής των ίδιων υποδοχέων στην προσυναπτική μεμβράνη. Έτσι, θεωρείται ότι δρα ως μερικός ανταγωνιστής. Θεωρείται επίσης ότι έχει την ίδια δράση του μερικού ανταγωνιστή απέναντι στους υποδοχείς σεροτονίνης 5-HT_{1A}, ενώ λειτουργεί ως ανταγωνιστής των υποδοχέων σεροτονίνης 5-HT_{2A}. Γενικότερα, η αριπιπραζόλη θεωρείται σταθεροποιητής του συστήματος ντοπαμίνης-σεροτονίνης. **(Aihara et al., 2003)**

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι φαρμακολογικά ως ανταγωνιστής ορίζεται το φάρμακο που αλληλεπιδρά με έναν υποδοχέα και εμποδίζει τη δράση ενός αγωνιστή, χωρίς να ενεργοποιεί τον υποδοχέα από μόνο του. Ως αγωνιστής ορίζεται το φάρμακο που

αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα προκαλεί βιολογικό αποτέλεσμα. Τέλος, ως μερικός αγωνιστής θεωρείται το φάρμακο που προκαλεί μικρότερο φαρμακολογικό αποτέλεσμα από έναν αγωνιστή. (farmacy.upatras.gwww.phr/index.php/en/latest-news/doc/121-1 Φεβρουάριος 2014).

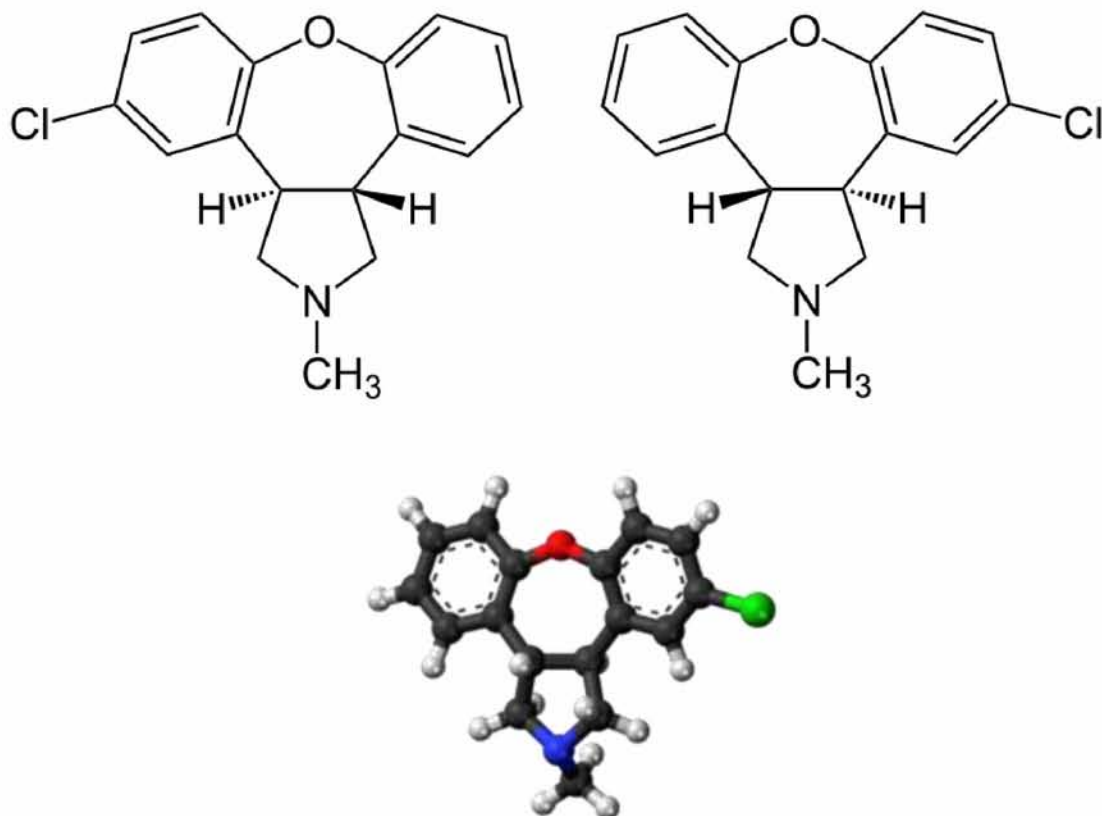
2.6. Φαρμακοκινητική

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των περισσότερων αντιψυχωσικών φαρμάκων στο πλάσμα του αίματος είναι 15-20 ώρες, ενώ η κάθαρσή τους εξαρτάται εξ' ολοκλήρου από το μεταβολισμό τους στο ήπαρ, από ένα συνδυασμό οξειδωτικών και συζευκτικών αντιδράσεων.

Τα περισσότερα αντιψυχωσικά φάρμακα χορηγούνται από το στόμα ή με ενδομυϊκή ένεση, μία ή δύο φορές ημερησίως. Εμπορικά διαθέσιμες είναι επίσης και οι αργής – αποδέσμευσης (depot) φαρμακοτεχνικές μορφές με την ενεργή δραστική ουσία να εστεροποιείται με επτανοϊκό ή δεκανοϊκό οξύ και να διαλύεται σε έλαιο. (Mycek et al., 2003)

3. ΑΣΕΝΑΠΙΝΗ

Η Ασenaπίνη, [(3*a*RS,12*b*RS)-5-chloro-2-methyl-2,3,3*a*,12*b*-tetrahydro-1*H*-dibenzo[2,3:6,7]-oxepino[4,5-*c*]pyrrole (2*Z*)-2-butenedioate (1:1)], αποτελεί ένα τυπικό διβενζοξυ-επι-πυρρόλιο με μοναδική φαρμακευτική δράση έναντι διαφόρων υποδοχέων των κυττάρων.



Σχήμα 3.1: Χημική και τρισδιάστατη δομή της ασεναπίνης

Η Ασεναπίνη (ASE), αποτελεί ένα από τα νεότερα αντιψυχωσικά φάρμακα, τα οποία αναφέρονται ως «άτυπα» αντιψυχωσικά. Ειδικότερα, είναι η δραστική ουσία του αντιψυχωσικού φαρμάκου, με ονομασία εμπορίου Saphris ή Sycrest, το οποίο βοηθά στην καταπολέμηση της σχιζοφρένειας και της διπολικής διαταραχής. Τα νεότερα αυτά φάρμακα, λειτουργούν γενικά, εξίσου καλά, όπως και τα παλαιότερα, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με προβλήματα κίνησης. Ωστόσο, άλλες παρενέργειες, όπως η αύξηση του σωματικού βάρους ή ο διαβήτης, είναι πιθανό να συμβούν.

Η Ασεναπίνη, έχει εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, καθώς και για την οξεία θεραπεία ως μονοθεραπεία ή ως συμπλήρωμα με λίθιο ή βαλπροϊκό οξύ τόσο σε μανιακά, όσο και σε μεικτά επεισόδια ενηλίκων ασθενών με

διπολική διαταραχή I. Επίσης, έχει εγκριθεί στην Ευρώπη για τη θεραπεία των μανιακών επεισοδίων στη διπολική διαταραχή. (**van de Wetering-Krebbers et al., 2011**)

Είναι ένα παράγωγο διβενζοξυπινοπυρολίου. Ο μηχανισμός δράσης της ασεναπίνης, όπως και με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα που έχουν αποτελεσματικότητα στη διπολική διαταραχή, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, με βάση τη φαρμακολογία των υποδοχέων της, προτείνεται ότι η αποτελεσματικότητα της ασεναπίνης επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση, μέσω ενός συνδυασμού ανταγωνιστικής δράσης στους υποδοχείς D2 και 5-HT_{2A}. Οι δράσεις σε άλλους υποδοχείς π.χ., 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇, D₃, και α₂-αδρενεργικούς υποδοχείς, μπορεί επίσης να συνεισφέρει στις κλινικές επιδράσεις της ασεναπίνης.

3.1. Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες:

Η ασεναπίνη που ανήκει στην ομάδα των ψυχοτρόπων και αντιψυχωσικών παρουσιάζει τις ακόλουθες φαρμακοκινητικές ιδιότητες:

Απορρόφηση

Μετά την υπογλώσσια χορήγηση, η ασεναπίνη απορροφάται ταχέως με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα να εμφανίζονται εντός 0,5 με 1,5 ώρες. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της υπογλώσσιας ασεναπίνης στα 5 mg είναι 35 %. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της ασεναπίνης όταν καταπίνεται είναι χαμηλή (<2 % με μία μορφή πόσιμου δισκίου). Η πρόσληψη νερού αρκετά (2 ή 5) λεπτά μετά τη χορήγηση της ασεναπίνης οδήγησε σε μείωση (19 % και 10 %, αντιστοίχως) της έκθεσης στην ασεναπίνη. Συνεπώς, η βρώση και η πόση θα πρέπει να αποφεύγεται για 10 λεπτά μετά τη χορήγηση. (http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001177/WC500096895.pdf Προσπέλαση την 19/03/2014)

Κατανομή

Η ασεναπίνη κατανέμεται ταχέως και έχει μεγάλο όγκο κατανομής (περίπου 1700 l), φανερόντας εκτεταμένη εξωαγγειακή κατανομή. Η ασεναπίνη δεσμεύεται ισχυρά (95 %) στις πρωτεΐνες του πλάσματος, συμπεριλαμβανομένης της αλβουμίνης και της α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης.

Βιομετατροπή

Η ασεναπίνη μεταβολίζεται εκτενώς. Η άμεση γλυκουρονιδίαση (που επιτυγχάνεται με μεσολάβηση του UGT1A4) και η οξείδωση και η απομεθυλίωση που επιτυγχάνονται με μεσολάβηση του κυτοχρώματος P450 (πρωτίστως του CYP1A2, με συνεισφορές του 2D6 και του 3A4) είναι οι πρωταρχικές μεταβολικές οδοί για την ασεναπίνη. Σε μία *in vivo* μελέτη σε ανθρώπους με ραδιοεπισημασμένη ασεναπίνη, το κυρίαρχο σχετιζόμενο με φάρμακο συστατικό στο πλάσμα ήταν η N⁺-γλυκουρονιδιωμένη ασεναπίνη, άλλα περιλαμβάνουν N-δεσμεθυλασεναπίνη, N-καρβαμυλο-γλυκουρονιδιωμένη N-δεσμεθυλασεναπίνη και μη μεταβληθείσα ασεναπίνη σε μικρότερες ποσότητες. Η δράση του Sycrest οφείλεται πρωτίστως στο μητρικό μόριο.

Η ασεναπίνη είναι ένας ασθενής αναστολέας του CYP2D6. Η ασεναπίνη δεν προκαλεί επαγωγή των δράσεων του CYP1A2 ή CYP3A4 σε υπό καλλιέργεια ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Η συγχορήγηση της ασεναπίνης με γνωστούς αναστολείς, επαγωγείς ή υποστρώματα αυτών των μεταβολικών οδών έχει μελετηθεί σε αρκετές μελέτες αλληλεπίδρασης φαρμάκου-φαρμάκου.

Αποβολή

Η ασεναπίνη είναι ένα μόριο, με μία κάθαρση μετά την ενδοφλέβια χορήγηση της τάξης των 52 L/h.

Σε μία μελέτη ισορροπίας μάζας, η πλειοψηφία της ραδιενεργής δόσης ανακτήθηκε στα ούρα (περίπου 50 %) και τα κόπρανα (περίπου 40 %), με μόνο μία μικρή ποσότητα να απεκκρίνεται στα κόπρανα (5-16 %) ως μη μεταβληθείσα ένωση. Μετά από μία αρχική

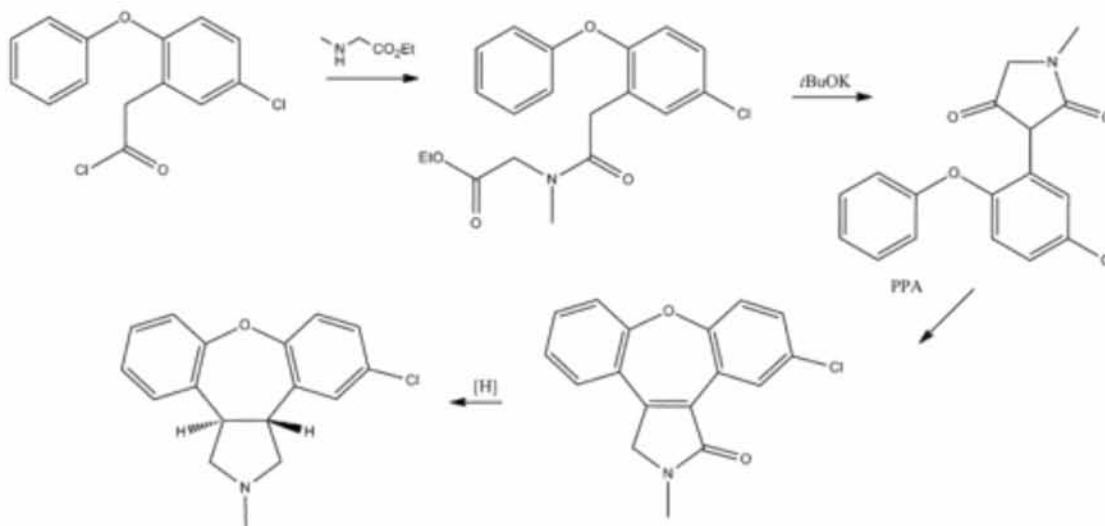
πιο σύντομη φάση κατανομής, ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής της ασεναπίνης είναι περίπου 24 h.

Γραμμικότητα/μη-γραμμικότητα

Αυξάνοντας τη δόση από 5 σε 10 mg δύο φορές την ημέρα (μία διπλάσια αύξηση) έχει ως αποτέλεσμα μικρότερες από γραμμικές (1,7 φορές) αυξήσεις και στο μέγεθος της έκθεσης και στη μέγιστη συγκέντρωση. Η μικρότερη από την αναλογική αύξηση της C_{max} και της AUC με τη δόση μπορεί να αποδοθεί σε περιορισμούς στην ικανότητα απορρόφησης από το βλεννογόνο του στόματος μετά την υπογλώσσια χορήγηση.

Κατά τη διάρκεια δοσολογίας δύο φορές την ημέρα, η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται εντός 3 ημερών. Συνολικά, η φαρμακοκινητική της ασεναπίνης στη σταθερή κατάσταση είναι παρόμοια με τη φαρμακοκινητική εφάπαξ δόσης.

Σύνθεση φαρμάκου



http://en.wikipedia.org/wiki/File:Asenapine_scheme.png Προσπέλαση 19/03/2014

Η ASE έχει ένα μοναδικό προφίλ σύνδεσης υποδοχέων, με ισχυρό πολλαπλών υποδοχέων ανταγωνισμό, όπως για τον συνδυασμό υποδοχέων της σεροτονίνης, της ντοπαμίνης, της νοραδρεναλίνης και της ισταμίνης. Επίσης, έχει απόλυτα μεγαλύτερη συγγένεια από τα σημερινά διαθέσιμα αντιψυχωσικά φάρμακα για ένα υποσύνολο των θεραπευτικών σεροτονινεργικών (5-HT_{2A}, 2B, 2C, 6, και 7), νοραδρενεργικών (α₁ και α₂) και ντοπαμινεργικών (D₃ και D₄) υποδοχέων και καμία αξιολογημένη δραστηριότητα σε μουσκαρινικούς χολινεργικούς υποδοχείς.

Δοσολογία και τρόπος χορήγησης

Δοσολογία

Μανιακό επεισόδιο

Η συνιστώμενη δόση έναρξης του Sycrest ως μονοθεραπεία είναι 10 mg δύο φορές την ημέρα. Μία δόση θα πρέπει να λαμβάνεται το πρωί και μία δόση θα πρέπει να λαμβάνεται το βράδυ. Η δόση μπορεί να μειώνεται σε 5 mg δύο φορές την ημέρα ανάλογα με την κλινική αξιολόγηση. Για τη θεραπεία συνδυασμού συνιστάται μία δόση έναρξης των 5 mg δύο φορές την ημέρα. Με βάση την κλινική ανταπόκριση και ανοχή στον κάθε ασθενή, η δόση μπορεί να αυξάνεται σε 10 mg δύο φορές την ημέρα.

Μετά την χορήγηση από το στόμα, η ασεναπίνη απορροφάται ταχέως με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα να εμφανίζονται εντός 0,5 με 1,5 ώρες. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της υπογλώσσιας ασεναπίνης στα 5 mg είναι 35%.

Η ασεναπίνη είναι ένα μόριο, με μία κάθαρση μετά την ενδοφλέβια χορήγηση της τάξεως των 52 l/h. Ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής της ασεναπίνης είναι περίπου 24h. Μόνο μια μικρή ποσότητα απεκκρίνεται στα κόπρανα.

Παρενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση της ασεναπίνης είναι μεταξύ άλλων:

- αύξηση βάρους
- αυξημένη όρεξη
- μικρές ή παρατεταμένες μυϊκές συσπάσεις
- ανησυχία
- ακούσιες μυϊκές συσπάσεις
- αργές κινήσεις, τρόμος
- καταστολή
- ζάλη
- αλλαγή στη γεύση
- αίσθημα αιμωδίας στη γλώσσα ή στο στόμα
- μυϊκό σφίξιμο
- κόπωση
- αύξηση στο επίπεδο των πρωτεϊνών στο ήπαρ

4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

4.1. Εισαγωγή στην Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

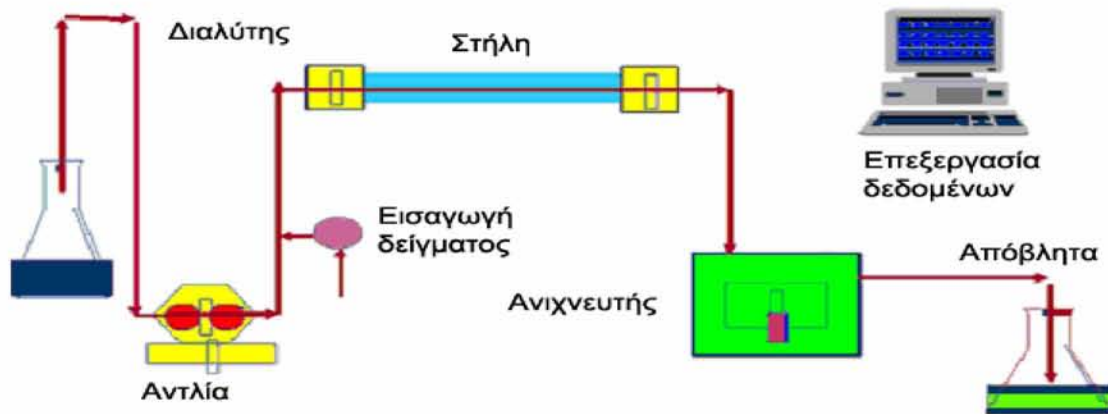
Η χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της άνισης κατανομής των συστατικών του μίγματος μεταξύ των δύο μη ανμειγνύομενων φάσεων. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Η ταχύτητα μετακίνησης εξαρτάται από τη χημική συγγένεια της ουσίας προς την κινητή ή την ακίνητη φάση.

Είναι η διαχωριστική τεχνική που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί, επομένως κρίνεται σκόπιμη μια σύντομη περιγραφή της.

Η βασική διάταξη ενός χρωματογράφου υψηλής πίεσης περιλαμβάνει τα ακόλουθα επιμέρους τμήματα:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών.
- Αντλία (σταθερής ροής ή πίεσης).
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα, αυτόματος δειγματολήπτης).
- Χρωματογραφική Στήλη (αποτελεί την καρδιά του διαχωρισμού).
- Ανιχνευτής.
- Σύστημα καταγραφής των ληφθέντων αποτελεσμάτων με χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Μία τυπική διάταξη ενός κρωματογράφου HPLC φαίνεται στο Σχήμα 4.1.



Σχήμα 4.1: Τυπική διάταξη HPLC

4.2. Πλεονεκτήματα της HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης είναι μια ευαίσθητη αναλυτική τεχνική ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού, η οποία εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, τα οποία την καθιστούν σήμερα μια από τις πλέον εφαρμοζόμενες αναλυτικές τεχνικές που υπερέχει σαφώς έναντι των υπολοίπων. Αυτά είναι:

1. Η πολύ καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
2. Η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα.
3. Μπορεί να εξασφαλίσει χαμηλά όρια ανίχνευσης και υψηλή εξειδίκευση (εκλεκτικότητα) με τη χρήση του κατάλληλου ανιχνευτή.
4. Η ευκολία εφαρμογής της.
5. Η δυνατότητα εφαρμογών σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, τόσο για αναλύσεις ρουτίνας, όσο και για ερευνητικούς σκοπούς ώστε την καθιστά μία καθολική τεχνική.

Το τελευταίο αυτό πλεονέκτημα είναι πολύ σημαντικό και οφείλεται στη μεγάλη ευελιξία που εμφανίζει η τεχνική. Η δυνατότητα εφαρμογής πολλών διαφορετικών χρωματογραφικών συνθηκών με μεταβολές στη σύσταση και στην ταχύτητα ροής της

κινητής φάσης και η δυνατότητα χρησιμοποίησης μεγάλου αριθμού διαφόρων τύπων υλικών πλήρωσης των στηλών και διαφόρων τύπων ανιχνευτών καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό και προσδιορισμό, τόσο ανόργανων ιόντων, όσο και μικρών οργανικών μορίων και μακρομορίων με βιολογική δράση όπως, αμινοξέα, αντιβιοτικά, πρωτεΐνες, βιταμίνες, ναρκωτικά, φάρμακα κ.α. **(Copra & Roberts, 2001)**

Η HPLC είναι μια τεχνική που δίνει τη δυνατότητα σε πολλούς τομείς της χημικής ανάλυσης: σε προσδιορισμούς ρουτίνας, σε αναλυτική και παρασκευαστική κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα βρίσκει εφαρμογές:

- Σε Φαρμακοβιομηχανίες.
- Στη Βιοχημεία.
- Στη Χημεία Τροφίμων.
- Σε Χημικές Βιομηχανίες.
- Στην Κλινική Χημεία.
- Σε Δικονομικές – Τοξικολογικές μελέτες.
- Σε Περιβαλλοντικές μελέτες.

(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001) (Παπαδογιάννης, 2004)

5. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Όσο αποτελεσματική και αν είναι η διαχωριστική μέθοδος που χρησιμοποιείται, πολλές φορές είναι απαραίτητη η προκατεργασία του δείγματος πριν αυτό αναλυθεί. Η προκατεργασία του δείγματος αποτελεί το πιο πολύπλοκο και χρονοβόρο στάδιο και καταλαμβάνει τα δύο τρίτα του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Παρόλα αυτά όμως, κρίνεται απαραίτητο για την απομάκρυνση και παραλαβή ή για την προσυγκέντρωση του αναλυόμενου δείγματος.

Οι στόχοι της προκατεργασίας του δείγματος είναι:

- Η τροποποίηση του υποστρώματος.
- Ο καθαρισμός του δείγματος.
- Ο εμπλουτισμός / η προσυγκέντρωση.
- Η απομόνωση των συστατικών που μας ενδιαφέρουν.

Με την κατάλληλη τεχνική προκατεργασίας του δείγματος επιτυγχάνεται να:

1. Βελτιωθεί η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα και η εκλεκτικότητα.
2. Αυξηθεί ο χρόνος ζωής της στήλης και του οργάνου.
3. Βελτιωθεί το όριο ανίχνευσης LOD.

Μία τεχνική προκατεργασίας δείγματος πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως να είναι απλή, ταχεία, οικονομική, εκλεκτική για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, αποτελεσματική και να μπορεί να αυτοματοποιηθεί.

Για την ανάπτυξη της καταλληλότερης μεθόδου προκατεργασίας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ορισμένες παράμετροι:

- Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του δείγματος.
- Η χημική σύσταση του δείγματος.
- Υπόστρωμα/παρεμποδίσεις.
- Η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Η ανάκτηση, η οποία πρέπει να είναι ποσοτική.
- Η διαδικασία να είναι απλή και
- Η επαναληψιμότητα / η ακρίβεια.

(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001) (Παπαδογιάννης, 2004)

6. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έχουν χρησιμοποιηθεί δυο εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, στερεάς μορφής και είναι οι τρίχες της κεφαλής και οι όνυχες.

Τα υποστρώματα αυτά τελευταία, γνωρίζουν όλο και μεγαλύτερα αναγνώριση και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην τοξικολογία. Η τοξικολογία είναι ένας κλάδος της βιολογίας, της χημείας και της ιατρικής που ασχολείται με τη μελέτη των αρνητικών επιπτώσεων μίας χημικής ένωσης σε ζώντες οργανισμούς.

Η τοξικολογική ανάλυση δείγματος τρίχας ή όνυχος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών βιολογικών υποστρωμάτων όπως τα ούρα και το αίμα επειδή μπορεί να είναι πληροφοριακή όταν το αίμα και τα ούρα δεν αναμένεται πλέον να περιέχουν την ουσία που αναζητείται και όταν θέλουμε να τεκμηριώσουμε τη χρόνια λήψη μίας ουσίας. **(Mali et al., 2011) (Barbosa et al., 2013)**

6.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ένα τυπικό σχήμα ανάλυσης ενός βιολογικού δείγματος περιλαμβάνει συνήθως τέσσερα στάδια:

- Δειγματοληψία: το δείγμα μπορεί να είναι ιστός, υγρό, αίμα, ούρα κλπ, παραλαμβάνεται, ομογενοποιείται ή και φυγοκεντρείται.

- Επεξεργασία του δείγματος για την απομόνωση της επιθυμητής ένωσης και προσυγκέντρωση της.
- Ενόργανη ανάλυση του επεξεργασμένου δείγματος.

Το πιο σημαντικό στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων σε όλα τα στάδιά της, είναι να μην καταστραφεί ή αλλοιωθεί η επιθυμητή ένωση, γι' αυτό και απαιτείται πολύ προσεκτικός χειρισμός από τον αναλυτή. (Παπαδογιάννης, 2004)

6.2. ΤΡΙΧΕΣ

Η πρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα η κερατίνη είναι το κύριο συστατικό της τρίχας, η οποία αποτελείται από δύο ευδιάκριτες δομές:

1) Το **Εξωτερικό** ή ορατό τμήμα, που ονομάζεται **στελέχος**. Είναι ένας μακρύς, λεπτός κύλινδρος που καλύπτεται από κύτταρα, τα οποία είναι δεμένα μεταξύ τους και αποτελούνται από 3 στοιβάδες:

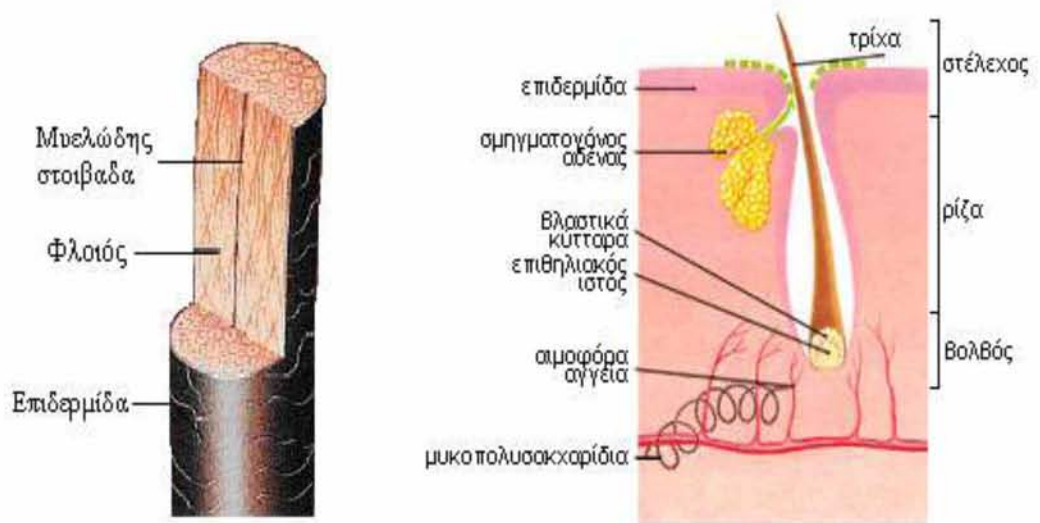
- **τη μυελώδη** που είναι η εσωτερική στοιβάδα της τρίχας. Έχει σπογγώδη πυκνότητα και αποτελείται από έναν αριθμό κυττάρων που είναι το ένα δίπλα στο άλλο σε σειρές που διαχωρίζονται από κενά αέρα.
- **το φλοιό** που είναι η δεύτερη στοιβάδα και αποτελείται από κύτταρα που περιέχουν κερατίνη και μελανίνη, τη χρωστική που καθορίζει το χρώμα των μαλλιών.
- **την επιδερμίδα**, η οποία είναι η εξωτερική, ορατή στοιβάδα που αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με λέπια και περιέχουν κερατίνη, έχει μορφή κεραμιδιών και εσωκλείει τη μυελώδη στοιβάδα και το φλοιό. Η επιδερμίδα είναι η βασική στοιβάδα του στελέχους.

2) Το **Εσωτερικό τμήμα**, που βρίσκεται σε μία κοιλότητα που ονομάζεται **τριχοφόρος θύλακας** ή **σμηγματογόνος θύλακας**, που αποτελείται από:

- **τη ρίζα** που είναι το τμήμα της τρίχας που είναι “βυθισμένο” στο ανώτερο τμήμα του θύλακα.
- **το βολβό**, ο οποίος είναι το κατώτερο τμήμα του τριχοφόρου θύλακα που έχει ένα διεσταλμένο ωοειδές σχήμα. Όλη η διαδικασία της ανάπτυξης που οδηγεί στη σύνθεση της δομής της τρίχας, συμβαίνει στο σημείο αυτό.
- **τον επιθηλιακό ιστό ή ιστό της ρίζας**, που είναι πλούσιος σε αιμοφόρα αγγεία που οξυγονώνουν και θρέφουν το βολβό, αναπαράγουν τα βλαστικά κύτταρα που ωθούν προς τα επάνω τα νέα κύτταρα της τρίχας.
- **το σμηγματογόνο αδένα**, ο οποίος είναι τοποθετημένος δίπλα στο θύλακα, παράγει σμήγμα, μια λιπαρή ουσία που θρέφει και λιπαίνει τα λέπια για να δώσει λάμψη και ελαστικότητα στα μαλλιά.
- **τον ανορθωτήρα μυ της τρίχας**, ο οποίος βρίσκεται διαγώνια στο πλάι του σμηγματογόνου αδένα, έχει τη λειτουργία της εκκένωσής του, μέσω συμπίεσης. Επιπλέον, διατηρεί το φυσιολογικό pH (5,5), την ενυδάτωση και την ελαστικότητα του δέρματος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές, ώστε να βρεθεί ένα κατάλληλο πρωτόκολλο προκατεργασίας των δειγμάτων. Το πρωτόκολλο αυτό θα προηγούνταν της ανάλυσης με HPLC και θα είχε ως στόχο την παραλαβή της προσδιοριζόμενης ένωσης, ενώ ταυτόχρονα θα προσέδιδε στην τεχνική αξιοπιστία, απλότητα, εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα.

(Πανταζίδου, 2011)



Σχήμα 6.1: Δομή τρίχας.

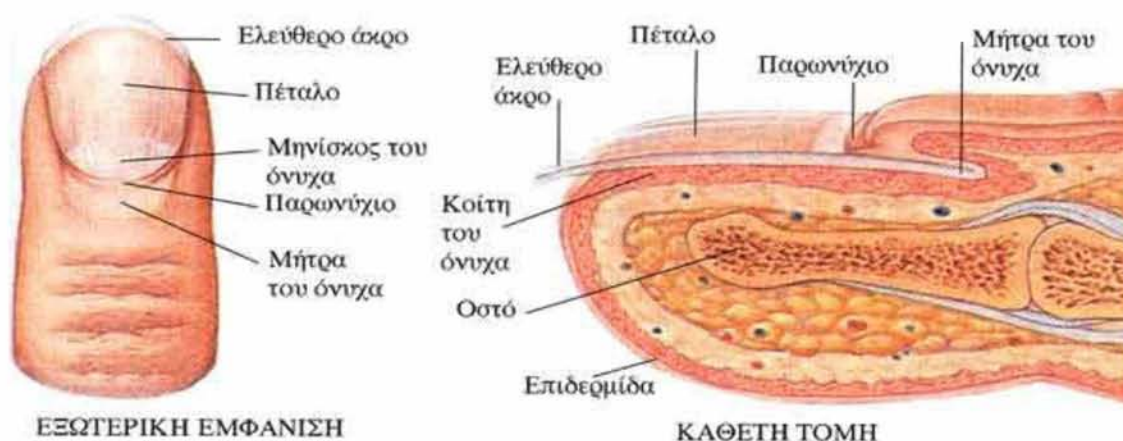
6.3. ΟΝΥΧΕΣ

Με τον όρο όνυχα αναφερόμαστε στην ονυχαία πλάκα ή πλάκα του όνυχα ή πέταλο, η οποία είναι το σκληρό, ημιδιαφανές τμήμα του όνυχα. Η πλάκα του όνυχα αποτελείται από νεκρά, συμπιεσμένα κύτταρα, τα οποία έχουν ως βασικό συστατικό τους την κερατίνη, καθώς επίσης και λιπίδια, τα οποία εξασφαλίζουν την απαραίτητη περιεκτικότητα νερού στη δομή του, για τη διασφάλιση της ελαστικότητάς του. Η κοίτη του όνυχα βρίσκεται κάτω από την πλάκα του όνυχα και εκτείνεται από τη μήτρα, έως το υπονύχιο (το σημείο κάτω από το ελεύθερο άκρο του όνυχα) και έχει δύο λειτουργίες:

- επιτρέπει στην πλάκα να προχωρά καθώς μεγαλώνει, και
- την κρατάει συνδεδεμένη στο δάκτυλο.

Η μήτρα του όνυχα βρίσκεται κάτω από την κεντρική παραonyχίδα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της πλάκας του όνυχα. Τέλος, η πλάκα του όνυχα περιβάλλεται από τις παραonyχίδες, οι οποίες προσφέρουν προστασία στη μήτρα του όνυχα (Σχήμα 6.2).

(Πανταζίδου, 2011)



Σχήμα 6.2: Δομή του όνυχα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

Η ασεναπίνη είναι ένα αντιψυχωσικό φάρμακο νέο και καινοτόμο και σύμφωνα με τη μελέτη της βιβλιογραφίας δεν υπάρχουν μέθοδοι προσδιορισμού της στα βιολογικά υποστρώματα, όπως είναι οι ανθρώπινες τρίχες και όνυχες. Ο προσδιορισμός της έχει γίνει μέχρι στιγμής κυρίως σε βιολογικά υγρά, όπως το πλάσμα και ο ορός αίματος. Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά τα άρθρα που βρέθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία.

Το 2011, μια ομάδα ερευνητών (**De Boer et al., 2011**) ανέπτυξαν μία μέθοδο για τον προσδιορισμό της ασεναπίνης (ASE) και τριών μεταβολιτών της σε πλάσμα αίματος παρουσία εσωτερικού προτύπου. Ο προσδιορισμός έγινε με χρήση της τεχνικής LC-MS/MS έπειτα από αυτοματοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) των αναλυτών από το δείγμα. Ο προσδιορισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης Discovery C₈ (150 × 2.1 mm, 5 μm) με βαθμωτή έκλουση έπειτα από εκχύλιση στερεάς φάσης. Η ανίχνευση έγινε με φασματόμετρο μαζών με αναλυτή τριπλού τετραπόλου. Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, τη σταθερότητα. Τέλος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα και βρέθηκε ικανοποιητική για τον προσδιορισμό της ασεναπίνης στο πλάσμα αίματος στα όρια 0,0250-20,0 ng/μL.

Το 2012, η ίδια ομάδα επιστημόνων (**De Boer et al., 2012**) τροποποίησαν την παραπάνω μέθοδο με σκοπό την εφαρμογή της για τον προσδιορισμό της ασεναπίνης και δύο μεταβολιτών της σε δείγμα ανθρώπινων ούρων. Ο προσδιορισμός έγινε και πάλι με την μέθοδο SPE-HPLC-MS/MS με την χρήση στήλης αντίστροφης φάσης Discovery C₈ (150 × 2.1 mm, 5μm) και βαθμωτή έκλουση. Η μέθοδος βρέθηκε γραμμική σε εύρος τιμών 10,0 – 3000 ng/mL για την ασεναπίνη και ελέγχθηκε ως προς την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα. Τέλος, βρήκε εφαρμογή σε δείγματα ούρων από κλινικές δοκιμές.

Το 2012 οι (**Aarely et al., 2012**) δημοσίευσαν ένα ερευνητικό άρθρο σχετικά με τον προσδιορισμό της ασεναπίνης στα φαρμακευτικά σκευάσματά της. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό ήταν η HPLC αντίστροφης φάσης ODS C18 Column 250 × 4.6 mm; 5μm). Η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους στα 270 nm.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε, αφού μελετήθηκε αρχικά για την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη γραμμικότητά της. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης βρέθηκαν 0,4329 και 0,1311 mg/mL αντίστοιχα. Έτσι, αναπτύχθηκε μια εύκολη και γρήγορη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ασεναπίνης στα σκευάσματά της.

Την ίδια χρονιά, 2012, μια επιστημονική ομάδα (**Chhalotiya et al., 2012**) δημοσίευσε ένα άρθρο σχετικά με την ανάπτυξη μιας μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ασεναπίνης σε σκευάσματά της (bulk μορφή). Ο προσδιορισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης SunFire C₁₈, 250×4.6 mm, 5 μm και ισοκρατική έκλουση. Η ανίχνευση έγινε με UV στα 232 nm. Ο συνολικός χρόνος ήταν 5,51 λεπτά. Η νέα μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό της ασεναπίνης και στη μορφή δισκίων.

Το 2013, οι (**Ansermot et al., 2013**), ανέπτυξαν μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο ταυτόχρονου προσδιορισμού δέκα αντιψυχωσικών φαρμάκων μεταξύ των οποίων ήταν και η ασεναπίνη σε πλάσμα αίματος. Ο προσδιορισμός έγινε με UHPLC-MS σε διάρκεια περίπου τριών λεπτών. Ο διαχωρισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης UPLC BEH Shield RP18 (2.1 × 50 mm; 1.7 μm) με βαθμωτή έκλουση. Η προκατεργασία ήταν πολύ εύκολη και γρήγορη καθώς η αποπρωτείνωση έγινε με ακετονιτρίλιο ACN. Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ακρίβεια, τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα και τη σταθερότητα και επικυρώθηκε πλήρως. Βρέθηκε γραμμική και απόλυτα ακριβής για εύρος 0,5 – 200 ng/ mL για την ασεναπίνη. Η μέθοδος αποδείχθηκε κατάλληλη κατά την εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα.

Το 2013, οι (**Reddy et al, 2013**) ανέπτυξαν μια μέθοδο προσδιορισμού δύο αντιψυχωσικών φαρμάκων ταυτόχρονα, της ασεναπίνης και του βαλπροϊκού οξέος που χορηγούνται σε περιπτώσεις σχιζοφρένειας και συμπτωμάτων διπολικής διαταραχής. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με LC-MS/MS σε πλάσμα αίματος. Ο διαχωρισμός έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης Phenomenex C₁₈ (50 × 4.6 mm, 5 μm) ισοκρατικά σε θερμοκρασία 40 °C. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε συνδεόταν με αναλυτή τριπλού τετραπόλου. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 2,5 λεπτά. Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ακρίβεια, τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα και τη σταθερότητα και επικυρώθηκε πλήρως. Βρέθηκε γραμμική και απόλυτα ακριβής για εύρος 0,1 – 10,02 ng/mL για την

ασεναπίνη. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τη φαρμακοκινητική μελέτη σε δείγματα 8 εθελοντών ανδρών.

8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αυξανόμενη χρήση των αντιψυχωσικών φαρμάκων -όπως αναφέρθηκε παραπάνω- δημιούργησε την ανάγκη για την ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα επιτρέπει το γρήγορο, φθινό, απλό και αποτελεσματικό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά δείγματα.

Στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της ασεναπίνης (asenapine - ASE), ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου άτυπου αντιψυχωσικού φαρμάκου.

Η περιορισμένη βιβλιογραφική αναφορά στη χρήση της HPLC, με τη βοήθεια φασματομετρικού ανιχνευτή UV-vis, για την ανίχνευση αυτής της ένωσης, καθώς και η έλλειψη αναφορών για τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου αντιψυχωσικού στα αντίστοιχα βιολογικά υποστρώματα, όπως οι τρίχες και τα νύχια, καταδεικνύουν την πρωτοτυπία της εργασίας.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

9.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Τα επιμέρους που απαρτίζουν τη διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης που χρησιμοποιήθηκε είναι:

1. Αντλία ισοκρατικής έκλουσης Shimadzu LC-10 AD (Kyoto, Japan)
2. Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne, με εισαγόμενο όγκο δείγματος 20 μL (Cotati California, U.S.A).
3. Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής πολλαπλού μήκους κύματος SSI, 500 UV-Vis detector Variable (Scientific Systems, INC/State College, PA, U.S.A.) με μήκος κύματος ανάλυσης στα 270 nm και ευαισθησία 0,002 AUFS.
4. Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων DAQ Software for Chemist, που αναπτύχθηκε από τον Καθηγητή Π. Νικήτα του Τμήματος Χημείας του ΑΠΘ (Εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).
5. Μικροσύριγγα Hamilton 50 μL (Bonaduz, Switzerland)
6. Φιάλη αποθήκευσης διαλυτών.
7. Χρωματογραφική στήλη Inertsil C₈, (250 × 4.0 mm) 5 μm (MZ AnalysenTechnik, Mainz, Germany)).



Σχήμα 9.1: Διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης που χρησιμοποιήθηκε.

9.2. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Αναλυτικός ζυγός Shimadzu AUX 120, ακρίβειας $\pm 0,0001\text{g}$.
2. Φυγόκεντρος Hermle, Z 230 (B. Hermle, Gosheim, Germany).
3. Συσκευή υπερήχων Transonic 460/H (Elma, Germany).
4. Συσκευή εξάτμισης αζώτου με εννιά κανάλια Reacti- Vap TM (model 18780) PIERCE (Rockford, IL, USA).
5. Αναδευτήρας IN 47802 Small Vortexer Glass-col (Terre Haute, USA).

9.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι αναλυτικώς καθαρά και είναι τα εξής:

- Από τον οίκο Carlo Erba (Μιλάνο, Ιταλία) χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικώς καθαροί και είναι οι εξής: μεθανόλη και ακετονιτρίλιο,
- Νερό υψηλής καθαρότητας από το σύστημα καθαρισμού Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Από το φαρμακευτικό σκεύασμα, την ασεναπίνη, μετά από τη διαλυτοποίηση κατάλληλης ποσότητας σε μεθανόλη, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα. Το φαρμακευτικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: Asenapine (Merck Sharp Dohme Rahway, NJ USA)
- Ακετονιτρίλιο, (ACN) HPLC Grade, Fisher Scientific (Leicestershire, U.K).
- Μεθανόλη, (MeOH) UV-IR-HPLC-HPLC isocratic, Panreac (Barcelona, Spain).
- Οξικό Οξύ (Merck, Germany)
- Οξικό Νάτριο (Merck, Germany)

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής καθαρότητας για HPLC.

10. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

10.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Ο ανιχνευτής που επιλέχθηκε για τη διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης ήταν φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής UV-vis. Η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Ως καταλληλότερο μήκος κύματος κρίθηκε αυτό των 270 nm, λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας της βασικής γραμμής.

10.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΕΚΚΛΟΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η σύσταση της κινητής φάσης που επιλέχθηκε ήταν σε αναλογία 50:40:10 % v/v ρυθμιστικό διάλυμα {οξικό οξύ CH_3COOH 0,2 M - οξικό νάτριο CH_3COONa 0,2M, pH 4,5 }, ακετονιτρίλιο (CH_3CN) και μεθανόλη (CH_3OH). Επίσης η ταχύτητα ροής για το βέλτιστο διαχωρισμό επιλέχθηκε στα 1,0 mL/min. Με αυτές τις συνθήκες ανάλυσης ήταν εφικτός ο καλύτερος διαχωρισμός, με αρκετά σύντομο χρόνο έκλουσης της προσδιοριζόμενης ένωσης. Αναλυτικότερα, η ασεναπίνη εκλύεται στα 5 min, με πίεση που δεν ξεπερνά τα 151 bar.

Η κατάλληλη χρωματογραφική στήλη και η κινητή φάση είναι καθοριστικοί παράγοντες για το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Για το διαχωρισμό της ασεναπίνης, χρησιμοποιήθηκε η στήλη Intersil C₈, (250 × 4.0 mm) 5 μm (MZ AnalysenTechnik, Mainz, Germany)). Για την επιλογή του κατάλληλου εκκλουστικού συστήματος

πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές. Αρχικά, και αφού επιλέχθηκε η στήλη που διαχώριζε ικανοποιητικά την ένωση, δοκιμάστηκε ως κινητή φάση, ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5 / ACN σε αναλογία 90:10 % v/v. Ο διαχωρισμός που επιτεύχθηκε δεν ήταν ικανοποιητικός.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η προηγούμενη κινητή φάση με αλλαγή στη σύστασή της, δηλαδή ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5 / MeOH και ACN σε αναλογία 40:40:20 % v/v. Ο διαχωρισμός που επιτεύχθηκε δεν ήταν αρκετά ικανοποιητικός.

Έτσι, σε ένα επόμενο στάδιο, δοκιμάστηκε η κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5 / MeOH και ACN σε αναλογία 40:50:10 % v/v, με την οποία ο διαχωρισμός πάλι δεν ήταν καλύτερος.

Μετά από πολλές δοκιμές, αποδείχθηκε, πως ο καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με αναλογία κινητής φάσης 50:40:10 % v/v, όπου και ο χρόνος έκλουσης ήταν πολύ ικανοποιητικός. Αφού ο διαχωρισμός ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικός, έπειτα δοκιμάστηκαν διαφορετικές ροές του εκλουστικού για το συνδυασμό καλού διαχωρισμού και σύντομου χρόνου ανάλυσης, με βέλτιστο αυτό με ροή 1 mL/min.

Χρησιμοποιώντας τη στήλη και ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5 / MeOH και ACN, σε αναλογία όγκων 50:40:10 % v/v, ροή 1 mL/min, πίεση 151 bar και αναλυτικό μήκος κύματος τα 270 nm, πραγματοποιήθηκε η έκλουση του συγκεκριμένου συστατικού, ισοκρατικά σε λιγότερα από 6 λεπτά. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τα πρότυπα διαλύματα του προσδιοριζόμενου συστατικού, αφού προηγουμένως επιλέχθηκε μια ένωση, ως εσωτερικό πρότυπο. Ο χρόνος έκλουσης της ασεναπίνης βρέθηκε να είναι 5 min.

10.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Εσωτερικό πρότυπο μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ένωση που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα (συγκέντρωση) σε όλα τα δείγματα πρότυπα, λευκά και πραγματικά. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου επιλέγεται για να ξεπεραστούν προβλήματα που προέρχονται από τυχαία και συστηματικά σφάλματα, καθώς τα σήματα του δείγματος και του εσωτερικού προτύπου θα επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό, με αποτέλεσμα ο λόγος των σημάτων να είναι πιο σταθερός και επαναλήψιμος. Μία ένωση για να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο στην HPLC, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

- Να έχει παραπλήσιες ιδιότητες με τις προσδιοριζόμενες.
- Να μην αποτελεί συστατικό του δείγματος.
- Να μην αντιδρά με κανένα από τα συστατικά του μίγματος.
- Να δίνει μία και μοναδική κορυφή.
- Ο χρόνος συγκράτησής της να είναι κοντά σε αυτούς των προσδιοριζόμενων συστατικών, αλλά να διαφέρουν ικανοποιητικά. **(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001)**

Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα της ασεναπίνης έπρεπε η ένωση που θα επιλεγόταν ως εσωτερικό πρότυπο, να απορροφά στα 270 nm και να εκλούεται πριν το χρόνο έκλουσης της επιθυμητής μας ένωσης. Οι δοκιμές που έγιναν φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 10.1. Με βάση τις ανωτέρω προϋποθέσεις και με γνώμονα το ελαττωμένο κόστος, δοκιμάστηκαν όλες οι διαθέσιμες ουσίες, οι οποίες ανήκαν σε άλλες κατηγορίες φαρμάκων που δε θα μπορούσαν να συγχρηγοούνται με τα αντιψυχωσικά. Έτσι, ως κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο κρίθηκε η σουλφαδιμεθοξίνη, η οποία εκλούεται στα 3,7 min. Αφού επιλέχθηκε το εσωτερικό πρότυπο, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τη βέλτιστη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στα διαλύματα της ασεναπίνης. Οι

δοκιμές περιλάμβαναν συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 2 ng/μL. Τελικά, η σουλφαδιμεθοξίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1 ng/μL καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και ο χρόνος έκλουσης ήταν 3,7 min, πρώτο στη σειρά έκλουσης των συστατικών. Η σουλφαδιμεθοξίνη, είναι ένα αντιβιοτικό, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας του αναπνευστικού, του ουροποιητικού συστήματος, καθώς και για εντερικές λοιμώξεις και λοιμώξεις των μαλακών ιστών.

Πίνακας 10.1: Δοκιμές ενώσεων για την εύρεση της καταλληλότερης για να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο.

Ένωση	Συγκέντρωση (ng/μL)	Χρόνος έκλουσης (min)	Σχόλια- Παρατηρήσεις
παραξανθίνη	10	6	Όχι καλό σχήμα κορυφής
Ισοκαφεΐνη	10	5,4	Η κορυφή σπάει
Μείγμα θεοφυλλίνη-ασεναπίνη	10	3,7	Όχι καλό σχήμα κορυφής
Κολχικίνη	10	3,9	Καλή κορυφή, αλλά αλληλεπικάλυψη με ενδογενείς ουσίες
Σουλφαδιμεθοξίνη C₁₂H₁₄N₄O₄S	10	3,7	Κατάλληλη για εσωτερικό πρότυπο

10.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μετά από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε πως ο βέλτιστος προσδιορισμός του συγκεκριμένου αντιψυχωσικού φαρμάκου επιτεύχθηκε με τις χρωματογραφικές συνθήκες που παρατίθενται συγκεντρωτικά στον πίνακα 10.2.

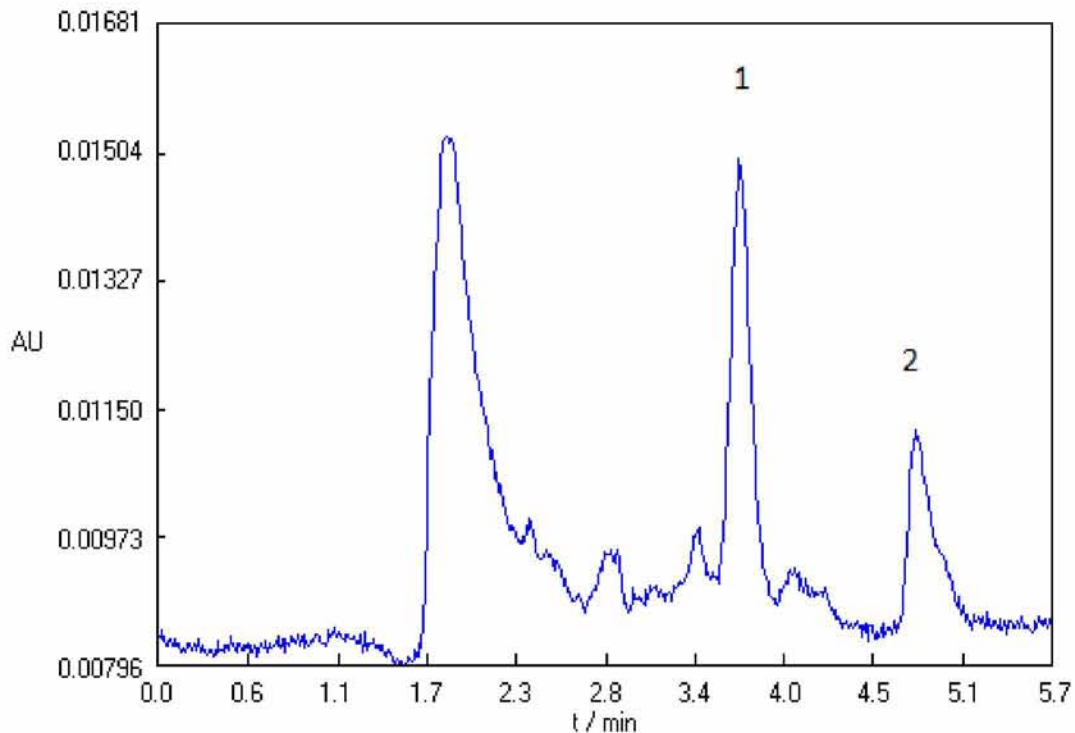
Πίνακας 10.2: Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν για το προσδιορισμό του αντιψυχωσικού φαρμάκου ASE.

Στήλη	Inertsil C ₈ , (250 × 4.0 mm) 5 μm (MZ AnalysenTechnik, Mainz, Germany)).
Εκλουστικό Σύστημα	Ρυθμιστικό διάλυμα {οξικό οξύ (CH ₃ COOH- οξικό νάτριο CH ₃ COONa pH 4,5}, ακετονιτρίλιο (CH ₃ CN) και μεθανόλη (CH ₃ OH) σε αναλογία 50:40:10 % v/v αντίστοιχα.
Ανιχνευτής	UV-vis (270 nm)
Πίεση	151 bar
Ταχύτητα Ροής	1,0 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	Περιβάλλοντος
Εισαγόμενος Όγκος	20 μL

Στο σχήμα παρατίθεται ένα τυπικό χρωματογράφημα, στο οποίο φαίνεται ο προσδιορισμός της ασεναπίνης σε πρότυπο διάλυμα 5 ng/μL, παρουσία εσωτερικού προτύπου σουλφαδιμεθοξίνης, σε συγκέντρωση 1 ng/μL.

Η σειρά έκλουσης είναι:

1. Σουλφαδιμεθοξίνη 3,7 min
2. Ασεναπίνη 5 min



Σχήμα 10.2: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ασεναπίνης (5 ng/μL) παρουσία εσωτερικού προτύπου (1 ng/μL), σύμφωνα με τις χρωματογραφικές συνθήκες του πίνακα 10.2.

10.5. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Η διακριτική ικανότητα είναι σημαντική και υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$R_s = \frac{2(tR_2 - tR_1)}{tw_1 + tw_2}$$

όπου

tR_1 και tR_2 : οι χρόνοι συγκράτησης των συγκρινόμενων κορυφών

tw_1 και tw_2 : τα εύρη των συγκρινόμενων κορυφών εκφρασμένα σε μονάδες χρόνου.

Με τις προαναφερθείσες χρωματογραφικές συνθήκες, το προσδιοριζόμενο άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο διαχωρίζεται πολύ ικανοποιητικά από το εσωτερικό πρότυπο με διακριτική ικανότητα 1,6, γεγονός που καταδεικνύει πολύ καλό διαχωρισμό.

11.ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

11.1. Κοινά κριτήρια επίδοσης και απαιτήσεις των αναλυτικών τεχνικών

Όλες οι αναλυτικές τεχνικές για να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι επιβεβαίωσης πρέπει, σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό, να παρέχουν πληροφορίες για τη χημική δομή της προσδιοριζόμενης ένωσης. Η αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να είναι σε θέση να κάνει διάκριση μεταξύ περισσοτέρων της μίας ενώσεων, οι οποίες δίνουν την ίδια απόκριση. Όταν χρησιμοποιείται στη μέθοδο ένα κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, αυτό πρέπει να προστίθεται στη κατάλληλη δόση προς ανάλυση στην αρχή της διαδικασίας εκχύλισης.

Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Ως **επικύρωση** μίας μεθόδου ορίζεται η επιβεβαίωση κατόπιν εξέτασης και η προσκόμιση πραγματικών τεκμηρίων για το ότι πληρούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μία συγκεκριμένη χρήση. Η επικύρωση δηλαδή είναι μια διαδικασία συλλογής στοιχείων μέσω διαφόρων δοκιμών που καταδεικνύουν ότι η αναλυτική μέθοδος συμμορφώνεται με τα κριτήρια που έχουν οριστεί για τα χαρακτηριστικά επίδοσής της. Η οδηγία USP 23 της Αμερικανικής Φαρμακοποιίας ορίζει ως χαρακτηριστικό επίδοσης μια λειτουργική ιδιότητα που μπορεί να αποδοθεί σε μία αναλυτική μέθοδο, όπως για παράδειγμα, η ειδικότητα, η ακρίβεια, η ορθότητα, η πιστότητα, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η ανάκτηση, η ικανότητα ανίχνευσης και η ανθεκτικότητα. Ως κριτήρια επίδοσης νοούνται οι απαιτήσεις για ένα χαρακτηριστικό επίδοσης σύμφωνα με τα οποία μπορεί να κριθεί ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό, για τον οποίο επελέγη και παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα. Ανάλογα με το σκοπό, τον οποίο καλείται να εξυπηρετήσει κάθε αναλυτική μέθοδος, εξετάζονται κατά τη

διάρκεια της επικύρωσης διαφορετικά χαρακτηριστικά επίδοσης. (Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001)

11.2. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

11.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Αρχικά παρασκευάστηκε πυκνό μεθανολικό διάλυμα, 100 ng/μL, από το πρότυπο της ένωσης, και από αυτό το διάλυμα γίνονταν οι απαιτούμενες αραιώσεις στις επιθυμητές κάθε φορά συγκεντρώσεις, ενώ τα διαλύματα της ένωσης χρησιμοποιήθηκαν και για τον εμβολιασμό των βιολογικών δειγμάτων.

Το μεθανολικό διάλυμα παρακαταθήκης που παρασκευάστηκε, αποθηκεύτηκε σε ογκομετρική φιάλη και συντηρήθηκε στους 4° C (θερμοκρασία ψύξης).

Κατόπιν παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα της σουλφαδιμεθοξίνης (εσωτερικό πρότυπο), συγκέντρωσης 200 ng/μL. Διατηρήθηκε στους 4° C (θερμοκρασία ψυγείου) και βρέθηκε σταθερό για έξι μήνες.

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς και την επικύρωση της μεθόδου παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα της ασεναπίνης σε συγκεντρώσεις, που κυμαίνονταν από 0,5 έως 15 ng/μL (0,5, 1, 2, 3, 5, 10 και 15 ng/μL) προσθέτοντας σε κάθε ένα από αυτά το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 1 ng/μL. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν τρεις για την κάθε συγκέντρωση.

Για την ασεναπίνη, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο της ένωσης σε σκόνη, το οποίο αφού ζυγίστηκε με ακρίβεια σε ηλεκτρονικό ζυγό στα 0,002 g μεταφέρθηκε σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 20 mL, στην οποία προστέθηκε μεθανόλη, όχι όμως μέχρι χαραγής. Ακολούθησε ανάδευση για 5 min με τη χρήση αναδευτήρα (vortex), τοποθετήθηκε η ογκομετρική φιάλη στο σύστημα υπερήχων για 15 min και στη συνέχεια προστέθηκε μεθανόλη έως χαραγής, για να προκύψει το τελικό πυκνό διάλυμα.

Τα αραιά διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις που έγιναν, έτσι ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού, προήλθαν με τις κατάλληλες αραιώσεις από τα παραπάνω πυκνά διαλύματα με εύρος συγκεντρώσεων από 0.5 έως 15 ng/μL και αποδείχθηκε ότι είναι σταθερά για τουλάχιστον τέσσερις μήνες.

Τέλος, για να διαπιστωθεί η σταθερότητα της ένωσης πραγματοποιούνταν κάθε μήνα μετρήσεις στα πρότυπα διαλύματα του υπάρχοντος φαρμάκου και σε πρότυπα διαλύματα που παρασκευάζονταν εκείνη την ώρα και τα αποτελέσματα συγκρίνονταν μεταξύ τους. Το κριτήριο αποδοχής ήταν απόκριση μεταξύ 95% και 105% του υπάρχοντος διαλύματος ως προς το φρέσκο παρασκευασμένο διάλυμα.

Η προτεινόμενη μέθοδος στα πρότυπα διαλύματα ελέγχθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την ευαισθησία, τη σταθερότητα, την εκλεκτικότητα, την ακρίβεια και την καταλληλότητα του συστήματος.

11.3. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Μετά την επιλογή των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών και των πυκνών διαλυμάτων έπρεπε να ελεγχθεί η γραμμικότητα της αναπτυσσόμενης μεθόδου. Ο έλεγχος αυτός έλαβε χώρα κατασκευάζοντας καμπύλες αναφοράς για την προσδιοριζόμενη ένωση.

Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα του συστατικού, σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων: 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 και 15 ng/μL, ενώ σε καθένα από αυτά προστέθηκε και το εσωτερικό πρότυπο (σουλφαδιμεθοξίνη) σε σταθερή συγκέντρωση 1 ng/μL.

Σε όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, ολοκληρώθηκε η κορυφή κάθε ένωσης, με σκοπό τον υπολογισμό του εμβαδού της. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο λόγος του

εμβαδού της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου. Από τα αποτελέσματα, υπολογίστηκε η εξίσωση παλινδρόμησης, συμπεριλαμβανομένων:

- Της κλίσης της ευθείας, b.
- Της τεταγμένης επί την αρχή, a.
- Του τυπικού σφάλματος κατά τον προσδιορισμό των a & b.
- Του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης r.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας όλων των δεδομένων υπό τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες συνοψίζονται στον Πίνακα 11.1

Πίνακας 11.1: Καμπύλες αναφοράς της ασεναπίνης σε πρότυπα διαλύματα παρουσία εσωτερικού προτύπου.

Ένωση	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης r
ASE	$y = (0,1199 \pm 0,0026)x - (0,0905 \pm 0,0201)$	0,9991

Όπου y: ο λόγος του εμβαδού της ένωσης προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου

x: η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης σε ng/μL.

Η γραμμικότητα της μεθόδου επικυρώθηκε τελικά για επίπεδα συγκεντρώσεων 1,7 - 15 ng/μL, ανάλογα με την ένωση, μέσω των καμπυλών αναφοράς, ενώ ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ήταν 0,9991.

11.4. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ

Με τον όρο **Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)**, νοείται η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης που μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 95 ή 99 %.

Με τον όρο **Όριο Ποσοτικής Αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ)**, νοείται η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με βεβαιότητα 95 ή 99 %.

Θεωρητικά, το όριο ανίχνευσης εκφράζει τη συγκέντρωση της ένωσης που δίνει τιμή μέτρησης x_L ίση με τη μέση τιμή των μετρήσεων μιας σειράς λευκών προσδιορισμών αυξημένη κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης s_b των μετρήσεων αυτών.

Από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς εξάγεται ότι: $X_L - X_b$,

$$LOD = \frac{\overline{x_L - x_b}}{\text{κλίση}} \quad (11.1)$$

Επίσης, ισχύει η σχέση:

$$x_L = x_b + 3,3s_b \quad (11.2)$$

Με συνδυασμό των σχέσεων (8.1) και (8.2) προκύπτει η σχέση:

$$LOD = 3,3 \frac{s_b}{\text{κλίση}} \quad (11.3)$$

Το όριο ποσοτικής αποτίμησης ορίζεται ως το τριπλάσιο του ορίου ανίχνευσης και υπολογίζεται με τη σχέση:

$$\text{LOQ} = 10 \frac{s_b}{\text{κλίση}} \quad (11.4)$$

Με βάση τις σχέσεις (11.3) και (11.4) υπολογίστηκαν τα LOD και LOQ, όπου s_b είναι η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή. **(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001)**

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης, καθώς και το ανώτατο όριο της γραμμικής περιοχής για την ένωση φαίνονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.2: Όρια ανίχνευσης, ποσοτικής αποτίμησης και ανώτατα όρια γραμμικής περιοχής της προσδιοριζόμενης ένωσης σε πρότυπα διαλύματα.

Ένωση	LOD (ng/μL)	LOQ (ng/μL)	Ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής (ng/μL)
ASE	0,55	1,65	15

12.ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΣΕΝΑΠΙΝΗΣ (ASE) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΤΡΙΧΩΝ.

12.1. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΡΙΧΑΣ

Για την εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου προκατεργασίας δείγματος και στη συνέχεια, για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς, τα δείγματα τρίχας εμβολιάστηκαν με διάλυμα ασεναπίνης. Τα δείγματα τρίχας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από εθελοντή, ο οποίος δε λάμβανε την προσδιοριζόμενη ένωση.

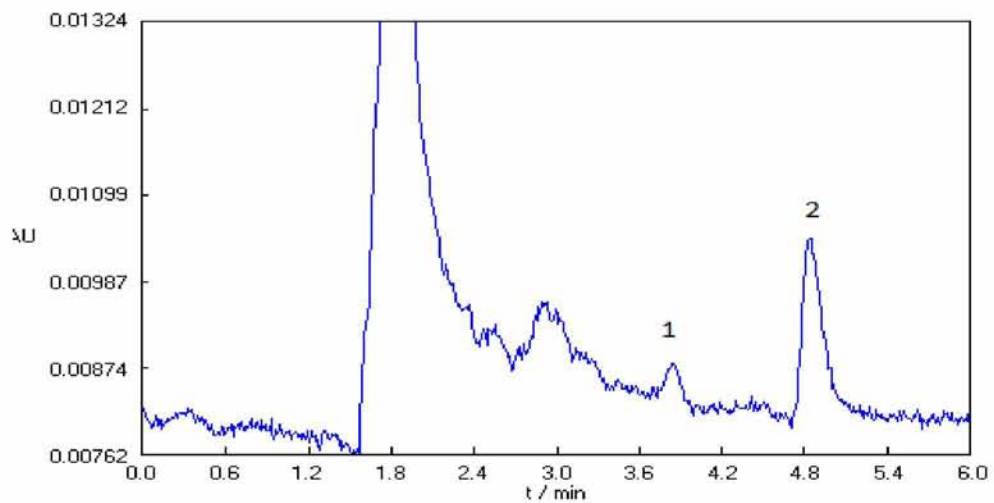
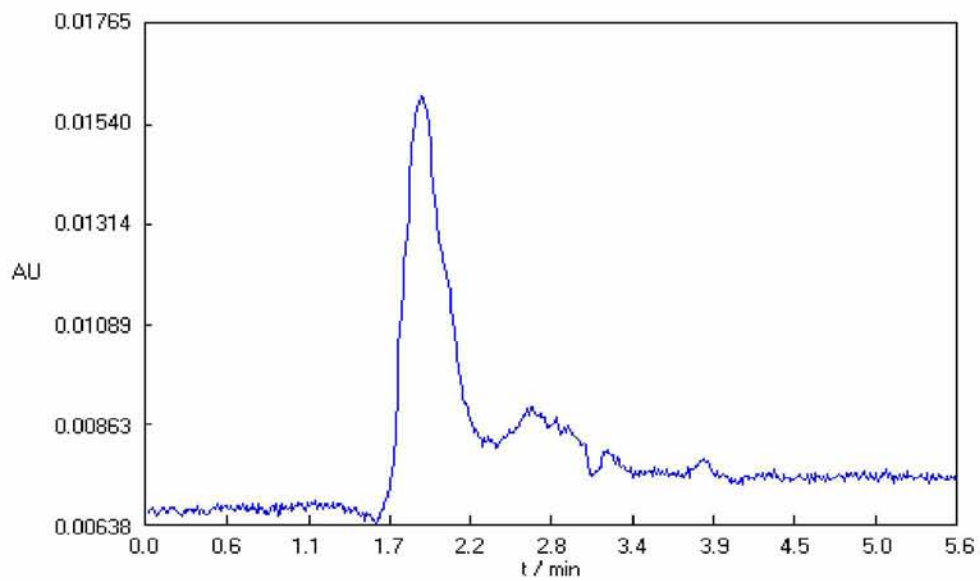
Λόγω της στερεάς μορφής του υποστρώματος, έπρεπε να βρεθεί το κατάλληλο εκλουστικό μέσο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η μέγιστη δυνατή παραλαβή-ανάκτηση της ασεναπίνης. Η μεγαλύτερη ανάκτηση επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε με εκλουστικό μέσο τη μεθανόλη, με το εξής πρωτόκολλο:

- Πλύση 50 mg τρίχας αρχικά με 1 mL νερό για ένα 2 min, στη συνέχεια πλύση της τρίχας με 1 mL ακετόνη για 2 min και τέλος ξανά πλύση της τρίχας με 1 mL νερό για 2 min.
- Τεμαχισμός της τρίχας σε κομμάτια μήκους περίπου 1 cm.
- Αφήνεται η τρίχα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρεται η τρίχα σε καθαρό ποτήρι ζέσεως.
- Προσθήκη 200 μ L πρότυπου μίγματος του προσδιοριζόμενου αντιψυχωσικού, συγκέντρωσης συγκεντρώσεων από 1 έως 15 ng/ μ L.
- Το δείγμα τρίχας με το πρότυπο μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για ολόκληρο το βράδυ.

- Προσθήκη 1 mL μεθανόλης και 1 mL κινητής φάσης .
- Τοποθέτηση του ποτηριού ζέσεως σε σύστημα υπερήχων για 10 min.
- Αφήνεται το δείγμα να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και θέρμανση στους 30°C.
- Επαναδιάλυση σε 200 μ L μεθανόλης.
- Εισαγωγή 20 μ L δείγματος στο σύστημα της HPLC.

Εκτός από το τελικό πρωτόκολλο δοκιμάστηκαν και άλλα πρωτόκολλα με διάφορα εκλουστικά μέσα αντί της μεθανόλης, όπως επίσης και διάφορες θερμοκρασίες και χρόνοι παραμονής στο σύστημα των υπερήχων.

Στο σχήμα 10.1 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά λευκού δείγματος τρίχας και του εμβολιασμένου δείγματος, με τις ενώσεις ασεναπίνη και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκεντρώσεις 20 ng/mg και 4 ng/mg αντίστοιχα.



Σχήμα 12.1: Χρωματογραφήματα (A) λευκού δείγματος τρίχας και (B)εμβολιασμένου δείγματος με την προσδιοριζόμενη ένωση και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 20 ng/mg και 4 ng/mg αντίστοιχα. Βρέθηκαν, 1-I.S :3.8 min, 2-ASE 4.9 min.

12.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΤΡΙΧΑΣ

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς επιλέχθηκαν έξι πρότυπα μίγματα του αντιψυχωσικού φαρμάκου διαφορετικών συγκεντρώσεων μεταξύ τους, εύρους 4 - 60 ng/mg, και ακολουθήθηκε η προκατεργασία που προαναφέρθηκε παραπάνω.

Σε έξι ποτήρια ζέσεως ζυγίστηκαν 50 mg τρίχας και πλύθηκαν με 1 mL νερού, 1 mL ακετόνης και τέλος με 1 mL νερού. Στη συνέχεια οι τρίχες τεμαχίστηκαν σε κομμάτια μήκους του 1 cm και προστέθηκαν 200 μ L πρότυπου μίγματος των αντικαταθλιπτικών ενώσεων και αφέθηκαν για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η προσθήκη 10 mL μεθανόλης και τοποθέτηση στο σύστημα υπερήχων για 10 min στους 50°C. Αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα έγινε μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης. Εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και θέρμανση. Επαναδιάλυση σε 200 μ L CH₃OH και χρωματογραφική ανάλυση. Σε όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν για κάθε συγκέντρωση, ολοκληρώθηκε η κορυφή κάθε ένωσης, για τον υπολογισμό του εμβαδού της. Έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε υπολογιστή με τη μέθοδο της παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 12.1.

Πίνακας 12.1: Καμπύλες αναφοράς της ασεναπίνης, σε εμβολιασμένα δείγματα τρίχας.

Ένωση	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης r
ASE	$y = (0,0812 \pm 0,0028)x - (0,1123 \pm 0,0928)$	0,9982

(y: το εμβαδό της κορυφής της κάθε ένωσης, ενώ x: η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης σε ng/mg και r: συντελεστής γραμμικής συσχέτισης r).

12.3. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Το επόμενο βήμα, μετά την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς και την εύρεση των εξισώσεων για την ένωση σε υπόστρωμα τρίχας, ήταν ο πειραματικός προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) για την προσδιοριζόμενη ένωση. Στα δείγματα τρίχας ο ορισμός και ο υπολογισμός των LOD και LOQ είναι ίδιοι με αυτούς που δόθηκαν στην παράγραφο για τα πρότυπα διαλύματα. Στον πίνακα 10.6 παρατίθενται τα αποτελέσματα του ορίου ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) καθώς και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής για το αντιψυχωσικό φάρμακο.

Πίνακας 12.2: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής για την ασεναπίνη.

Ένωση	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής (ng/mg)
ASE	3,8	11,4	60

12.4. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΙΧΑΣ (WITHIN-DAY REPEATABILITY)

Η ακρίβεια περιγράφει την ορθότητα του πειραματικού αποτελέσματος, δηλαδή είναι ο αριθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που παράγονται με τη μέθοδο, με την πραγματική, ή μια παραδεκτή ως πραγματική τιμή. Η ακρίβεια ποσοτικά υπολογίζεται από τον τύπο του σχετικού σφάλματος:

$$\text{Σχετικό σφάλμα (\%)} = \frac{[\text{Μέση ευρεθε ίσα τιμή} - \text{Θεωρητική (πραγματική) τιμή}]}{\text{Θεωρητική}} \times 100$$

Η ακρίβεια εκφράστηκε μέσω της ανάκτησης και του σχετικού σφάλματος για τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα εμβολιασμένων τριχών (πέντε μετρήσεις σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις).

Η πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζει το βαθμό συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα και χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες:

- Στην επαναληψιμότητα (repeatability), η οποία μαθηματικά εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση RSD (Relative Standard Deviation) ή το συντελεστή διακύμανσης CV (Coefficient of Variance), σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{RSD (\%CV)} = \frac{SD \cdot 100}{x} \quad [12.1]$$

Όπου x : η μέση τιμή μετρήσεων

SD : η τυπική απόκλιση

Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται από την σχέση:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\chi - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{όταν } n < 10 \quad [12.2]$$

ή

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\chi - \bar{x})^2}{n-1}} \text{ όταν } n > 10 \quad [12.3]$$

όπου n = ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση.

- Στην ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision).
- Στην αναπαραγωγικότητα (reproducibility).

Η επαναληψιμότητα εκφράζεται επίσης ως **intra-day ή within-day repeatability**, όταν υπολογίζεται εντός της ίδιας ημέρας ενώ, η ενδιάμεση πιστότητα εκφράζεται ως **inter-day ή between-day precision**, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα και υπολογίζεται σε μια περίοδο διαδοχικών ημερών (5-8 ημέρες).

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου αποδείχτηκε από την απουσία παρεμποδίσεων στους χρόνους συγκράτησης των προσδιοριζόμενων ενώσεων στα δείγματα των τριχών.

Η επαναληψιμότητα ελέγχθηκε με τη λήψη πολλαπλών μετρήσεων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για κάθε συγκέντρωση λήφθηκαν τρεις μετρήσεις κατά την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον πίνακα 12.3, ο οποίος περιλαμβάνει τη μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα, την τυπική απόκλιση (SD) της μέτρησης, τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μέτρησης και την επί τοις εκατό ανάκτηση κάθε αντικαταθλιπτικού φαρμάκου σε εμβολιασμένα (spiked) δείγματα τρίχας.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 12.3, τόσο η επαναληψιμότητα, όσο και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας, κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας, ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται μεταξύ 1,5% και 14,6% η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου είναι μεταξύ 95,0 % και 102,5 %.

Πίνακας 12.3: Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας εμβολιασμένα με διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης για 5 μετρήσεις.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/mg)	Ποσότητα που βρέθηκε \pm SD (n=5) (ng/mg)	RSD	Ανάκτηση (%)
ASE	4	4,1 \pm 0,6	14,6	102,5
	12	11,4 \pm 0,8	7,0	95,0
	40	39,9 \pm 0,6	1,5	99,8

12.5. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΙΧΑΣ ΣΕ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΝΤΕ ΗΜΕΡΩΝ (BETWEEN-DAY PRECISION)

Για τον έλεγχο της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου σε διαφορετικές ημέρες, μετρήθηκαν τρία δείγματα τρίχας εμβολιασμένα με μίγμα του φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για πέντε συνεχόμενες ημέρες. Κάθε ημέρα, για κάθε συγκέντρωση που επιλέχθηκε, λαμβάνονταν τρεις διαφορετικές μετρήσεις από τα εμβολιασμένα δείγματα τρίχας.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις τρεις μετρήσεις ημερησίως για τις πέντε συνεχόμενες ημέρες, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.8, ο οποίος περιλαμβάνει τη μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα, την τυπική απόκλιση (SD) της μέτρησης, τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μέτρησης και την επί τοις εκατό ανάκτηση του αντιψυχωσικού φαρμάκου σε εμβολιασμένα (spiked) δείγματα τρίχας.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 12.4, τόσο η επαναληψιμότητα, όσο και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών,

ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται μεταξύ 1,7% και 7,3%, η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου βρίσκονται μεταξύ 101,0% και 102,5%.

Πίνακας 12.4: Η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα τρίχας εμβολιασμένα με μίγμα ασεναπίνης και εσωτερικού προτύπου, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών και για τρεις μετρήσεις ημερησίως.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/mg)	Ποσότητα που βρέθηκε \pm SD (n=3) (ng/mg)	RSD	Ανάκτηση (%)
ASE	4	4,1 \pm 0,3	7,3	102,5
	12	11,9 \pm 0,2	1,7	99,2
	40	40,4 \pm 1,8	4,5	101,0

16. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΣΕΝΑΠΙΝΗΣ (ASE) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΝΥΧΩΝ.

16.1. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΝΥΧΩΝ

Για την εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου προκατεργασίας δείγματος και στη συνέχεια για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς τα δείγματα ανθρώπινων ονύχων εμβολιάστηκαν με μίγμα ασεναπίνης. Τα δείγματα ονύχων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από εθελοντή, ο οποίος δε λάμβανε την προσδιοριζόμενη ένωση.

Λόγω της στερεάς μορφής του υποστρώματος, έπρεπε να βρεθεί το κατάλληλο εκλουστικό μέσο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η βέλτιστη παραλαβή-ανάκτηση της ασεναπίνης.

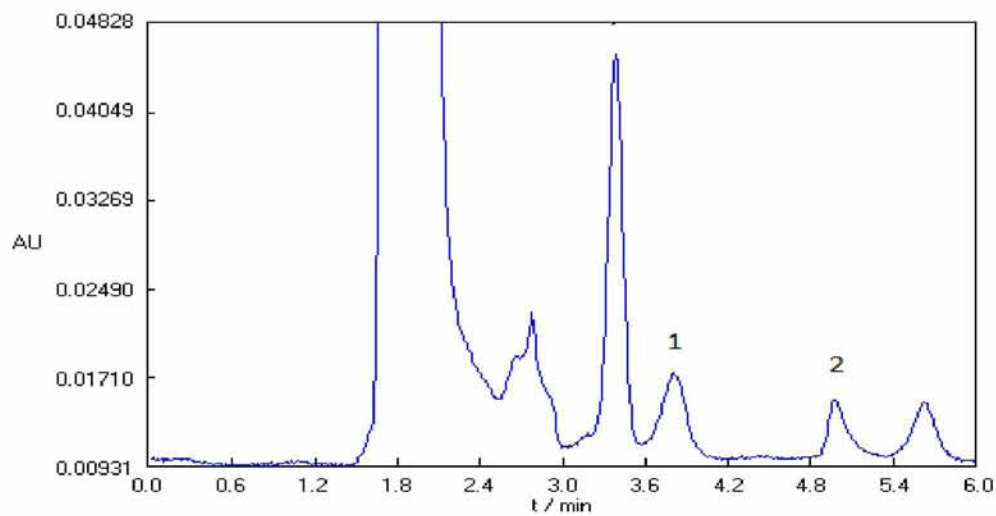
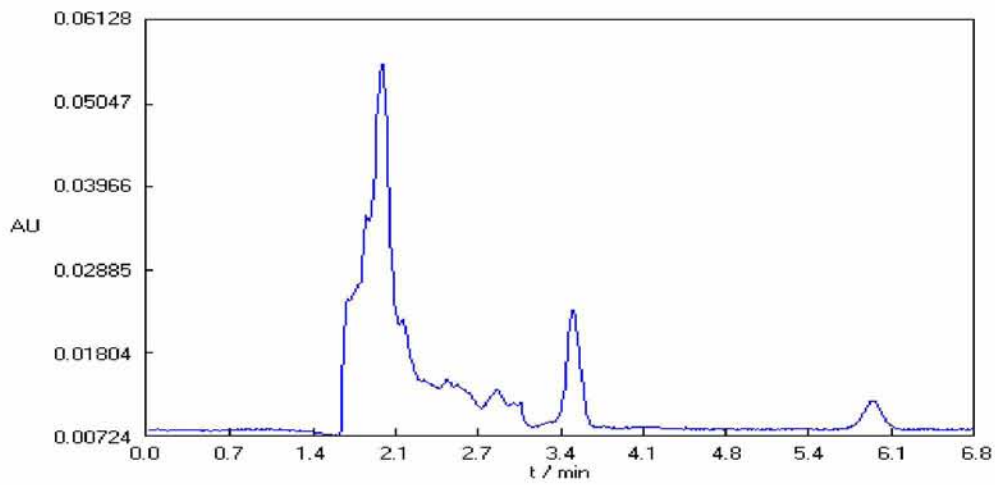
Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

- Πλύση των ονύχων αρχικά με 1 mL νερό για ένα 2 min, στη συνέχεια πλύση με 1 mL ακετόνη για 2 min και τέλος ξανά με 1 mL νερό για 2 min.
- Τεμαχισμός των ονύχων σε μικρά κομμάτια.
- Αφήνονται οι όνυχες να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρονται οι όνυχες σε καθαρό ποτήρι ζέσεως.
- Προσθήκη 200 μ L πρότυπου μίγματος, συγκέντρωσης 5 ng/ μ L, της προσδιοριζόμενης ένωσης μαζί με το εσωτερικό πρότυπο.
- Το δείγμα ονύχων με το πρότυπο μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για ολόκληρο το βράδυ.
- Προσθήκη 1 mL μεθανόλης και 1 mL κινητής φάσης.

- Τοποθέτηση του ποτηριού ζέσεως σε σύστημα υπερήχων για 10 min.
- Απομάκρυνση των ονύχων.
- Αφήνεται το υπερκείμενο υγρό του δείγματος να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και θέρμανση στους 30°C.
- Επαναδιάλυση σε 200 μL μεθανόλης.
- Εισαγωγή 20 μL δείγματος στο σύστημα της HPLC.

Εκτός από το τελικό πρωτόκολλο, δοκιμάστηκαν και άλλα πρωτόκολλα με διάφορα εκλουστικά μέσα αντί της μεθανόλης, όπως επίσης και διάφορες θερμοκρασίες και χρόνοι παραμονής στο σύστημα των υπερήχων.

Στο σχήμα 13.1 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά λευκού δείγματος νυχιού και του εμβολιασμένου δείγματος, με τις ενώσεις ασεναπίνη και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκεντρώσεις 20 ng/mg και 4 ng/mg αντίστοιχα.



Σχήμα 13.1. Χρωματογραφήματα (Α) λευκού δείγματος νυχιού και (Β)εμβολιασμένου δείγματος με την προσδιοριζόμενη ένωση και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 20 ng/mg και 4 ng/mg αντίστοιχα. Βρέθηκαν, 1-I.S :3.8 min, 2-ASE 4.9 min.

16.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΝΥΧΟΣ

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς επιλέχθηκαν έξι πρότυπα μίγματα της ασεναπίνης με το εσωτερικό πρότυπο, διαφορετικών συγκεντρώσεων μεταξύ τους, εύρους 4-60 ng/mg, και ακολουθήθηκε η προκατεργασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

Σε έξι ποτήρια ζέσεως ζυγίστηκαν 50 mg ανθρώπινων ονύχων και πλύθηκαν με 1 mL νερού, 1 mL ακετόνης και τέλος με 1 mL νερού ξανά. Στη συνέχεια τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και προστέθηκαν 200 μ L πρότυπου μίγματος ASE-I.S και αφέθηκαν για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η προσθήκη 1 mL μεθανόλης και 1 mL κινητής φάσης και τοποθέτηση στο σύστημα υπερήχων για 10 min στους 50°C. Αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού σε καθαρό φυγοκεντρικό φιαλίδιο. Ακολούθησε εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου, θέρμανση, επαναδιάλυση σε 200 μ L CH₃OH και χρωματογραφική ανάλυση. Σε όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν για κάθε συγκέντρωση, ολοκληρώθηκε η κορυφή κάθε ένωσης, για τον υπολογισμό του εμβαδού της. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν σε υπολογιστή με τη μέθοδο της παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 13.1.

Πίνακας 13.1: Καμπύλη αναφοράς της ασεναπίνης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινων ονύχων.

Ένωση	Εξίσωση Παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχέτισης r
ASE	$y = (0,0245 \pm 0,0006)x + (0,0026 \pm 0,0149)$	0,9997

(y: το εμβαδό της κορυφής της κάθε ένωσης, ενώ x: η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης σε ng/mg και r: συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)

16.3. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Το επόμενο βήμα, μετά τη κατασκευή των καμπύλων αναφοράς και την εύρεση των εξισώσεων για την ένωση σε δείγμα ονύχων, ήταν ο πειραματικός προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης (LOD) και των ορίων ποσοτικής αποτίμησης (LOQ). Στα δείγματα ονύχων ο ορισμός και ο υπολογισμός των LOD και LOQ είναι ίδιοι με αυτούς που δόθηκαν στην παράγραφο για τα πρότυπα διαλύματα. Στον πίνακα 11.5 που ακολουθεί παρατίθενται τα αποτελέσματα του ορίου ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ), καθώς και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής.

Πίνακας 13.2: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) και το ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής για την προσδιοριζόμενη αντιψυχωσική ένωση.

Προσδιοριζόμενη ένωση	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Ανώτατο όριο γραμμικής περιοχής (ng/mg)
ASE	2,0	6,1	60

16.4. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΝΥΧΩΝ (WITHIN-DAY REPEATABILITY)

Η επαναληψιμότητα ελέγχθηκε με τη λήψη πολλαπλών μετρήσεων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για κάθε συγκέντρωση λήφθηκαν πέντε μετρήσεις κατά την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον πίνακα 11.6, ο οποίος περιλαμβάνει τη μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα, την τυπική απόκλιση (SD) της μέτρησης, τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μέτρησης και την επί τοις εκατό ανάκτηση του αντιψυχωσικού φαρμάκου σε εμβολιασμένα (spiked) δείγματα ονύχων. Η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και η ανάκτηση στα δείγματα ονύχων υπολογίστηκαν με τους ίδιους τύπους με αυτούς που δόθηκαν στη παράγραφο 12.4 για τα δείγματα τριχών.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 13.3, τόσο η επαναληψιμότητα, όσο και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ονύχων, κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας, ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται από 1,5% έως 5,1%, η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου βρίσκονται μεταξύ 98,8% και 103,0 %.

Πίνακας 13.3: Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ανθρώπινων ονύχων εμβολιασμένα με διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/mg)	Ποσότητα που βρέθηκε \pm SD (n=5) (ng/mg)	RSD	Ανάκτηση (%)
ASE	8	7,9 \pm 0,4	5,1	98,8
	20	20,6 \pm 0,4	1,9	103,0
	40	40,4 \pm 0,6	1,5	101,0

16.5. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΝΥΧΩΝ ΣΕ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΝΤΕ ΗΜΕΡΩΝ (BETWEEN-DAY PRECISION)

Για τον έλεγχο της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου σε διαφορετικές ημέρες, μετρήθηκαν τρία δείγματα ονύχων εμβολιασμένα με μίγμα του αντιψυχωσικού φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για πέντε συνεχόμενες ημέρες. Κάθε ημέρα και για κάθε συγκέντρωση που επιλέχθηκε, λαμβάνονταν τρεις διαφορετικές μετρήσεις από τα εμβολιασμένα δείγματα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις τρεις μετρήσεις ημερησίως για τις πέντε ημέρες, παρουσιάζονται στον πίνακα 13.4, ο οποίος περιλαμβάνει τη μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα, την τυπική απόκλιση (SD) της μέτρησης, τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μέτρησης και την επί τοις εκατό ανάκτηση του αντιψυχωσικού φαρμάκου σε εμβολιασμένα (spiked) δείγματα ανθρώπινων ονύχων.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 13.4, τόσο η πιστότητα, όσο και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ονύχων, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών, ήταν πολύ καλές. Η σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται μεταξύ 1,4% και 3,9%, η οποία εκφράζει την επαναληψιμότητα, ενώ οι ανακτήσεις της μεθόδου μεταξύ 102,0 και 105,0 %.

Πίνακας 13.4: Η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε δείγματα ανθρώπινων ονύχων εμβολιασμένα με μίγμα της προσδιοριζόμενης ένωσης, κατά τη διάρκεια πέντε ημερών και για τρεις μετρήσεις ημερησίως.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (ng/mg)	Ποσότητα που βρέθηκε \pm SD (n=3) (ng/mg)	RSD	Ανάκτηση (%)
ASE	8	8,4 \pm 0,2	2,4	105,0
	20	20,8 \pm 0,3	1,4	104,0
	40	40,8 \pm 1,6	3,9	102,0

17. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ασεναπίνη είναι ένα νέο άτυπο αντιψυχωσικό φάρμακο που χρησιμοποιείται τελευταία για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας και της διπολικής διαταραχής.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε νέα μέθοδος προσδιορισμού της ασεναπίνης, ενός άτυπου αντιψυχωσικού φαρμάκου, για πρώτη φορά σε εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, όπως είναι οι τρίχες και οι ονύχες. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό από το εσωτερικό πρότυπο και των ενδογενών ουσιών του δείγματος και τον προσδιορισμό του αντιψυχωσικού φαρμάκου σε εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα ήταν η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης με την χρήση εσωτερικού προτύπου ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 270 nm.

Η νέα μέθοδος αναπτύχθηκε αρχικά σε πρότυπα διαλύματα της ένωσης και του εσωτερικού προτύπου ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε δείγματα τριχών και ονύχων πολύ αποτελεσματικά. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν περίπου 5 min.

Η μέθοδος ελέγχθηκε και επικυρώθηκε ως προς την γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια τόσο στα πρότυπα όσο και στα βιολογικά δείγματα τριχών και ονύχων και τα όρια ποσοτικής αποτίμησης και ανίχνευσης LOQ και LOD αντίστοιχα, καθώς και τα ποσοστά ανάκτησης βρέθηκαν πολύ ικανοποιητικά.

Τέλος, ελέγχθηκε η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης και βρέθηκε πως είναι σταθερή σε διάρκεια 3 εβδομάδων, τόσο σε δείγματα ονύχων, όσο και σε τρίχες σε θερμοκρασία ψύξης 4 °C. Συνοψίζοντας, λοιπόν μπορούμε να καταλήξουμε πως η μέθοδος για το διαχωρισμό και προσδιορισμό του προσδιοριζόμενου αντιψυχωσικού φαρμάκου σε δείγματα τριχών και ονύχων είναι:

- Ταχεία, λόγω των μικρών χρόνων ανάλυσης, αλλά και προκατεργασίας του δείγματος.
- Απλή.
- Οικονομική.

- Αποτελεσματική.
- Επαναλήψιμη.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, μπορεί η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε να αποτελέσει ένα εργαλείο στη τοξικολογία για τη διερεύνηση της αιτίας θανάτου ή την επιβεβαίωση χρόνιας λήψης ενός αντίστοιχου αντιψυχωσικού φαρμάκου.

18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

Aarely, K., Thimmaraju, M. K., Nerella, R., Allabotharam, S. (2012). ‘‘*Method development and validation of asenapine in bulk by RP-HPLC method*’’. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 4(5), 2580-2584.

Aihara, K., Shimada, J., Miwa, T., Tottori, K., Burris, K. D., Yocca, F. D., Horie, M., Kikuchi, T. (2004). ‘‘*The novel antipsychotic aripiprazole is a partial agonist at short and long isoforms of D2 receptors linked to the regulation of adenylyl cyclase activity and prolactin release*’’. **Brain research** Apr 2;1003(1-2), 9-17.

Ansermot, N., Brawand-Amey, M., Kottelat, A., Eap, C. B. (2013). ‘‘*Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*’’. **J. Chromatography A**, 1292, 160-172.

American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*, 4th Edition, Text Revision. Washington DC, American Psychiatric Publishing.

Barbosa, J, Faria, J, Carvalho, F, Pedro, M, Queirós, O, Moreira, R, Dinis-Oliveira, R. J. (2013). ‘‘*Hair as an alternative matrix in bioanalysis*’’. **Bioanalysis**, 5(8), 895-914.

Castle, D. J., McGrath J., Kulkani J. (2003). *Γυναίκες και σχιζοφρένεια*, εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

Chhalotitya, U. K., Bhatt, K. K., Shah, D. A., Patel, J. R. (2012). ‘*Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for the Quantification of the New Antipsychotic Agent Asenapine in Bulk and in Pharmaceutical Formulation*’, **Sci Pharm.** 80, 407–417.

De Boer, T., Meulman, E., Meijering, H., Wieling, J., Dogterom, P., Lass, H. (2011). ‘*Quantification of asenapine and three metabolites in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry with automated solid-phase extraction: application to a phase I clinical trial with asenapine in healthy male subjects*’. **Biomedical Chromatography**, 26(2), 156-165.

De Boer, T., Meulman, E., Meijering, H., Wieling, J., Dogterom, P., Lass, H. (2012). ‘*Development and validation of automated SPE-HPLC-MS/MS methods for the quantification of asenapine, a new antipsychotic agent, and its two major metabolites in human urine*’. **Biomedical Chromatography**, 25(12), 1461-1463.

Julien, R. M. (2003). *Βασικές αρχές ψυχοφαρμακολογίας*, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ

Keltner, N. L., Johnson, V. (2002). ‘*Biological perspectives. Aripiprazole: a third generation of antipsychotics begins?*’ **Perspect. Psychiatr. Care** 38, 157-159.

Mali, N., Karpe M., Kadam, V. (2011). ‘*A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse*’. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 01 (06), 58-65

Marder, S. R., Van Kammen, D. P., Sadock, B. J., Sadock, V. A. (2005). 31.16, *Dopamine Receptor Antagonists (Typical Antipsychotics)*. Kaplan & Sadock’s Comprehensive Textbook of Psychiatry (8th Edition). Publisher Lippincott Williams & Wilkins.

Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. (2003). *Φαρμακολογία*, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα.

Rang, H.P., Dale, M.M. (2007). *Φαρμακολογία*, 5^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα.

Reddy, A., V., B., Venugopal, N., Madhavi, G. (2013). ‘*Simultaneous determination of asenapine and valproic acid in human plasma using LC–MS/MS: Application of the method to support pharmacokinetic study*’. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 3(6), 394–401.

Rollenhagen, A., Joachim, H., R., L. (2006). ‘*The morphology of excitatory central synapses: from structure to function*’. **Cell Tissue Res**, 326, 221-237

Sadock, B.J., Sadock, V.A. (2001). *Kaplan and Sadock’s Handbook of Clinical Psychiatry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 3rd edition, 8, 126-147.

Sinacola, R. S., Petters-Strickland, T. (2008). *Βασική ψυχοφαρμακολογία*, εκδόσεις GOTSIS

Stahl, S.M. (2000). *Essential Psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications*, Cambridge University Press, 2nd edition.

Stahl, S., M. (2003). ‘Describing an Atypical Antipsychotic: Receptor Binding and Its Role in Pathophysiology’. Primary Care Companion **J Clin Psychiatry**, 5 (suppl 3) physicians Postgraduate press

Stahl, S., M., Mignon L. (2010). Second Edition. *Stahl’s Illustrated Antipsychotics: Treating Psychosis, Mania and Depression*. Neuroscience Education Institute, Cambridge University Press.

Van de Wetering-Krebbbers, S. F. M. Jacobs, P. L., Kemperman, G. J. , Spaans E. Peeters, P.A.M., Delbressine, L. P. C., van Iersel M. L. P. S. (2011). ‘Metabolism and Excretion of Asenapine in Healthy Male Subjects’. **Drug Metabolism and Disposition**, 39(4), 580-590.

World Health Organisation. (1992). *The International Classification of Diseases*, 10th Edition (ICD-10). Gineva, WHO.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Μαδιανός Μ. (2004). *Κλινική Ψυχιατρική*. Εκδόσεις Καστανιώτη. Σελ. 186-192.

Παπαδογιάννης, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β.Φ. (2001) *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη

Παπαδογιάννης, Ι.Ν. (2004). *Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη

Πανταζίδου, Κ. (2009). “ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΑΡΟΞΕΤΙΝΗΣ ΦΛΟΥΟΞΕΤΙΝΗΣ ΒΕΝΛΑΦΑΞΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΤΟΥΛΟΞΕΤΙΝΗΣ ΣΕ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ”. Θεσσαλονίκη, 2011.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

<http://www.ekaranikas.gr/psyhealth/psydis/bipdis/> Προσπέλαση 12-3-2014

<http://www.psynet.gr/index.php/mainmenu-35/34-17> Προσπέλαση την 14/03/2014

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Προσπέλαση την 10/03/2014

<http://psi-gr.tripod.com/> Προσπέλαση την 02/03/2014

farmacy.upatras.gwww.phr/index.php/en/latest-news/doc/121-1 Προσπέλαση την 15/02/2014

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Asenapine_scheme.png Προσπέλαση 19/03/2014

http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR-Product_Information/human/001177/WC500096895.pdf Προσπέλαση την 19/03/2014