

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ.3.11.07.....
Αριθ. Πρωτ.2395.....

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

11

**ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΤΕΜΙΣΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ ΜΕ ΥΪΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV).**

ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Τσιρόπουλος Νικόλαος

Εξεταστική επιτροπή: Τσιρόπουλος Νικόλαος

Κομιώτης Δημήτριος

Γεωργιάτσου Έλενα

ΑΡ. ΕΙΣ. 11/2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 2368/1
Ημερ. Εισ.: 3-2-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2002
ΖΑΡ

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως μερική υποχρέωση για τη λήψη πτυχίου του ΠΣΕ Ιατρική Βιοχημεία, το οποίο ιδρύθηκε το 1998 και εδρεύει στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το θέμα της εργασίας καθορίστηκε από τον Επίκουρο Καθηγητή Χημείας κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του καθώς και για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του, τόσο κατά την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτριο Κομιώτη, Διδάσκοντα του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την επιστημονική καθοδήγηση του κατά την πορεία εξέλιξης αυτής της εργασίας καθώς και για τη βοήθεια που μου προσέφερε τόσο στο εργαστηριακό όσο και στο συγγραφικό μέρος.

Ανάλογες ευχαριστίες οφείλω και στην Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, κ. Έλενα Γεωργιάτσου για τη κριτική ανάγνωση της πτυχιακής αυτής εργασίας, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Δεν θα πρέπει να ξεχάσω να ευχαριστήσω το κ. Δημήτριο Λύκα, διδακτορικό φοιτητή του Τμήματος Γεωπονίας, ο οποίος παρά το φόρτο εργασίας που είχε, μου έδινε πολύτιμες εργαστηριακές συμβουλές.

Ακόμη θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Διοίκηση του ΠΣΕ Ιατρική Βιοχημεία για την οικονομική υποστήριξη της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και στη γραμματεία του τμήματος για τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και προς την εταιρία Dafra Pharma (Βέλγιο) για την ευγενή προσφορά των βασικών αντιδραστηρίων που απαιτούσε η πτυχιακή μου εργασία.



Περίληψη

Ο στόχος της πτυχιακή αυτής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αρτεμισινίνης και της διυδροαρτεμισινίνης. Ο λόγος για τον οποίο μας ενδιαφέρουν οι ουσίες αυτές είναι ότι αποτελούν πολλά υποσχόμενα και ικανά φάρμακα κατά της ελονοσίας που ανταποκρίνονται στη διπλή πρόκληση που επιβάλλεται από την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών παρασίτων στα υπόλοιπα ανθελονοσιακά φάρμακα και από την ταχύτατη ανάπτυξη της συγκεκριμένης ασθένειας σε ορισμένες περιοχές του πλανήτη μας.

Η πειραματική διαδικασία αναφέρεται στη δυνατότητα σχηματισμού παραγώγων μετά από θέρμανση των προαναφερομένων ουσιών σε όξινο και βασικό περιβάλλον. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι όσον αφορά την αρτεμισινίνη δεν παρατηρείται σχηματισμός κάποιου παραγώγου της μετά από περίοδο θέρμανσης 60min, ενώ αντιθέτως παρατηρείται ο πλήρης σχηματισμός παραγώγου της διυδροαρτεμισινίνης, το οποίο παρουσιάζει υψηλή απορρόφηση στην περιοχή 250-260 nm.

Η χρωματογραφική ανάλυση σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με στήλη αντίστροφης φάσης τύπου HyPURITY Advance (5 μm) διαστάσεων 150x4,6 mm, με ισοκρατική ανάλυση [40% Ακετονιτρίλιο (HPLC)-60% Νερό (HPLC)] και με ανίχνευση στα 254nm αποδείχθηκε ικανοποιητική για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό του σχηματιζόμενου παραγώγου και μέσω αυτού της διυδροαρτεμισινίνης. Η ευαισθησία του χρωματογραφικού συστήματος ως προς το σχηματιζόμενο παράγωγο βρέθηκε στα 0,04 μg. Η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι απλή, οικονομική και εμφανίζει εξαιρετική γραμμικότητα στην περιοχή από 125 μέχρι 1000 μg/ml που δοκιμάστηκε. Η ανωτέρω μέθοδος προτείνεται να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό της διυδροαρτεμισινίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα και μετά από περαιτέρω βελτιώσεις σε βιολογικά υγρά.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας γίνεται εκτενής αναφορά στην ελονοσία, στο δεύτερο γίνεται λόγος για την αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της, το τρίτο είναι το αναλυτικό μέρος και τέλος στο τέταρτο αναλύεται το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Abstract

The goal of this thesis was to develop a new assay for artemisinin and dihydroartemisinin. The reason why we are interested in investigating these substances is that they are promising and potent antimalarial drugs, which meet the dual challenge posed by drug-resistant parasites and rapid progression of malarial illness.

The experimental procedure is focused in the possibility of producing derivatives of the mentioned substances after heating, in acidulous and basic conditions. The results of the experiments regarding artemisinin have shown that there is no production of any derivative after heating for 1 hour in 60 °C, while those regarding dihydroartemisinin have shown that the particular substance is fully transformed into a derivative that absorbs strongly in the area of 250-260 nm.

The chromatographic analysis with HPLC containing a reverse phase column [HyPURITY Advance (5µm) 150x4,6 mm], conducting isocratic analysis [40% Acetonitrile (HPLC)-60% Water (HPLC)] and with detection in 254 nm, has been proved satisfying for the separation and quantification of the produced derivative and through it for dihydroartemisinin. The sensitivity of the chromatographic system for the produced derivative was calculated to 0,04 µg. The developed assay is simple, low costing, and has remarkable linearity in the area of concentration that was tested, which is from 125 µg/ml to 1000µg/ml. It is proposed that this method should be used for the determination of dihydroartemisinin in pharmaceutical products and after some improvements in biological samples.

The first part of this thesis is referred to the disease of malaria, the second to artemisinin and its derivatives, the third to analytical procedures involved and the final part to the experimental data.

Εισαγωγή

1. Ελονοσία

1.1 Γενικά

Η ελονοσία είναι η πιο θνησιγενής από τις παρασιτικές νόσους που προσβάλλουν τον άνθρωπο και μια από τις πιο διαδεδομένες λοιμώδεις νόσους στον κόσμο. Η ελονοσία λοιπόν είναι μια λοιμώδης νόσος που διαδράμει με υφέσεις και εξάρσεις και έχει σαν χαρακτηριστικά της τον υποτροπιάζοντα πυρετό, έντονα ρίγη, διόγκωση του σπλήνα, αναιμία και μεγάλη κακουχία. Εντοπίζεται σαν ενδημική νόσος ή σαν μεμονωμένα κρούσματα, κυρίως σε ταξιδιώτες που επιστρέφουν από περιοχές στις οποίες η νόσος ενδημεί, όπως Αφρική, Ασία, Νότια Αμερική. Έχει υπολογιστεί ότι από την ελονοσία προσβάλλονται κάθε χρόνο 100 εκατομμύρια άνθρωποι και από αυτούς το 1% περίπου πεθαίνει από τη νόσο [1].

1.2 Αιτιολογία-Κύκλος ζωής του παρασίτου στον ανθρώπινο οργανισμό

Για την πρόκληση της νόσου στον άνθρωπο ενοχοποιούνται τέσσερα είδη πλασμωδίων: Το *Plasmodium falciparum*, το *Plasmodium vivax*, το *Plasmodium ovale* και το *Plasmodium malariae*. Από τα τέσσερα αυτά είδη το *Plasmodium falciparum* προκαλεί λοιμώξεις, οι οποίες, αν δεν διαγνωστούν και θεραπευτούν έγκαιρα, οδηγούν στο θάνατο. Επιπλέον το *Plasmodium falciparum* είναι αρκετά ανθεκτικό στα ανθελονοσιακά φάρμακα.

Η έναρξη της λοίμωξης στον άνθρωπο αρχίζει με τον ενοφθαλμισμό σποροζωιτών στο δέρμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το τσίμπημα του ανωφελούς κώνωπος. Μόνο οι θηλυκοί κώνωπες είναι αιματοφάγοι, γιατί χρειάζονται το αίμα για την ωοτοκία τους. Από τη θέση ενοφθαλμισμού, οι σποροζώιτες μεταφέρονται με την κυκλοφορία στο ήπαρ σε σύντομο χρονικό διάστημα που δεν υπερβαίνει την μια

ώρα και εισέρχονται μέσα στα ηπατικά κύτταρα. Εκεί πολλαπλασιάζονται με σχιζογονία και εξελίσσονται σε ηπατικούς μεροζωΐτες. Αυτή αποτελεί την ηπατική φάση της ζωής του παρασίτου μέσα στον άνθρωπο.

Η ερυθροκυτταρική φάση της ζωής του παρασίτου αρχίζει με την προσβολή των ερυθροκυττάρων από τους μεροζωΐτες, οι οποίοι προέρχονται από το ήπαρ. Μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια οι μεροζωΐτες αναπτύσσονται και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με δύο τρόπους: ένα μη σεξουαλικό και ένα σεξουαλικό. Στο δεύτερο τρόπο πολλαπλασιασμού υπάρχει φυσικό αρσενικό και θηλυκό γαμετοκύτταρο. Οι ενδοερυθροκυτταρικοί μεροζωΐτες προκαλούν την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων που τους φιλοξενούν, διασκορπίζονται στην κυκλοφορία και εισέρχονται σε άλλα ερυθροκύτταρα, συνεχίζοντας έτσι τον ερυθροκυτταρικό κύκλο τους. Οι ερυθροκυτταρικοί μεροζωΐτες είναι λοιμογόνοι για τον άνθρωπο σε αντίθεση με τα γαμετοκύτταρα που δεν είναι. Όμως τα γαμετοκύτταρα είναι εκείνα που αποτελούν τη μορφή του παρασίτου που είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση της νόσου. Τα γαμετοκύτταρα όταν προσληφθούν από τον ανωφελή κώνωπα με αναρρόφηση αίματος από ανθρώπους που πάσχουν από τη νόσο, συνενώνονται σε ζυγώτη, ο οποίος εισέρχεται στο τοίχωμα του στομάχου του κώνωπος. Εκεί ο ζυγώτης μετατρέπεται σε ωοκύστη, η οποία με τη σειρά της ωριμάζει και στην πλήρη ανάπτυξη της περιέχει πολλούς μεροζωΐτες. Όταν η ωοκύστη σπάσει, οι μεροζωΐτες αποβάλλονται από τους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού μαζί με το σίελο, μολύνοντας τους ανθρώπους που θα τσιμπήσουν. Ο βιολογικός αυτός κύκλος του πλασμοδίου μέσα στο κουνούπι διαρκεί περίπου δύο εβδομάδες [1].

1.3 Παθογένεια

Όπως αναφέρθηκε η νόσηση του ανθρώπου οφείλεται στους ερυθροκυτταρικούς μεροζωΐτες, ενώ τα γαμετοκύτταρα, οι σποροζωΐτες και οι ηπατικοί μεροζωΐτες δεν προκαλούν συμπτώματα. Η απελευθέρωση των ερυθροκυτταρικών μεροζωΐτων και η επερχόμενη παρασιταϊμία ευθύνονται για τα συμπτώματα της νόσου. Η καταστροφή των ερυθροκυττάρων γίνεται κάθε 48 ώρες στις περιπτώσεις μόλυνσης από *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* και κάθε 72 ώρες όταν η νόσος οφείλεται σε *P.malariae*. Έτσι

δικαιολογείται η εμφάνιση των συμπτωμάτων της ελονοσίας (ρίγος, πυρετός, κεφαλαλγία, κακουχία) κάθε 48 (τριταίος πυρετός) ή κάθε 72 ώρες (τεταρταίος πυρετός) [1].

1.4 Επιδημιολογικά στοιχεία και δυσκολίες αντιμετώπισης της ελονοσίας

Η ελονοσία ενδημεί σε τόπους που οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη των κουνουπιών, δηλαδή τόπους που υγρούς και θερμούς και για το λόγο αυτό είναι η νόσος των τροπικών και υποτροπικών περιοχών. Με την εξαίρεση του *P. ovale* που απαντά μόνο στην Δυτική Αφρική τα υπόλοιπα είδη απαντούν σε όλες τις τροπικές και υποτροπικές χώρες. Από τα είδη αυτά τα *P. vivax* και *P. falciparum* είναι τα συχνότερα, ενώ το *P. malariae* απαντά πολύ σπανιότερα.

Ως επιδημιολογικοί δείκτες μόλυνσεως χρησιμοποιούνται ο σπληνικός δείκτης, ο παρασιταϊμικός δείκτης και ο δείκτης μεταδόσεως. Πιο συγκεκριμένα:

Σπληνικός δείκτης: Ορίζεται η αναλογία παιδιών ηλικίας 2-9 ετών με διογκωμένο σπλήνα. Ο σπληνικός δείκτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για οποιαδήποτε άλλη ομάδα ηλικιών, η οποία πρέπει όμως τότε να προσδιορίζεται.

Παρασιταϊμικός δείκτης: Ορίζεται η αναλογία είτε των ατόμων μιας ορισμένης ομάδος ηλικιών, ή των ατόμων εκείνων, που σε κάποια συγκεκριμένη ημερομηνία παρουσιάζουν παρασιταϊμία.

Δείκτης μεταδόσεως: Ορίζεται η αναλογία παιδιών κάτω του έτους με παρασιταϊμία.

Με βάση τους δείκτες αυτούς η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) διακρίνει ολοενδημικές (ΣΠ ή ΠΔ >75%), υπερενδημικές (ΣΔ ή ΠΔ 51 –75%), μεσοενδημικές (ΣΔ ή ΠΔ 11-50%) και υποενδημικές περιοχές (ΣΔ ή ΠΔ <10%). Συνήθως όμως προτιμάται από τους ειδικούς η διάκριση σε περιοχές σταθερής και ασταθούς ενδημικής ελονοσίας. Στις περιοχές σταθερής ενδημικής ελονοσίας, που αντιστοιχούν στις ολοενδημικές και υπερενδημικές, η μετάδοση της νόσου γίνεται το μεγαλύτερο μέρος του έτους. Τα άτομα γίνονται άνοσα, μετά από επανειλημμένες φυσικές μολύνσεις, περί το 5^ο έτος της ηλικίας τους με το τίμημα της αυξημένης παιδικής θνησιμότητας. Για το λόγο αυτό οι ενήλικες

δεν νοσούν αλλά μόνο τα παιδιά. Αντιθέτως στις περιοχές της ασταθούς ενδημικής ελονοσίας, που αντιστοιχούν στις μεσοενδημικές και υποενδημικές περιοχές, μετάδοση γίνεται μόνο μερικούς μήνες το χρόνο και ενδεχομένως όχι κάθε χρόνο, αναλόγως με τις καιρικές συνθήκες. Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού είναι επίνοσο και συμβαίνουν αληθινές επιδημίες.

Εάν η μόλυνση και η νόσηση συμβαίνουν στον ίδιο τόπο, τότε καλείται αυτόχθων, ενώ όταν το άτομο νοσήσει σε τόπο μακρινό από εκείνο που μολύνθηκε τότε ονομάζεται εισαγόμενη. Έχει ακόμη περιγραφεί μετάδοση σε μη ενδημικό τόπο με κουνούπια που μεταφέρθηκαν με αεροπλάνα τακτικών αερογραμμών.

Η συνέχιση των επιδημιών αυτής της μακρόχρονης ασθένειας αποδίδεται στις δυσκολίες διάγνωσης και ελέγχου της. Η μάχη κατά της ελονοσίας κυριαρχείται από τεχνικά και οικονομικά προβλήματα. Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει για να ξεριζωθεί ή τουλάχιστον να ελεγχθεί η ελονοσία, παραμένει η κυρίαρχη και πιο βαριά ασθένεια στις τροπικές και υποτροπικές χώρες προκαλώντας πέραν της νοσηρότητας και της θνησιμότητας και κοινωνικοοικονομικά προβλήματα. Ο συνεχής παρασιτισμός και η εξάπλωση στελεχών ανθεκτικά στα ανθελονοσιακά φάρμακα δημιουργεί μια μεγάλη απειλή αναφορικά με την σοβαρότητα της ασθένειας και στους θανάτους που προκαλεί. Υπολογίζεται ότι ένα 60% των μολυσμένων ατόμων δεν εμφανίζουν συμπτώματα πράγμα που δυσχεραίνει τις επιδημιολογικές μελέτες.

Ο έλεγχος των φορέων δηλαδή των ανωφελών απέβη άκαρπος αφού μόνο σε μερικές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, ήταν επιτυχής οπότε η μόνη στρατηγική αντιμετώπισης της νόσου στηρίζεται σε έλεγχο της νόσου σε τοπικά επίπεδα και σε φάρμακα κάτι που μέχρι στιγμής δεν έχει ιδιαίτερη επιτυχία λόγω της πολυπλοκότητας του κύκλου ζωής του παρασίτου τόσο στον άνθρωπο όσο και στα κουνούπια που το φέρουν. Η δημιουργία ανοσίας μέσω εμβολιασμών θα ήταν το ιδεατό όπλο μακροπρόθεσμης καταπολέμησης της ελονοσίας αλλά υπάρχουν πολλές δυσκολίες σε αυτή τη λύση και όλες οι απόπειρες βρίσκονται ακόμη σε προκλινικό στάδιο [2].

1.5 Ιστορικά στοιχεία

Η κλινική εικόνα της νόσου έχει περιγραφεί λεπτομερώς από τον Ιπποκράτη (5^{ος} π.χ αιώνας), κατά την διάκριση των τύπων του πυρετού. Το 1630 με την ανακάλυψη των θεραπευτικών ιδιοτήτων του εκχυλίσματος του φλοιού της κίνας, οι πυρετοί διακρίνονται σε ευαίσθητους και σε ανθεκτικούς στο φάρμακο αυτό. Το 1820 δύο Γάλλοι φαρμακοποιοί, ο Pelletier και ο Gaventou απομόνωσαν το δραστικό αλκαλοειδές της κίνας, την κινίνη. Το 1880 ο Laveran, Γάλλος στρατιωτικός γιατρός, απομόνωσε τον παθογόνο παράγοντα μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια.. Διαδοχικά αναγνωρίστηκαν τα είδη του πλασμοδίου που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο: το *Plasmodium vivax*, το *Plasmodium falciparum*, το *Plasmodium malariae*, και αργότερα το *Plasmodium ovale*. Ο ρόλος των ανωφελών που υποψιαζόταν ο Σερ Ronald Ross (1857-1932), επιβεβαιώθηκε από τον Ιταλό Grassi (1854-1925) το 1898. Η ύπαρξη δευτερογενούς εξωερυθροκυτταρικού (έξω από τα ερυθρά αιμοσφαίρια) κύκλου του *Plasmodium* στο ήπαρ, που εξηγεί την εμφάνιση υποτροπών των πυρετικών παροξυσμών, αποδείχθηκε μόλις το 1948 από τους Shortt και Garnham. Τέλος, από το 1940 η ανθελονοσιακή θεραπεία μπαίνει σε νέα φάση με την ανακάλυψη των λεγόμενων συνθετικών ανθελονοσιακών, που χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλη έκταση στον Πόλεμο του Ήιρηνικού. Από το 1965 όμως και μετά η εμφάνιση στελεχών του *Plasmodium falciparum*, ανθεκτικών στα περισσότερα χρησιμοποιούμενα συνθετικά ανθελονοσιακά, επισκίασε τις ελπίδες για εκρίζωση της ελονοσίας, ιδίως κατά το Πόλεμο του Βιετνάμ. Στον επιδημιολογικό τομέα, οι προσπάθειες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας έχουν από τότε προσανατολιστεί στην αναζήτηση νέων συνθετικών ανθελονοσιακών παρατεταμένης δράσης [3].

1.6 Κατηγορίες ανθελονοσιακών φαρμάκων

Η ορθή χρήση των ανθελονοσιακών φαρμάκων προϋποθέτει γνώση του αναπαραγωγικού σταδίου του πλασμοδίου στο οποίο δρουν. Τα φάρμακα διακρίνονται σε ερυθροκυτταρικά σχιστοζωιδιοκτόνα ή απλώς σχιστιζωιδιοκτόνα, ιστικά

σχιστοζωιδιοκτόνα ή ορθότερα υπνοζωιδιοκτόνα, σποροζωιδιοκτόνα και γαμετοκτόνα. Τα πρώτα χρησιμοποιούνται για τον τερματισμό της οξείας προσβολής και για χημειοπροφύλαξη, τα δεύτερα για ριζική ίαση νόσου από *P. vivax* και *P. ovale*, τα τρίτα ως αιτιολογικά προφυλακτικά, ενώ γαμετοκτόνο δράση έχουν αρκετά σχιστοζωιδιοκτόνα. Τα ανθελνοσσιακά φάρμακα είναι [2]:

A) 4-αμινοκινολόνες

Χλωροκίνη: Ισχυρότατο και ταχύτατο σχιστοζωιδιοκτόνο και γαμετοκτόνο. Ατυχώς το *P. falciparum* σε πολλά μέρη του κόσμου, τα οποία συνεχώς πληθαίνουν, έχει εμφανίσει αντοχή.

Αμοδιακίνη: Συγγενής της χλωροκίνης. Μερικά ανθεκτικά στη χλωροκίνη στελέχη του *P. falciparum* παραμένουν ευαίσθητα στην αμοδιακίνη.

B) 8-αμινοκινολόνες

Πριμακίνη: Είναι υπνοζωιδιοκτόνο και γαμετοκτόνο. Χρησιμοποιείται για ριζική ίαση νόσου από *P. vivax* και *P. ovale*.

Γ) Κινίνη

Πρόκειται για το αρχαιότερο χημειοθεραπευτικό. Είναι αλκαλοειδές της κιγχόνας. Είναι ισχυρότατο σχιστοζωιδιοκτόνο και σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη θεραπεία νόσου από ανθεκτικά στη χλωροκίνη στελέχη του *P. falciparum*.

Δ) Ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος

Στους ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος περιλαμβάνονται αφ' ενός τα υποκατάστατα του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (PABA), σουλφοναμίδες και σουλφόνες, που φέρονται και ως τύπου I ανταγωνιστές, και αφ' ετέρου οι αναστολείς της διυδροφυλλικής αναγωγής – πυριμεθάνη, προγουανιλίνη – που φέρονται και ως τύπου II ανταγωνιστές. Από τις σουλφοναμίδες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά οι μακράς διάρκειας δράσεως. Είναι ασθενή και βραδείας δράσεως σχιστοζωιδιοκτόνα. Η προγουανιλίνη αναφέρεται ιδιαίτερος γιατί χρησιμοποιείται ως αιτιολογικό προφυλακτικό σε περιοχές με ανθεκτικό στη χλωροκίνη *P. falciparum*.

Ε) Αντιβιοτικά

Οι τετρακυκλίνες, η κλινδαμυκίνη και η ερυθρομυκίνη έχουν βραδεία σχιστοζωιδιοκτόνο δράση.

ΣΤ) Νεώτερα ανθελονοσιακά

Μεφλοκίνη: Πρόκειται για συγγενή ουσία της κινίνης.

Αρτεμισινίνη: Ταχύτατο σχιστοζωιδιοκτόνο. Παρακάτω θα γίνει αναλυτική περιγραφή.

Φθοριοκινολόνες: Η νορφλοξασίνη δοκιμάστηκε με επιτυχία σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με ελονοσία από *P. falciparum* στην Ινδία.

1.7 Μηχανισμός δράσης αρτεμισινίνης και παραγώγων της

Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της σκοτώνουν τα παράσιτα πιο γρήγορα από κάθε άλλο ανθελονοσιακό μέσο λόγω της μοναδικής τους φαρμακοδυναμικής δράσης. Είναι τοξικά για το παράσιτο σε συγκεντρώσεις της τάξεως του νανόμετρου. Προκαλούν δομικές μεταβολές στο ερυθροκυτταρικό στάδιο του παρασίτου επηρεάζοντας τις μεμβράνες που περιβάλλουν τα τροφικά χυμοτόπια, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το πυρηνόπλασμα. Έτσι η αρτεμισινίνη εντοπίζεται σε συγκεκριμένες μεμβράνες του παρασίτου. Τέτοιες αλλαγές οδηγούν στο σχηματισμό αυτοφάγων κενοτοπίων και στο χάσιμο του κυτοπλάσματος γεγονός που σκοτώνει το παράσιτο [4]. Η υπεροξειδική δράση της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της είναι απαραίτητη για την ανθελονοσιακή δραστηριότητα ενώ αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων δείχνουν ότι η καρβοξυλική δράση δεν είναι απαραίτητη [5]. Αξιώνεται ότι ο θάνατος του παρασίτου της ελονοσίας από την αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της προέρχεται από την παραγωγή κυτταροτοξικών ουσιών, όπως ελεύθερες ρίζες και ενεργές αλδεύδες [6]. Αυτό αποδεικνύεται από τις ακόλουθες παρατηρήσεις.

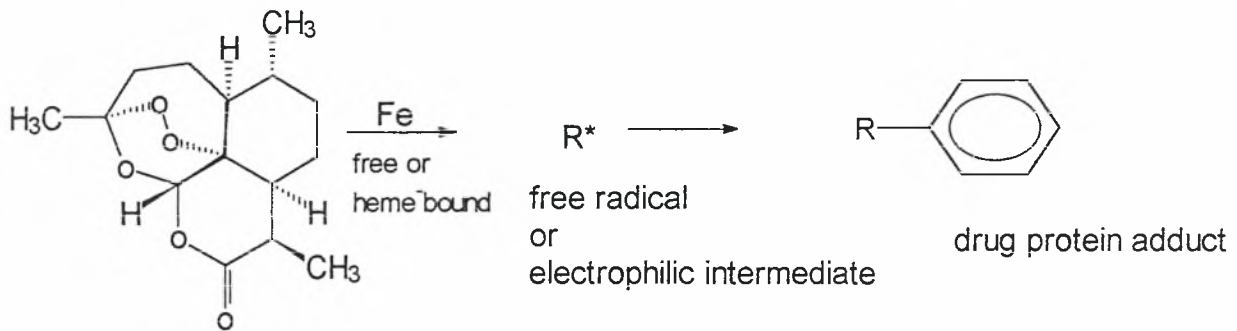
Τα παράγωγα της αρτεμισινίνης που στερούνται υπεροξειδικής γέφυρας, η οποία είναι γνωστή πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στερούνται και ανθελονοσιακής δράσης [7,8]. Επίσης οι ανθελονοσιακές δραστηριότητες της αρτεμισινίνης και του artesunate *in vitro*, εμπλουτίζονται με ισχυρή προσθήκη οξυγόνου

και με προσθήκη ουσιών που παράγουν ελεύθερες ρίζες, όπως δοξουρουμπισίνη, μικοναζόλη [9], καστεσίνη και αρτεμισίνη [10]. Παρομοίως, αντιοξειδωτικά όπως α-τοκοφερόλη, καταλάση, διθειοτρεϊτόλη [9], ασκορβικό και ανηγμένη γλουταθειόνη [11] μπλοκάρουν την ανθελονοσιακή τους δραστηριότητα. Τα περισσότερα φάρμακα που απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες, προκαλούν οξειδωτικές βλάβες [12]. Εν τούτοις τα παράγωγα αρτεμισινίνης βλάπτουν τα παράσιτα της ελονοσίας με ένα πολύ διαφορετικό τρόπο από τα άλλα οξειδωτικά φάρμακα. Αντί να αντιδρούν με οξυγόνο και να παράγουν μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών που περιέχουν οξυγόνο, η ίδια η αρτεμισίνη μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα σε μια αντίδραση που καταλύεται από σίδηρο [13].

Η βιοχημική δράση της αρτεμισινίνης εξαρτάται από δύο διαδοχικά βήματα. Το πρώτο βήμα, που είναι η ενεργοποίηση, περιλαμβάνει ένα μοριακό διαχωρισμό της υπεροξειδικής γέφυρας μεσολαβούμενο από σίδηρο, που παράγει μια ασταθή οργανική ελεύθερη ρίζα και άλλες ηλεκτόφιλες ομάδες [12]. Ο σίδηρος ενεργοποιεί την αρτεμισίνη σε ελεύθερη ρίζα, όπως επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού [14] και από μελέτες σε απομονωμένες μεμβράνες ερυθροκυττάρων [15]. Όμως επειδή υπάρχουν πολλές πηγές σιδήρου στο προσβεβλημένο ερυθροκύτταρο δεν είναι γνωστό ποια είναι η υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της αρτεμισινίνης [12]. Η παρατήρηση ότι η χλωροκίνη η οποία συνδέεται στην αίμη [16] ανταγωνίζεται την ανθελονοσιακή δραστηριότητα της αρτεμισινίνης ενάντια στο *Plasmodium falciparum* [17] δείχνει ότι η πηγή ελεύθερης αίμης μπορεί να είναι σημαντική. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι χηλικές ενώσεις σιδήρου ανταγωνίζονται το αντιπαρασιτικό αποτέλεσμα της αρτεμισινίνης [14].

Το δεύτερο βήμα που είναι η αλκυλοποίηση, περιλαμβάνει το σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων μεταξύ του φαρμάκου και των ελονοσιακών πρωτεϊνών (Σχήμα 1). In vitro η αρτεμισίνη δημιουργεί ομοιοπολικό σύμπλοκο με την αλβουμίνη. Η ομοιοπολική φύση των συμπλόκων έχει επιβεβαιωθεί με φασματοσκοπικές μελέτες και SDS-PAGE [18]. Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ραδιοσημασμένη αρτεμισίνη προσλαμβάνεται από τις μεμβράνες απομονωμένων ερυθροκυττάρων, ενώ δεν παρατηρήθηκε πρόσληψη ή αλκυλίωση πρωτεΐνης όταν η αρτεμισίνη επωάζεται με υγιή ερυθροκύτταρα [19].

Έτσι τα παράγωγα της αρτεμισινίνης παράγουν ελεύθερες ρίζες αλλά είναι διαφορετικά από τα φάρμακα που παράγουν οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες κατά δύο τρόπους, αφού οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες είναι ανθρακούχες και στοχεύουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους [20].



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της αρτεμισινίνης και παραγώγων της.

1.8 Φαρμακοκινητική αρτεμισινίνης και παραγώγων της

Οι φαρμακοκινητικές μελέτες είναι απαραίτητες για το σχεδιασμό της φαρμακευτικής αγωγής και για την πρόβλεψη αποτίμηση του φαρμάκου. Αναφορικά με την αρτεμισινίνη οι φαρμακοκινητικές πληροφορίες δεν είναι πολλές. Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ. Γενικά απορροφούνται ταχύτατα από τον γαστρεντερικό σωλήνα και η ανώτατη συγκέντρωση στο πλάσμα εμφανίζεται μια ώρα μετά τη λήψη της ουσίας. Εν συνεχεία υδρολύονται *in vivo* σε διυδρο-αρτεμισινίνη και εξαλείφονται από το πλάσμα με χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από 45 λεπτά ως 11 ώρες [20,21,22,23,24]. Παρόλα αυτά αν και έχουν γίνει αρκετές έρευνες την τελευταία δεκαετία πάνω στο συγκεκριμένο θέμα, παραμένουν περιορισμένες οι δημοσιευμένες πληροφορίες αναφορικά με την φαρμακοκινητική της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της. Στο Πίνακα I γίνεται μία σύνοψη των διαθέσιμων δεδομένων [12].

Έτος	Φάρμακο & Δόση	T _{½α} (h)	C _{max} (ng/ml)	T _{½β} (h)
1988	Artemether			
	3.2	-	1200	7.1
	6.0	-	900	10.9
	10.0	-	800	13.2
1988	Artemether			
	6	2.6	145	7.7
	10	2.0	224	11.1
1989	Artemisinin (Υπόθετα)			
	10	1.83	6.7	4.4
1988	Artemisinin			
	10	2.83	2.5	4.1
1988	Artemisinin (Υπόθετα)			
	10	2.98	9.6	4.1
1990	Artemisinin			
	5.3	0.5	260	1.9
1986	Artesunate			
	3.3-4.4	-	3088	0.5
1988	Artesunate			
	2.0	-	33000	1.4
	3.8	-	16000	0.8
1994	Arteether			
	3.6	0.6	-	23.1
1997	Artemisinin			
	500	1.55	-	4
1998	Artemisinin			
	500	1.16	364	2.72
1997	Artemisinin			
	250	2.61	360	4.34

Πίνακας I: Μελέτες φαρμακοκινητικής αρτεμισινίνης και παραγώγων της στον άνθρωπο.

1.9 Κλινικές Μελέτες

Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της είναι πάρα πολύ αποτελεσματικά στη θεραπεία σοβαρών περιπτώσεων ελονοσίας που προκαλούνται από το *Plasmodium falciparum*. Τα ανθελονοσιακά αυτά έχουν ευρύτερο φάσμα ειδικότητας όσον αφορά τα διάφορα στάδια της νόσου. Ωστόσο το φάρμακο είναι αποτελεσματικό μόνο όταν χορηγείται στην κατάλληλη μορφή για κάθε κλινική περίπτωση. Θα πρέπει να υπάρχει λεπτομερής περιγραφή της ανοχής στο φάρμακο, των ανεπιθύμητων δράσεων του στον οργανισμό και ο βαθμός επιτυχίας του. Μια σωστή κλινική εξέταση βοηθά στο να περιοριστεί η υπερβολική χορήγηση φαρμάκου. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι οι κλινικές μελέτες παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και στη επιβράδυνση της προόδου της ασθένειας στις πιο σοβαρές της μορφές [2].

1.10 Άλλες βιολογικές δράσεις της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της

Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της δοκιμάστηκαν για πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες και σε άλλα συστήματα λόγω της μη συνήθους χημικής δομής τους [25]. Τα φάρμακα αυτά βρέθηκαν να εμποδίζουν το σχηματισμό οδοντικής πλάκας από το *Toxoplasma gondii* [26] και να είναι αποτελεσματικά ενάντια στη *Leishmania major* [27]. Επίσης τα παράγωγα της αρτεμισινίνης βρέθηκαν, *in vitro* αλλά και σε πειραματόζωα, να είναι δραστικά ενάντια στο *Schistosoma mansoni* και στο *Schistosoma japonicum* [20]. Ακόμη ενδοϋπεροξειδία σχετικά με την αρτεμισινίνη βρέθηκε, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, να έχουν κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων Ehrlich [28], ανθρώπινων κυττάρων HeLa και έναντι του μυελού των οστών του τρωκτικού Mus [29]. Τα παράγωγα του αρτεμισινικού οξέως και του αρτεμισιτενίου βρέθηκαν να είναι κυτταροτοξικά *in vitro* έναντι της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς SMMC-7721 που συναντάται σε ηπάτωμα, της ανθρώπινης εμβρυϊκής πνευμονικής κυτταρικής σειράς WI 38, της ανθρώπινης γαστρικής καρκινικής κυτταρικής σειράς

SCG-7901 και της λευχαιμικής κυτταρικής σειράς P388 του τρωκτικού Mus [32]. Άγνωστες ουσίες που απομονώθηκαν από φύλλα του φυτού *Artemisia Annua* παρουσιάζουν ρυθμιστική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος [12]. Ακόμη η αρτεμισινίνη παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι των εξής κυτταρικών σειρών: A-549, HT-29, MCF-7, KB [30] και κατά των καρκινικών κυττάρων EN2 [31]. Τέλος η αρτεμισινίνη παρουσιάζει δραστηριότητα έναντι της μυκητίασης των πτηνών όταν χορηγείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπό τη μορφή πρόσθετου διατροφής [32,33].

2. Η Αρτεμισινίνη

2.1 Artemisia Annuua - Το φυτό από όπου προέρχεται η Αρτεμισινίνη

Η Artemisia Annuua είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Asteraceae. Είναι ένα ετήσιο βότανο που κατάγεται από την Κίνα και βρίσκεται στις στέπες των βόρειων τμημάτων των επαρχιών Chahar και Suiyan της Κίνας σε υψόμετρο 1000 – 1500 μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας. Το φυτό πλέον καλλιεργείται σε πολλές χώρες όπως Αυστραλία, Αργεντινή, Βουλγαρία, Γαλλία, Ουγγαρία, Ισπανία, Ιταλία και Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ γίνονται και απόπειρες καλλιέργειάς του στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή του νομού Τρικάλων. Έχει ένα κορμό με εναλλασσόμενες διακλαδώσεις που φτάνουν σε ύψος άνω των δύο μέτρων. Τα φύλλα της είναι έντονα διαμελισμένα και έχουν μήκος 2-5 cm.

Η Artemisia Annuua έχει έντονο άρωμα. Περιέχει καμφορά και αιθέρια έλαια και είναι πολύ ανθεκτικό φυτό. Από τη στιγμή που αρχίζει η πλήρης ανάπτυξή της μπορεί να επιβιώσει σε πολύ ζεστό κλίμα και σε περιόδους ξηρασίας. Οι ρίζες της διεισδύουν πολύ βαθιά στο έδαφος.

Η Αρτεμισινίνη είναι το προϊόν που εξάγεται από τα ξηρά φύλλα του φυτού. Η συμπεριφορά της Artemisia είναι ιδιαίτερη. Φυσιολογικά μεγαλωμένα φυτά μπορεί να στερούνται της ουσίας αρτεμισινίνης. Η Artemisia Annuua μπορεί να αναπτυχθεί σε πολλά μέρη αλλά μπορεί να μην περιέχει αρτεμισινίνη. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε φυτείες στο Βόρειο Βιετνάμ (κυρίως στα περίχωρα του Ανόι) ή σε άγρια φυτά (π.χ. στους απόκρημνους λόφους γύρω από το You Young στην κινέζικη επαρχία Chongqing όπου τα φυτά αναπτύσσονται σε ύψος ανώτερο των 1400 μέτρων).

Η συγκομιδή του φυτού πρέπει να γίνει πριν να ανθίσει έτσι ώστε να μην μειωθεί η ποσότητα της αρτεμισινίνης που περιέχει. Σε ιδανικές συνθήκες ένα εκτάριο αποφέρει 1-2 τόνους φύλλων Αρτεμισίας. Κάθε τόνος δίνει 2-3 κιλά αρτεμισινίνης [34,49].

2.2 Ιστορικά στοιχεία

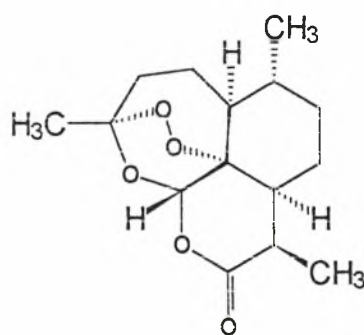
Η *Artemisia Annua* χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ελονοσίας στην Κίνα περισσότερο από 1000 χρόνια. Τα παλαιότερα αρχεία που την αναφέρουν χρονολογούνται 2000 χρόνια πριν, στις «Πενήντα Δύο Συνταγές» που ανακαλύφθηκαν στους τάφους της δυναστείας του Mawangdui Han. Οι εφαρμογές κατά της ελονοσίας περιγράφηκαν για πρώτη φορά στο Zhouhou Beiji Fang («Το Εγχειρίδιο των Επειγουσών Συνταγών»), το οποίο συντάχθηκε στα μέσα του τέταρτου αιώνα από τον Ge Hong.

Οι πόλεμοι πολλές φορές οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών καθώς και νέων φαρμάκων. Τα φάρμακα κατά της ελονοσίας είναι ένα τυπικό παράδειγμα. Η γλωροκίνη ήταν αποτέλεσμα του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου. Η μεφλοκίνη ήταν αποτέλεσμα του Πολέμου του Βιετνάμ από την πλευρά των Αμερικάνων. Η αρτεμισινίνη ήταν επίσης αποτέλεσμα του Πολέμου του Βιετνάμ.

Κατά τη διάρκεια του Πολέμου του Βιετνάμ στη δεκαετία του εβδομήντα πολλοί βιετναμέζοι στρατιώτες πεθαίναν από ελονοσία που προκαλείτο από παράσιτα ανθεκτικά στα τότε χρησιμοποιούμενα φάρμακα. Ο βιετναμέζος ηγέτης Ho Chi Minh ζήτησε τη βοήθεια των Κινέζων για να αντιμετωπίσει το πρόβλημα. Ο Mao προσέφερε γενναιόδωρα την βοήθειά του οργανώνοντας μεγάλης κλίμακας έρευνα για την ανάπτυξη νέων και αποτελεσματικότερων φαρμάκων εμπλέκοντας πολλούς επιστήμονες. Οι έρευνες δεν ήταν επιτυχείς μέχρι την ημέρα που ένας ερευνητής είχε την υπέροχη ιδέα να εκχυλίσει ένα θεραπευτικό βότανο (*Artemisia Annua*) με εξάνιο. Μέχρι εκείνη τη στιγμή όλες οι προπαρασκευαστικές ενέργειες γινόντουσαν χρησιμοποιώντας τα φύλλα της *Artemisia* ως είχαν ή με υδατικές εκχυλίσσεις, οπότε η εκχύλιση με εξάνιο οδήγησε σε ανακαλύψεις τελείως άγνωστες τους Κινέζους επιστήμονες. Η ουσία που εκχυλίστηκε ήτανε κιτρινωπή και ελαιώδης. Έπειτα από καθαρισμούς της σε υλικό απορρόφησης υγρασίας και με επαναλαμβανόμενες εκχυλίσσεις ανέκτησαν τελικά μια κρυσταλλική ουσία. Ονομάστηκε Αρτεμισινίνη (*Quing gha shu*). Η ουσία αυτή είχε την ικανότητα να σκοτώνει τα πολυπυρηνικά σποροζώα του παρασίτου της ελονοσίας [49].

2.3 Χημικά χαρακτηριστικά της αρτεμισινίνης

Η Αρτεμισινίνη ή Qinghaosu όπως λέγεται στα κινέζικα, είναι ένα λακτονικό σισκετερπένιο. Ο εμπειρικός τύπος της είναι $C_{15}H_{22}O_5$. Η αρτεμισινίνη περιέχει μια υπεροξειδική γέφυρα στην οποία αποδίδονται και οι ανθελονοσιακές της ιδιότητες. Έχει μια μοναδική δομή που δεν περιέχει ετεροκυκλικό δακτύλιο με άζωτο, ο οποίος συναντάται στα περισσότερα φάρμακα κατά της ελονοσίας. Είναι άοσμη και άχρωμη και σχηματίζει κρυστάλλους με σημείο τήξεως $156 - 157\text{ }^{\circ}\text{C}$ και είναι αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Το μοριακό της βάρος όπως υπολογίστηκε με υψηλής απόδοσης φασματοσκοπία μάζας είναι $m/e\ 282.1742\ m+$. Η δομή της προσδιορίστηκε με τη βοήθεια κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες Χ. Το σισκετερπένιο αυτό έχει 5 άτομα οξυγόνου, 2 εκ των οποίων σε μια υπεροξειδική γέφυρα πάνω από έναν επτάπλευρο δακτύλιο και άλλα 2 να περιλαμβάνονται σε ένα λακτονικό δακτύλιο. Η αρτεμισινίνη έχει 9 κέντρα ασυμμετρίας επιτρέποντας έτσι μεγάλο αριθμό πιθανών διαμορφώσεων στο χώρο, ευτυχώς όμως η *Artemisia Annua* δίνει μόνο μια διαμόρφωση διευκολύνοντας έτσι την ταυτοποίησή της [49]. Η στερεοχημική της δομή είναι η εξής:



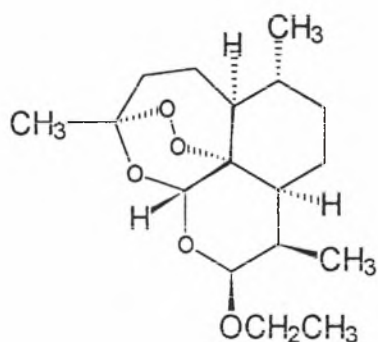
2.4 Η αρτεμισινίνη ως ανθελονοσιακό φάρμακο

Τα ανθελονοσιακά φάρμακα έχουν ένα επιλεκτικό τρόπο δράσης στις διάφορες φάσεις του παρασιτικού κύκλου ζωής και μπορούν να διακριθούν σε προφυλακτικά φάρμακα τα οποία εμποδίζουν την εδραίωση του παρασίτου στο συκώτι και σε εκείνα που επιτίθενται στο παράσιτο στα ερυθροκύτταρα εμποδίζοντας ή εξουδετερώνοντας την κλινική επίθεση. Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της είναι ισχυρά πολυπυρηνικά

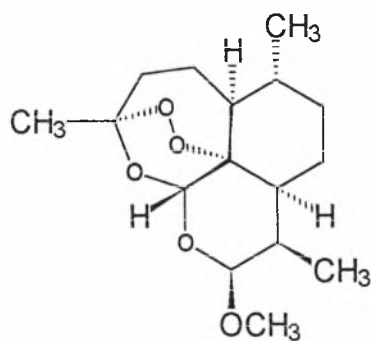
πρωτοζωοκτόνα του αίματος. Επίσης σκοτώνουν τα κύτταρα παραγωγής γαμετών. Δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν προφυλακτικά φάρμακα γιατί δεν επηρεάζουν τα παράσιτα στα στάδια ανάπτυξής τους στο συκώτι. Είναι ειδικά για τα συγκεκριμένα στάδια [12].

2.5 Παράγωγα της αρτεμισινίνης που χρησιμοποιούνται κατά της ελονοσίας

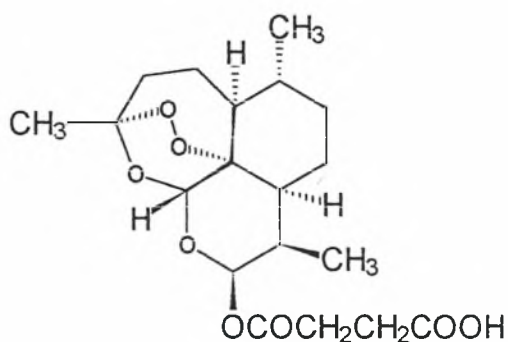
Arteether: Ο εμπειρικός τύπος του είναι $C_{17}H_{28}O_5$. Έχει μοριακό βάρος 312.4 και σημείο τήξεως 81-84 °C. Η διαλυτότητά του στο νερό είναι πρακτικά ανύπαρκτη και διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες [49]. Η στεreoχημική του δομή είναι:



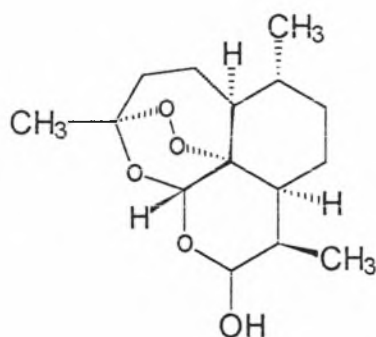
Artemether: Ο εμπειρικός του τύπος είναι $C_{16}H_{26}O_5$. Το μοριακό του βάρος είναι 298.4 και το σημείο τήξεώς του 86-90°C. Επίσης αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες [49]. Η στεreoχημική του δομή είναι:



Artesunate: Ο εμπειρικός του τύπος είναι $C_{19}H_{28}O_8$. Έχει μοριακό βάρος 384.4 και σημείο τήξεως 132-135 °C. Είναι ελαφρώς διαλυτό στο νερό και πολύ διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες [49]. Η στερεοχημική του δομή είναι:



Dihydroartemisinin (Διυδροαρτεμισινίνη): Ο εμπειρικός της τύπος είναι $C_{15}H_{24}O_5$. Έχει μοριακό βάρος 284.4 και σημείο τήξης 137 °C με διάσπαση της όμως. Ελάχιστα διαλυτή στο νερό και διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Η στερεοχημική της δομή είναι:



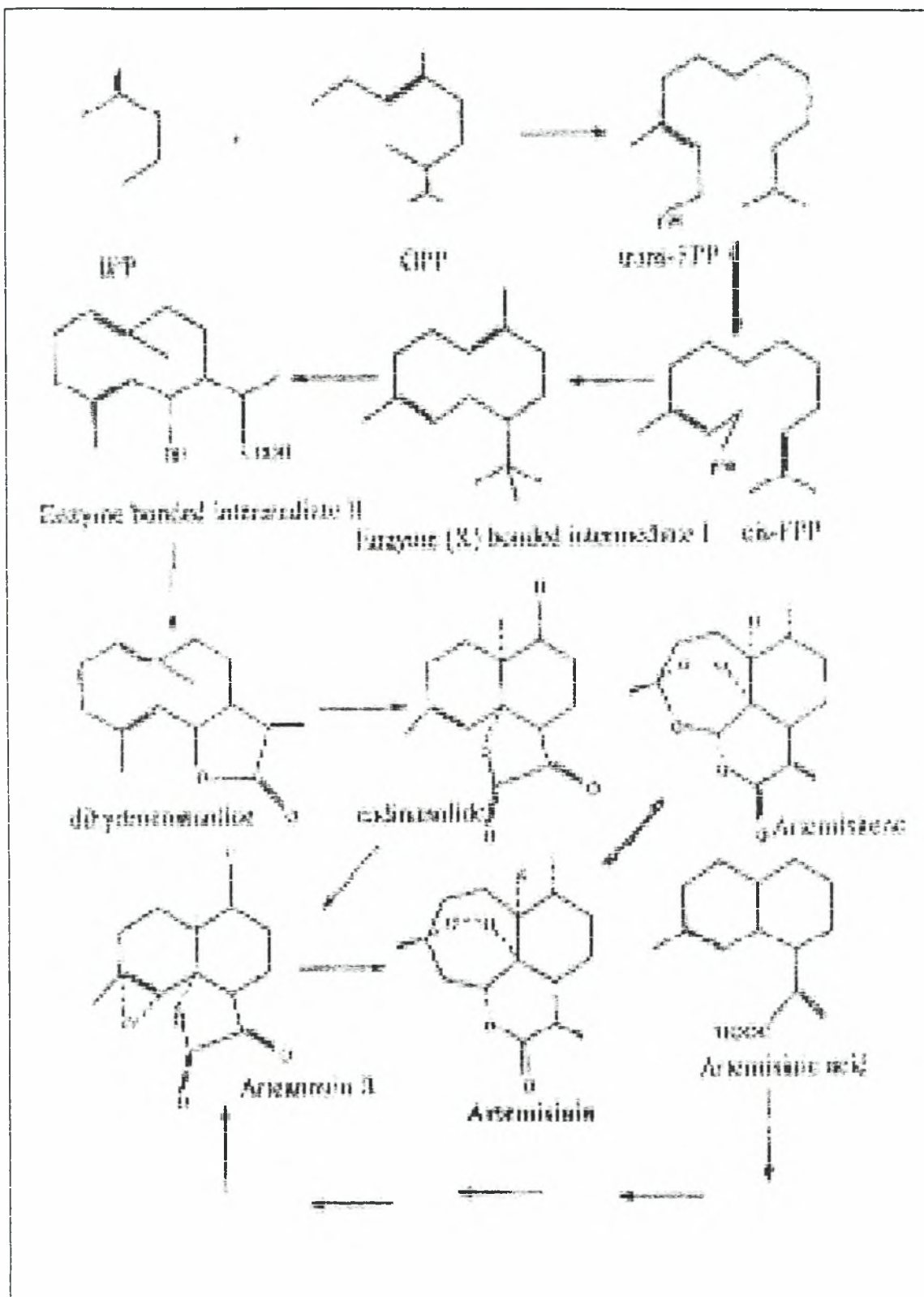
Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της μετατρέπονται γρήγορα στον ενεργό μεταβολίτη τους στο πλάσμα που είναι η διυδροαρτεμισινίνη η οποία είναι η χημική ουσία που έχει και την ανθελονοσιακή δράση [49].

2.6 Βιοσύνθεση της αρτεμισινίνης

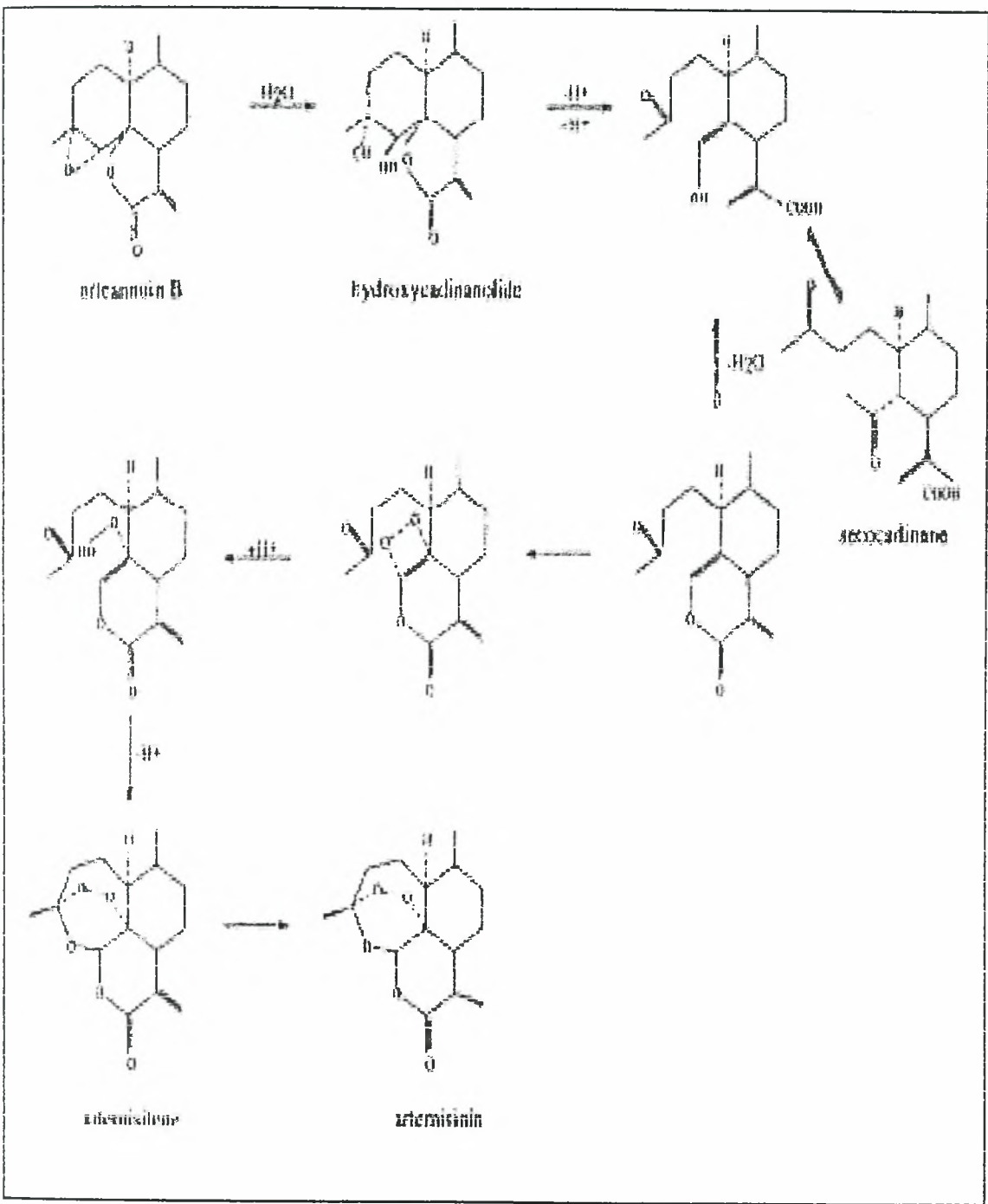
Η γνώση των βιοσυνθετικών μονοπατιών της αρτεμισινίνης, η διανομή των πρόδρομων ενώσεων της και των στενά συνδεδεμένων συνθετικών της είναι πολύ χρήσιμη και μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της παραγωγής του φαρμάκου. Για το λόγο αυτό πολλές μελέτες προσανατολίστηκαν στο να διαλευκάνουν τη βιοσύνθεση της αρτεμισινίνης. Το ολοκληρωμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αρτεμισινίνης όπως και κάποιων από τα πρόδρομά της δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. Κάποια βήματα βιομετατροπών διαλευκάνθηκαν *in vivo* και *in vitro* από τους Wang Yu et al., (1988) [12] και προτάθηκε μια κύρια γραμμή για τη σύνθεση της αρτεμισινίνης. Το αρτεμισινικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αρτεμισινίνης [12]. Το μεβαλονικό οξύ χρησιμεύει σαν πρωτεύουσα πρόδρομη ένωση για την βιοσύνθεση του αρτεμισινικού οξέος, που είναι πρόδρομος της αρτεμισινίνης και της παράλληλα παραγόμενης αρτεανουίνης Β. Οι Haung Jung et al., (1988) και οι Akhila et al., (1987, 1990) μελέτησαν το μονοπάτι βιοσύνθεσης της αρτεμισινίνης και αξίωσαν τα παρακάτω: φαρνεσυλπυροφωσφορικό άλας, σκελετός *germacrane*, δίδυδροκοστινολίδη, καδιανολίδη, αρτεανουίνη Β, αρτεμισινίνη (Σχήμα 2) [12]. Η μετατροπή της αρτεμισινίνης σε αρτεμισιτένιο και το αντίστροφο μπορεί επίσης να προκύψει και λόγω παρουσίας συστήματος οξυδορεδοουκτάσης. Οι μελέτες του Akhila δεν υπέδειξαν το αρτεμισινικό οξύ σαν τη πρόδρομο ένωση της αρτεμισινίνης, αλλά με την χορήγηση αρτεμισινικού οξέος σεσημασμένου με C^{14} σε ένα κλαράκι χωρίς φύλλα από *Artemisia Annua*, παρατηρήθηκε ραδιενεργή δραστηριότητα και στην αρτεανουίνη Β και στην αρτεμισινίνη, προτείνοντας ότι το αρτεμισινικό οξύ είναι πρόδρομος και των δυο ενώσεων [12]. Επίσης οι El-feraly et al., οι Roth και Acton (1987, 1989), οι Jung et al., (1990) και οι Kim και Kim (1992), θεωρούν ότι το αρτεμισινικό οξύ είναι το βιοσυνθετικό πρόδρομο των λακτονικών σεσκιτερπενίων αυτών είτε διαδοχικά είτε ανεξάρτητα [12,35].

Η αρτεανουίνη Β θεωρείται ως μια ακόμη πρόδρομος ένωση της αρτεμισινίνης [12,35]. Ο Brown το 1993 απομόνωσε δυο ουσίες, την σεκοκαδινάνη και την διυδροξυκαδιανολίδη που σχετίζονται με την βιοσύνθεση της αρτεμισινίνης. Η

απομόνωση αυτών των δύο ουσιών πρότεινε μια εναλλακτική οδό βιοσύνθεσης της αρτεμισινίνης. Σύμφωνα με αυτή, η αρτενουΐνη Β μετατρέπεται σε διυδροξυκαδιανολίδη η οποία υπόκειται σε θρυμματισμό κατά Grobs για να παραχθεί μια ενολική μορφή σεκοκαδινάνης. Η σεκοκαδινάνη υπόκειται σε ενζυμική οξείδωση και παράγεται αρτεμισιτένιο, το οποίο ανάγεται σε αρτεμισινίνη. Η υπόθεση αυτή (Σχήμα 3), δεν υποστηρίζεται από βιοχημικά ευρήματα αλλά είναι χημικά εφικτό να επιτευχθεί [12].



Σχήμα 2: Προτεινόμενα μονοπάτια για τη βιοσύνθεση της αρτεμισινίνης.



Σχήμα 3: Προτεινόμενη βιοσύνθεση αρτεμισίνης κατά Brown.

2.7 Βιοτεχνολογική παραγωγή αρτεμισινίνης

Λόγω του γεγονότος ότι τα φυτά είναι η μοναδική πηγή, επιχειρήθηκε μια βιοτεχνολογική προσέγγιση τα τελευταία 20 χρόνια ως βιώσιμη πηγή παραγωγής αρτεμισινίνης. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει παραγωγή από καλλιέργειες ιστών, συστήματα ελεύθερων κυττάρων και ολόκληρων φυτών.

Πολλοί ερευνητές έχουν πετύχει *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Artemisia annua* μέσω καλλιεργειών βλαστών της [36,37]. Οι βλαστοί μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα. Η βενζυλαδενίνη και το νερό της ινδικής καρύδας είναι αποτελεσματικά στην επαγωγή του σχηματισμού των βλαστών [12]. Οι καλλιέργειες αυτές έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη και παράγααν περισσότερη αρτεμισινίνη, όταν το μέσο ανάπτυξης περιείχε σουκρόζη 2% ως πηγή σακχάρων. Όταν η σουκρόζη αντικαθίσταται από άλλους υδατάνθρακες ή από συνδυασμό σουκρόζης και άλλων σακχάρων παρατηρούνται διαφορές στην ανάπτυξη και στην παραγωγή αρτεμισινίνης. Καλύτερη ανάπτυξη παρατηρείται όταν το μέσο ανάπτυξης που περιέχει σουκρόζη ή μείγμα σουκρόζης με μαλτόζη. Η ελάχιστη ανάπτυξη παρατηρείται όταν αντί για σουκρόζη χρησιμοποιείται λακτόζη. Όταν σαν πηγή υδατανθράκων χρησιμοποιείται μόνο η μαλτόζη, τότε παρατηρείται μείωση της ανακτόμενης βιομάζας [12].

Ακόμη έχουν γίνει προσπάθειες να βελτιωθεί η παραγωγή αρτεμισινίνης με την ενσωμάτωση στο υλικό ανάπτυξης διαφόρων συστατικών, όπως η υδρολυμένη καζεΐνη, ρυθμιστές της ανάπτυξης του φυτού, εμπλουτισμός σε βιοσυνθετικά πρόδρομα, ή επηρεάζοντας την οδό βιοσύνθεσης της αρτεμισινίνης. Η υδρολυμένη καζεΐνη είναι πηγή αμινοξέων και ολιγοπεπτιδίων και σε μικρές συγκεντρώσεις επάγει την σύνθεση αρτεμισινίνης αλλά παρατεταμένη έκθεση σε αυτήν επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή της βιομάζας και την ανάπτυξη του φυτού γενικότερα. Ο συνδυασμός βενζυλαμινοπουρίνης (1.0 mg/l) και κινετίνης (10 mg/l) προκαλεί αύξηση της παραγωγής αρτεμισινίνης *in vitro* κατά 3.6 και 2.6 φορές αντίστοιχα, λόγω της αύξησης της βιομάζας η οποία υπερβαίνει την μειωμένη περιεκτικότητα των φύλλων του φυτού σε αρτεμισινίνη [12]. Προσθήκη πρόδρομων της αρτεμισινίνης στο μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες ιστών της *Artemisia Annua* αύξησε την παραγωγή της.

Παρόλα αυτά χορήγηση λακτόνης μεβαλονικού οξέος παρουσίασε αρνητικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη και στην ποσότητα αρτεμισινίνης [12,36].

Πειράματα στα οποία επιχειρήθηκε να αυξηθεί η παραγωγή αρτεμισινίνης με παρεμβάσεις στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της με την προσθήκη αναστολέων σύνθεσης στερολών, μεταλλαξιόνους παράγοντες, ουσίες που αφαιρούν τους μύκητες ή μυκητοκτόνα, είχαν αντιφατικά αποτελέσματα. Προσθήκη ναφτιφίνης βελτίωνε την παραγωγή, ενώ η προσθήκη 5-αζακυτιδίνης, κολχικίνης, μικοναζόλης, τερμπιναφίνης αποδείχθηκε πολύ τοξική για τις καλλιέργειες και επηρέαζε αρνητικά την ανάπτυξη και παραγωγή αρτεμισινίνης. Ωστόσο μια άλλη μελέτη ανέφερε αύξηση των επιπέδων αρτεμισινίνης και ανάπτυξης των βλαστών εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση μικοναζόλης που χορηγείται. Η χορήγηση διαφόρων αντιμυκητιακών παραγόντων δεν επηρέασε ούτε θετικά ούτε αρνητικά κανένα από τους εξεταζόμενους παράγοντες [12].

2.8 Μερικά σκευάσματα αρτεμισινίνης και παραγώγων που κυκλοφορούν στο εμπόριο

Έπειτα από μια σύντομη έρευνα στο διαδίκτυο βρέθηκε ότι ορισμένα από τα σκευάσματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι τα εξής:

- ◆ Artemam tablets- 50 mg p/t. (Δραστική ουσία: β-artemether)
- ◆ Artemether injection- 80 mg/ml. (Δραστική ουσία: β-artemether)
- ◆ Arinate tablets- 100mg p/t. (Δραστική ουσία: artesunate)
- ◆ Artemos softgel capsules- 40 mg p/c. (Δραστική ουσία: β-artemether)
- ◆ Artesiane drink- 300 mg σκόνη αναμεμιγμένη με πορτοκάλι. (Δραστική ουσία: β-artemether)

2.9 Συμπεράσματα

Η αρτεμισινίνη και τα παράγωγά της έχουν αναδειχθεί στα πιο σημαντικά φάρμακα για τον έλεγχο της ελονοσίας, απαλείφοντας έτσι ένα μεγάλο βάρος από τις οικονομίες των αναπτυσσόμενων τροπικών χωρών. Πλέον τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως. Στην ουσία το φυτό *Artemisia Annua* είναι η μόνη πηγή της από τη στιγμή που η οργανική της σύνθεση είναι οικονομικά μη βιώσιμη. Η εγκαθίδρυση

των φαρμάκων που προέρχονται από αρτεμισινίνη ως τα κυρίαρχα κατά της ελονοσίας ήταν αποτέλεσμα της δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών πλασμωδίου απέναντι στο μεγαλύτερο ποσοστό φαρμάκων που χρησιμοποιούντο μέχρι τότε. Έτσι η χρήση τους πλέον δεν ήταν αποτελεσματική ούτε οικονομικά συμφέρουσα. Τα παράγωγα της αρτεμισινίνης απορροφούνται πολύ γρήγορα από τον οργανισμό και μετατρέπονται τάχιστα στον βιολογικά δραστικό μεταβολίτη τους, την διυδροαρτεμισινίνη, ενώ απαλείφονται από τον οργανισμό επίσης πολύ γρήγορα. Έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και εύρος δράσης από κάθε άλλη ομάδα ανθελονοσιακών. Αυτό που απαιτείται να γίνει όμως είναι να διαλευκανθεί ο δρόμος που ακολουθείται κατά την βιοσύνθεσή της και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό. Τα βιοσυνθετικά πρόδρομα της αρτεμισινίνης εμφανίζουν συγκεντρώσεις 8-10 φορές μεγαλύτερες από αυτή και άρα θα ήταν χρήσιμο να εξετασθεί πώς μέσω βιομετατροπών μπορεί να αυξηθεί η παραγωγή της. Γενικότερα όμως η ανακάλυψη της αρτεμισινίνης και η μαζική παραγωγή της ήταν ότι πιο συναρπαστικό συνέβη στο χώρο της ανάπτυξης φαρμάκων από φυτά, για την καταπολέμηση της ελονοσίας.



Αναλυτικό Μέρος

3.1 Χρωματογραφικοί προσδιορισμοί

Γενικά ο όρος **χρωματογραφία** περιλαμβάνει μια σειρά συσχετιζόμενων μεθόδων διαχωρισμού που είναι εφαρμόσιμες στη χημική ανάλυση και σύνθεση. Στη χρωματογραφία το διάλυμα μείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί κατανέμεται μεταξύ της κινητής και της ακίνητης φάσης. Η κατανομή αυτή στις δύο φάσεις είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας των δυνάμεων των μορίων του διαλύματος και των μορίων των δύο φάσεων. Οι δυνάμεις αυτές μπορεί να είναι πολικές, δυνάμεις που δημιουργούνται από υπάρχοντα ή επαγόμενα ηλεκτρικά πεδία, ή τέλος δυνάμεις van der Waals. Στην περίπτωση που οι δυνάμεις που ασκούνται από τη κινητή και ακίνητη φάση είναι ταυτόσημες τότε δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός.

Η κατανομή διαλυμένων ουσιών μεταξύ των δύο φάσεων οφείλεται κυρίως στα εξής χαρακτηριστικά:

- Στη διαλυτότητα του συστατικού
- Στην προσρόφηση της διαλυμένης ύλης
- Στην ανταλλαγή ιόντων
- Στο μέγεθος και το σχήμα των μορίων της διαλυμένης ουσίας

Συνεπώς σύμφωνα με τις παραπάνω κατηγορίες έχουμε τους ακόλουθους τύπους χρωματογραφίας:

- Χρωματογραφία κατανομής
- Χρωματογραφία προσρόφησης
- Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Γενικά μη ιοντικές ουσίες διαχωρίζονται με τον πρώτο από τους παραπάνω τύπο χρωματογραφίας, ισομερείς ουσίες με το δεύτερο, ιοντικές ουσίες με το τρίτο, και μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους με το τέταρτο τύπο χρωματογραφίας.

Στην υγρή χρωματογραφία οι τύποι διαχωρισμού που μπορούν να διεξαχθούν είναι οι εξής δύο: Διαχωρισμοί κανονικής φάσης και Διαχωρισμοί ανάστροφης φάσης.

Στους διαχωρισμούς κανονικής φάσης, χρησιμοποιούνται πολικές ακίνητες φάσεις (π.χ. silica gel), καθώς επίσης και μη πολικά διαλυτικά μέσα όπως π.χ. το n-πεντάνιο. Στους διαχωρισμούς ανάστροφης φάσης, όπου ακριβώς το αντίθετο φαινόμενο, χρησιμοποιούνται μη πολικές ακίνητες φάσεις και πολικά διαλυτικά μέσα.

Η χρήση ακίνητων φάσεων στις οποίες υπήρχαν ενωμένες χημικές ουσίες έφερε επανάσταση στα συστήματα της HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν υδρογονάνθρακες με 8 και 18 άτομα C «κολλημένοι» χημικά σε επιφάνειες silica gel. Αυτές οι ακίνητες φάσεις είναι συμβατές με μια μεγάλη ποικιλία υδατικών και οργανικών συστημάτων έκλυσης και επηρεάζονται λίγο ή και καθόλου από προσμίξεις ηλεκτρολυτών, ιοντικών ή πολικών ομάδων στο δείγμα [38].

3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) στην κλινική χημεία

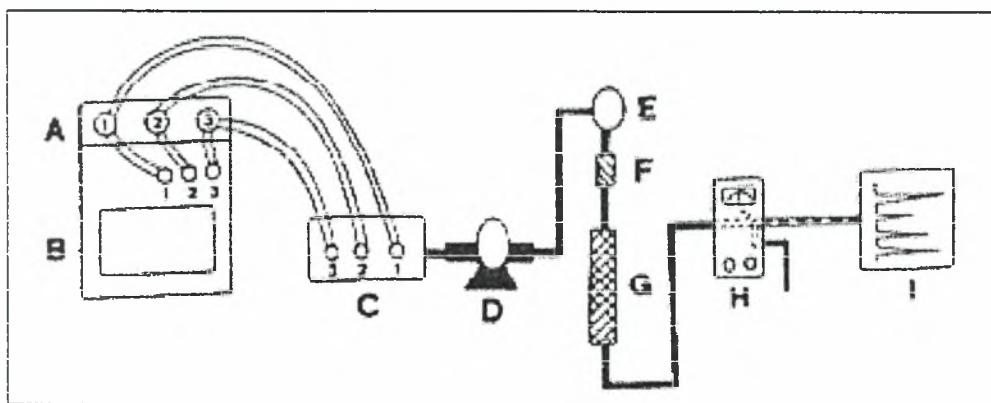
Η **Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης**, ΥΧΥΑ, (High Pressure Liquid Chromatography, **HPLC**) ανήκει γενικά στην κατηγορία της Χρωματογραφίας όπου η κινητή φάση είναι υγρό και η στατική φάση είναι στερεά ή υγρά ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Οι μηχανισμοί κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων μπορεί να είναι προσρόφηση, ιονανταλλαγή, σχετική διαλυτότητα, στερεοπαρεμπόδιση κτλ. Η ΥΧΥΑ επειδή χρησιμοποιεί χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως του φυσικού περιβάλλοντος (τα όρια θερμοκρασίας θέτονται μόνο από το σημείο ζέσεως και το σημείο πήξεως των χρησιμοποιούμενων διαλυτών) βρήκε ευρεία χρήση στο διαχωρισμό ουσιών ευπαθών σε υψηλές θερμοκρασίες, π.χ. πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων κτλ.

Το Σχήμα 4 παριστά διαγραμματικά μια συσκευή ΥΧΥΑ. Αποτελείται από τα εξής δύο μέρη: δύο δοχεία (Α και Β) για την αποθήκευση των διαλυτών που συνδέονται με απαερωτές για την απομάκρυνση του διαλελυμένου αέρα. Τα δύο υγρά αναμιγνύονται με κατάλληλη βαλβίδα αναμίξεως. Η ανάμιξη μπορεί να είναι προγραμματιζόμενη αλλάζοντας τις αναλογίες αναμίξεως ανάλογα με την εφαρμογή. Το μίγμα των διαλυτών αντλείται με μεγάλη πίεση και οδηγείται στο θάλαμο διαχωρισμού, που έχει σταθερή θερμοκρασία. Ο υγρός φορέας (κινητή φάση) πρώτα περνά μέσα από ένα ελικοειδή σωλήνα για να αποκτήσει τη θερμοκρασία του θαλάμου και κατόπιν μέσα από την προστήλη, που έχει τα ίδια ακριβώς υλικά με την κυρίως στήλη. Το δείγμα εισάγεται πρό

της κύριας στήλης είτε με σύριγγα ή με βαλβίδα εισαγωγής και το έκλουσμα της στήλης οδηγείται από τη μια πλευρά ενός διαφορικού ανιχνευτή προς το συλλέκτη των κλασμάτων ή στο δοχείο απορρίψεως των δειγμάτων. Η υψηλή πίεση που απαιτείται να εφαρμοσθεί στην κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, λαμβάνεται με την αντλία. Περισσότερο χρησιμοποιούνται οι αντλίες με κινητήρα, που παρέχουν το διαλύτη με σταθερή ροή και χωρίς διακυμάνσεις. Η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος περιέχει ένα βαθμονομημένο βρόχο (10-100μl), έτσι ώστε να εισάγεται σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά.

Συχνά η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με συνεχή και προοδευτική μεταβολή της σύστασης του υγρού μεταφορέα (κινητή φάση) και αυτό είναι γνωστό ως βαθμιαία έκλουση. Η μεταβολή της σύστασης του διαλύτη προκαλεί μεταβολή στους συντελεστές κατανομής μάζας των ουσιών και συνεπώς βελτιώνει την διαχωριστικότητα. Έτσι οι κορυφές είναι καλύτερα διαχωρισμένες, ενώ οι τελευταίες από αυτές στο χρωματογράφημα δεν έχουν μεγάλη διεύρυνση.

Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται πληθώρα ανιχνευτών, που ανήκουν, κυρίως στην κατηγορία των ανιχνευτών που αποκρίνονται στις μεταβολές συγκεντρώσεων. Οι σπουδαιότεροι από αυτούς είναι οι φωτομετρικοί, οι φθορισμομετρικοί, οι δείκτου διαθλάσεως, οι ηλεκτροχημικοί, οι ραδιενέργειας, οι υπεριώδους κ.α [39].



Σχήμα 4: Διαγραμματική παράσταση συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. A= Διαλύτες, B= Ρυθμιστής διαλυτών, C= Μίκτης διαλυτών, D= Αντλία, E= Βαλβίδα εισαγωγής, F= Προστίλη, G= Κύρια στήλη, H= Ανιχνευτής, I= Καταγραφέας.

3.2.1 Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC

Ο ανιχνευτής σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται για το συνεχή έλεγχο του υγρού που βγαίνει από τη στήλη. Ένας ανιχνευτής HPLC, ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις [40].

1. Χαμηλό επίπεδο θορύβου
2. Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
3. Μικρός χρόνος απόκρισης
4. Μικρός νεκρός όγκος (να μη συνεισφέρει στη διερεύνηση των κορυφών)
5. Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής
6. Ευελιξία σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης
7. Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
8. Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους
9. Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος

Οι ανιχνευτές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες [40]:

A. Γενικοί ανιχνευτές. Οι γενικοί ανιχνευτές μετράνε την αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης, όπως π.χ. οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης και αγωγιμότητας.

B. Ειδικοί ανιχνευτές. Οι ειδικοί ανιχνευτές μετράνε την αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των αναλυόμενων συστατικών, όπως π.χ. οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και πολρογραφικοί ανιχνευτές.

Ο ανιχνευτής αφού μετρήσει την αλλαγή της φυσικοχημικής ιδιότητας τη μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα του ανιχνευτή μπορεί να είναι ανάλογο είτε της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας, είτε να είναι ανάλογο της ροής μάζας της ουσίας.

Ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι παρακάτω:

1. Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους
2. Ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων
3. Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές
4. Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
5. Φασματογράφοι μάζας
6. Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
7. Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές
8. Ανιχνευτές ραδιενέργειας
9. Ανιχνευτές σκεδασμού του φωτός
10. Ανιχνευτές φλόγας
 - i. Ανιχνευτές ιονισμού φλόγας
 - ii. Φωτομετρικοί ανιχνευτές
 - iii. Ανιχνευτές εκπομπής

3.2.2 Η χρήση της HPLC στην κλινική χημεία

Τα τελευταία 20 περίπου χρόνια η υγρή χρωματογραφία υψηλής βρήκε εκτενέστατη εφαρμογή στο τομέα της κλινικής χημείας, όπου το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς ρουτίνας διεκπεραιώνεται με τη συγκεκριμένη τεχνική. Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην κλινική χημεία πρέπει να είναι ευαίσθητες, γρήγορες και αξιόπιστες. Αυτές τις προϋποθέσεις η HPLC τις εκπληρώνει. Η ανάπτυξη της οργανολογίας της HPLC έλυσε το σημαντικό πρόβλημα της ανάλυσης μειγμάτων που περιείχαν παρόμοιες ουσίες. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημά της είναι ότι ελαχιστοποιούνται οι διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος. Επίσης σημαντικό είναι ότι σαν τεχνική έχει αξιοσημείωτη πολλαπλή χρησιμότητα και προσαρμοστικότητα και υπόκειται σε πλήρη αυτοματοποίηση.

Σήμερα το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης HPLC στη κλινική χημεία είναι η δυνατότητα συνδυασμού της τεχνικής με φασματοφωτόμετρο μάζας (HPLC/MS). Ο συνδυασμός αυτός δίνει στο κλινικό χημικό μια ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και διαχωρισμό ουσιών με κλινικό ενδιαφέρον αλλά για την ώρα είναι ένα

σύστημα υψηλού κόστους. Ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα της HPLC αποτελεί η δυνατότητα ταυτόχρονης χρήσης δυο διαχωριστικών μεθόδων σε μια μόνο στήλη, όπως π.χ. ο συνδυασμός χρωματογραφίας κατανομής ανάστροφης φάσης με ιοντοανταλλαγή [38].

3.3 Αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της αρτεμισινίνης, των βιοσυνθετικών προδρόμων της, των παραγώγων και μεταβολιτών της αναπτύχθηκαν αναλυτικές τεχνικές οι οποίες βελτιώθηκαν και εν συνεχεία βελτιστοποιήθηκαν για να εφαρμόζονται σε φυτικά υλικά καθώς και σε βιολογικά υγρά. Η ανάλυση της αρτεμισινίνης είναι ένα πρόβλημα-πρόκληση, αφού το μόριο είναι ασταθές, οι συγκεντρώσεις της στο φυτό είναι μικρές, το άθικτο μόριο δεν βάφεται επαρκώς και άλλα συστατικά του φυτού παρεμβαίνουν στην ανίχνευση.

Πολλές συμβατικές και μη συμβατικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν την αρτεμισίνη. Οι συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία λεπτής στήλης (TLC) [12,35,41], την αέρια χρωματογραφία (GC) [12] και αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό φασματοσκοπία μάζας [12], φασματοσκοπία μάζας σε διάταξη σειράς (MS/MS) [42], υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους [43], αλλά κύρια με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Οι μη συμβατικές τεχνικές ανίχνευσης αρτεμισινίνης είναι η RIA [44] και η ELISA [12].

3.3.1 Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση της αρτεμισινίνης- Σύγκριση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν

3.3.1.1 Συμβατικές μέθοδοι

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας δεν είναι αξιόπιστη τεχνική για την ποσοτικοποίηση της αρτεμισινίνης λόγω του ότι το μόριο δεν έχει μεγάλες δυνατότητες

βαψίματος και λόγω του ότι άλλα φυτικά μόρια παρεμποδίζουν την αναλυτική διαδικασία.

Η αέρια χρωματογραφία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της αρτεμισινίνης. Η αρτεμισινίνη όμως παρουσιάζει αστάθεια στη θέρμανση και έτσι αποικοδομείται χημικά μέσα στη στήλη. Μελέτες σχετικές με τη σταθερότητα της αρτεμισινίνης στη θέρμανση έδειξαν ότι είναι σταθερή μέχρι τους 150°C, αλλά αποικοδομείται όταν θερμαίνεται στους 180-200°C [12]. Οι Siphahimalani et al. (1991) παρουσίασαν μια απλή και γρήγορη μέθοδο για την έμμεση ανίχνευση και προσδιορισμό της αρτεμισινίνης σε επίπεδα νανογραμμαρίων (ng) σε φυτικό ιστό είτε από το φυτό είτε από καλλιέργειες φυτικού ιστού [12]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη γραμμική σχέση που υπάρχει μεταξύ της συγκέντρωσης της αρτεμισινίνης και του εμβαδού των κορυφών δύο προϊόντων, που προέρχονται από την αποσύνθεση της λόγω θέρμανσης. Παρόλα αυτά δεν επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός από την αρτεανουίνη Β, όταν αυτή περιέχεται σε απόσταγμα φυτού, καθώς αυτή έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με ένα από τα προϊόντα της αποσύνθεσης της αρτεμισινίνης [12]. Οι Woerdenbag et al. (1991) κατάφεραν να διαχωρίσουν την αρτεμισινίνη από την αρτεανουίνη Β χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας. Οι Ranasinghe et al. (1993) ανέπτυξαν μια γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης αρτεμισινίνης και των παραγώγων της χρησιμοποιώντας διαδοχική φασματοσκοπία μάζας (MS/MS) [42].

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (ΥΧΥΑ) με ανιχνευτή υπεριώδους έχει επίσης χρησιμοποιηθεί αρκετά αλλά η πληθώρα των συστατικών της *Artemisia Annua* που απορροφούν στο μικρό μήκος κύματος το οποίο απαιτείται για να ανιχνευθεί αποτελεσματικά η αρτεμισινίνη εξαλείφουν την κορυφή της στο χρωματογράφημα. Επίσης η αρτεμισινίνη πρέπει να παραγωγοποιηθεί λόγω της έλλειψης που παρουσιάζει σε χρωμοφόρες ομάδες οι οποίες απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αυτή η διαδικασία μπορεί να βλάψει το αποτέλεσμα του χρωματογραφήματος λόγω της παράλληλης παραγωγοποίησης και των άλλων συστατικών του εκχυλίσματος της *Artemisia Annua* [12].

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί η αρτεμισινίνη με μεγάλη ευαισθησία χωρίς διάσπαση και παρεμπόδιση από άλλα συστατικά είναι η χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ηλεκτοχημικό

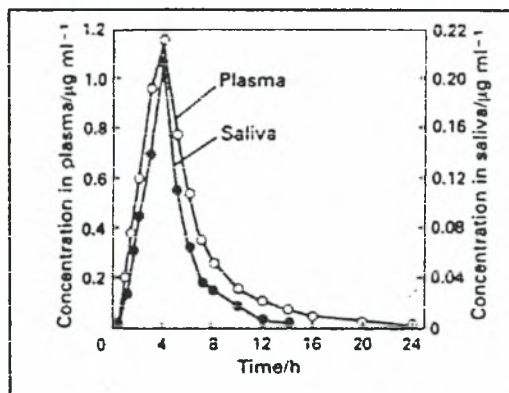
ανιχνευτή. Στην περίπτωση αυτή δεν απαιτείται παραγωγοποίηση ή καθαρισμός του δείγματος. Οι Funk et al., (1980) ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν την έντονη εκλεκτικότητα και ευαισθησία στον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των υπεροξειδίων χρησιμοποιώντας HPLC και ηλεκτοχημικό ανιχνευτή (ECD), σε αρνητικό δυναμικό [12]. Η χρήση δε της εν λόγω μεθόδου ως μέθοδο ανίχνευσης της αρτεμισινίνης περιγράφηκε αρχικά από τους Acton et al. (1985) [12]. Οι Ferreira et al. (1994) περιέγραψαν μια μέθοδο για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης HPLC-ECD επιταχύνοντας και απλοποιώντας την ανάλυση. Η βελτιωμένη αυτή μέθοδος διαχώριζε αποτελεσματικότερα και προσδιόριζε την διυδροαρτεμισινίνη, το αρτεμισιτένιο, την αρτεμισινίνη, και τον καρβοξυλικό μεθυλεστέρα της διυδροαρτεμισινίνης [12]. Η μέθοδος αυτή μετρά αρτεμισινίνη απευθείας λόγω του ότι το υπεροξειδικό τμήμα της υπόκειται σε ηλεκτροχημική αναγωγή. Είναι πολύ ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητα αρτεμισινίνης σε επίπεδα νανογραμμαρίου, ενώ σε σύγκριση με την HPLC-UV είναι 100 φορές πιο ευαίσθητη [36]. Ακόμη είναι ειδική για παράγωγα αρτεμισινίνης που περιέχουν την υπεροξειδική γέφυρα, όχι όμως για εκείνα που την στερούνται. Στις μετρήσεις με HPLC-ECD δεν παρεμβάλλονται άλλα συστατικά του εκχυλίσματος του φυτού, πρόβλημα που υπάρχει σε μεθόδους TLC και HPLC-UV, όμως το σύστημα αυτό απαιτεί πολύ συγκεκριμένες συνθήκες ανάλυσης και είναι ιδιαίτερα ευπαθές. Στην ίδια εργασία των Ferreira et al., έγινε σύγκριση των μεθόδων HPLC-EC και αέριας χρωματογραφίας (GC) και βγήκαν τα συμπεράσματα: α) Και οι δύο μέθοδοι παρέχουν ικανοποιητικού επιπέδου διαχωρισμό της αρτεμισινίνης από τα βιολογικά της πρόδρομα, β) Η HPLC με ηλεκτροχημική ανίχνευση είναι 10 φορές πιο ευαίσθητη από την GC αναφορικά με την ανίχνευση της αρτεμισινίνης.

Οι περισσότερες περιπτώσεις των συμβατικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν παραπάνω είναι ειδικές για την αρτεμισινίνη αλλά δεν είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να την ανιχνεύσουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε δείγματα φυτικού ιστού από μικρά δενδρύλλια ή από καλλιέργειες κυττάρων ή ιστού.

3.3.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης αρτεμισινίνης και δίδυδροαρτεμισινίνης με HPLC-UV που περιλαμβάνουν παραγωγοποίηση

Το 1986 οι Zhao Shishan και Zeng Mei-Yi παρουσίασαν μια μέθοδο για το προσδιορισμό επιπέδων αρτεμισινίνης σε πλάσμα ζώων που βασίζεται στη μετατροπή της αρτεμισινίνης στο παράγωγό της Q260 το οποίο απορροφά ισχυρά στα 260 nm. Για να γίνει η εν λόγω μετατροπή το διάλυμα αρτεμισινίνης αναμίχθηκε με 0,16% NaOH στους 45 °C για 30 min, και έπειτα εξουδετερώθηκε με οξικό οξύ.. Το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου προσδιορίστηκε στα 3 ng/ml [45].

Το 1987 σε εργασία του ο Zhao Shishan, ανέπτυξε στο ίδιο πρότυπο με την προηγούμενη εργασία του μια μέθοδο για το προσδιορισμό αρτεμισινίνης στον ανθρώπινο ορό και στο σάλιο με όριο ανίχνευσης στα 2,5 ng/ml. Στο Σχήμα 5 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα και στο σάλιο ενός ατόμου ανά 4 ώρες, για διάστημα 24 ωρών, όπως προέκυψαν από την παραπάνω εργασία [46].



Σχήμα 5: Συγκεντρώσεις αρτεμισινίνης σε πλάσμα και σάλιο ανά 4 ώρες σε εθελοντή που του χορηγήθηκε κάψουλα αρτεμισινίνης. Δόση: 10mg/kg. Ο εθελοντής ήταν άνδρας 28 ετών, βάρος 60 κιλά.

Οι Xuan-de Luo et al. (1987) ανέπτυξαν μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο για το προσδιορισμό της διυδροαρτεμισινίνης που βασίζεται στην παραγωγοποίησή της με διακετύλο-διυδρο-φλουορεσκίνη (στους 40 °C για 4 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου για 8 ώρες) και προσδιορισμό με HPLC-UV (235 nm). Η ευαισθησία της μεθόδου που υπολογίστηκε στα 0,1ng την καθιστά ικανή να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακοκινητικές μελέτες [47].

3.3.2 Μη συμβατικές μέθοδοι

Οι ανοσοραδιοϊσοτοπική (RIA) και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική (ELISA) μέθοδοι είναι πιο ευαίσθητες και πολύ ειδικές. Η RIA είναι πιο ευαίσθητη σαν μέθοδος, αλλά η χρήση ραδιοϊσοτόπων παρουσιάζει μια πλειάδα προβλημάτων που έχουν να κάνουν με τις προϋποθέσεις χρήσης, αβέβαιη σταθερότητα, υψηλό κόστος, κινδύνους για την υγεία των χρηστών, και δυσκολίες στην απόρριψή τους. Για τους λόγους αυτούς η ELISA είναι πιο χρησιμοποιούμενη και ιδιαίτερα δημοφιλής σαν μέθοδος και βασίζεται στην ειδικότητα του αντισώματος για την υπεροξειδική γέφυρα [12].

Οι Ferreira και Janick (1996) ανέπτυξαν μια ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο που εμπεριείχε την παραγωγή της αρτεμισινίνης σε καρβοξυλμεθυλεστέρα διυδροαρτεμισινίνης σε τρία στάδια και την σύνδεσή της με αλβουμίνη ορού μόσχου (BSA). Η συζευγμένη αρτεμισινίνη-BSA χορηγήθηκε σε κουνέλια προκειμένου να παραχθούν πολυκλωνικά αντισώματα. Η μέθοδος αυτή μπορούσε να ανιχνεύσει 1.5 ng/ml αρτεμισινίνης και παρουσιαζόταν να είναι 400 φορές πιο ευαίσθητη από τη μέθοδο προσδιορισμού με HPLC-ECD [48].

Γενικότερα αυτές οι μη συμβατικές μέθοδοι είναι επίπονες διότι απαιτούν την παραγωγή πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Πειραματικό Μέρος

4.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της πτυχιακής αυτής εργασίας ήταν η διερεύνηση ανάπτυξης απλών τεχνικών παραγωγοποίησης της αρτεμισινίνης και του δραστικού βιολογικού μεταβολίτη της, της διυδροαρτεμισινίνης, με στόχο την μετατροπή τους σε παράγωγα που να είναι πιο ευαίσθητα από τα αρχικά μόρια ως προς την ανίχνευσή τους στο υπεριώδες (UV).

Οι δραστηριότητες της εργασίας αυτής προσανατολίστηκαν στην μελέτη της συμπεριφοράς των προαναφερθέντων μορίων σε όξινο και βασικό περιβάλλον παρουσία θέρμανσης. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια χρωματογραφικής ανάλυσης σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση στο υπεριώδες (HPLC-UV).

4.2 Υλικά και Όργανα

4.2.1 Αντιδραστήρια

- Αρτεμισινίνη και διυδροαρτεμισινίνη καθαρότητας 99,6%, προσφορά της εταιρίας Dafra Pharma S.A (Βέλγιο).
- Μεθανόλη (CH₃OH) για HPLC της εταιρίας Labscan
- Αιθανόλη (CH₃CH₂OH) για HPLC της εταιρίας Labscan
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN) για HPLC της εταιρίας Labscan
- Νερό για HPLC της εταιρίας Labscan
- Υδροχλώριο (HCl) 37% της εταιρίας Merck
- Καυστικό νάτριο (NaOH) της εταιρίας Sigma

4.2.2 Διαλύματα-Παρασκευή διαλυμάτων

- **Διαλύματα εργασίας**
 - Παρασκευάστηκε ένα αιθανολικό διάλυμα αρτεμισινίνης συγκέντρωσης 10mg/ml από το οποίο με αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα μικρότερων συγκεντρώσεων.

- Παρασκευάστηκε αιθανολικό διάλυμα διυδροαρτεμισινίνης συγκέντρωσης 3mg/ml , από το οποίο με αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα μικρότερων συγκεντρώσεων.
 - Παρασκευάστηκε αρχικό αιθανολικό διάλυμα HCl 2N, από το οποίο με αραιώση σε αιθανόλη παρασκευάστηκαν διαλύματα HCl 1N και 0.5N.
 - Παρασκευάστηκε αιθανολικό διάλυμα NaOH 1N.
- **Διαλύματα για τη βαθμονόμηση**
 - Παρασκευάστηκαν αιθανολικά διαλύματα διυδρο-αρτεμισινίνης αρχικών συγκεντρώσεων 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml και 250 µg/ml.
 - **Διαλύματα κινητής φάσης**
 - Χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση αναλογίας 50% μεθανόλη (HPLC) – 50% νερό (HPLC) καθώς και κινητή φάση αναλογίας 40% ακετονιτρίλιο (HPLC) – 60% νερό (HPLC).

4.2.3 Όργανα

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), Hewlett Packard 1100, εφοδιασμένο με απαερωτή αερίων, βαλβίδα έγχυσης τύπου Reodyne (20 µl) και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV-vis). Η στήλη ήταν αντίστροφης φάσης τύπου HyPURITY Advance (5µm) με διαστάσεις 150x4,6 mm και έφερε προστήλη (guard column) για την προστασία της. Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων το σύστημα βρισκόταν σε θερμοστάτηση στους 25°C. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml/min Η κινητή φάση ήταν μίγμα ακετονιτριλίου (CH₃CN) και νερού με αναλογία 40:60 όσον αφορά τη περίπτωση της διυδρο-αρτεμισινίνης, και μίγμα μεθανόλης και νερού σε αναλογία 50:50 όσον αφορά τη περίπτωση της αρτεμισινίνης. Το νερό περιείχε 10% μεθανόλη προς αποφυγή ανάπτυξης μικροβιακών πληθυσμών. Η έκλουση ήταν ισοκρατική και στις δύο περιπτώσεις.
- Πρόγραμμα HP Chem Station για τον έλεγχο των παραμέτρων λειτουργίας του συστήματος της υγρής χρωματογραφίας και για την επεξεργασία και ολοκλήρωση

του χρωματογραφικού σήματος. Η ποσοτικοποίηση των κορυφών έγινε με βάση το εμβαδόν τους.

- Φασματοφωτόμετρο UV Hitachi.
- Υδατόλουτρο Polyscience 9601 (ΗΠΑ), με ακρίβεια ρύθμισης της θερμοκρασίας $\pm 0,1$ °C.
- Αναλυτικός ζυγός OHAUS με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
- Αναδευτήρας (Vortex)
- Στατώ
- Σιφόνια των 5 ml, 10ml και σιφόνια ακριβείας των 1 ml, 2 ml, 3 ml, 10 ml, πιπέτες του 1 ml, 5 ml, δοκιμαστικοί σωλήνες, ογκομετρικές φιάλες των 20 ml, 50 ml, 100ml και κυψελίδες χαλαζία διαδρομής 1mm. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικοί κύλινδροι και κωνικές φιάλες για την παρασκευή της κινητής φάσης.

4.3 Συμπεριφορά αρτεμισινίνης σε όξινο και βασικό περιβάλλον

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμίχθηκε 1ml από το αιθανολικό διάλυμα αρτεμισινίνης 10 mg/ml, με 1ml αιθανολικού διαλύματος HCl 1N. Το νέο διάλυμα αναδευτήκε στο vortex και στη συνέχεια οδηγήθηκε στο θερμοστάτη για θέρμανση στους 60°C για 60min. Η απορρόφηση του παρασκευασθέντος διαλύματος στο υπεριώδες καταγράφηκε δύο φορές, τη πρώτη φορά πριν τη θέρμανσή του και τη δεύτερη φορά μετά τη θέρμανση του. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο πίνακα II.

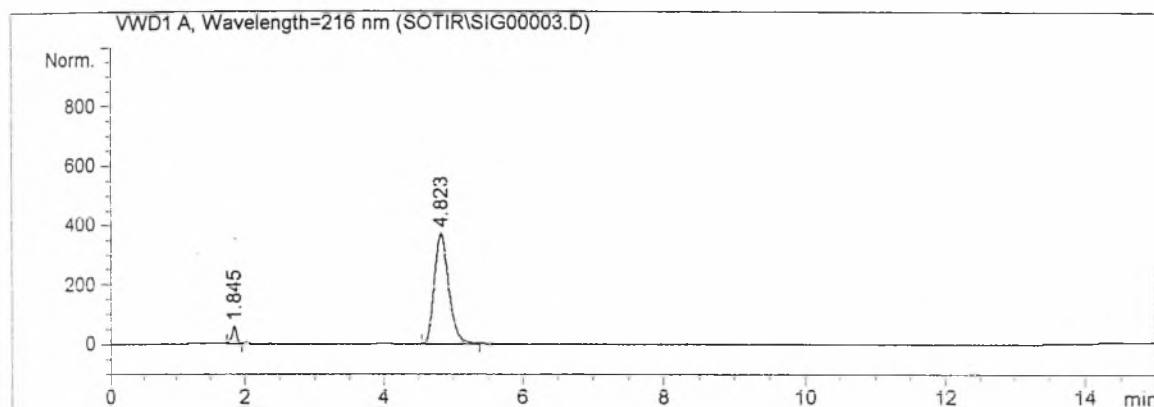
λ (nm)	Abs (mAU) σε t = 0 min	Abs (mAU) σε t = 60 min
200	1.041	1.200
216	2.114	2.400
226	0.987	1.600
236	0.934	1.109
250	0.751	1.000
270	0.388	0.800

Πίνακας II: Απορρόφηση αιθανολικού διαλύματος αρτεμισινίνης σε HCl 1N, τελικής συγκέντρωσης 5 mg/ml στο υπεριώδες, σε χρόνο t=0 min και t=60 min.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω πίνακα η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα της αρτεμισινίνης στο υπεριώδες εμφανίζεται σε μήκος κύματος 216 nm.

Το επόμενο βήμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η ανάλυση με το σύστημα HPLC-UV στα 216 nm. Το χρωματογράφημα που πήραμε για το διάλυμα χωρίς θέρμανση φαίνεται στο Σχήμα 6.

Έγινε χρωματογράφιση και για το διάλυμα μετά από τη θέρμανση, όμως δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή σε σχέση με το χρωματογράφημα του διαλύματος πριν τη θέρμανση. Άρα το συμπέρασμα το οποίο εξάγεται είναι ότι όσον αφορά τη θέρμανση της αρτεμισινίνης σε όξινο περιβάλλον δεν προκύπτει σχηματισμός παραγώγου της.



Σχήμα 6: Χρωματογράφημα αιθανολικού διαλύματος αρτεμισινίνης σε HCl 1N, τελικής συγκέντρωσης 5 mg/ml. Η κορυφή της αρτεμισινίνης είναι αυτή που έχει χρόνο κατακράτησης 4.823 min.

Από το παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες η αρτεμισινίνη παρουσιάζει χρόνο ανάκτησης περίπου 4.8 min. Το όριο ανίχνευσης για τη συγκεκριμένη ανάλυση, συντηρητικά υπολογιζόμενο, είναι 100μg/ml, ενώ η ευαισθησία του χρωματογραφικού ανιχνευτή είναι 1μg. Η ευαισθησία αυτή είναι ικανοποιητική και δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της ποσότητας της δραστικής ουσίας που περιέχεται στα φαρμακευτικά σκευάσματα, αλλά όχι στα βιολογικά υγρά.

Δοκιμάστηκε πειραματικά η θέρμανση διαλύματος αρτεμισινίνης μετά από προσθήκη βάσης, συγκεκριμένα NaOH 1N στη θέση του HCl 1N. Ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία όμως δεν προέκυψαν ενθαρρυντικά στοιχεία για τον σχηματισμό παραγώγου.

4.4 Συμπεριφορά διυδρο-αρτεμισινίνης σε όξινο και βασικό περιβάλλον μετά από θέρμανση

Αναμίχθηκαν 1ml από το αιθανολικό διάλυμα διυδρο-αρτεμισινίνης συγκέντρωσης 3 mg/ml, με 2ml HCl 1N σε δοκιμαστικό σωλήνα και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε στο vortex. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 1mg/ml.

Στη συνέχεια έγινε χρωματογράφιση στο σύστημα της HPLC στα 216 nm χωρίς να έχει προηγηθεί θέρμανση του διαλύματος. Από το χρωματογράφημα στο Σχήμα 7A φαίνεται ότι ο χρόνος ανάκτησης της διυδροαρτεμισινίνης είναι 4 min και το εμβαδόν της κορυφής είναι 1136 mAU x s.

1 ml αιθανολικού διαλύματος διυδροαρτεμισινίνης αναμίχθηκε με 1 ml αιθανολικού διαλύματος HCl 1N, και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε σε vortex. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 1 mg/ml. Το διάλυμα δεν θερμάνθηκε και ακολούθησε χρωματογράφησή του στο σύστημα της HPLC στα 254 nm αυτή τη φορά. Από το χρωματογράφημα του Σχήματος 7B φαίνεται ότι ο χρόνος ανάκτησης της ουσίας παραμένει σταθερός στα 4 min, άρα πρόκειται για το ίδιο προϊόν. Το εμβαδόν της κορυφής βρέθηκε στα 120 mAU x s.

Με θέρμανση στους 60 °C για 60 min παρατηρήθηκε ότι δημιουργήθηκε ένα προϊόν που παρουσιάζοταν στα 6 min. Το Σχήμα 7Γ αντιστοιχεί στο διάλυμα με χρόνο θέρμανσης 60 min και δείχνει την κορυφή αυτή που έχει εμβαδόν περίπου 24000 mAU x s. Αν συγκριθούν τα σχήματα 7B και 7Γ θα διαπιστωθεί ότι με τη θέρμανση επιτεύχθηκε αύξηση της κορυφής κατά 200 φορές.

Αυτό που παρατηρήθηκε κατά τις διαδοχικές ενέσεις στους καθορισμένους χρόνους, ήταν ότι η κορυφή του παραγώγου της διυδροαρτεμισινίνης παρουσιάζοταν σε χρόνο 6 min, που σημαίνει το σχηματισμό ενός νέου μορίου, το οποίο φαίνεται να απορροφά ισχυρά στο υπεριώδες.

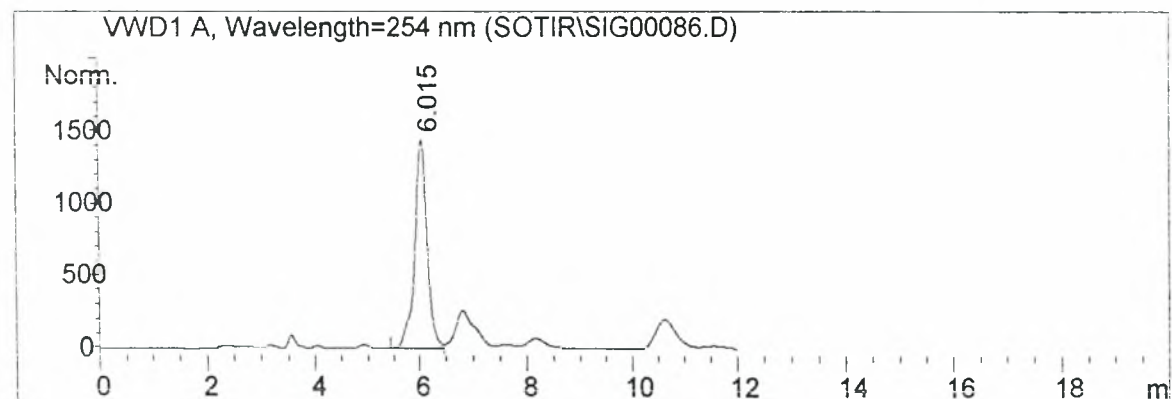
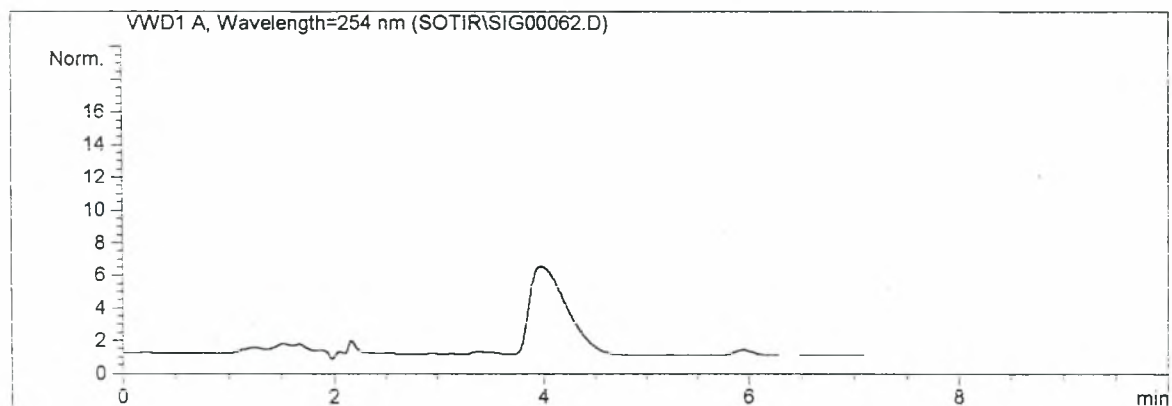
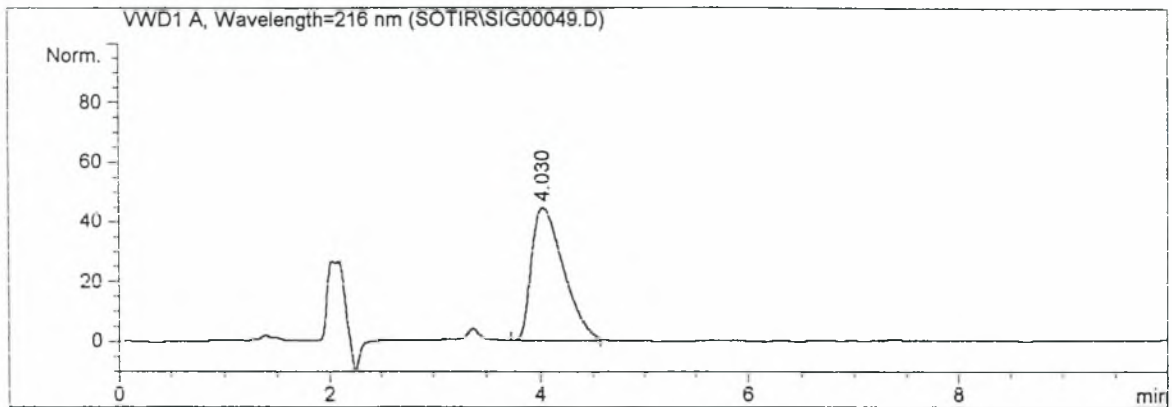
Αυτό επιβεβαιώθηκε μετά τη λήψη του φάσματος του προϊόντος από το σύστημα της HPLC με χρόνο κατακράτησης 6 min που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8. Το μέγιστο της απορρόφησης για το συγκεκριμένο προϊόν βρέθηκε στην περιοχή 250 – 260 nm.

Επόμενος στόχος ήταν η κινητική παρακολούθηση της αντίδρασης σχηματισμού του παραπάνω παραγώγου. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κατά το



οποίο αναμίχθηκαν 3 ml αιθανολικού διαλύματος διυδροαρτεμισινίνης συγκέντρωσης 2 mg/ml με 3 ml αιθανολικού διαλύματος HCl 2N, το διάλυμα αυτό αναδεύτηκε και στη συνέχεια οδηγήθηκε στο υδατόλουτρο για θέρμανση στους 60°C. Η κινητική της αντίδρασης παρακολούθηθηκε σε χρόνους 0, 20, 40, 50, 60, και 70 min., καθώς σε αυτά τα χρονικά διαστήματα μέρος τους θερμαινόμενου διαλύματος εγχύονταν στο χρωματογραφικό σύστημα. Αυτό που παρατηρήθηκε κατά τις διαδοχικές ενέσεις στους καθορισμένους χρόνους, ήταν ότι η κορυφή του παραγώγου της αρτεμισινίνης που παρουσιάζόταν με χρόνο κατακράτησης 6 min ($t_R=6$) αυξανόταν ποσοτικά μέχρι τα 60 min και μετά παρουσίαζε σταθεροποίηση, δηλαδή πλατώ (Σχήμα 9).

Όπως υπολογίστηκε η ευαισθησία του χρωματογραφικού συστήματος στο παράγωγο αναγόμενη σε συγκέντρωση της διυδροαρτεμισινίνης είναι 0,04 µg. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που ακολουθήθηκε τοποθετείται στα 2 mg/ml. Όμως με χρήση βρόγχου μεγαλύτερου όγκου (π.χ. 100µl αντί για 20 µl που χρησιμοποιήθηκε) καθώς και με καταλληλότερη προσθήκη διαλυμάτων οξέος το όριο ανίχνευσης μπορεί να τοποθετηθεί στα επίπεδα του 0,2 µg/ml. Περαιτέρω μείωση του ορίου ανίχνευσης πιθανότατα θα μπορούσε να προκύψει από απομόνωση του παραγώγου ή / και από συμπύκνωση των τελικών διαλυμάτων. Γενικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής είναι ενθαρρυντικά γιατί είναι δυνατός ο προσδιορισμός της διυδροαρτεμισινίνης, με όριο ανίχνευσης τέτοιο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις σε φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και μετά από περαιτέρω βελτιώσεις σε βιολογικά δείγματα.

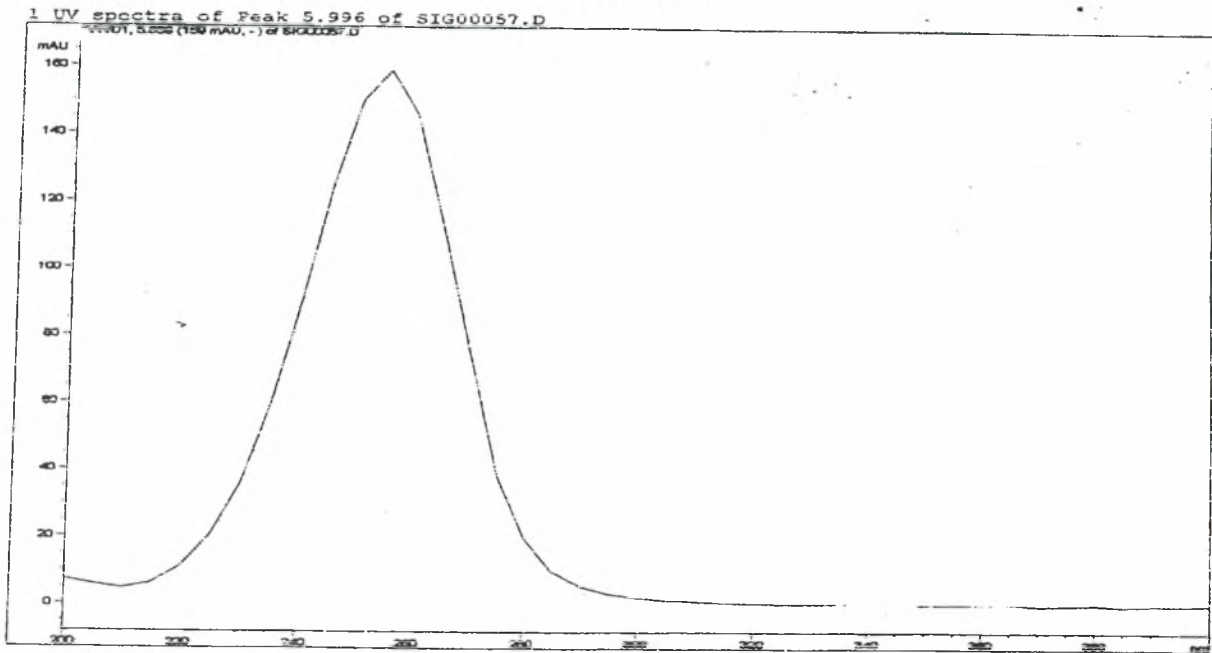


Σχήμα 7: Α. Χρωματογράφημα (με ανίχνευση στα 216 nm) διαλύματος διυδροαρτεμισίνης συγκέντρωσης 1 mg/ml, σε όξινο περιβάλλον, χωρίς θέρμανση.

Β. Χρωματογράφημα (με ανίχνευση στα 254 nm) διαλύματος διυδροαρτεμισίνης συγκέντρωσης 1 mg/ml, σε όξινο περιβάλλον, χωρίς θέρμανση.

Γ. Χρωματογράφημα (με ανίχνευση στα 254 nm) διαλύματος διυδροαρτεμισίνης συγκέντρωσης 1 mg/ml, σε όξινο περιβάλλον, με θέρμανση στους 60 °C για 60min.

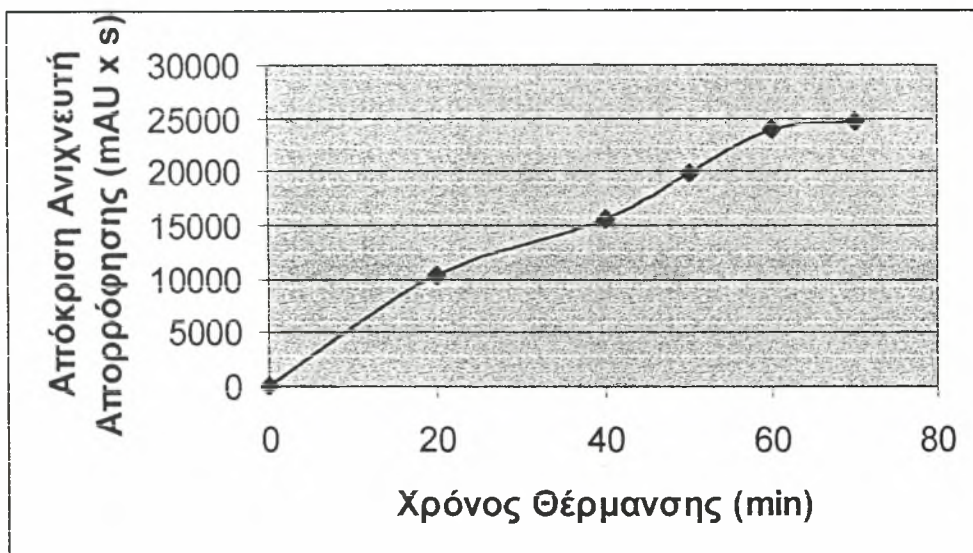
Print of window 39: 1 UV spectra of Peak 5.996 of SIG00057.D



PLC1100 26/7/2002 12:28:23 μμ NGT

Page 1 of 1

Σχήμα 8: Καταγραφή φάσματος στο υπεριώδες της κορυφής που εμφανίζεται με $t_R = 6$ min του σχήματος 2Γ.



Σχήμα 9: Τιμές απόκρισης του ανιχνευτή (Peak Areas) για το παραγόμενο προϊόν σε σχέση με το χρόνο θέρμανσης στους 60 °C. Η συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων διδροαρτεμισινίνης ήταν 1 mg/ml.

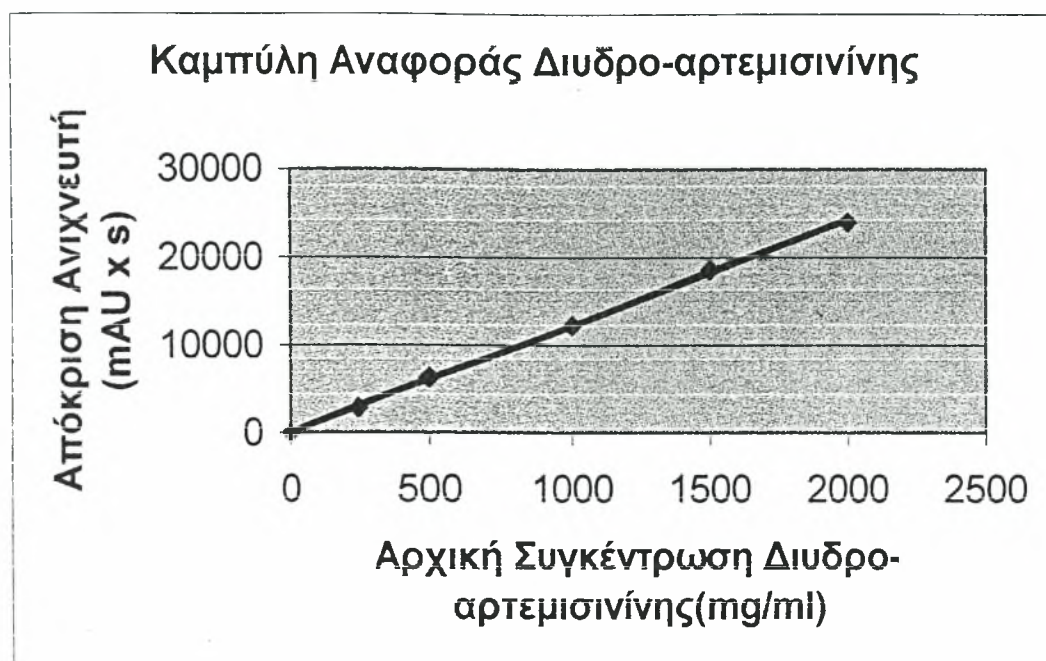
4.5 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Για να την αξιολόγηση της αξιοπιστία της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της διυδροαρτεμισινίνης πρέπει να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς της. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν αιθανολικά διαλύματα διυδροαρτεμισινίνης με συγκεντρώσεις 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml και 0,125 mg/ml. Εν συνεχεία σε 3 ml από το κάθε διάλυμα προστέθηκε 1 ml HCl 2N και τα θερμάνθηκε στους 60 °C για 60 min. Στον άξονα των τετημένων (χ) βρίσκονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων και στον άξονα των τεταγμένων (ψ) οι μέσοι όροι των τιμών των εμβαδόν που πήραμε απο το χρωματογράφημα του κάθε δείγματος (Πίνακας III).

Αρχική συγκέντρωση διυδροαρτεμισινίνης (μg/ml)	Τελική συγκέντρωση διυδροαρτεμισινίνης (μg/ml)	Μέση τιμή απόκρισης (Peak Area) σε mAU x s	Τυπική απόκλιση (n=3) σε mAU x s	Σχετική τυπική απόκλιση
250	125	2876	172,6	6%
500	250	6307	365,8	5,8%
1000	500	12263	821,6	6,7%
1500	750	18579	1151,9	6,2%
2000	1000	24000	1536	6,4%

Πίνακας III: Τιμές απόκρισης για το παραγόμενο προϊόν σε σχέση με τις αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων διυδροαρτεμισινίνης τα οποία στη συνέχεια αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις 1000 μg/ml, 750 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml.

Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 10):



Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς για το παραγόμενο προϊόν μετά από θέρμανση (60°C για 60 min) σε όξινο περιβάλλον διαλυμάτων διυδροαρτεμισινίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης είναι ίσος με $r=0,9993$. Η εξίσωση που χαρακτηρίζει τη καμπύλη του σχήματος 5 είναι η $\psi=12,12\chi+65,575$. Άρα η καμπύλη είναι πολύ καλή και επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της μεθόδου.

4.6 Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα είναι δυνατόν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα αναφορικά με το αν και κατά πόσο επιτεύχθηκε ο σκοπός της εργασίας αυτής. Όπως προαναφέρθηκε ο σκοπός ήταν η διερεύνηση απλών, οικονομικών, αξιόπιστων και πρωτότυπων τεχνικών παραγωγοποίησης της αρτεμισινίνης και του δραστικού βιολογικού μεταβολίτη της, της διυδρο-αρτεμισινίνης, με στόχο την ανάπτυξη οικονομικών, αξιόπιστων και πρωτότυπων μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση στο υπεριώδες (HPLC-UV).

Σχετικά με την αρτεμισινίνη διαπιστώθηκε ότι με προσθήκη οξέος (HCl 1M) και θέρμανση για 1 ώρα στους 60°C δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές, ούτε ποιοτικές ούτε ποσοτικές, σχετικά με το αρχικό διάλυμα πριν τη θέρμανση. Επομένως δεν διαφαίνεται δυνατότητα σχηματισμού παραγώγου που να ικανοποιεί τους στόχους της εργασίας μας.

Ωστόσο, καθόσον η τιμή της ευαισθησίας του αναλυτικού συστήματος HPLC-UV τοποθετείται στο 1μg αρτεμισινίνης και αυτή του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ανάλυσης στα 100μg/ml, προκύπτει ότι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δραστικής ουσίας στα φαρμακευτικά σκευάσματα, όχι όμως και σε βιολογικά υγρά που οι συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρότερες.

Όσον αφορά την υδροαρτεμισινίνη διαπιστώθηκε ότι η τιμή της απορρόφησης της στο υπεριώδες είναι μικρή και δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί ως έχει σε ένα αναλυτικό σύστημα HPLC-UV. Ωστόσο μετά από θέρμανση της σε όξινο περιβάλλον διαπιστώθηκε η δημιουργία ενός παραγώγου, το οποίο εμφανίζεται σε διαφορετικό χρόνο κατακράτησης (t_R) από αυτό της διυδροαρτεμισινίνης και το οποίο απορροφά ισχυρά στην περιοχή 250-260 nm. Καθιστώντας δυνατό τον έμμεσο, μέσω αυτού του παραγώγου, προσδιορισμό της διυδροαρτεμισινίνης. Μελετήθηκε η κινητική της αντίδρασης σε διαφορετικούς χρόνους θέρμανσης και βρέθηκε ότι για την ποσοτική μετατροπή του αρχικού μορίου της διυδροαρτεμισινίνης στο παράγωγο της απαιτείται θέρμανση για 60min στους 60°C.

Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε διαλύματα διυδροαρτεμισινίνης με εύρος συγκεντρώσεων από 125 $\mu\text{g/ml}$ έως 1000 $\mu\text{g/ml}$ βρέθηκε συμπεριφέρεται γραμμικά στην περιοχή αυτή. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου όπως αναπτύχθηκε τοποθετείται στα 2 $\mu\text{g/ml}$, αλλά υπάρχει δυνατότητα αισθητής βελτίωσης του.

Από τα παραπάνω ενθαρρυντικά αποτελέσματα προκύπτει ότι η μέθοδος έμμεσου προσδιορισμού της διυδροαρτεμισινίνης με ανιχνευτή υπεριώδους, μετά από παραγωγοποίησή της με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον, είναι μια απλή, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος και προτείνεται για την ανάλυση και ποσοτικοποίησή της διυδροαρτεμισινίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και, μετά από κατάλληλες βελτιώσεις, σε δείγματα βιολογικών υγρών.

Βιβλιογραφία

1. Παπαδημητρίου Μ., *Εσωτερική Παθολογία, Τόμος Πρώτος*, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, (1998).
2. Σφηκάκης Π., Γιαμαρέλλου Ε., *Λοιμώξεις & Αντιμικροβιακή Χημειοθεραπεία*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, (1991).
3. Πάπυρος Larousse Britannica, Τόμος 23.
4. Maeno Y., Toyoshima T., Fujioka H., Ito, Y., Meshnick S.R., Benakis A., Milhous W.K., Aikawa M., *Morphologic effects of artemisinin in Plasmodium falciparum*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 49, 485-491, (1993).
5. Jung M., Li X., Bustos D.A., Elsohly H.N, Mcchesney J.D., Milhous W.K., *Synthesis and antimalarial activity of (+)- deoxoartemisinin*, J. Med. Chem. 33, 1516-1518, (1990).
6. Zhang F., Gosser D.K., Jr Meshnick S.R, *Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu)*, Biochem. Pharmacol. 43, 1805-1809, (1992).
7. Brossi A., Venugopalan B., Dominguez G.L, Yeh H.J.C., Flippen-Angerson J.L., Buchs P., Luo X.D., Milhous W., Peters W., *Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties*, J. Med. Chem. 31, 645-650, (1988).
8. Klayman D.L., *Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China*, Science 228, 1049-1055, (1985).
9. Krungkrai S.R., Yuthavong Y., *The antimalarial action on Plasmodium falciparum of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 710-714, (1987).
10. Elford B.C., Roberts M.F., Phillipson J.D., Wilson R.J., *Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 434-436. (1987).
11. Meshnick S.R., Tsang T.W., Lin F.B., Pan H.Z., Chang C.N., Kuypers F., Chiu D., Lubin B., *Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu*, Prog. Clin. Biol. Res. 313, 95-104, (1989).

12. Dhingra V, Vishweshwar Rao K., Lakshmi Narasu M., *Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drug*, Life Sciences 66, 279-300, (2000).
13. Meshnick S.R., *Free radicals and antioxidants*, Lancet 344, 1441-1442, (1994).
14. Meshnick S.R., Yang Y.Z., Lima V., Kuypers F., Kamchonwongpaisan S., Yuthavong Y., *Iron dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu)*, Antimicrob. Agents Chemother. 37, 1108-1114, (1993).
15. Wei N., Sadrzadeh S.M., *Enhancement of hemin-induced membrane damage by artemisinin*, Biochem. Pharmacol. 48, 737-741, (1994).
16. Chou A., Chevli R., Fitch C.D., *Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites*, Biochemistry 19, 1543-1549, (1980).
17. Stahel E., Druilhe R., Gentilini M., *Antagonism of chloroquine with other antimalarials*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 82, 221, (1988).
18. Yang Y.Z., Asawamahasakda W., Meshnick S.R., *Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin*, Biochem. Pharmacol. 46, 336-339, (1993).
19. Asawamahasakda W., Ittarat I., Pu Y.M., Ziffer H., Meshnick S.R., *Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins*, Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1854-1858, (1994).
20. Meshnick S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan S., *Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy*, Microbiological Reviews 60(2), 301-315, (1996).
21. Gera R., Khalil A., *Artemisinin and its derivatives*, Indian Pediatrics 34, 813-816, (1997).
22. Duc D.D., De Vries P.J., Khanh N.X., Binh L.N, Kager P.A., Van Boxtel C.J., *The pharmacokinetics of a single dose of artemisinin in healthy Vietnamese subjects*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 51, 785-790, (1994).
23. Na-Bangchang K., Karbwang J., Thomas C.G., Thanavibul A., Sukontason K., Ward S.A., Edwards G., *Pharmacokinetics of artemether after oral*

- administration to healthy Thai males and patients with acute, uncomplicated falciparum malaria*, Br. J. Clin. Pharmacol. 37, 249-253, (1994).
24. Titulaer H.A.C., Zuidema J., Kager P.A., Wetsteyn J.C.F.M, Lugt C.H.B., Merkus F.W.H.M, *The pharmacokinetics of artemisinin after oral, intramuscular, and rectal administration to volunteers*, J. Pharm. Pharmacol. 42, 810-813, (1990).
 25. Tawfik A.F., Bishop S.J., Ayalp A., El-Feraly F.S., *Effects of artemisinin, dihydroartemisinin and arteether on immune responses of normal mice*, Int. J. Immunopharmacol. 12, 385-389, (1990).
 26. Ou-Yang K., Krug E.C., Marr J.J., Berens R.L., *Inhibition of growth factor of Toxoplasma Gondii by qinghaosu and derivatives*, Antimicrob. Agents Chemother. 34, 1961-1965, (1990).
 27. Yang D.M., Liew ND F.Y., *Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis*, Parasitology 106, 7-11, (1993).
 28. Woerdenbag H.J., Moskal T.A., Pras N., Malingre T.M., El-Feraly F.S., Kampinga H.M., Konings A.W.T., *Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells*, J. Nat. Prod. 56, 849-856, (1993).
 29. Beekman A.C., Wierenga P.K., Woerdenbag H.J., Van Uden W., Pras N., Konings A.W., El-Feraly F.S., Galal A.M., Wikstrom H.V., *Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumor compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumor cells*, Planta Med. 64, 615-619, (1998).
 30. Zheng G.Q., *Cytotoxic terpenoids and flavonoids from Artemisia Annua*, Planta Med. 60, 54-57, (1994).
 31. Beekman A.C., Barentsen A.R., Woerdenbag H.J., Van Uden W., Pras N., Konings A.W., El-Feraly F.S., Galal A.M., Wikstrom H.V., *Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives*, J. Nat. Prod. 60, 325-330, (1997).
 32. Allen P.C., Lydon J., Danforth H.D., *Effects of components of Artemisia Annua on coccidia infections in chickens*, Science 76, 1156-1163, (1997).
 33. Allen P.C., Danforth H.D., Audustine P.C., *Dietary modulation of anian coccidiosis*, Int. J. Parasitol. 28, 1131-114-, (1998).
 34. Πάπυρος Larousse Britannica, Τόμος 11.

35. Roth R.J., Acton N., *A simple conversion of artemisinic acid to artemisinin*, J. Nat. Prod. 52, 1183-1185, (1989).
36. Martinez B.C., Staba J., *The production of artemisinin in Artemisia Annuia*, L. Adv. Cell Cult. 6, 69-87, (1988).
37. Nair M.S.R., Acton N., Klayman D.L., Kendrick K., Basile D.V., Mante S., *Production of artemisinin in tissue cultures of Artemisia Annuia*, J. Nat. Prod. 49, 504-507, (1986).
38. Papadogiannis I. N., *HPLC in Clinical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, (1990).
39. Τσιρόπουλος Ν., Μπακέας Ε., *Εισαγωγή στις εργαστηριακές τεχνικές της Οργανικής Χημείας*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, (1999).
40. Παπαδογιάννης Ι.Ν., Σαμανίδου Β.Φ., *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Πήγασος, Αθήνα, (2000).
41. Klayman D.L., Lin A.J., Acton N., Scovill J.P., Hoch J.M., Milhous W.K., Theorides A.D., *Isolation of artemisinin (qinghaosu) from Artemisia Annuia growing in the United States*, J. Nat. Prod. 47, 715-717, (1984).
42. Ranasinghe A., Sweatlock J.D., Cooks R.G., *A rapid screening method for artemisinin and its congeners using ms/ms: search for new analogues in Artemisia Annuia*, J. Nat. Prod. 56, 552-563, (1993).
43. Melendez V., Peggins O., Brewer T.G., Theorides A.D., *Determination of the antimalarial arteether and its deethylated metabolite dihydroartemisinin in plasma by high-performance liquid chromatography with reductive electrochemical detection*, J. Pharm. Sci. 80, 132-188, (1991).
44. Zhao K.C., Liu C.X., Liang X.T., Mingguary Y., Song Z.Y., *Development of a radio immunoassay for determination of artesunate, a derivative of the antimalarial qinghaosu*, Proc. Chinese Acad. Med. Sci., Pekin Union Medical College 1, 213-217, (1986).
45. Zhao S., Zeng M.Y., *Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma*, Anal. Chem. 58, 289-292, (1986).

46. Zhao S., *High-performance liquid chromatographic determination of Artemisinin (Qinghaosu) in human plasma and saliva*, Analyst 112, 661-664, (1987).
47. Luo X-D., Xie M., Zou A., *Sub-nanogram detection of dihydroartemisinin after chemical derivatization with diacetyldihydrofluorescein followed by high-performance liquid chromatography and UV absorption*, Chromatographia 23, 112-114, (1987).
48. Ferreira J.F.S., Janick J., *Immunoquantitative analysis of artemisinin from Artemisia Annuu using polyclonal antibodies*, Phytochemistry 41, 97-104, (1996).
49. Website: [www. Artesunate.com](http://www.Artesunate.com)



Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Εισαγωγή.....	4
1. Ελονοσία.....	4
1.1 Γενικά.....	4
1.2 Αιτιολογία-Κύκλος ζωής του παρασίτου στον ανθρώπινο οργανισμό.....	4
1.3 Παθογένεια.....	5
1.4 Επιδημιολογικά στοιχεία και δυσκολίες αντιμετώπισης της ελονοσίας.....	6
1.5 Ιστορικά στοιχεία.....	8
1.6 Κατηγορίες ανθελονοσιακών φαρμάκων.....	8
Α) 4-αμινοκινολόνες.....	9
Β) 8-αμινοκινολόνες.....	9
Γ) Κινίνη.....	9
Δ) Ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος.....	9
Ε) Αντιβιοτικά.....	10
ΣΤ) Νεώτερα ανθελονοσιακά.....	10
1.7 Μηχανισμός δράσης αρτεμισινίνης και παραγώγων της.....	10
1.8 Φαρμακοκινητική αρτεμισινίνης και παραγώγων της.....	12
1.9 Κλινικές Μελέτες.....	14
1.10 Άλλες βιολογικές δράσεις της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της.....	14
2. Η Αρτεμισινίνη.....	16
2.1 Artemisia Anuua - Το φυτό από όπου προέρχεται η Αρτεμισινίνη.....	16
2.2 Ιστορικά στοιχεία.....	17
2.3 Χημικά χαρακτηριστικά της αρτεμισινίνης.....	18
2.4 Η αρτεμισινίνη ως ανθελονοσιακό φάρμακο.....	18
2.5 Παράγωγα της αρτεμισινίνης που χρησιμοποιούνται κατά της ελονοσίας.....	19
2.6 Βιοσύνθεση της αρτεμισινίνης.....	21
2.7 Βιοτεχνολογική παραγωγή αρτεμισινίνης.....	25
2.8 Μερικά σκευάσματα αρτεμισινίνης και παραγώγων που κυκλοφορούν στο εμπόριο.....	26
2.9 Συμπεράσματα.....	26
Αναλυτικό Μέρος.....	28
3.1 Χρωματογραφικοί προσδιορισμοί.....	28
3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) στην κλινική χημεία.....	29
3.2.1 Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC.....	31
3.2.2 Η χρήση της HPLC στην κλινική χημεία.....	32
3.3 Αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό της αρτεμισινίνης και των παραγώγων της.....	33
3.3.1 Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση της αρτεμισινίνης- Σύγκριση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν.....	33
3.3.1.1 Συμβατικές μέθοδοι.....	33
3.3.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης αρτεμισινίνης και δίδροαρτεμισινίνης με HPLC-UV που περιλαμβάνουν παραγωγοποίηση.....	36
3.3.2 Μη συμβατικές μέθοδοι.....	37

Πειραματικό Μέρος.....	38
4.1 Σκοπός της εργασίας.....	38
4.2 Υλικά και Όργανα.....	38
4.2.1 Αντιδραστήρια	38
4.2.2 Διαλύματα-Παρασκευή διαλυμάτων.....	38
4.2.3 Όργανα	39
4.3 Συμπεριφορά αρτεμισινίνης σε όξινο και βασικό περιβάλλον	40
4.4 Συμπεριφορά διυδρο-αρτεμισινίνης σε όξινο και βασικό περιβάλλον μετά από θέρμανση.....	42
4.5 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς.....	46
4.6 Συμπεράσματα	48
Βιβλιογραφία	50
Περιεχόμενα.....	55

ΔΙΕΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

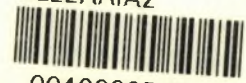
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

Τηλ.: 74.760-61 ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057240