



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΚΕΧΑΓΙΑ ΕΛΕΝΗ

“Ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης σε πλάσμα”.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ.ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ

**ΛΑΡΙΣΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΟ ΕΤΟΣ: 2014-2015**

Διπλωματική εργασία

“Ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης σε πλάσμα”.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσακάλωφ Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- Επιβλέπων Καθηγητής

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας-Συνεπιβλέπων Καθηγητής

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας-Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας δεν θα ήταν εφικτή χωρίς τη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Ευχαριστώ εγκάρδια τον επιβλέποντα Καθηγητή Ανδρέα Τσακάλωφ, για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους, τις συμβουλές και τις διορθώσεις κατά τη συγγραφή, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας μου. Χωρίς την καθοδήγησή του δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας για τη βοήθεια, τη φιλοξενία και το ενδιαφέρον που έδειξαν κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου και ιδιαίτερα την υπεύθυνη Κ. Χατζηνίκου Μαρίνα για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά της κατά τη διάρκεια της έρευνάς μου.

Κεχαγιά Ελένη, Λάρισα, Σεπτέμβριος 2015

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	6
Εισαγωγή	7
Αντιβιοτικά	7
Ορισμός	7
Ιστορία της ανακάλυψης των αντιβιοτικών	7
Ταξινόμηση των αντιβιοτικών	8
Παρενέργειες αντιβιοτικών	10
Η δαπτομυκίνη ως ένα από τα σημαντικότερα αντιβιοτικά που αναπτύχθηκαν τα τελευταία πενήντα χρόνια	10
Από το ινστιτούτο Eli Lilly στο Cubist	11
Το 2003 η έγκριση της δαπτομυκίνης από τον FDA	11
Δομή της δαπτομυκίνης	12
Μηχανισμός δράσης της δαπτομυκίνης	12
Αντιβακτηριακό φάσμα	13
Δόση-Θεραπεία σε ενήλικους	13
Ανεπιθύμητες Ενέργειες	14
Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της δαπτομυκίνης	14
Προσδιορισμός αντιβιοτικών στα βιολογικά υγρά	15
Βιβλιογραφική ανασκόπηση τεχνικών ανίχνευσης και προσδιορισμού της δαπτομυκίνης	15
Γενικά για τη χρωματογραφία	15
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	15
Είδη HPLC	15
Οργανολογία της HPLC	17
Σύστημα αντλίας	17
Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη	17
Στήλες	18
Ανιχνευτές	18
Δημιουργία του προγράμματος επεξεργασίας της sequence	19
Δημιουργία της sequence	23
Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων	24
Αναλυτικές παράμετροι αξιολόγησης	24
Ακρίβεια και Πιστότητα (Accuracy)	25
Επαναληψιμότητα	25
Εκλεκτικότητα – Εξειδίκευση	26

Γραμμικότητα και Εύρος	26
Σταθερότητα	26
Ανιχνευσιμότητα (LOD και LOQ)	27
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	27
Συσκευές	28
Υλικά-Αναλώσιμα	28
Ουσίες για τα πρότυπα διαλύματα	28
Παρασκευή διαλυτών και προτύπων	29
Ανάπτυξη της μεθόδου	29
Προκατεργασία δειγμάτων	30
Αποτελέσματα	32
Τεχνική της καμπύλης αναφοράς	32
Τεχνική του εσωτερικού προτύπου	32
Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς	33
Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στο πλάσμα	35
Επικύρωση της μεθόδου	39
Εκλεκτικότητα (<i>Specificity</i>)	39
Γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς (<i>Calibration curve linearity</i>)	41
Επαναληψιμότητα και ακρίβεια της μεθόδου (<i>precision and accuracy</i>)	43
Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ)	46
Σταθερότητα(<i>Stability</i>)	46
Συμπεράσματα-Συζήτηση	47
Βιβλιογραφία	49
Παράρτημα	52

Περίληψη

Η δαπτομυκίνη είναι ο πρώτος αντιπρόσωπος μιας νέας ομάδας αντιβιοτικών που ονομάζεται κυκλικά λιποπεπτιδικά αντιβιοτικά. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της στο πλάσμα των ασθενών είναι σημαντικός για την βελτιστοποίηση της δοσολογίας του φαρμάκου. Η παρούσα διπλωματική έχει ως στόχο την ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης σε δείγματα πλάσματος ασθενών με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή σειράς φωτοδίοδων (HPLC-PDA).

Κατά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας δοκιμαστήκαν δυο διαφορετικοί τρόποι προκατεργασίας των δειγμάτων πλάσματος:

1. Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμεύουσες πρωτεΐνες με ακετονιτρίλιο. Πιο συγκεκριμένα έγινε προσθήκη 1ml ακετονιτρίλιου στάγδην σε 1ml πλάσματος. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση με συσκευή vortex για λίγα δευτερόλεπτα και φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Τέλος έγινε παραλαβή του υπερκλειμένου και εισαγωγή του σε φίλτρο σύριγγας Nylon syringe filter 0.2μm.

2. Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμεύουσες πρωτεΐνες με ακετονιτρίλιο και απομόνωση των συστατικών της μήτρας με υπερδιήθηση μέσω μεμβρανών κελουλόζης (ultrafiltration).

Καλύτερη απόδοση παρουσιάζει ο δεύτερος τρόπος, που απαλλάσσει το δείγμα από τα συστατικά του πλάσματος που μολύνουν σταδιακά την χρωματογραφική στήλη και παρεμποδίζουν την ανάλυση (μετατόπιση και παραμόρφωση των χρωματογραφικών κορυφών). Για την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή σειράς δίοδων (PDA) και εξοπλισμένο με την αναλυτική στήλη: SUPERALCO C18 (15cm X 4,6mm X 5μm). Η ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία στήλης 50°C με κινητή φάση αποτελούμενη από μίγμα (35:65) δύο διαλυτών: Α) δισόξινο φωσφορικό κάλιο (0,1mM K₂HPO₄) και Β) Μεθανόλη (MeOH), με πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης, με ταχύτητα ροής 0,700mL/min και πίεση στα 700-900psi. Η ανίχνευση του φαρμάκου γίνεται στα 224nm και 280nm.

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε σύμφωνα με την οδηγία του Οργανισμού Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA). Για την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν μόνο ποιοτικά διαλύματα δαπτομυκίνης (Quality Controls-QC) σε τρεις συγκεντρώσεις, 30,60 και 90μg/ml, καθώς και μια σειρά προτύπων με συγκεντρώσεις 20-120μg/ml. Η μέθοδος έχει καλή γραμμικότητα ($R^2 > 0,998$), καλύπτει όλο το εύρος των αναμενόμενων θεραπευτικών συγκεντρώσεων (8-150μg/ml). Όσο αναφορά την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά με τη μέση τιμή ακρίβειας να υπολογίζεται σε 96% και 101%. Η σταθερότητα της δαπτομυκίνης εξετάστηκε και φαίνεται ότι είναι πάρα πολύ υψηλή (99,64%, 99,84%), το οποίο φανερώνει ότι η δαπτομυκίνη ήταν σταθερή στις συνθήκες αποθήκευσής της (-20°C).

Με όλη την παραπάνω διαδικασία αποκτήθηκε γνώση και κατάρτιση τόσο για την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) όσο και για το πρωτόκολλο επικύρωσης και ανάπτυξης μιας μεθόδου ποσοτικοποίησης ενός αντιβιοτικού, συγκεκριμένα της δαπτομυκίνης.

Abstract

Daptomycin is the first representative of a new group of antibiotics called cyclic lipopeptide antibiotics. The determination of plasma concentration of patients is important to optimize the dosage of the drug. This thesis is to develop a methodology for the detection and quantification of daptomycin in plasma samples of patients with the method of high performance liquid chromatography with a detector of visible / ultraviolet (HPLC-PDA).

In developing the methodology two different ways of pre-treatment plasma samples was tested:

1. Precipitation of plasma proteins with simultaneous extraction of the daptomycin-binding proteins with acetonitrile. Specifically 1ml of acetonitrile was added dropwise 1ml plasma. Then stirred with a vortex device for a few seconds and centrifugation at 4000 rpm for 15 minutes at 4°C. Finally he took receipt of the supernatant and the introduction of a syringe filter Nylon syringe filter 0.2mm.
2. Precipitation of plasma proteins with simultaneous extraction of the daptomycin-binding proteins with acetonitrile and isolation of matrix components by ultrafiltration through membranes keloulozis.

Better performance shows the second way, which discharge the sample from the plasma components which progressively contaminate the chromatographic column and hinder the analysis (displacement and deformation of the chromatographic peaks). For the chromatographic analysis of the samples used in liquid chromatography DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 diode array detector system (PDA) and equipped with the analytical column: SUPERALCO C18 (15cm x 4,6mm X 5mm). The analysis was conducted at column temperature of 50 ° C with a mobile phase consisting of mixture (35:65) of two solvents: A) Potassium dihydrogen phosphate (0.1 mM KH_2PO_4) and B) Methanol (MeOH), with isocratic elution program, a flow rate 0,700mL / min and pressure on 700-900psi. The detection of the drug is at 224nm and 280nm.

The validation process was done according to the directive of Drug and Food Control Agency US (FDA). To validate the method used quality solutions of daptomycin (Quality Controls-QC) at three concentrations, 30,60 and 90mg / ml, and a series of standards with concentrations 20-120mg / ml. The method has good linearity ($R^2 > 0,998$), covers the entire range of expected therapeutic concentrations (8-150mg / ml). As mention precision and reproducibility of the results are satisfactory with the average accuracy value is calculated at 96% and 101%. Finally stability of the stock solution was examined and daptomycin appears to be too high (99.64%, 99.84%), which indicates that daptomycin was stable on storage conditions (-20°C).

With all the above process was obtained knowledge and training as to the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) and the commit protocol and development of a method of quantification of an antibiotic, in particular of daptomycin.

Εισαγωγή

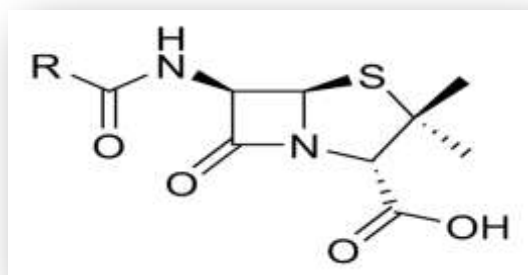
Αντιβιοτικά

Ορισμός

Ως αντιβιοτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε χημική ένωση που εμποδίζει ή καταργεί την αύξηση των μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι μύκητες ή τα πρωτόζωα. Ο όρος αναφέρθηκε αρχικά σε οποιοδήποτε μέσο με βιολογική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς, εντούτοις σήμερα χρησιμοποιείται για την περιγραφή ουσιών με αντιβακτηριακή, αντιμυκητική ή αντιπαρασιτική δράση.[4]

Ιστορία της ανακάλυψης των αντιβιοτικών

Η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών ήταν από τους αρχαίους Κινέζους πριν από πάνω 2.500 έτη. Πολλοί άλλοι αρχαίοι πολιτισμοί, συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων Αιγυπτίων και των αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν ήδη μύκητες και φυτά για να θεραπεύσουν μολύνσεις, εξ αιτίας της παραγωγής των αντιβιοτικών ουσιών από αυτούς τους οργανισμούς. Εκείνη τη στιγμή όμως, οι ενώσεις που αναπτύσσουν την αντιβιοτική δράση ήταν άγνωστες. Οι αντιβιοτικές ιδιότητες του *Penicillium* sp. περιγράφηκαν αρχικά στη Γαλλία από τον Ερνέστ Ντυσέν (Ernest Duchesne) το 1897. Εντούτοις, η εργασία του δεν επηρέασε την επιστημονική κοινότητα μέχρι την ανακάλυψη από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ της πενικιλίνης. Η σύγχρονη έρευνα για την αντιβιοτική θεραπεία άρχισε στη Γερμανία με την ανάπτυξη του στενού-φάσματος αντιβιοτικού "Σαλβαρσάνη" από τον Πάουλ Έρλιχ (Paul Ehrlich) το 1909, επιτρέποντας για πρώτη φορά μια αποδοτική θεραπεία της διαδεδομένης σύφιλης. Το φάρμακο, που ήταν επίσης αποτελεσματικό και ενάντια σε άλλες μολύνσεις, δεν είναι πλέον σε εφαρμογή στη σύγχρονη ιατρική. Τα αντιβιοτικά αναπτύχθηκαν περαιτέρω στη Μεγάλη Βρετανία μετά από την ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1928 από τον Φλέμινγκ. Περισσότερο από δέκα έτη αργότερα, ο Ernst Chain και ο Howard Florey έδειξαν ενδιαφέρον στην εργασία του και βρήκαν την καθαρισμένη μορφή της πενικιλίνης. Οι τρεις τους μοιράστηκαν το βραβείο Νόμπελ του 1945 στην ιατρική. Ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναφερθεί μόνο στις ουσίες που εξήχθησαν από έναν μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, αλλά σήμερα περιλαμβάνει επίσης τα πολλά συνθετικά και ημισυνθετικά φάρμακα που έχουν αντιβακτηριακά αποτελέσματα.[4]



Εικόνα 1 : Δομή Πενικιλίνης(http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_penicillin.htm)

Ταξινόμηση των αντιβιοτικών

Τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την εστίαση της δράσης τους σε:

- αντιβιοτικά **«στενού - φάσματος»**, που στοχεύουν σε ιδιαίτερους τύπους βακτηρίων, όπως τα κατά Gram θετικά ή κατά Gram αρνητικά βακτήρια,
- ενώ τα αντιβιοτικά **ευρέος φάσματος** έχουν επιπτώσεις σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων.

Επιπλέον ταξινομούνται σε :

- **Βακτηριοκτόνα:** αντιμικροβιακά που προκαλούν ταχεία θανάτωση των παθογόνων μικροβίων σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις. Σε αυτά ανήκουν β-λακταμικά αντιβιοτικά, Γλυκοπεπτιδία (βανκομυκίνη), Αμινογλυκοσίδες και Κινολόνες.
- **Βακτηριοστατικά:** αντιμικροβιακά που προκαλούν αναστολή του πληθυσμού των παθογόνων μικροβίων σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις. Σε αυτά ανήκουν Τετρακυκλίνες, Μακρολίδια, Λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη) και Σουλφοναμίδες.

Πολύ σημαντική επίσης είναι η ταξινόμηση ανάλογα με το βιοχημικό μηχανισμό δράσης τους και διακρίνονται σε:

- **Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.** Τα φάρμακα αυτά παρεμβαίνουν στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η δομή αυτή αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βακτηρίων και δεν απαντάται στα κύτταρα των θηλαστικών. Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας επιδεικνύουν μέγιστη αποτελεσματικότητα σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενους μικροοργανισμούς, ενώ έχουν μικρή ή μηδενική επίδραση σε βακτήρια που δεν βρίσκονται σε στάδιο πολλαπλασιασμού. Τα αντιβιοτικά που δρουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα προκαλούν την εξασθένηση και στη συνέχεια τη λύση του. Στην κατηγορία αντιβιοτικών που αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος ανήκουν:

1. β-λακτάμες: Πενικιλίνες
Κεφαλοσπορίνες
Καρβαπενέμες
Μονοβακτάμες

2. Βανκομυκίνη
3. Βακιτρακίνη

- **Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση.** Σε αυτά ανήκουν:

1. ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ: Στρεπτομυκίνη, Αμικασίνη, Γετναμυκίνη, Τομπραμυκίνη, Νεομυκίνη
2. ΜΑΚΡΟΛΥΔΕΣ: Ερυθρομυκίνη, Κλαριθρομυκίνη, Αζιθρομυκίνη
3. ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ: Κλινδαμυκίνη
4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

5. ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ

➤ **Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων.**

Σε αυτά ανήκουν: Κινολόνες και Φθορικινολόνες-παράγωγα ναλδιξικού οξέος, σιπροφλοξασίνη, νορφλιξασίνη, οφλοξασίνη, λομεφλοξασίνη

➤ **Αντιμεταβολίτες (Αναστολείς μεταβολισμού φυλλικού οξέος).** Το φυλλικό οξύ είναι απαραίτητο για την σύνθεση πουρινών και πυριμιδινών (πρόδρομα του RNA, DNA) που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όταν υπάρχει έλλειψη φυλλικού οξέος τα κύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν ούτε να διαιρεθούν. Πολλά βακτήρια, επειδή δεν είναι διαπερατά σε φυλλικό οξύ, πρέπει να στηριχθούν στην ικανότητά τους να συνθέτουν φυλλικό από PABA (π-άμινο-βενζοϊκό οξύ). Αντίθετα, ο άνθρωπος δεν μπορεί να συνθέσει φυλλικό οξύ και πρέπει να το προσλαμβάνει από τις τροφές. Στους αντιμεταβολίτες ανήκουν: **Σουλφοναμίδες**

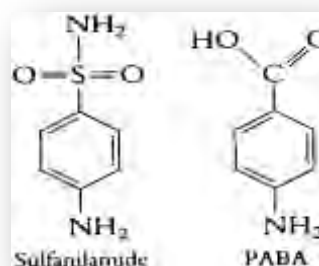
Σουλφακεταμίδη

Μαφενίδη

Σουλφισοξαζόλη

Σουλφαδιαζίνη

Σουλφανιλαμίδη



Εικόνα2:Σουλφοναμίδη,PABA(<https://el.wikipedia.org/wiki>)

Επίσης έχουμε:

➤ **ΑΝΤΙΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ** στα οποία ανήκουν κυρίως τα αντιφυματικά φάρμακα, όπως η ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, πυραζυναμίδη, αιθαμβουτόλη.

➤ **ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ :**

1. Πολυένια: Αμφοτερικίνη Β (IV ή τοπικά), Νυστατίνη
2. Αζόλες: Κετοконаζόλη, Ιτρακοναζόλη, Μικοναζόλη, Εικοναζόλη, Φθοριοκοναζόλη
3. Γριζεοφουλβίνη
4. 5-φθοριοκυτοσίνη

Παρενέργειες αντιβιοτικών

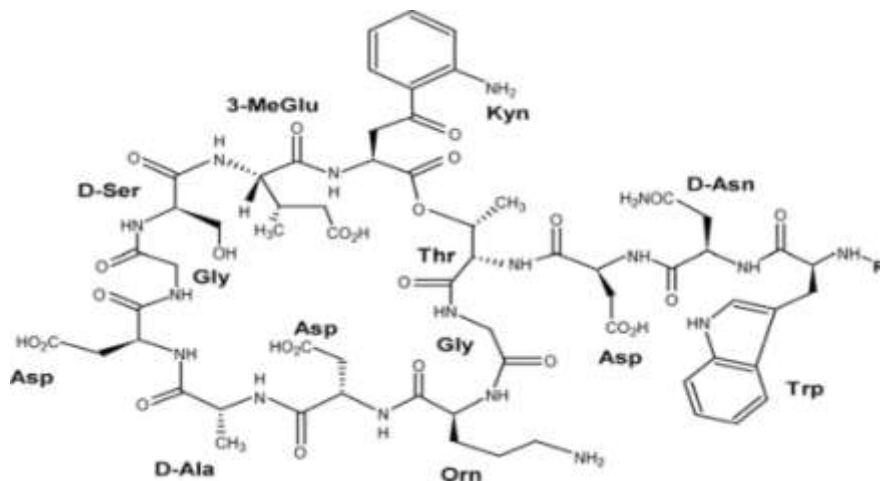
Οι πιθανές παρενέργειες είναι ποικίλες, εξαρτώνται από τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και τους μικροβιακούς οργανισμούς που στοχεύουν. Η υπερδοσολογία μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες, ενώ η μακροχρόνια χορήγηση προκαλεί ανοχή των μικροβίων. Σε περίπτωση που πρέπει να χορηγηθούν δύο αντιβιοτικά ταυτόχρονα, ή ένα αντιβιοτικό ταυτόχρονα με άλλο φάρμακο, π.χ. παυσίπονο, αντιφλεγμονώδες, πρέπει να εξετάζουμε αν οι δύο ουσίες ταιριάζουν μεταξύ τους ή όχι. Μια από τις πιο κοινές παρενέργειες είναι η διάρροια, που προκαλείται μερικές φορές από το αναερόβιο βακτήριο *clostridium difficile*, που προκύπτει από το αντιβιοτικό που αναστατώνει την κανονική ισορροπία της εντερικής χλωρίδας.[4]

Τα τελευταία έτη τρεις νέες κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν παρουσιαστεί στην κλινική χρήση. Αυτό ακολουθείται μετά από μια παύση 40 ετών στην ανακάλυψη νέων κατηγοριών αντιβιοτικών ενώσεων. Αυτά τα νέα αντιβιοτικά είναι των ακόλουθων τριών κατηγοριών: κυκλικές λιποπεπτίδες (daptomycin), γλυκικυκλίνες (tigecycline), και οξαζολιδινόνες (linezolid)

Δαπτομυκίνη

Η δαπτομυκίνη ως ένα από τα σημαντικότερα αντιβιοτικά που αναπτύχθηκαν τα τελευταία πενήντα χρόνια και η ανακάλυψή της

Η δαπτομυκίνη είναι ένα φυσικό προϊόν ενός ακτινομύκητα εδάφους. Ο μικροοργανισμός που την παράγει, δηλαδή ο *Streptomyces roseosporus*, απομονώθηκε από τους επιστήμονες στο Eli Lilly από ένα δείγμα εδάφους από το όρος Αραράτ(Τουρκία). Ο συγκεκριμένος ακτινομύκητας παράγει μια οικογένεια λιποπεπτιδικών αντιβιοτικών που ορίζεται ως A21987C (Εικόνα 3). Οι ίδιοι επιστήμονες απομόνωσαν επίσης ένα στέλεχος του *Actinoplanes utahensis*, το οποίο παρήγαγε μια εκκρινόμενη δεακυλάση που θα μπορούσε να διασπάσει τη φυσική μεγάλη αλυσίδα της πλευρικής μακράς αλυσίδας λιπιδίων από τους παράγοντες A21978C. Αυτό επέτρεψε την παραγωγή του πυρήνα κυκλικού πεπτιδίου για επανακυλιώσεις με διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες των λιπιδίων. Η δαπτομυκίνη, η οποία περιέχει μία πλευρική αλυσίδα N-δεκανοϊκού οξέος, επιλέχθηκε για την κλινική ανάπτυξη λόγω της in vitro αποτελεσματικότητας της και της χαμηλής τοξικότητας στα ζώα.



Εικόνα 3 : Η δομή των A21978C παραγόντων και της δαπτομυκίνης. [7]

Από το ινστιτούτο Eli Lilly στο Cubist

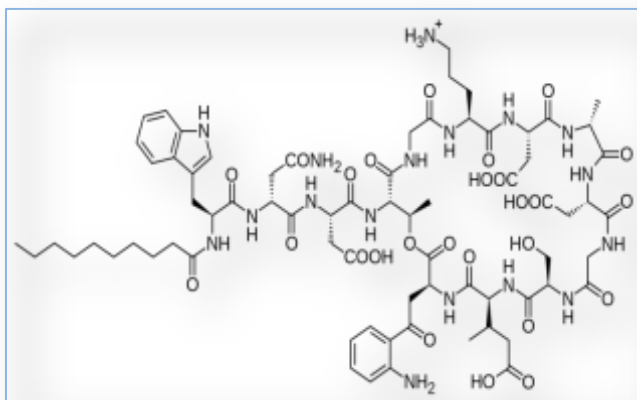
Στο ινστιτούτο Eli Lilly εφαρμόστηκαν από τους επιστήμονες κλινικές μελέτες ενδοφλέβιας δαπτομυκίνης κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές του 1990. Παρόλο που τα αρχικά αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά περαιτέρω δοκιμές διακόπηκαν κυρίως λόγω της εμφάνισης τοξικότητας. Το Νοέμβριο του 1997, η εταιρία Cubist οριστικοποίησε την άδεια για τη συμφωνία με τη δαπτομυκίνη. Οι επιστήμονες στην Cubist ήταν πεπεισμένοι ότι η δαπτομυκίνη είχε καλές ιδιότητες (όπως υψηλή δραστικότητα, βακτηριοκτόνο δραστικότητα, υψηλή αποτελεσματικότητα σε μοντέλα ζώων ενάντια σε Gram-θετικά παθογόνα) και ότι άξιζε περαιτέρω προσπάθεια για να ξεπεραστούν τα προβλήματα τοξικότητας. Έτσι με τη σημαντική συμβολή του Dr. Francis Tally άρχισαν ξανά οι κλινικές δοκιμές στην Cubist και τον Μάρτιο του 1998 απεστάλη έγγραφο για έγκριση και αδειοδότηση του νέου φαρμάκου στον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Το 1998, η Cubist κατέθεσε αίτηση διπλώματος ευρεσιτεχνίας που απευθύνεται σε μεθόδους χορήγησης της δαπτομυκίνης, ονομάζοντας τους Oleson και Tally ως εφευρέτες, βάσει του νέου θεραπευτικού σχήματος για την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων που αφορούν το μυοσκελετικό σύστημα. Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας εκδόθηκε από τις Ηνωμένες Πολιτείες Διπλωμάτων Ευρεσιτεχνίας και Εμπορικών Σημάτων τον Οκτώβριο του 2002. [7]

Το 2003 η έγκριση της δαπτομυκίνης από τον FDA

Το 2003, η δαπτομυκίνη σε ενέσιμη μορφή (Cubicin), η πρώτη στην κατηγορία όξινου λιποπεπτιδίου IV αντιβιοτικού, εγκρίθηκε από τον FDA σε μία δοσολογία 4 mg/kg χορηγούμενη μία φορά την ημέρα για τη θεραπεία της περίπλοκης SSSI που προκαλείται από ειδικά gram-θετικά βακτήρια. Από την έναρξή του τον Νοέμβριο του 2003, το φάρμακο είχε τη μεγαλύτερη οικονομική επιτυχία (σε ονομαστικές τιμές των πωλήσεων) σε σχέση με κάθε IV αντιβιοτικό στην ιστορία των ΗΠΑ. Το 2006, είχε εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες για την θεραπευτική αγωγή του S.Aureus για βακτηριαμία, συμπεριλαμβανομένων δεξιάς λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας, σε δόση των 6 mg /kg χορηγούμενη μία φορά ημερησίως. [7]

Δομή της δαπτομυκίνης

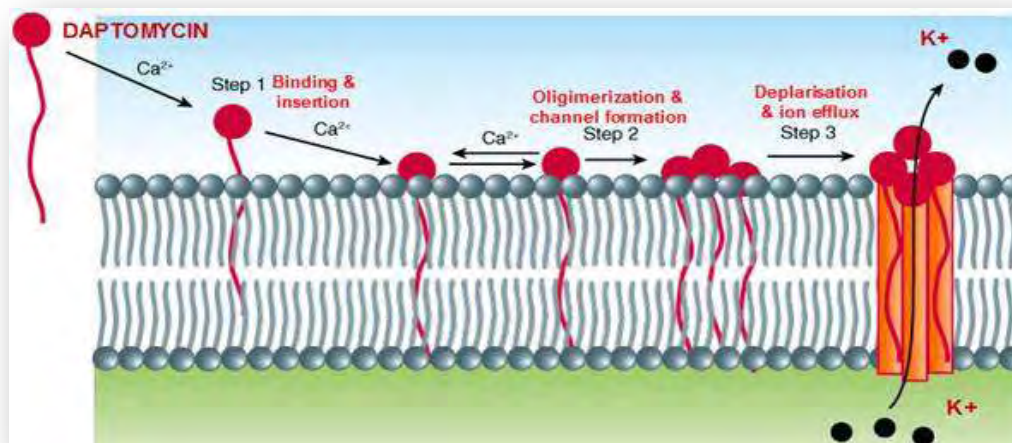
Η δαπτομυκίνη, έχει μοναδική χημική δομή και πρόκειται για ένα λιποπεπτίδιο 13 αμινοξέων που αποτελείται από υδατοδιαλυτό (υδρόφιλο) πυρήνα και λιποστατικό (λιπόφιλο) άκρο.



Εικόνα 4 : α) Δομή του μορίου της δαπτομυκίνης και β) φαρμακευτικό σκεύασμα Cubicin 500mg για ενδοφλέβια χορήγηση.[1],[2]

Μηχανισμός δράσης της δαπτομυκίνης

Η δαπτομυκίνη χαρακτηρίζεται από καινοτόμο μηχανισμό ταχέως βακτηριοκτόνου δράσεως που οφείλεται στη μοναδική χημική της δομή. Ο μηχανισμός δράσης της δαπτομυκίνης είναι μοναδικός, αλλά δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, το λιπόφιλο άκρο της δαπτομυκίνης εισέρχεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των Gram- θετικών βακτηρίων, μία διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου, τα οποία φαίνεται ότι προκαλούν μία δομική αλλαγή στο μόριο της δαπτομυκίνης που επιτρέπει στο αντιβιοτικό να αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη του βακτηρίου. Συνέπεια τούτων είναι ότι επέρχεται εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας αναστολή της συνθέσεως του RNA, DNA και πρωτεϊνών, απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού καλίου και θάνατο του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα όσο αφορά το μηχανισμό δράσης, αυτός περιγράφεται και στην εικόνα 5 σε τρία βήματα. Στο πρώτο βήμα η προσάρτηση της δαπτομυκίνης λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια ιόντων ασβεστίου και, στη συνέχεια, η ουρά με υψηλή λιποφιλικότητα εισάγεται εντός της μεμβράνης των gram θετικών βακτηρίων. Δεύτερον, ακολουθεί ο ολιγομερισμός του καναλιού και μετά η εκπόλωση. Τέλος, λόγω της εκπόλωσης υπάρχει διαρροή ιόντος (κυρίως καλίου) που οδηγεί σε αναστολή της DNA, RNA και πρωτεϊνικής σύνθεσης και στην κατάρρευση του οργανισμού που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. [1],[2],[3],[5],[6]



Εικόνα 5: Στάδια μηχανισμού δράσης δαπτομυκίνης.(<http://www.antibiotics-info.org/daptomycin>)

Αντιβακτηριακό φάσμα

Η δαπτομυκίνη είναι δραστική *in vitro* έναντι ευρέως φάσματος Gram – θετικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλόκοκκων, στρεπτόκοκκων και εντερόκοκκων. Επιπλέον, σημαντικό είναι ότι η δαπτομυκίνη είναι δραστική *in vitro* έναντι Gram – θετικών στελεχών που είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά πρώτης γραμμής, όπως είναι ο MRSA και ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), ο ενδιάμεσης αντοχής στα γλυκοπεπτίδια *S. Aureus* (GISA) και *S. epidermidis* (GISE), ο ανθεκτικός στη βανκομυκίνη *S. aureus* (VRSA) και ο ανθεκτικός στη βανκομυκίνη εντερόκοκκος (VRE). Η δαπτομυκίνη δεν είναι δραστική έναντι των Gram – αρνητικών βακτηρίων επειδή δε δύναται να διεισδύσει στην εξωτερική μεμβράνη των εν λόγω μικροοργανισμών.[2],[5]

Δόση-Θεραπεία σε ενήλικους

Κατάσταση	Δόση (IV)
Λοιμώξεις του δέρματος και δερματικών δομών	4 mg/kg/day για 7–14 μέρες
Πολύπλοκες Λοιμώξεις	4 mg/kg/day για 7–14 μέρες
Βακτηριαμία	6mg/kg/day επί τουλάχιστον 2–6 εβδομάδες.

Πίνακας 1: Δοσολογία

Η δαπτομυκίνη(cubicin) χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενηλίκων με τις παρακάτω βακτηριακές λοιμώξεις:

1. Περίπλοκες λοιμώξεις δέρματος και των μαλακών ιστών κάτω από το δέρμα. Ο όρος περίπλοκη σημαίνει ότι η μόλυνση είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί, διότι, είναι διαδεδομένη στους εν τω βάθει ιστούς κάτω από το δέρμα, το οποίο μπορεί να χρειαστεί θεραπεία με χειρουργική επέμβαση ή τον ασθενή να υπόκεινται σε άλλες συνθήκες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία.
2. Λοιμώδη δεξιά-ενδοκαρδίτιδα (λοίμωξη των μηνίγγων ή των βαλβίδων της δεξιάς πλευράς της καρδιάς) που προκαλείται από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
3. Βακτηριαμία (λοίμωξη του αίματος) που προκαλείται από *S. aureus*, που συνδέεται με οποιαδήποτε από τις προαναφερόμενες λοιμώξεις. [5],[6]

Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Η πλέον συνήθης αναφερθείσα ανεπιθύμητη ενέργεια με τη δαπτομυκίνη είναι η αύξηση της κινάσης της κρεατινίνης (CPK) του ορού. Μία άλλη σπάνια αλλά σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η νευροπάθεια. Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (πυρετός, εξάνθημα και/ή κνίδωση) παρατηρούνται σπανίως σε ασθενείς θεραπευόμενους με δαπτομυκίνη και μάλιστα λιγότερο συχνά συγκριτικά με τις ημισυνθετικές πενικιλίνες ή βανκομυκίνη. Με αποτέλεσμα οι ασθενείς να πρέπει να παρακολουθούνται για τυχόν εμφάνιση μυαλγιών ή μυϊκής αδυναμίας και τα επίπεδα CPK να ελέγχονται σε εβδομαδιαία βάση. [5]

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της δαπτομυκίνης

Μελέτες έδειξαν ότι η δαπτομυκίνη δεν απορροφάται σε σημαντικό βαθμό κατόπιν χορήγησης από του στόματος. Μελέτες κατανομής στους ιστούς που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα έδειξαν ότι η δαπτομυκίνη κατανέμεται κατά προτίμηση σε υψηλά αγγειοποιημένους ιστούς και διαπερνά σε μικρότερο βαθμό το φραγμό αίματος-εγκεφάλου και το φραγμό του πλακούντα κατόπιν άπαξ και πολλαπλών δόσεων. Σε υγιείς εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε δαπτομυκίνη, η δέσμευση στις πρωτεΐνες παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο στο 90% συμπεριλαμβανομένων και ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια. Η δαπτομυκίνη δεν είναι αναστολέας ή επαγωγέας του ανθρώπινου κυτοχρώματος P450. Ως εκ τούτου, δεν εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα σε επίπεδο μεταβολισμού. Φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές μελέτες αλληλεπίδρασης της δαπτομυκίνης με φάρμακα όπως αζτρεονάμη, τομπρομυκίνη, βαρφαρίνης δεν οδήγησαν σε σημαντικές αλληλεπιδράσεις με αυτά. [8]

Προσδιορισμός αντιβιοτικών στα βιολογικά υγρά

Είναι πολύ σημαντικός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας ουσίας και συγκεκριμένα ενός αντιβιοτικού στα βιολογικά υγρά όπως το πλάσμα. Τα αντιβιοτικά απορροφώνται από τον οργανισμό του ασθενούς με διαφορετικό ρυθμό καθώς διαφέρει σε καθένα από αυτά ο χρόνος που απαιτείται για να απομακρυνθούν από διάφορες οδούς από τον οργανισμό. Για αυτό είναι σημαντικό να υπάρχει γνώση για την ποσότητα του αντιβιοτικού που ανιχνεύεται στο πλάσμα για να καθοριστούν οι φαρμακοκινητικές του ιδιότητες, ώστε να συμβάλλουν στη χρησιμοποίησή του για θεραπεία. Άρα είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί μια μέθοδος, ευαίσθητη και με ακρίβεια, που να επιτυγχάνει ουσιαστικά την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του αντιβιοτικού σε βιολογικά υγρά ασθενών. Αυτό θα υλοποιηθεί με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με έναν ανιχνευτή σειράς διόδων. (HPLC-PDA)

Η παρούσα εργασία βασίστηκε κυρίως για το σχεδιασμό του πειραματικού μέρους (μήκη κύματος, φάσεις διαλυτών και επεξεργασία δειγμάτων) και της επικύρωσης της μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της δαπτομυκίνης σε επιστημονικά άρθρα που έχουν δημοσιευτεί σε διεθνή περιοδικά χρησιμοποιώντας διάφορες αναλυτικές τεχνικές Υγρής Χρωματογραφίας όπως αναφέρονται στον πίνακα 2.

Βιβλιογραφική ανασκόπηση τεχνικών ανίχνευσης και προσδιορισμού της δαπτομυκίνης

A/A	Paper	Ετος paper	Στήλη	Μήκη κύματος(nm)	Φάσεις διαλυτών	Χρόνος έκλυσης δαπτομυκίνης(min)	Χρόνος προγράμματος(min)	Επεξεργασία δειγμάτων	pH
1	Validated high performance liquid chromatography–UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma , Jens Martens-Lobenhoffer , Jan T. Kielstein, Catrin Oye, Stefanie M. Bode-Boger.	2008	C8	224,264,282,370 Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε το μέγιστο απορρόφησης στα 224nm	Κινητή φάση: αναμίχθηκε από ρυθμιστικό διάλυμα(20mM τριφθορικό οξύ και 15mM τριαιθυλαμίνη) και ακετονιτρίλιο	9,2	11	Προσθήκη 200μl μεθανόλης, στη συνέχεια vortex για 5s, 15min σε θερμοκρασία δωματίου για να ολοκληρωθεί η καθίζηση των πρωτεϊνών και τέλος φυγοκέντρηση για 10min σε 9100x g	3,5
2	Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma.	2009	C-18		Κινητή φάση: Αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα Α(νερό και μυρμηγκικό οξύ) και ρυθμιστικό διάλυμα Β(ακετονιτρίλιο και μυρμηγκικό οξύ)	10±0,25	13	Προσθήκη 200μl ακετονιτρίλιου, στη συνέχεια vortex για 10 s και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 10min. Τέλος διάλυση κάποιων μl υπερκείμενου σε 400μl νερού	5
3	An HPLC assay for daptomycin in serum , C. M. Tobin, J. M. Darville, A. M. Lovering and A. P. MacGowan.	2008	C8	223	Κινητή φάση: Α) 0,2M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5,5 και Β) ακετονιτρίλιο σε αναλογία 70:30	5	15	Ανάμιξη 100μl ορού με 100μl ακετονιτρίλιου , 5min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 5min σε 13000g	5,5
4	Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study, Evangelos Gikasa, Fotini N. Bazotia, Panagiotis Fanourgiakis, Efstathia Perivolioti, Andreas Roussidis, Athanasios Skoutelis, Anthony Tsarbopoulos	2009	C18	220	Κινητή φάση: Α) 0,1% υδατικόTFA και Β) μεθανόλη	2	4,5	Επεξεργασία με μίγμα μεθανόλης:ακετονιτρίλιου,(αναλογία 1:2) στη συνέχεια vortex για 1min και φυγοκέντρηση στις 10,000rpm για 2.45 min στους 15 °C.	
5	Serum Bactericidal Activities of High-Dose Daptomycin with and without Coadministration of Gentamicin against Isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Enterococcus</i> species , C. Andrew	2006	C-18	220	Κινητή φάση: Αποτελείται από ανάμιξη φωσφορικού αμμωνίου και ακετονιτρίλιου σε αναλογία 66 :34			Προσθήκη 500μl μεθανόλης	

Γενικά για τη χρωματογραφία

Η χρωματογραφική ανάλυση, γνωστή συνήθως ως χρωματογραφία, περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού των συστατικών μείγματος ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής, που βρίσκονται στη χρωματογραφική “στήλη”, και βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι, η κινητή φάση διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτήν των συστατικών του μείγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και συνήθως εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.[13]

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, γνωστή ως High Performance Liquid Chromatography (HPLC), αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης. Αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1970 και η ταχύτατη εδραίωσή της στο χώρο της ενόργανης ανάλυσης βασίστηκε στην ανακάλυψη νέων υλικών πλήρωσης, καθώς και στην ευκολία που παρείχαν οι συνδεδεμένοι σε σειρά ανιχνευτές. Ουσιαστικά αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης των στηλών, οπότε και αναπτύσσονται μεγάλες πιέσεις. Στο τέλος της δεκαετίας αναπτύχθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης η οποία έλυσε ολοκληρωτικά το πρόβλημα διαχωρισμού παρόμοιων συστατικών. Στη δεκαετία του 1980 εμφανίστηκαν νέες τεχνικές οι οποίες βελτίωσαν το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και τον ποσοτικό διαχωρισμό των ενώσεων, ενώ παράλληλα η ανάπτυξη των υπολογιστών διευκόλυνε ουσιαστικά την αυτοματοποίηση της συγκεκριμένης τεχνικής. Η HPLC είναι μια δυναμική διεργασία προσρόφησης (adsorption). Τα προς ανάλυση μόρια, κατά την κίνησή τους μέσω του πορώδους υλικού πλήρωσης της στήλης τείνουν να αλληλεπιδράσουν με θέσεις της προσροφητικής επιφάνειας, ενώ ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση.[13]

Είδη HPLC

Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πλήρωσης της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

i) Χρωματογραφία Προσρόφησης

Ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα. Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης:

a) Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης

Εδώ, η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο

b) Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Εδώ, η στατική φάση, η οποία είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, δίολες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό.

ii) Χρωματογραφία Κατανομής

Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιονικών ενώσεων.

iii) Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

iv) Χρωματογραφία Συγγένειας

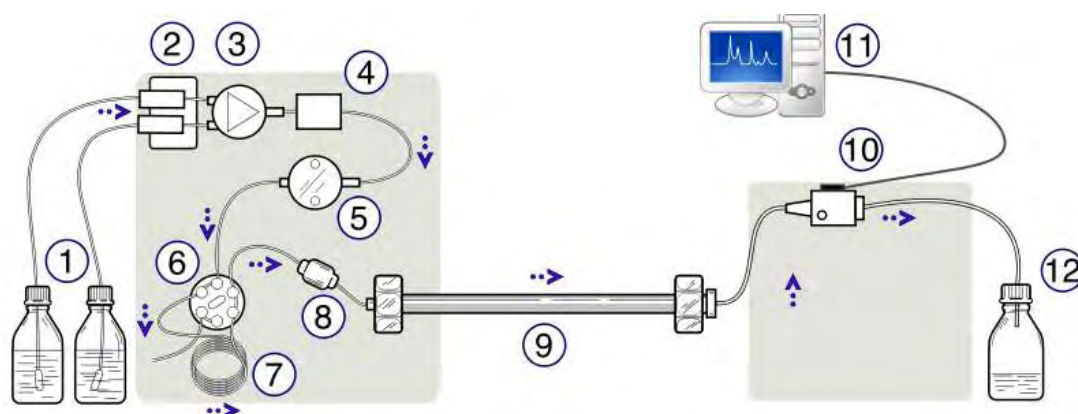
Για την επίτευξη του διαχωρισμού, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών, η οποία αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον και με την οποία διαχωρίζονται εναντιομερείς μορφές ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία. [14]

Οργανολογία της HPLC

Οι βασικές μονάδες ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι:

- Το σύστημα της αντλίας (pump).
- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve).
- Στήλη (column).
- Ανιχνευτής (detector).
- Καταγραφικό.
- Υπολογιστής -εκτυπωτής

Το σχήμα 1 απεικονίζει σχηματικά μια διάταξη HPLC:



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. (1) φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, (2) απαερωτής, (3) βαλβίδα βαθμωτής έκλουσης, (4) δοχείο ανάμιξης κινητής φάσης (μίκτης), (5) αντλία υψηλής πίεσης, (6) βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (7) βρόχος εισαγωγής δείγματος, (8) προστήλη, (9) χρωματογραφική στήλη, (10) ανιχνευτής, (11) σύστημα καταγραφής δεδομένων και (12) φιάλη συλλογής αποβλήτων.

Σύστημα αντλίας

Το σύστημα αντλίας περιλαμβάνει το δοχείο του διαλύτη, τα διάφορα φίλτρα και τις διατάξεις πίεσης και ροής. Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλυση (isocratic), ή φιάλες μέχρι τέσσερις στη βαθμωτή έκλυση (gradient) όπου τοποθετούνται οι διαλύτες και απαερώνονται. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να φύγουν όλα τα διαλυμένα αέρια και κυρίως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα και μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής.

Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη, ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόγχο. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των βαλβίδων είναι ότι δε διακόπτουμε τη ροή του εκλουστικού και εργαζόμαστε σε υψηλές πιέσεις. Σήμερα υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που μας επιτρέπουν να εισάγουμε διαφορετικούς όγκους στην αναλυτική στήλη.

Στήλες

Οι κυρίως στήλες ή απλά στήλες HPLC είναι κυλινδρικές από ανοξείδωτο μέταλλο, ή πλαστικό κατάλληλο, ώστε να αντέχουν στις μεγάλες πιέσεις που εξασκούν επάνω τους οι αντλίες. Οι διαστάσεις τους είναι 10-50 cm και η διάμετρός τους 1-5mm. Αγοράζονται έτοιμες από τις κατασκευάστριες εταιρίες. Το εσωτερικό τους πληρούται με λεπτόκοκκο αδρανές υλικό που οι πόροι του καλύπτονται με την υγρή στατική φάση. Μια καλά πληρωμένη στήλη μπορεί να έχει απόδοση περίπου 400 θεωρητικών πλακών ανά εκατοστό με σωματίδια 5-10μm. Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας τον αριθμό των θεωρητικών πλακών "N" δηλαδή το μήκος της στήλης, ή μεταβάλλοντας τη διάμετρο των κόκκων του υλικού πλήρωσης, ή αυξομειώνοντας την ταχύτητα της κινητής φάσης.

Υπάρχουν δύο τύποι στηλών:

- α) αναλυτικές στήλες,
- β) προστατευτικές στήλες.

Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές στην HPLC χρησιμοποιούνται τόσο για τον ποιοτικό, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς μελέτη ουσιών. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών και η επιλογή του κατάλληλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του προς ανάλυση μίγματος.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι:

- Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis Detector).
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector).
- Φασματογράφος μαζών (Mass Spectroscopic Detector)
- Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (Electrochemical Detector)
- Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector).
- Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector).
- Ανιχνευτής σκεδασμού φωτός (Light Scattering Detectors).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων (PDA).[14], [15]συζευγμένος με το σύστημα **ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000**. Στην εικόνα 6 απεικονίζεται το παραπάνω σύστημα:



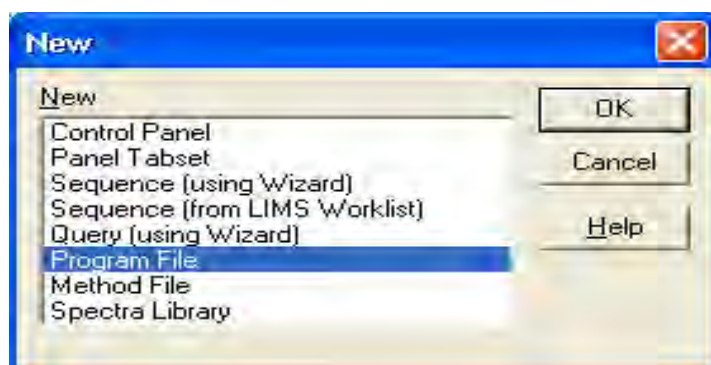
- ▶ ΔΙΑΛΥΤΕΣ
- ▶ ΑΝΤΛΙΑ
- ▶ ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ
- ▶ ΦΟΥΡΝΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜ/ΚΗ ΣΤΗΛΗ
- ▶ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ PDA

Εικόνα 6 :Σύστημα ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA.

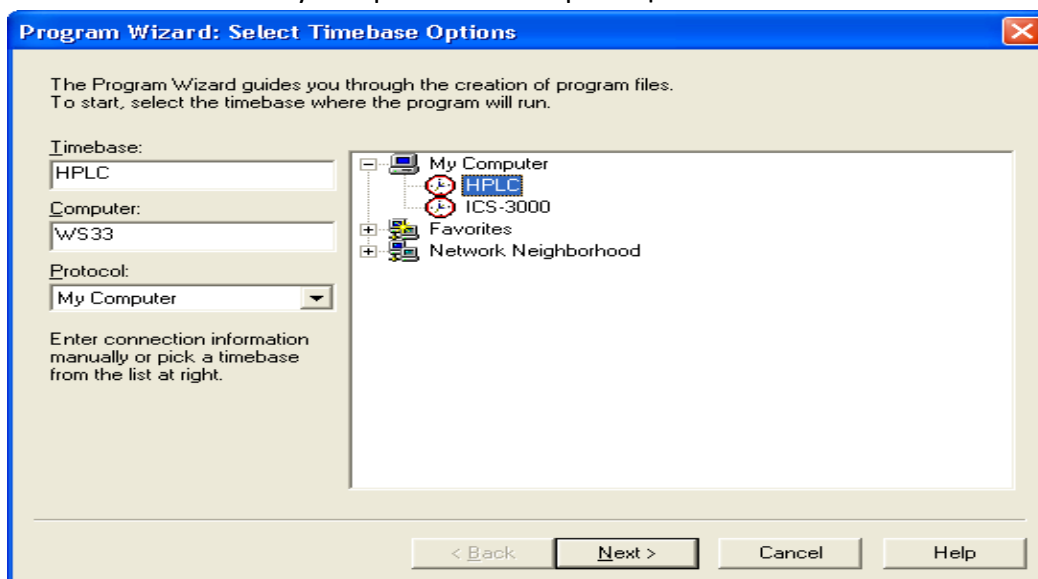
Για τη λειτουργία του συστήματος αυτού και την ανάλυση των δειγμάτων απαιτείται η εξοικείωση με το λογισμικό Chromeleon του συστήματος MODEL ULTIMATE 3000, δηλαδή η δημιουργία μιας sequence και ενός προγράμματος με το οποίο θα γίνει η ανάλυση της sequence. Παρακάτω αναλύονται τα στάδια για να επιτευχθούν τα παραπάνω.

Δημιουργία του προγράμματος επεξεργασίας της sequence

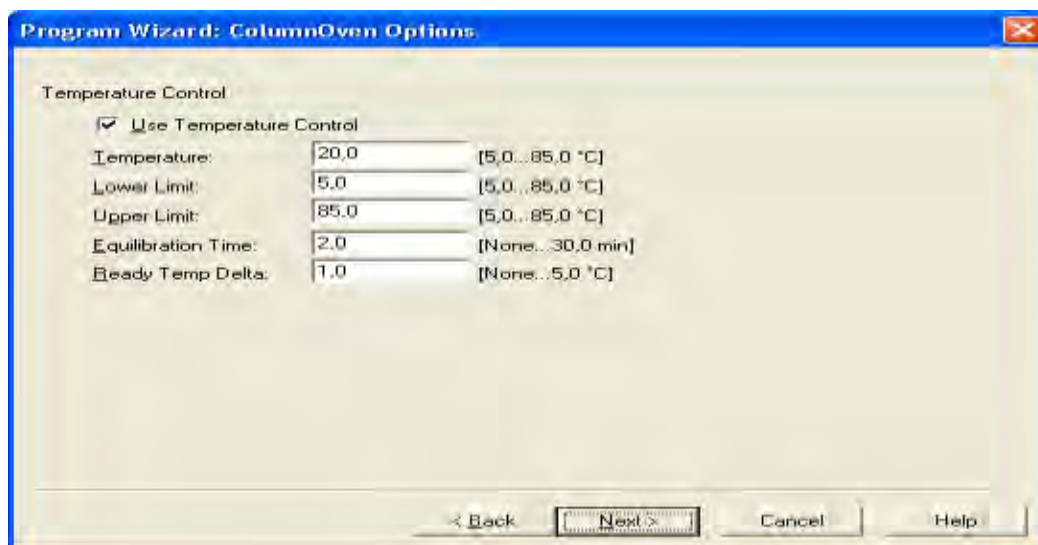
1. Από τον Browser δημιουργείται ένας νέος φάκελος μέσα στον οποίο θα φτιαχτεί το νέο sequence. Μαρκάρεται πρώτα ο κύριος φάκελος (έστω Ultimate 3000) και έπειτα File → New Directory
2. Για την δημιουργία του προγράμματος (δηλαδή τον προσδιορισμό των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος)
Επιλέγεται File →New



3. Μετά κλικ στο My computer → Επιλέγεται η timebase HPLC



4. Ρυθμίζεται η θερμοκρασία του φούρνου στηλών της συγκεκριμένης εφαρμογής. Ορίζονται τα ανώτερα και κατώτερα όρια καθώς και ο χρόνος εξισορρόπησης και η επιτρεπτή θερμοκρασιακή απόκλιση. Στο πρόγραμμα για την ανάλυση της δαπτομυκίνης η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 50°C.



5. Έπειτα προσδιορίζεται αν θα εκτελεστεί ισοκρατική ή βαθμωτή έκλουση. Ορίζεται η ροή του εκλουστικού καθώς και ο ρυθμός αύξησης της ροής από την εκκίνηση της αντλίας ως την επιθυμητή ροή. Στο πρόγραμμα ανάλυσης της δαπτομυκίνης εκτελέστηκε ισοκρατική ανάλυση σταθερά στο 65%(μεθανόλη) σε πρόγραμμα 15 λεπτών και η ροή ορίστηκε στα 0,700ml/min.

Program Wizard: Pump Options

Gradient Type: Isocratic

Solvents	Name	Type	Start	End
%A:	%A			
%B:	%B		0,0 %	0,0 %
%C:	%C		0,0 %	0,0 %
%D:	%D		0,0 %	0,0 %

Pressure Limits
 Lower Limit: 0 [0...5802 psi]
 Upper Limit: 5802 [0...5802 psi]

Column Flow
 Start: 0,000 [0,000...10,000 ml/min]
 End: 0,000 [0,000...10,000 ml/min]

Maximum Flow Acceleration / Deceleration
 Up: 0,300 [0,001...9999,999 ml/min²]
 Down: 0,300 [Infinite...9999,999 ml/min²]

< Back Next > Cancel Help

6. Ρυθμίζονται οι παράμετροι του αυτόματου δειγματολήπτη

Program Wizard: Sampler Options

Draw Speed: 0,050 [0,010...33,333 µl/s]
 Draw Delay: 7000 [0...300000 ms]
 Dispense Speed: 2,000 [0,010...33,333 µl/s]
 Dispense Delay: 2000 [0...300000 ms]
 Dispense to Waste Speed: 4,000 [0,010...33,333 µl/s]
 Sample Height: 2,000 [0,000...30,000 mm]

Inject Wash: Bath

Wash Volume: 75,000 [0,000...5000,000 µl]
 Wash Speed: 4,000 [0,010...33,333 µl/s]

< Back Next > Cancel Help

Program Wizard: Sampler Options

Inject Mode: Normal

Connected Pump Device: Pump

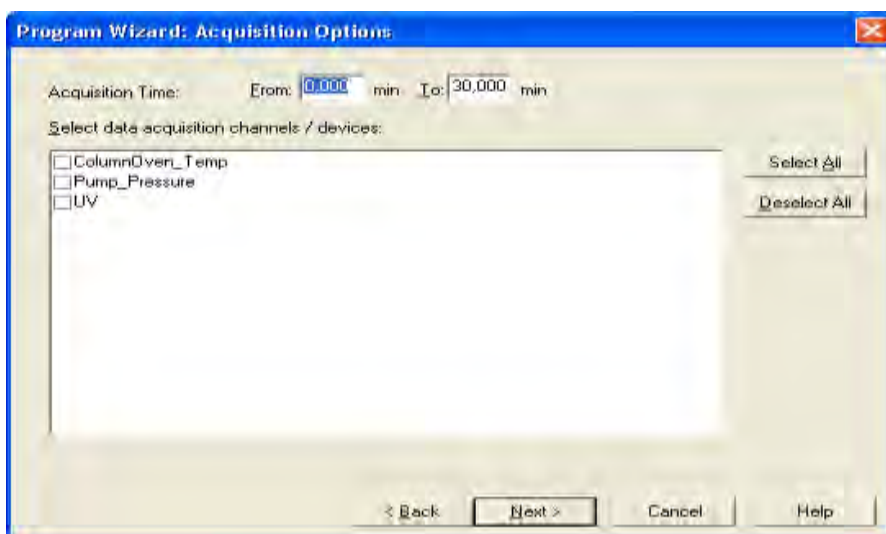
Synchronize injection with pump.

Bypass

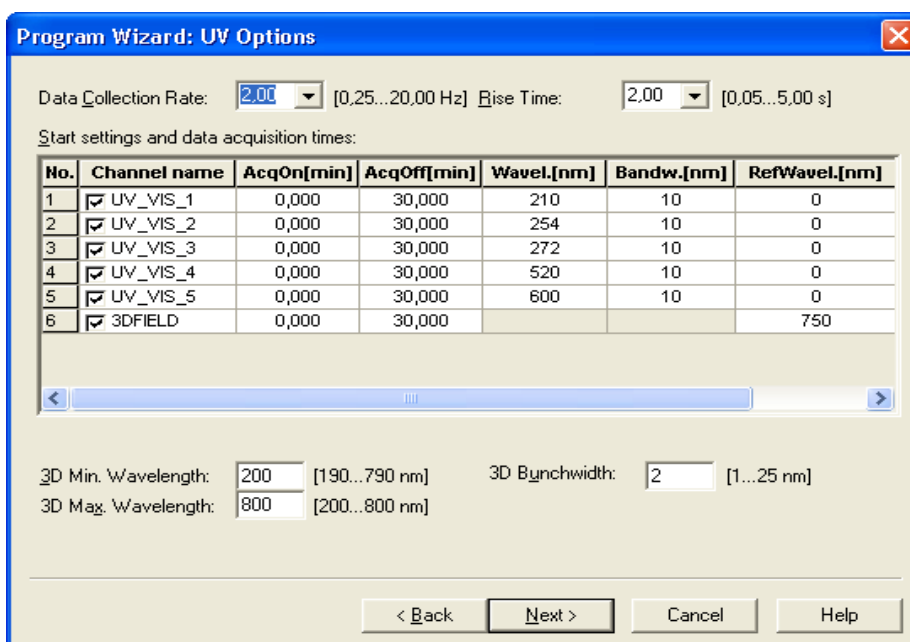
Flush Out Factor: [] [1,0...10,0]
 Maximum Inject Volume: [] [0,001...100,000 µl]
 Flow: [] [ml/min]
 Bypass Time: [] [min]

< Back Next > Cancel Help

7. Επιλέγεται ο χρόνος καταγραφής σήματος κάνοντας τικ στο UV και αν επιθυμείται καταγραφή ταυτόχρονα και της θερμοκρασίας και της πίεσης.



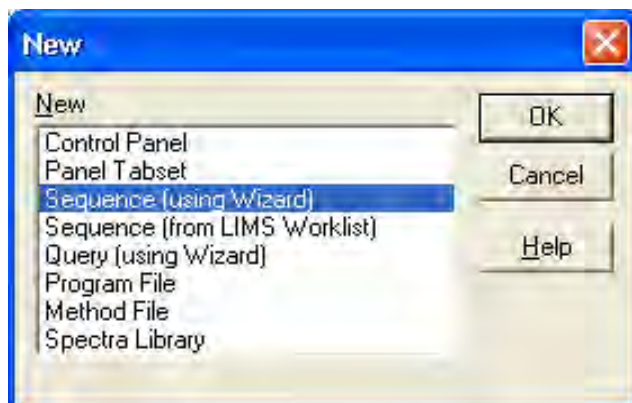
8. Τέλος, γίνεται ρύθμιση του μήκους κύματος, συγκεκριμένα στο πρόγραμμα για την ανάλυση της δαπτομυκίνης ορίστηκαν τα μήκη κύματος 224 και 280nm.[4]



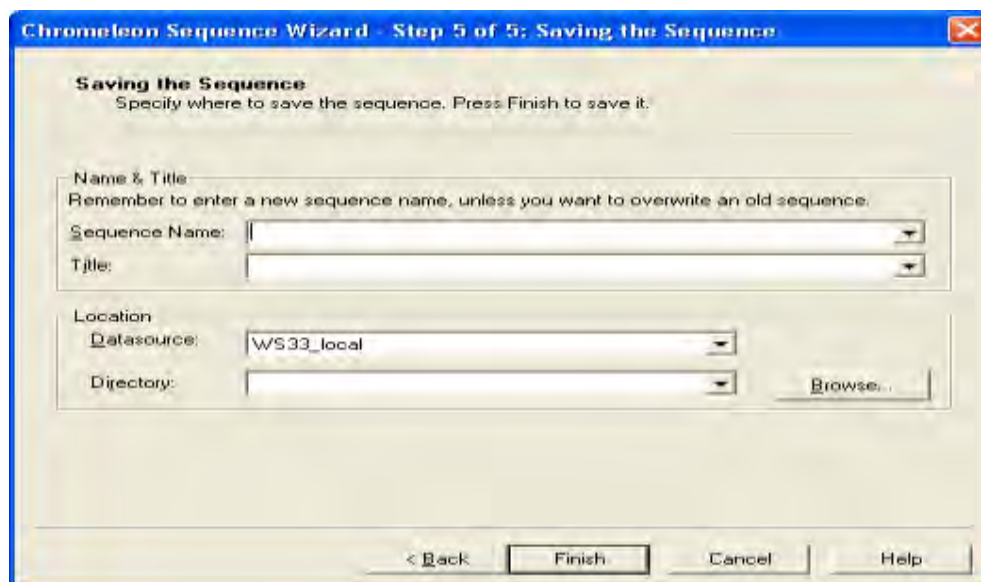
Ακολουθούν τα βήματα δημιουργίας μιας sequence:

Δημιουργία της sequence

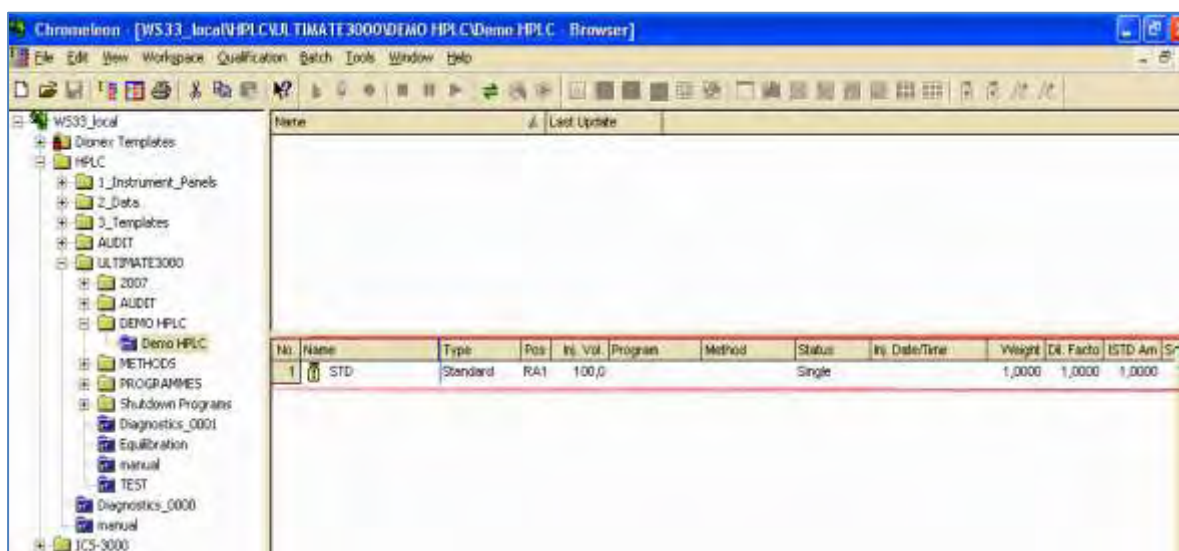
1. Από τον Browser δημιουργείται ένας νέο φάκελος μέσα στον οποίο θα φτιαχτεί το νέο sequence. Μαρκάρεται πρώτα ο κύριος φάκελος (έστω Ultimate 3000) και έπειτα File → New Directory
2. Στη συνέχεια εκτελείται File → New → Sequence (Using Wizard) → OK



3. Εδώ επιλέγεται το όνομα της sequence με ένα τίτλο (περιγραφής) και επιλέγεται από το Browse ο φάκελος (directory) μέσα στον οποίο θα αποθηκευτεί το συγκεκριμένο sequence.



4. Επιλέγεται το πρόγραμμα με το οποίο θα αναλυθεί η sequence (το οποίο έχει δημιουργηθεί παραπάνω) και επιλέγεται ένα όνομα για τη sequence.
5. Τέλος με το πάτημα Finish, το sequence έχει την παρακάτω τελική μορφή:



Μπορούν να προστεθούν όσα δείγματα θέλουμε τα οποία θα επεξεργαστούν με το πρόγραμμα και που δημιουργήθηκε παραπάνω για τη δαπτομυκίνη. Μόλις ολοκληρωθούν τα παραπάνω βήματα μπορεί να αρχίσει η ανάλυση των δειγμάτων της δαπτομυκίνης. [16]

Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων

Επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η διαδικασία, που δίνει στον αναλυτικό χημικό τα απαραίτητα δεδομένα για να αποδείξει κατά πόσο το σύστημα λειτουργεί και αποδίδει για την προτεινόμενη χρήση του, παρέχοντας ακριβή, επαναλήψιμα και αξιόπιστα αναλυτικά αποτελέσματα σε μια συγκεκριμένη ανάλυση. Η αξιοπιστία μιας συγκεκριμένης μεθόδου πρέπει να αποδεικνύεται με εργαστηριακά πειράματα, χρησιμοποιώντας δείγματα ή πρότυπα, τα οποία είναι παρόμοια με τα άγνωστα δείγματα και αναλύονται σε καθημερινή βάση.

Κανονισμοί, όπως αυτός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2002/657/EK) και του Οργανισμού Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), επιβάλλουν οι αναλυτικές μέθοδοι να επικυρώνονται πριν εφαρμοστούν σε αναλύσεις ρουτίνας. [17],[18],[21]

Αναλυτικές παράμετροι αξιολόγησης

Υπάρχουν νομοθετικές υπηρεσίες και βιβλιογραφία που ρυθμίζουν ποιες λειτουργικές παράμετροι πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε ένα πρωτόκολλο. Σύμφωνα με τους παραπάνω κανονισμούς και συγκεκριμένα με την οδηγία του Οργανισμού Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), γενικά η αξιολόγηση μιας αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνει μελέτες για έξι βασικές παραμέτρους:

1. Ακρίβεια και Πιστότητα (Accuracy)
2. Επαναληψιμότητα (Precision)
3. Εκλεκτικότητα-Εξειδίκευση (Specificity)

4. Γραμμικότητα και Εύρος
5. Σταθερότητα (Stability)
6. Ανιχνευσιμότητα (LOD και LOQ)

Ο ορισμός αυτών των παραμέτρων και τα ενδεικτικά κριτήρια αποδοχής αναλύονται παρακάτω.[17],[18],[21]

Ακρίβεια και Πιστότητα (Accuracy)

Ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου είναι ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που παράγονται από τη μέθοδο με την πραγματική τιμή ή με μια παραδεκτή ως πραγματική τιμή. Η ακρίβεια μπορεί να μετρηθεί αναλύοντας ένα λευκό δείγμα υποστρώματος, που έχει εμβολιαστεί με γνωστές συγκεντρώσεις. Η αναμενόμενη ανάκτηση εξαρτάται από το υπόστρωμα του δείγματος, τη διαδικασία προκατεργασίας δείγματος και τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού. Για τη μέτρησή της προτείνεται να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκεντρώσεων που καλύπτουν το εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων.

Ποσοτικά η ακρίβεια εκφράζεται από το σχετικό σφάλμα μέτρησης, σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Σχετικό σφάλμα(\%)} = \left(\frac{\text{Μέση ευρεθείσα τιμή} - \text{Θεωρητική τιμή}}{\text{Θεωρητική τιμή}} \right) * 100\% . [17],[18],[21]$$

Επαναληψιμότητα

Επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα. Αντανακλά τις διακυμάνσεις εντός μιας μικρής χρονικής περιόδου με τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας (μαθηματικά εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση RSD (Relative Standard Deviation) ή τον συντελεστή διακύμανσης CV (Coefficient of variance). Για τη μέτρησή της πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκεντρώσεων με συγκεντρώσεις που καλύπτουν το εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων. Η επαναληψιμότητα που καθορίζεται σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης δεν πρέπει να ξεπερνά το 15% του συντελεστή διακύμανσης(CV). Η επαναληψιμότητα διακρίνεται σε:

- a. Εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα (**Within run precision**): αναφέρεται στην επαναληψιμότητα σειράς μετρήσεων του ίδιου διαλύματος εργασίας ενός δείγματος (αποτελεί μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων του σταδίου της μέτρησης της αναλυτικής παραμέτρου).
- b. Μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα (**Between run precision**): αναφέρεται σε σειρά προσδιορισμών διαφορετικών τμημάτων του ίδιου δείγματος στα οποία εφαρμόζονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου. [17],[18],[21]

Εκλεκτικότητα - Εξειδίκευση

Εκλεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα της μεθόδου να μετρά επακριβώς ένα συστατικό παρουσία παρεμποδίσεων, που αναμένεται να εμφανιστούν σ' ένα δείγμα. Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας πρέπει να αποδειχθεί η έλλειψη σήματος στο λευκό βιολογικό υπόστρωμα δείγματος.

Εξειδίκευση αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να μετρά μόνο αυτό που είναι καθορισμένο να μετρηθεί μ' ένα προκαθορισμένο επίπεδο ακρίβειας και επαναληψιμότητας.[17],[18],[21]

Γραμμικότητα και Εύρος

Γραμμικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ικανότητα να υπολογίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων άμεσα ή με προκαθορισμένες μαθηματικές μετατροπές, σε αναλογία με τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών ενός δείγματος σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.

Η γραμμικότητα καθορίζεται από μια σειρά 3 – 6 εισαγωγών δείγματος από 5 ή περισσότερα πρότυπα, των οποίων η συγκέντρωση εκτείνεται στο εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων. Προσδιορίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (Correlation Coefficient, R), ο οποίος εκφράζει την απόκλιση των τιμών από την καμπύλη αναφοράς. Η τιμή του πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,95.

Ευθεία ελαχίστων τετραγώνων: Είναι η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς

$$y = Ax + B,$$

όπου A : κλίση της ευθείας, καθορίζει την ευαισθησία και B : σημείο τομής του άξονα των y .

Η ευαισθησία εκφράζει τη μεταβολή του σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη, και έχει μονάδες σήματος προς συγκέντρωση. Εκφράζεται από την κλίση (slope) της καμπύλης απόκρισης.

Το εύρος της μεθόδου είναι συνδεδεμένο με τη γραμμικότητά της. Είναι το διάστημα μεταξύ της χαμηλότερης και της υψηλότερης τιμής της συγκέντρωσης του συστατικού, για το οποίο έχει αποδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος έχει ένα κατάλληλο επίπεδο ακρίβειας, επαναληψιμότητας και γραμμικότητας.[17],[18],[21]

Σταθερότητα

Η σταθερότητα της ουσίας σε ένα βιολογικό υγρό είναι συνάρτηση των συνθηκών αποθήκευσής της, των χημικών ιδιοτήτων της ουσίας και της μήτρας. Οι διαδικασίες σταθερότητας πρέπει να αξιολογούν τη σταθερότητα των ουσιών κατά τη συλλογή και τη διαχείριση δειγμάτων, μετά από μακροχρόνια (αποθήκευση στην κατάψυξη σε επιθυμητή θερμοκρασία) και βραχυπρόθεσμη (θερμοκρασία δωματίου) αποθήκευση και κατά την απόψυξη και κατά την αναλυτική διαδικασία. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει αξιολόγηση της σταθερότητας της ουσίας στο διάλυμα αποθέματος (stock solution). Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας πρέπει να χρησιμοποιείται ένα σύνολο δειγμάτων που παρασκευάζονται από ένα πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα αποθέματος (stock solution) που περιέχει τον αναλύτη σε γνωστή συγκέντρωση. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για ανάλυση της σταθερότητας είναι γνωστής συγκέντρωσης.[17],[18],[21]

Ανιχνευσιμότητα (LOD και LOQ)

Καθορίζεται από το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ)

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους. Το όριο ανίχνευσης είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του συστατικού, που μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από τη βασική γραμμή θορύβου στον ανιχνευτή. Στην πράξη είναι η εισαγόμενη ποσότητα, που παρέχει κορυφή με ύψος διπλάσιο ή τριπλάσιο του ύψους του θορύβου της βασικής γραμμής. Πιο συγκεκριμένα:

Όριο ανιχνεύσεως: Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού.

Όριο ποσοτικοποίησης : Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού.

Τα παραπάνω όρια υπολογίζονται με βάση την τυπική απόκλιση (SD) της αναλυτικής απόκρισης (response) και την κλίση (slope) (α) της καμπύλης απόκρισης:

$$\text{LOD} = [3,3 \times \text{SD}] / \alpha$$

$$\text{LOQ} = [10 \times \text{SD}] / \alpha$$

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με την ανάπτυξη και επικύρωση μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης σε δείγματα πλάσματος ασθενών με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (PDA).

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές μελέτες, που αποσκοπούσαν στον έλεγχο της μεθόδου ως προς τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, την ακρίβεια, την εκλεκτικότητα, την σταθερότητα και την ανιχνευσιμότητα. Για την επικύρωσή της χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ποιοτικού ελέγχου στα 30,60 και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ καθώς και μια σειρά προτύπων δαπτομυκίνης συγκντρώσεων 20-120 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Τα πρώτα στάδια της μεθόδου που παρουσιάζονται και αναλύονται (καμπύλη βαθμονόμησης με υδατικά διαλύματα δαπτομυκίνης και με διαλύματα πλάσματος στη συνέχεια) καθώς και η επικύρωση της μεθόδου είναι αρκετά ενθαρρυντικά και σημαντικά για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της δαπτομυκίνης.

Οργανολογία-Υλικά

Συσκευές

Για τη παρασκευή των διαλυμάτων και για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές :

- Σύστημα ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA
- Συσκευή ανάδευσης, Vortex
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός ακριβείας
- Φυγόκεντρος
- Αυτόματες πιπέτες των 100μl,1000μl και 200μl

Υλικά-Αναλώσιμα

- Μεμβράνες νάυλον 47mm (Filter Membranes Disc Nylon 47mm, 0.45um, GRACE)
- Ένθετα γυάλινα (Micro – Insert, clear glass, GRACE)
- Φίλτρα σύριγγας Nylon syringe filter 0.2μm (pore size 0.20um, diameter Φ13mm, Rigas Labs)
- Σιφώνιο γυάλινο (Class A - 5 ml)
- Σιφώνιο γυάλινο (Class A - 10 ml)

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν:

- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4 , Potassium phosphate monobasic, Sigma – Aldrich)
- Μεθανόλη (MeOH, Methanol Chromatography HPLC grade, Sigma – Aldrich)
- Υδροχλωρικό οξύ 35% (Merck)
- Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile Chromatography HPLC grade, Sigma – Aldrich)
- Νερό υπερκάθαρο

Ουσίες για τα πρότυπα διαλύματα

- Δαπτομυκίνη για ενδοφλέβια χορήγηση Cubicin®500mg
- Κινοξαλίνη(Quinoxaline 99%, Sigma – Aldrich)

Παρασκευή διαλυτών και προτύπων

1) Για την παρασκευή της κινητής φάσης A ζυγίστηκαν με ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό 0,88gr KH_2PO_4 τα οποία διαλύθηκαν σε ένα λίτρο (lt) υπερκάθαρου νερού. Προστέθηκαν περίπου 10 σταγόνες υδροχλωρικού οξέος 35% ώστε το pH του να είναι περίπου ίσο με 3.

2) Για την παρασκευή της κινητής φάσης B χρησιμοποιήθηκε ένα λίτρο(lt) μεθανόλης HPLC

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πριν τη χρήση των φάσεων, οι δύο φάσεις πρέπει να διηθηθούν υπό κενό με χρήση μεμβράνης νάυλον 47mm. Η διήθηση είναι απαραίτητη για την κατακράτηση πιθανών προσμίξεων που μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στη στήλη.

3) Διαλύτης: Για την παρασκευή του διαλύτη ζυγίστηκαν 2,7gr KH_2PO_4 , τα οποία τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος πλήρωσε με υπερκάθαρο νερό.

4) Διάλυμα αποθήκευσης(Stock solution) δαπτομυκίνης: Για την κατασκευή ενός διαλύματος αποθήκευσης δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 1000μg/ml ζυγίστηκαν 0,014gr Cubicin® 500mg, στα οποία προστέθηκαν 10ml του διαλύτη που κατασκευάστηκε παραπάνω. Το πρότυπο διάλυμα φυλάχθηκε σε κατακόρυφο καταψύκτη στους -20°C.

5) Διάλυμα αποθήκευσης (Stock solution) κιννοξαλίνης: Χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα κιννοξαλίνης συγκέντρωσης 10μg/mL σε διαλύτη νερό: μεθανόλη σε σύσταση 50 : 50 % v / v. Πιο συγκεκριμένα ζυγίστηκαν 0,5gr κιννοξαλίνης, τα οποία διαλύθηκαν σε διάλυμα νερό:μεθανόλη σε σύσταση 25 : 25 ml. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

Ανάπτυξη της μεθόδου

Επιλογή εκλουστικού συστήματος: Αρχικά, όσον αφορά τα προγράμματα έκλουσης, η βαθμωτή έκλουση έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο και η ισοκρατική έκλουση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η ισοκρατική έκλουση με σύστημα διαλυτών μεθανόλης: KH_2PO_4 0,1mM 65%:35% σε πρόγραμμα 15 λεπτών. Επιπλέον, για την καλύτερη σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος και για την αποφυγή σφαλμάτων επιλέχθηκε ο χώρος της στήλης να έχει σταθερή θερμοκρασία. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50°C.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που τελικά επιλέχθηκαν ήταν:

- Αναλυτική στήλη: SUPERALCO C18 (15cm X 4,6mmX 5μm)
- Εκλουστικό σύστημα (κινητή φάση): δισόξινο φωσφορικό κάλιο(KH_2PO_4): Μεθανόλη (MeOH), με πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης(65%)
- Πίεση: 700-900psi
- Ταχύτητα ροής: 0,700mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 50°C

- Όγκος έγχυσης: 0,20ml
- Εσωτερικό πρότυπο: διάλυμα κινόξαλίνης

Προκατεργασία δειγμάτων

Στα δείγματα πλάσματος έγινε επεξεργασία με δύο διαφορετικούς τρόπους και επιλέχθηκε ο τρόπος που έδινε τον καλύτερο διαχωρισμό της δαπτομυκίνης και του εσωτερικού προτύπου από τις προσμίξεις, για να επιτευχθεί η ύπαρξη μόνο των προσδιοριζόμενων ουσιών στα χρωματογραφήματα. Οι δύο τρόποι επεξεργασίας είναι οι ακόλουθοι:

1. Επεξεργασία των δειγμάτων με ακετονιτρίλιο για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμεύουσες πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα τα στάδια της επεξεργασίας είναι τα ακόλουθα:

- Φυγοκέντριση δειγμάτων αίματος στις 1600 στροφές για 15 λεπτά. Παραλαβή και συλλογή του υπερκείμενου πλάσματος και διατήρησή του στην κατάψυξη στους -20°C
- Αρχικά παρασκευή του blank πλάσματος. Σε 1ml πλάσματος προστίθεται 1ml ακετονιτριλίου στάγδην. Η χρήση του ακετονιτριλίου συμβάλλει στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του πλάσματος (οι οποίες συγκεντρώνονται στο ίζημα μετά τη φυγοκέντριση). Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με συσκευή vortex για λίγα δευτερόλεπτα και φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C . Τέλος παραλαβή του υπερκείμενου και εισαγωγή του σε φίλτρο σύριγγας Nylon syringe filter $0.2\mu\text{m}$, η χρήση του οποίου βοηθά στην κατακράτηση πιθανόν προσμίξεων ή πρωτεϊνών που υπάρχουν στο υπερκείμενο.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε κάθε δείγμα πλάσματος ακολουθήθηκαν τα ανωτέρω βήματα. Έτσι, με τον τρόπο επεξεργασίας το δείγμα που εισάγεται στη στήλη είναι καθαρό από προσμίξεις και δεν δημιουργεί πρόβλημα επιμόλυνσης στη στήλη.

2. Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμεύουσες πρωτεΐνες με ακετονιτρίλιο και απομόνωση των συστατικών της μήτρας με υπερ-διήθηση μέσω μεμβρανών κελουλόζης.

Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στην υπερδιήθηση. Η υπερδιήθηση γίνεται με ειδικά φίλτρα τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα 7. Τα φίλτρα αποτελούνται από πλαστικό σωλήνα από πολυαιθυλένιο με μικρή διάμετρο (sample reservoir), στη βάση του οποίου υπάρχει δακτύλιος (o-ring) που καταλήγει στη μεμβράνη (membrane) που είναι από κελουλόζη, για να συγκρατεί και να διαχωρίζει τις ανεπιθύμητες ουσίες του πλάσματος και να παραλαμβάνεται το καθαρό δείγμα για την ανάλυση στο μηχάνημα της υγρής χρωματογραφίας στο πλαστικό δοχείο (filtrate cup) που υπάρχει κάτω από την μεμβράνη.



Εικόνα 7: Ειδικά φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν για υπερδιήθηση(<http://www.medicaexpo.com/prod/merck-millipore/product-70876-442562>)

Η μεμβράνη που βρίσκεται στη βάση του φίλτρου, έχει εμβαδόν επιφάνειας 0.92cm^2 και επηρεάζεται από το pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται καθώς και από την ύπαρξη ισχυρών οργανικών διαλυτών. Για το λόγο αυτό ελέγχεται το pH των διαλυμάτων και αποφεύγονται οι ισχυροί οργανικοί διαλύτες. Το φίλτρο πρέπει να βρίσκεται σε γωνία 45° όταν πληρώνεται με το δείγμα για να αποφεύγονται οι φυσαλίδες γιατί δημιουργούν πρόβλημα κατά την φυγοκέντριση. Ο όγκος του δείγματος που θα υποστεί υπερδιήθηση πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 150μL και μέχρι τα 1000μL και για τη φυγοκέντριση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταχύτητα στο spin μεταξύ των 1000 και μέχρι τα 2000g. Πάνω στην μεμβράνη υπάρχει γλυκερόλη η οποία πρέπει να απομακρυνθεί πριν την χρησιμοποίησή τους, γιατί η ουσία αυτή παρεμποδίζει κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης αφού εκλούεται μαζί με το αντιβιοτικό και δημιουργεί διπλή κορυφή.

Αφού πρώτα γίνει η επεξεργασία με το ακετονιτρίλιο όπως περιγράφεται παραπάνω, χωρίς να γίνει εισαγωγή του δείγματος σε φίλτρο σύριγγας Nylon syringe filter $0.2\mu\text{m}$, ακολουθείται η εξής διαδικασία σε κάθε φιλτράκι:

- Προστέθηκε 1mL διαλύματος NaOH 0.1N
- Φυγοκεντρήθηκε στα 2000g στους 20°C για 30min
- Έγινε απόχυση του κλάσματος της φυγοκέντρωσης
- Έκπλυση με 1mL νερού και επανάληψη της φυγοκέντρωσης στα 2000g στους 20°C για 30min
- Έγινε απόχυση του κλάσματος της έκπλυσης της φυγοκέντρωσης

Εν συνεχεία έγινε η τοποθέτηση του εξεταζόμενου δείγματος πλάσματος στο φιλτράκι, φυγοκεντρήθηκε στα 2000g στους 20°C για 30min. Τέλος τοποθετούνται τα 120μL που προκύπτουν από την υπερδιήθησή του, σε φιαλίδια στον δειγματολήπτη του

μηχανήματος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ακολουθείται χρωματογραφική ανάλυση.

Συμπερασματικά, ο δεύτερος τρόπος επεξεργασίας είχε καλύτερη απόδοση, διότι απαλλάσσει το δείγμα από τα συστατικά του πλάσματος που μολύνουν σταδιακά την χρωματογραφική στήλη και παρεμποδίζουν την ανάλυση (μετατόπιση και παραμόρφωση των χρωματογραφικών κορυφών).

Αποτελέσματα

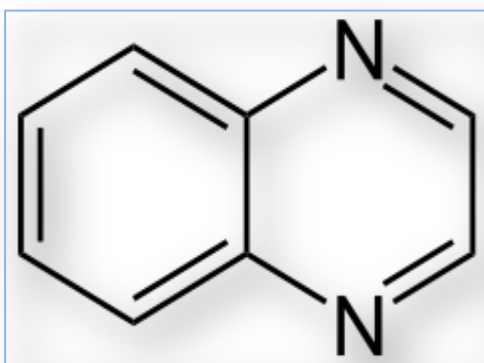
Τεχνική της καμπύλης αναφοράς

Όσο αναφορά την τεχνική της καμπύλης αναφοράς, στηρίζεται στην βαθμονόμηση του οργάνου μέτρησης με χρήση πρότυπων (standards) της υπό προσδιορισμό ουσίας (αναλύτη). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο αριθμός των προτύπων κυμαίνεται από 3 (ελάχιστος αριθμός προτύπων) έως 6. Τα πειραματικά σημεία μεταφέρονται σε διάγραμμα με τετημένη την συγκέντρωση (ή μάζα) της ουσίας και τεταγμένη την μετρούμενη φυσική/ φυσικοχημική ιδιότητα.

Η ιδανική καμπύλη αναφοράς παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) Είναι γραμμική (linear), 2) Διέρχεται από την αρχή των αξόνων, 3) Μπορεί να εφαρμοστεί σε ευρύτατη περιοχή συγκεντρώσεων.

Τεχνική του εσωτερικού προτύπου

Στα πρότυπα και στα άγνωστα δείγματα προστίθεται αυστηρά **ΙΔΙΑ** συγκέντρωση μιας ουσίας (εσωτερικό πρότυπο) που ΔΕΝ υπάρχει στο δείγμα. Για κάθε πρότυπο και άγνωστο δείγμα μετρούνται τα σήματα της υπό προσδιορισμό ουσίας (αναλύτη) P_x και του εσωτερικού προτύπου P_{is} . Ο λόγος (P_x/P_{is}) χρησιμοποιείται ως «διορθωμένο» σήμα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ή τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του άγνωστου δείγματος. Η καμπύλη αναφοράς περιέχει ως τεταγμένη τον λόγο (σήμα αναλύτη/ σήμα εξωτερικού προτύπου). Η ουσία που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο πρέπει να εμφανίζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τον αναλύτη (εδώ τη δαπτομυκίνη), να εμφανίζει παραπλήσια συμπεριφορά στην αναλυτική μέθοδο και να μπορεί να προσδιορίζεται εκλεκτικά. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε



ως εσωτερικό πρότυπο η κινόξαλίνη, η οποία είναι μια αρωματική ετεροκυκλική οργανική ένωση. Έχει δικυκλική δομή, αποτελούμενη από έναν δακτύλιο βενζολίου, συμπυκνωμένο με έναν δακτύλιο πυραζίνης.

Εικόνα 8: Δομή της κινόξαλίνης (<http://www.wikiwand.com/el>)

Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με υδατικά διαλύματα περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα: Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα πρότυπα υδατικά διαλύματα δαπτομυκίνης συγκεντρώσεων 20,40,80 και 120μg/ml. Οι συγκεντρώσεις τους ανήκουν στο θεραπευτικό εύρος των συγκεντρώσεων της δαπτομυκίνης στο πλάσμα. Από βιβλιογραφική ανασκόπηση βρέθηκε ότι το εύρος των θεραπευτικών συγκεντρώσεων στο πλάσμα κυμαίνεται από 8μg/ml ελάχιστη συγκέντρωση μέχρι και 150μg/ml η μέγιστη. Οπότε οι συγκεντρώσεις των τεσσάρων πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται μέσα στο εύρος αυτό και το καλύπτουν.

Για την παρασκευή του κάθε υδατικού προτύπου προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος του διαλύματος της δαπτομυκίνης, του εσωτερικού προτύπου και του διαλύτη σε τελικό όγκο δείγματος 1ml. Στον πίνακα 3 φαίνονται ακριβώς οι ποσότητες που προστέθηκαν για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Όγκος stock διαλύματος δαπτομυκίνης (μl)	Όγκος εσωτερικού προτύπου-κινόξαλίνης(μl)	Όγκος διαλύτη-ΚΗ ₂ ΡΟ ₄ (μl)
20	20	5	975
40	40	5	955
80	80	5	915
120	120	5	875

Πίνακας 3: Υδατικά πρότυπα

Η καμπύλη αναφοράς προέκυψε έπειτα από ανάλυση των πρότυπων αυτών υδατικών διαλυμάτων και εμβοδομέτρηση των κορυφών της δαπτομυκίνης για κάθε συγκέντρωση. Η χάραξη της πραγματοποιήθηκε με βάση το μέσο όρο του λόγου του εμβαδού της δαπτομυκίνης προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου.

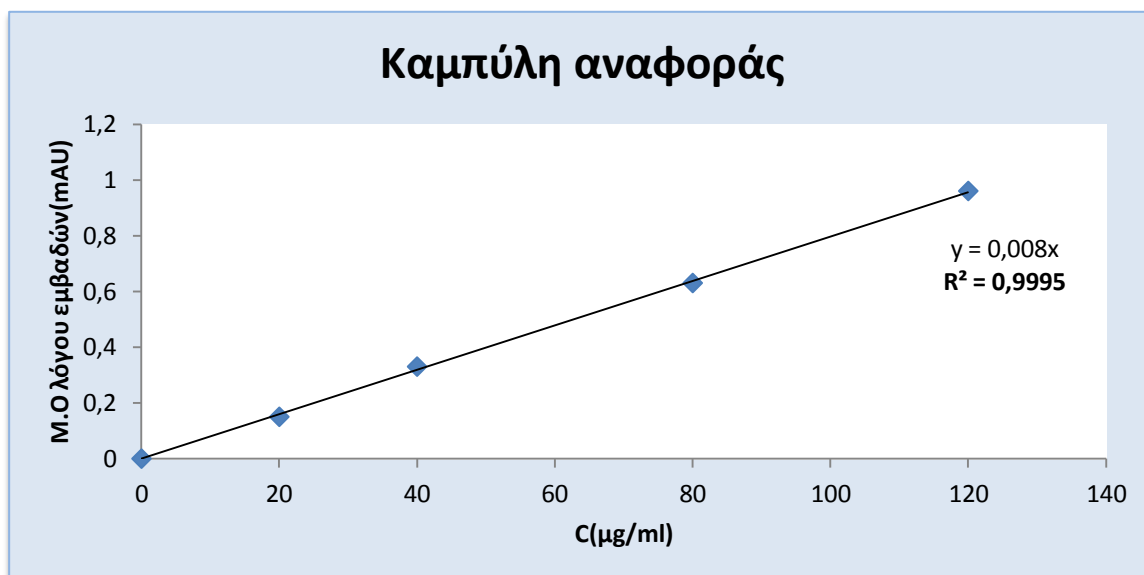
Στους Πίνακες 4 και 5 φαίνονται οι τιμές του λόγου των εμβαδών για κάθε μια από τις συγκεντρώσεις στα 224nm και στα 280nm και στο Σχήμα 2 και 3 οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Μ.Ο. λόγου
20	0,15
40	0,33
80	0,63
120	0,96

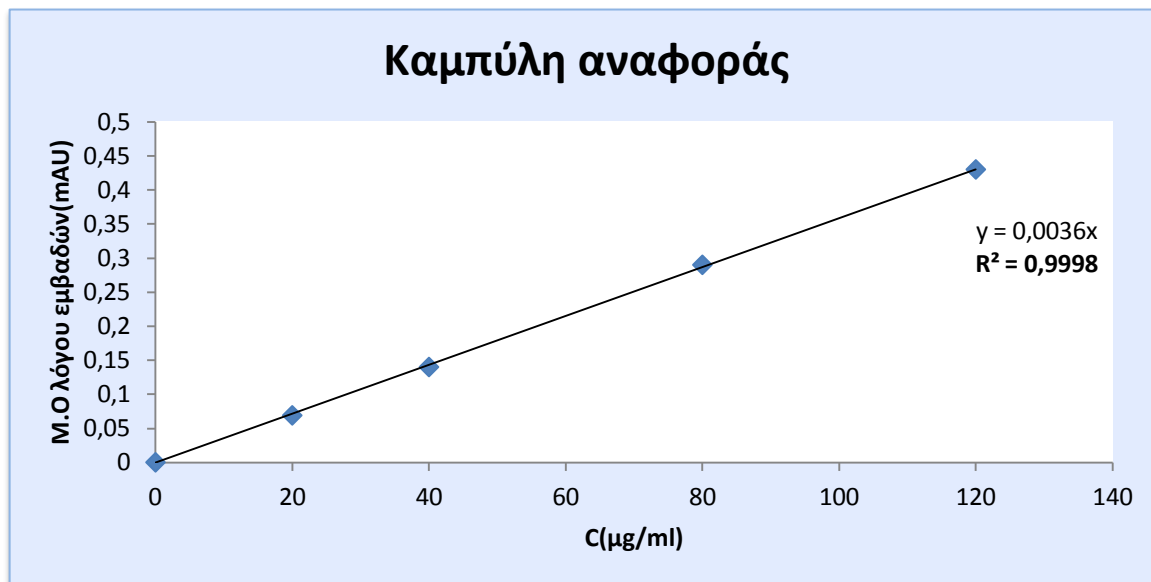
Πίνακας 4: Υδατικά πρότυπα-Μ.Ο λόγου στα 224nm

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Μ.Ο. λόγου
20	0,069
40	0,14
80	0,29
120	0,43

Πίνακας 5: Υδατικά πρότυπα-Μ.Ο λόγου στα 280nm



Σχήμα 2: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 224nm



Σχήμα 3: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 280nm

Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2) της καμπύλης αναφοράς είναι 0,9995 και 0,9998, που αποδεικνύει τη γραμμικότητα της μεθόδου. Ο χρόνος έκλουσης της δαπτομυκίνης ήταν $t_R=9,79$ min και εσωτερικού προτύπου $t_R=4$ min. Τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς παρατίθενται στο Παράρτημα σελίδες 52-55.

Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στο πλάσμα

Ακολούθησε η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στο πλάσμα. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα πρότυπα διαλύματα πλάσματος συγκεντρώσεων 20,40,80 και 120μg/ml, ίδιων δηλαδή συγκεντρώσεων με των υδατικών πρότυπων διαλυμάτων. Για την παρασκευή του κάθε προτύπου προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος του διαλύματος της δαπτομυκίνης, του εσωτερικού προτύπου και του πλάσματος σε τελικό όγκο 1ml. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται ακριβώς οι ποσότητες που προστέθηκαν για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Όγκος stock διαλύματος δαπτομυκίνης (μl)	Όγκος εσωτερικού προτύπου-κιννοξαλίνης (μl)	Όγκος διαλύτη- KH_2PO_4 (μl)
20	20	2	978
40	40	2	958
80	80	2	918
120	120	2	878

Πίνακας 6: Πρότυπα διαλύματα πλάσματος

Τα διαλύματα αφού παρασκευάστηκαν, επεξεργάστηκαν με τον πρώτο τρόπο επεξεργασίας σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω στην παράγραφο για την επεξεργασία των δειγμάτων.

Η καμπύλη αναφοράς προέκυψε έπειτα από ανάλυση των πρότυπων αυτών δειγμάτων πλάσματος και εμβοδομέτρηση των κορυφών της δαπτομυκίνης για κάθε συγκέντρωση. Η χάραξή της πραγματοποιήθηκε με βάση το μέσο όρο του λόγου του εμβαδού της δαπτομυκίνης προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου.

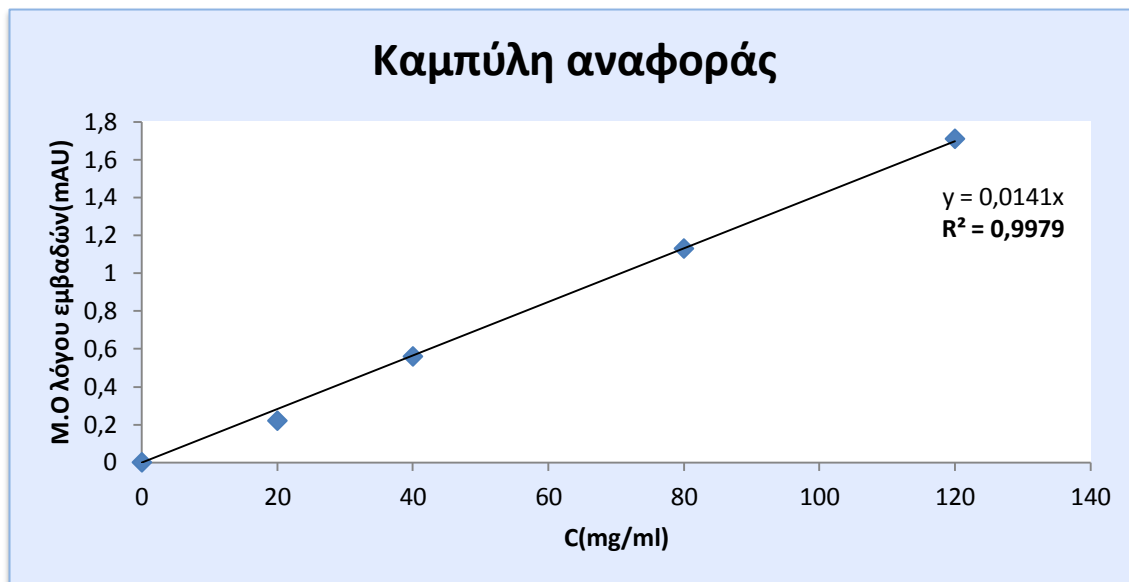
Στους Πίνακα 7 και 8 φαίνονται οι τιμές του λόγου των εμβαδών για κάθε μια από τις συγκεντρώσεις στα 224nm και στα 280nm και στο Σχήμα 4 και 5 οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Μ.Ο. λόγου
20	0,22
40	0,56
80	1,13
120	1,71

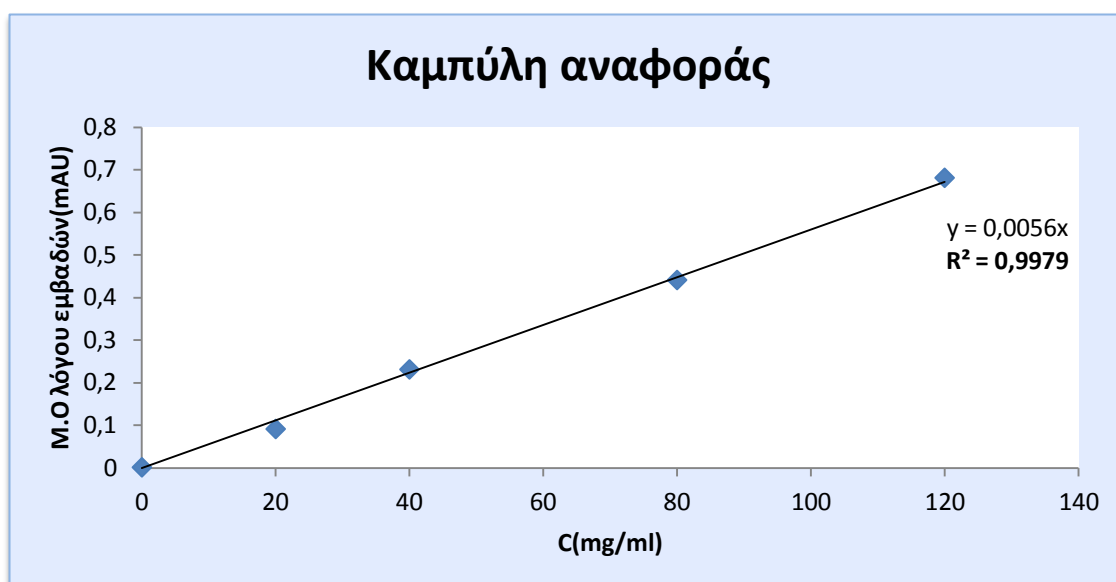
Πίνακας 7: Πρότυπα πλάσματος-Μ.Ο λόγου στα 224nm

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Μ.Ο. λόγου
20	0,09
40	0,23
80	0,44
120	0,68

Πίνακας 8: Πρότυπα πλάσματος-Μ.Ο λόγου στα 280nm



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 224nm



Σχήμα 5: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 280nm

Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2) της καμπύλης αναφοράς είναι 0,9979, που αποδεικνύει τη γραμμικότητα της μεθόδου. Ο χρόνος έκλουσης της δαπτομυκίνης ήταν $t_R = 8,4 \pm 0,10$ min και εσωτερικού προτύπου $t_R = 3,7$ min.

Τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς παρατίθενται στο Παράρτημα σελίδες 56-59.

Οι παραπάνω καμπύλες αναφοράς στο πλάσμα (Σχήμα 4 και 5) αφορά δείγματα πλάσματος, στα οποία έγινε προκατεργασία με προσθήκη ακετονιτριλίου για κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Κατασκευάστηκε και καμπύλη αναφοράς στο πλάσμα (Σχήμα 6 και 7) που αφορά δείγματα πλάσματος, στα οποία έγινε επεξεργασία με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμεύουσες πρωτεΐνες με ακετονιτρίλιο

και απομόνωση των συστατικών της μήτρας με υπερ-διήθηση μέσω μεμβρανών κελουλόζης.

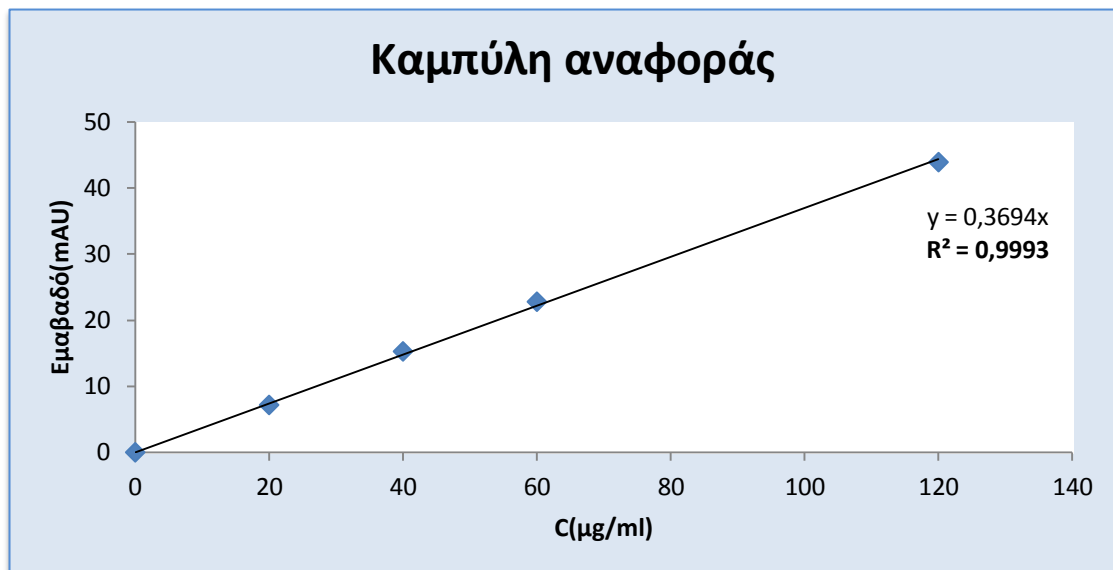
Στους Πίνακα 9 και 10 φαίνονται οι τιμές των εμβαδών της δαπτομυκίνης για κάθε μια από τις συγκεντρώσεις στα 224nm και στα 280nm και στο Σχήμα 6 και 7 οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Εμβαδό δαπτομυκίνης
20	7,167
40	15,265
80	22,778
120	43,9

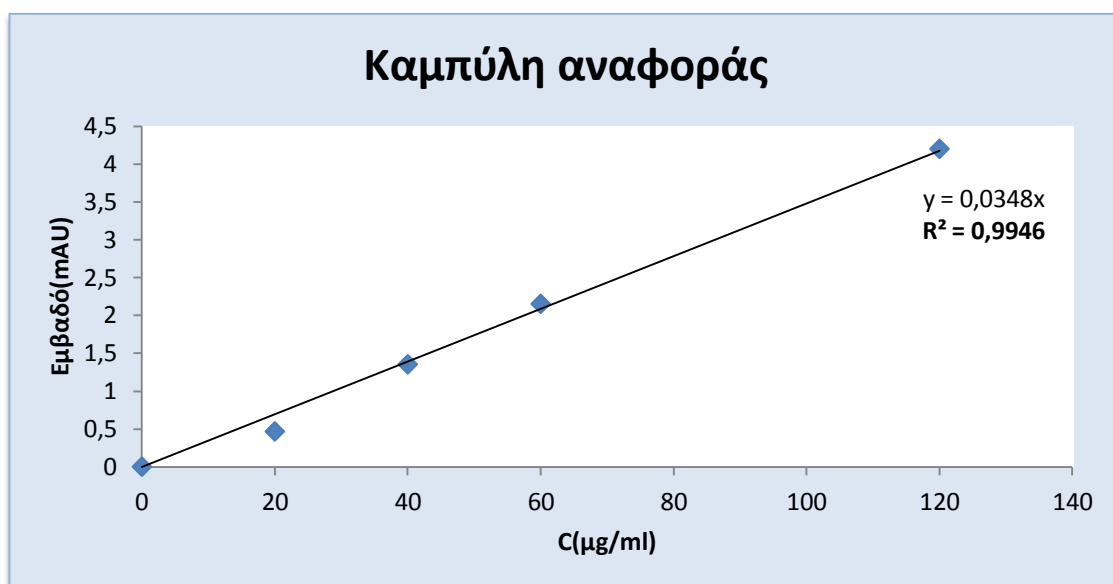
Πίνακας 9: Πρότυπα διαλύματα πλάσματος στα 224nm

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (μg/ml)	Εμβαδό δαπτομυκίνης
20	0,4657
40	1,3529
80	2,152
120	4,2

Πίνακας 10: Πρότυπα διαλύματα πλάσματος στα 280nm



Σχήμα 6: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 224nm



Σχήμα 7: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς στα 280nm

Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2) της καμπύλης αναφοράς είναι 0,9993 και 0,9946, που αποδεικνύει τη γραμμικότητα της μεθόδου. Ο χρόνος έκλουσης της δαπτομυκίνης ήταν $t_R=8$ min και εσωτερικού προτύπου $t_R=3,8$ min.

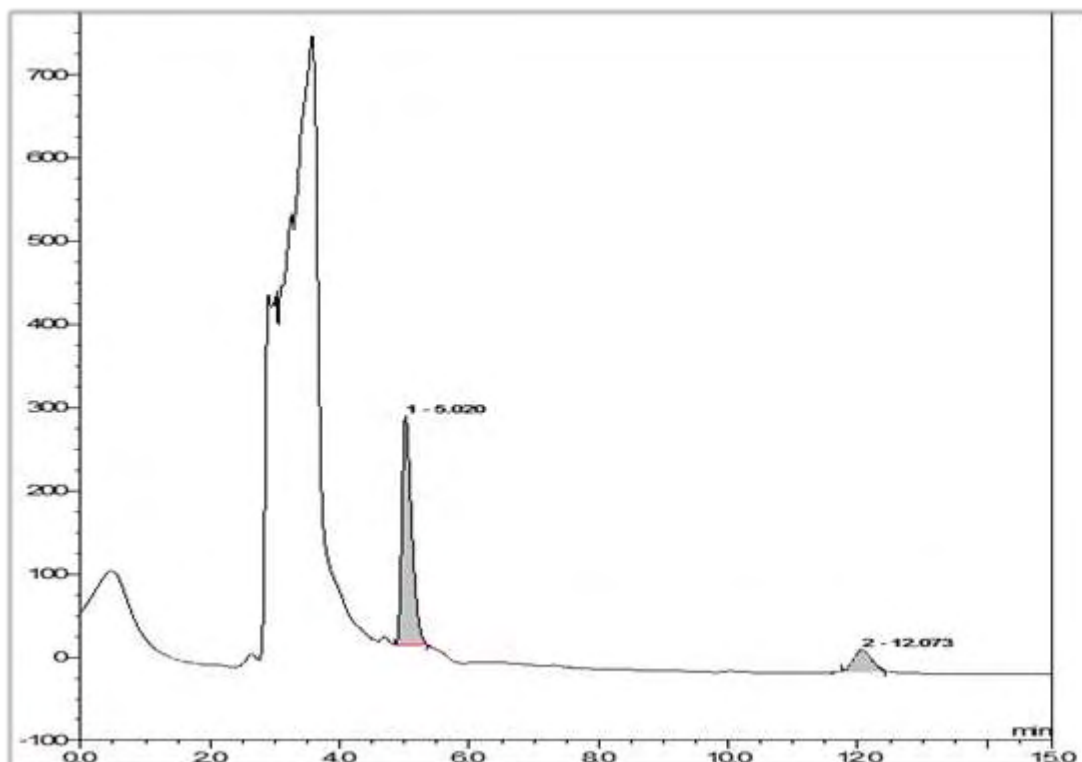
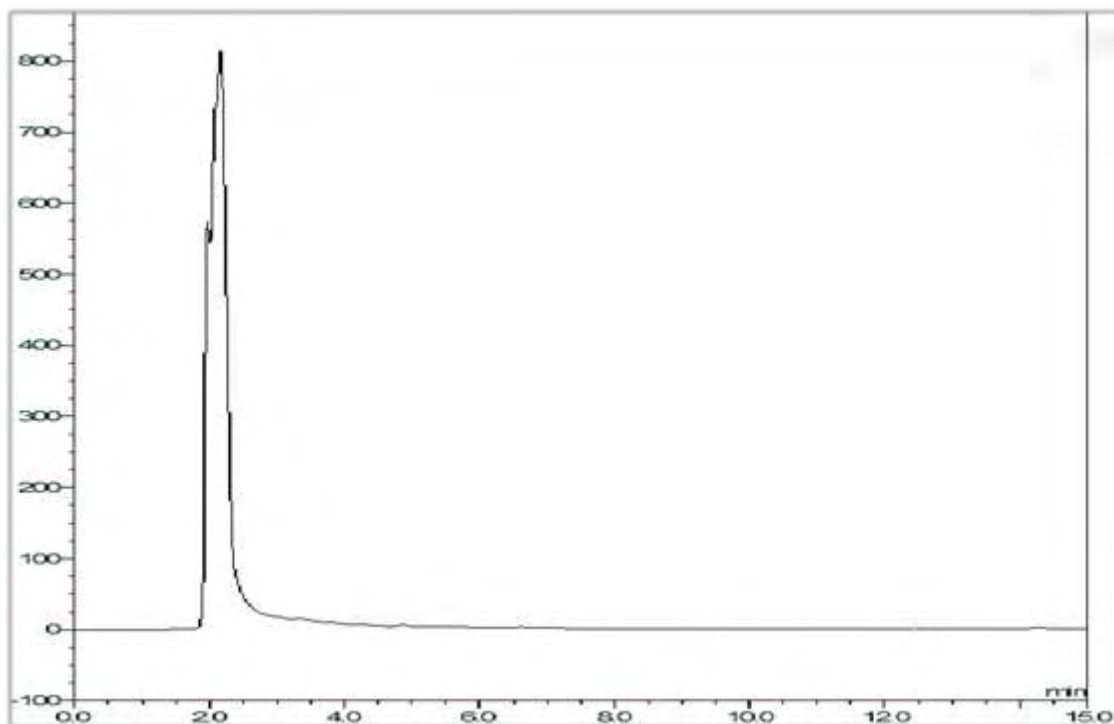
Ενδεικτικά χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς παρατίθενται στο Παράρτημα σελίδες 60-61.

Επικύρωση της μεθόδου

Εκλεκτικότητα (Specificity)

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης είναι εκλεκτική, αφού δεν εμφανίζει κορυφή σε τυφλό δείγμα στον χρόνο έκλουσης της κορυφής μας. Στην εικόνα

11 δίνεται το χρωματογράφημα του blank πλάσματος, το οποίο εμφανίζει μόνο μία κορυφή στα δύο λεπτά και δεν εμφανίζει καμία στο χρόνο έκλουσης του εσωτερικού προτύπου και της δαπτομυκίνης, ενώ στο κάτω μέρος του σχήματος δίνεται ένα χρωματογράφημα πλάσματος, συγκέντρωσης 20μg/ml.



Εικόνα 9: Χρωματογραφήματα α) λευκού πλάσματος(*blank plasma*) και β) δαπτομυκίνης σε πλάσμα συγκέντρωσης 20mg/ml Κορυφές: κινολοξονική (εσωτερικό πρότυπο) $t_R=5,02min$, δαπτομυκίνη $t_R=12,07min$

Γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς (*Calibration curve linearity*)

Η καμπύλη αναφοράς τόσο στα υδατικά διαλύματα όσο και στα δείγματα πλάσματος, αποδεικνύει τη γραμμικότητα της μεθόδου λόγω της τιμής του συντελεστή R που είναι μεγαλύτερη από 0,95.

Για την απόδειξη της γραμμικότητας παρασκευάστηκαν 4 πρότυπα υδατικά διαλύματα δαπτομυκίνης σε συγκεντρώσεις 20,40,80 και 120mg/ml. Τα πρότυπα αυτά αναλύθηκαν για πέντε συνεχόμενες ημέρες. Για κάθε ανάλυση υπολογίστηκε η καμπύλη αναφοράς, ο συντελεστής R^2 , ο συντελεστής τυπικής απόκλισης SD και ο συντελεστής διακύμανσης CV. Η κάθε καμπύλη αναφοράς και οι παράγοντες αυτοί υπολογίστηκαν και με την παρουσία εσωτερικού προτύπου και χωρίς. Στους πίνακες 11 και 12 φαίνονται τα αποτελέσματα χωρίς τον υπολογισμό του εσωτερικού προτύπου σε μήκη κύματος 224nm και 280nm και στους πίνακες 13 και 14 φαίνονται τα αποτελέσματα με τον υπολογισμό του εσωτερικού προτύπου αντίστοιχα.

Χωρίς εσωτερικό πρότυπο

Curve	R^2	R	a	b
1	0,9999	0,9999	1,4187	0
2	0,9998	0,9999	1,3637	0
3	0,9991	0,9995	1,4278	0
4	1	1	1,502	0
5	0,9999	0,9999	1,386	0
Mean	0,99974	0,99984	1,41964	0
SD	0,00033	0,00017	0,04714	0
C.V(%)	0,03263	0,01744	3,32066	0

Πίνακας 11: Αποτελέσματα της ανάλυσης στα 224nm

Curve	R ²	R	a	b
1	0,9989	0,999	13,072	0
2	0,9997	0,9998	12,656	0
3	0,998	0,999	13,799	0
4	0,9999	0,9999	13,621	0
5	1	1	12,918	0
Mean	0,9993	0,99954	13,2132	0
SD	0,00076	0,00045	0,43058	0
C.V(%)	0,07568	0,04456	3,25875	0

Πίνακας 12: Αποτελέσματα της ανάλυσης στα 280nm

Με εσωτερικό πρότυπο

Curve	R ²	R	a	b
1	0,9975	0,9987	55,256	0
2	0,9952	0,9976	54,78	0
3	0,9908	0,9953	54,708	0
4	0,999	0,9995	54,031	0
5	0,9986	0,9992	53,466	0
Mean	0,99622	0,99806	54,4482	0
SD	0,00302	0,00152	0,62752	0
C.V(%)	0,30263	0,15269	1,15251	0

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα της ανάλυσης στα 224nm

Curve	R ²	R	a	b
1	0,9933	0,9966	111,57	0
2	0,9963	0,9981	110,84	0
3	0,9946	0,9973	116,19	0
4				
4	0,9991	0,9995	107	0
5	0,9971	0,9985	110,66	0
Mean	0,99608	0,998	111,252	0
SD	0,00201	0,00099	2,93546	0
C.V(%)	0,20143	0,09980	2,63860	0

Πίνακας 14 : Αποτελέσματα της ανάλυσης στα 280nm

Παρατηρήθηκε εξαιρετική γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης στο εύρος των συγκεντρώσεων 20-120mg/ml, με την τιμή του συντελεστή R να είναι αρκετά μεγαλύτερη από τα αποδεκτά κριτήρια ($R > 0.95$) με μέση τιμή 0,99984 χωρίς εσωτερικό πρότυπο και 0,99806 με εσωτερικό πρότυπο. Επιπλέον ο συντελεστής διακύμανσης κυμαίνεται στα 0,017 και 0,15 και όσο πιο μικρή η τιμή του τόσο πιο μικρή και η μεταβλητότητα.

Επαναληψιμότητα και ακρίβεια της μεθόδου (precision and accuracy)

Ελέγχθηκε η πιστότητα της μεθόδου ως προς την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια, ως σχετικό σφάλμα (%), στη διάρκεια μιας ημέρας ($n = 3$, intra-day) και σε διαφορετικές μέρες ($n = 5$, inter day).

Για την μέτρηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου στη διάρκεια μιας μέρας χρησιμοποιήθηκαν ποιοτικά διαλύματα δαπτομυκίνης (Quality Controls-QC) σε τρεις συγκεντρώσεις, 30,60 και 100 $\mu\text{g/ml}$. Το κάθε διάλυμα μετρήθηκε τρεις φορές. Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω διαλυμάτων επιλέχθηκαν ώστε η μία να βρίσκεται κοντά στη μικρότερη συγκέντρωση της καμπύλης αναφοράς(30 $\mu\text{g/ml}$), η επόμενη να βρίσκεται περίπου στο μέσο (60 $\mu\text{g/ml}$) και η μεγαλύτερη να είναι περίπου στο 80% της υψηλότερης συγκέντρωσης(100 $\mu\text{g/ml}$). Για την μέτρηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου σε διαφορετικές μέρες παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης πάλι σε συγκέντρωσεις 30,60 και 90 $\mu\text{g/ml}$. Τα πρότυπα αυτά παρασκευάστηκαν κάθε μέρα και μετρήθηκαν για πέντε συνεχόμενες μέρες. Για τον υπολογισμό της ακρίβειας της μεθόδου, υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (%), σύμφωνα με την εξίσωση στη

σελίδα 25 του θεωρητικού μέρους και για το υπολογισμό της επαναληψιμότητας και κατ' επέκταση της πιστότητας υπολογίστηκε ο συντελεστής διακύμανσης(CV).

Στους πίνακες 15 και 16 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου μέσα σε μία ημέρα(intra-day) στα 224 και 280nm μήκη κύματος. Η ακρίβεια φαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα με μέση τιμή 96% και 94% και τον συντελεστή διακύμανσης να κυμαίνεται από 0,25 μέχρι 3,22%.

Target concentration (µg/ml)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias(%)
	Mean	SD	C.V.(%)		
Intra-day(n=3)					
30	26,90	0,29	1,08	89,67	-10,33
60	58,10	0,25	0,42	96,84	-3,16
100	94,50	0,24	0,25	94,5	-5,5

Πίνακας 15: (Επαναληψιμότητα και ακρίβεια στα 224nm στη διάρκεια μιας ημέρας)

Target concentration (µg/ml)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias(%)
	Mean	SD	C.V.(%)		
Intra-day(n=3)					
30	28,68	0,88	3,05	95,6	-4,40
60	62	1,12	1,81	96,67	-3,33
100	96,76	1,28	1,32	96,76	-3,24

Πίνακας 16: (Επαναληψιμότητα και ακρίβεια στα 280nm στη διάρκεια μιας ημέρας)

Στους πίνακες 17 και 18 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου μέσα σε διάστημα πέντε ημερών (inter-day) στα 224 και 280nm. Η ακρίβεια φαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα με μέση τιμή 101% και ο συντελεστής διακύμανσης κυμαίνεται από 0,25 μέχρι 3,22.

Target concentration (µg/ml)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias(%)
	Mean	SD	C.V.(%)		
Inter-day(n=5)					
30	31,16	0,96	3,07	103,86	3,86
60	61,47	1,86	3,03	102,45	2,45
100	97,87	3,35	3,42	97,87	-2,13

Πίνακας 17: (Επαναληψιμότητα και ακρίβεια στα 224nm στη διάρκεια πέντε ημερών)

Target concentration (µg/ml)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias(%)
	Mean	SD	C.V.(%)		
Inter-day(n=5)					
30	30,37	1,50	4,94	101,23	1,23
60	61,56	0,83	1,34	102,60	2,60
100	99,76	3,23	3,24	100,24	0,24

Πίνακας 18: (Επαναληψιμότητα και ακρίβεια στα 280nm στη διάρκεια πέντε ημερών)

Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ)

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2). Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση(SD)=0,011717 και με βάση την κλίση της εξίσωσης ($\alpha=0,008$) έχουμε:

$$LOD = [3,3 \times SD]/\alpha = 4,83 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$LOQ = [10 \times SD]/\alpha = 14,64 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Και το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης είναι χαμηλότερα σε τιμή από την μικρότερη συγκέντρωση προτύπου(20 $\mu\text{g/ml}$) που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις και στις καμπύλες βαθμονόμησης.

Σταθερότητα(Stability)

Μελετήθηκε η σταθερότητα του διαλύματος αποθέματος της δαπτομυκίνης(stock solution). Έτσι αναλύθηκε ένα πρότυπο συγκέντρωσης 60 $\mu\text{g/ml}$ πριν και μετά την παραμονή του για επτά ημέρες στους -20°C. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναγράφονται στους πίνακες 21 και 22.

Η σταθερότητα των πρότυπων διαλυμάτων υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Μεταβολή C(\%)} = \frac{\text{συγκέντρωση πρώτης ημέρας} - \text{συγκέντρωση έβδομης ημέρας}}{\text{συγκέντρωση πρώτης ημέρας}} \times 100.$$

Άρα με αντικατάσταση των δεδομένων στον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι:

$$\text{Μεταβολή C(\%)} = \frac{62,99 - 61,49}{61,49} \times 100 = 2,4\%$$

Διάλυμα συγκέντρωσης 60 $\mu\text{g/ml}$	Λόγος εμβαδών(mAU)	Συγκέντρωση δαπτομυκίνης($\mu\text{g/ml}$)	Σταθερότητα(%)
Πρώτη ημέρα	1,15	62,99	97,64
Έβδομη ημέρα (μετά από μία εβδομάδα στους -22°C)	1,15	61,50	

Πίνακας 19: Σταθερότητα δαπτομυκίνης στα 224nm

Με τον ίδιο τύπο υπολογίζεται η σταθερότητα και στα 280nm:

$$\text{Μεταβολή C(\%)} = \frac{\text{συγκέντρωση πρώτης ημέρας} - \text{συγκέντρωση έβδομης ημέρας}}{\text{συγκέντρωση πρώτης ημέρας}} \times 100.$$

Άρα με αντικατάσταση των δεδομένων στον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι:

$$\text{Μεταβολή C(\%)} = \frac{62,07 - 61,97}{62,07} \times 100 = 0,16\%$$

Διάλυμα συγκέντρωσης 60μg/ml	Λόγος εμβαδών(mAU)	Συγκέντρωση δαπτομυκίνης (μg/ml)	Σταθερότητα(%)
Πρώτη ημέρα	0,56	62,07	99,84
Έβδομη ημέρα (μετά από μία εβδομάδα στους -22°C)	0,56	61,97	

Πίνακας 20: Σταθερότητα δαπτομυκίνης στα 280nm

Όπως παρατηρείται η σταθερότητα είναι πάρα πολύ υψηλή (97,64%, 99,84%), το οποίο φανερώνει ότι η δαπτομυκίνη ήταν σταθερή στις συνθήκες αποθήκευσής της (-20°C).

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύσσεται και επικυρώνεται η αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού της δαπτομυκίνης σε πλάσμα με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή σειράς διόδων (HPLC-PDA).

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε τόσο ισοκρατική έκλουση που μπορεί να εφαρμοστεί σε απλά χρωματογραφικά συστήματα όσο και βαθμωτή έκλουση για πιο σύνθετα συστήματα. Η ισοκρατική έκλουση έγινε με σύστημα διαλυτών μεθανόλης:KH₂PO₄0,1mM 65%:35% σταθερά με χρόνο έκλουσης της δαπτομυκίνης $t_R=9,79$ min και εσωτερικού προτύπου $t_R=4$ min, ενώ η βαθμωτή έγινε με γραμμική διαβάθμιση της σύστασης της μεθανόλης από 45% σε 85% και επέτρεψε ταχύτερο διαχωρισμό με $t_R=9,5$ min $t_R=5,5$ min. Και στις δύο περιπτώσεις έγινε διαχωρισμός και των δύο επιθυμητών ουσιών (δαπτομυκίνης και του εσωτερικού προτύπου κινολοξίνη) με καλή απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Για την ανάλυση των δειγμάτων του πλάσματος δοκιμάστηκαν δύο τρόποι επεξεργασίας των δειγμάτων:

1. Επεξεργασία των δειγμάτων με ακετονιτρίλιο για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη εκχύλιση της δαπτομυκίνης από δεσμευμένες πρωτεΐνες (η δαπτομυκίνη βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος δεσμευμένη 92% σε πρωτεΐνες του πλάσματος). Μετά από φυγοκέντριση και διήθηση του υπερκείμενου το διήθημα εισάγεται στο χρωματογράφο. Η διήθηση έγινε μέσω φίλτρων σύριγγας Nylon syringe filter 0.2μm. Ο τρόπος αυτός είναι ο βασικός τρόπος που περιγράφεται στις πρόσφατες δημοσιεύσεις για την ανάλυση της δαπτομυκίνης (πίνακας 2). Είναι ο απλούστερος τρόπος προεργασίας των δειγμάτων που όμως έχει ελάχιστη επιλεκτικότητα και παράγει εκχύλισμα με πολλές ενδογενείς ουσίες μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους που δύναται να μολύνουν την χρωματογραφική στήλη μετά από ορισμένο αριθμό εγχύσεων. Η μόλυνση της στήλης παρατηρήθηκε και στη δική μας περίπτωση με αποτέλεσμα χρονική μετατόπιση και παραμόρφωση των χρωματογραφικών κορυφών. Ο τρόπος αυτός κρίθηκε ακατάλληλος για τους δικούς μας στόχους.
2. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει την υπερ-διήθηση του εκχυλίσματος. Περιλαμβάνει βήματα κατακρήμνισης-εκχύλισης με ακετονιτρίλιο,

φυγοκέντρηση και υπερ- διήθηση του υπερκείμενου σε συσκευή υπερδιήθησης Centrifree® UF Device. Η συσκευή απομακρύνει ενδογενείς μακρομοριακές ενώσεις. Ως αποτέλεσμα είχαμε σταθερή και καλή απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού με σταθερούς χρόνους συγκράτησης έπειτα από πολλαπλές εγχύσεις.

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του Οργανισμού Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA). Η απόκριση του ανιχνευτή είναι γραμμική με $R^2 = 0,996 \pm 0,003$ (n=5) σε περιοχή συγκεντρώσεων 0 -120 µg/mL που καλύπτει την αναμενόμενη θεραπευτική περιοχή της δαπτομυκίνης. Η ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε με δείγματα ποιοτικού έλεγχου στα 30,60 και 100 µg/ml και έχει μέση τιμή 94% και 96% (στα 224nm και 280nm αντίστοιχα) σε ανάλυση εντός μιας ημέρας (intra-day-n=3), ενώ για ανάλυση εντός πέντε ημερών (inter-day-n=5) έχει μέση τιμή 101%. Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικής αποτίμησης της μεθόδου είναι LOD=4,83 µg/ml και LOQ=14,64 µg/ml .

Στην παρούσα διπλωματική, αποκτήθηκε γνώση για τις βασικές αρχές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και εξοικείωση με το σύστημα υγρής χρωματογραφίας DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA, καθώς και με τη χρήση του λογισμικού Chromeleon. Μελλοντικά στόχος είναι η μέθοδος αυτή να εφαρμοστεί και σε δείγματα ασθενών. Είναι μια μέθοδος με ακρίβεια, ευαισθητη, με μειωμένο κόστος και δεν είναι εξαιρετικά χρονοβόρα. Τέλος η συγκεκριμένη μέθοδος με τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό άλλων αντιβιοτικών σε βιολογικά υγρά ασθενών.

Βιβλιογραφία

1. Daptomycin Structure and Mechanism of action revealed, Previews, Chemistry & Biology, Vol. 11, 887–895, July, 2004
2. Νέοι Αντιμικροβιακοί Παράγοντες για τη Θεραπεία Ανθεκτικών Gram – Θετικών Λοιμώξεων, ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΚΑΡΑΧΑΛΙΟΣ, ΓΕΩΡΓΙΟΣ Χ. ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΗΣ, ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΚΑΡΑΧΑΛΙΟΣ, Ιατρικά χρονικά.
3. <http://www.antibiotics-info.org/daptomycin.html>
4. <http://el.wikipedia.org/wiki/> αντιβιοτικό
5. Daptomycin, Kerry L. Tedesco, PharmD, Michael J. Rybak, PharmD, MS, Medscape
6. <http://cubicin.com/datatour.html>
7. Daptomycin: From the Mountain to the Clinic, with Essential Help from Francis Tally, MD, [Barry I. Eisenstein](#), [Frederick B. Oleson Jr](#), and [Richard H. Baltz](#), Clin Infect Dis. 2010
8. Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος, europa.eu/health/documents
9. Validated high performance liquid chromatography–UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma, Jens Martens-Lobenhoffer , Jan T. Kielstein, Catrin Oye, Stefanie M. Bode-Boger.
10. An HPLC assay for daptomycin in serum, C. M. Tobin, J. M. Darville, A. M. Lovering and A. P. MacGowan.
11. Daptomycin Pharmacokinetics and Safety following Administration of Escalating Doses Once Daily to Healthy Subjects, Barry H. Dvorchik, David Brazier, Michael F. DeBruin, and Robert D. Arbeit.
12. Serum Bactericidal Activities of High-Dose Daptomycin with and without Coadministration of Gentamicin against Isolates of Staphylococcus aureus and Enterococcus species, C. Andrew DeRyke, Christina Sutherland, Bo Zhang, David P. Nicolau, Joseph L. Kuti.
13. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΜΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΣΤΕΡΕΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ (SOLID DISPERSION), Διδακτορική διατριβή, Μπαρμπαλέξης Παναγιώτης, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής
14. «Πειράματα Ποσοτικοποίησης Παραγόντων Ενώσεων α-Dicarbonyl του Κρασιού», Μπίτη Μαρία, Μυστηρίδου Εμμανουέλα, Πανεπιστήμιο Πατρών , Τμήμα Επιστήμης Υλικών
15. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (LC-MS/MS) ΣΕ ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ ΑΠΟ ΕΠΙΜΥΕΣ, ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ, ΧΗΜΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΑΝ. ΚΑΘ. Γ. ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ, Μεταπτυχιακή εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας
16. ΣΥΝΤΟΜΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA
17. ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 12ης Αυγούστου 2002 για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και

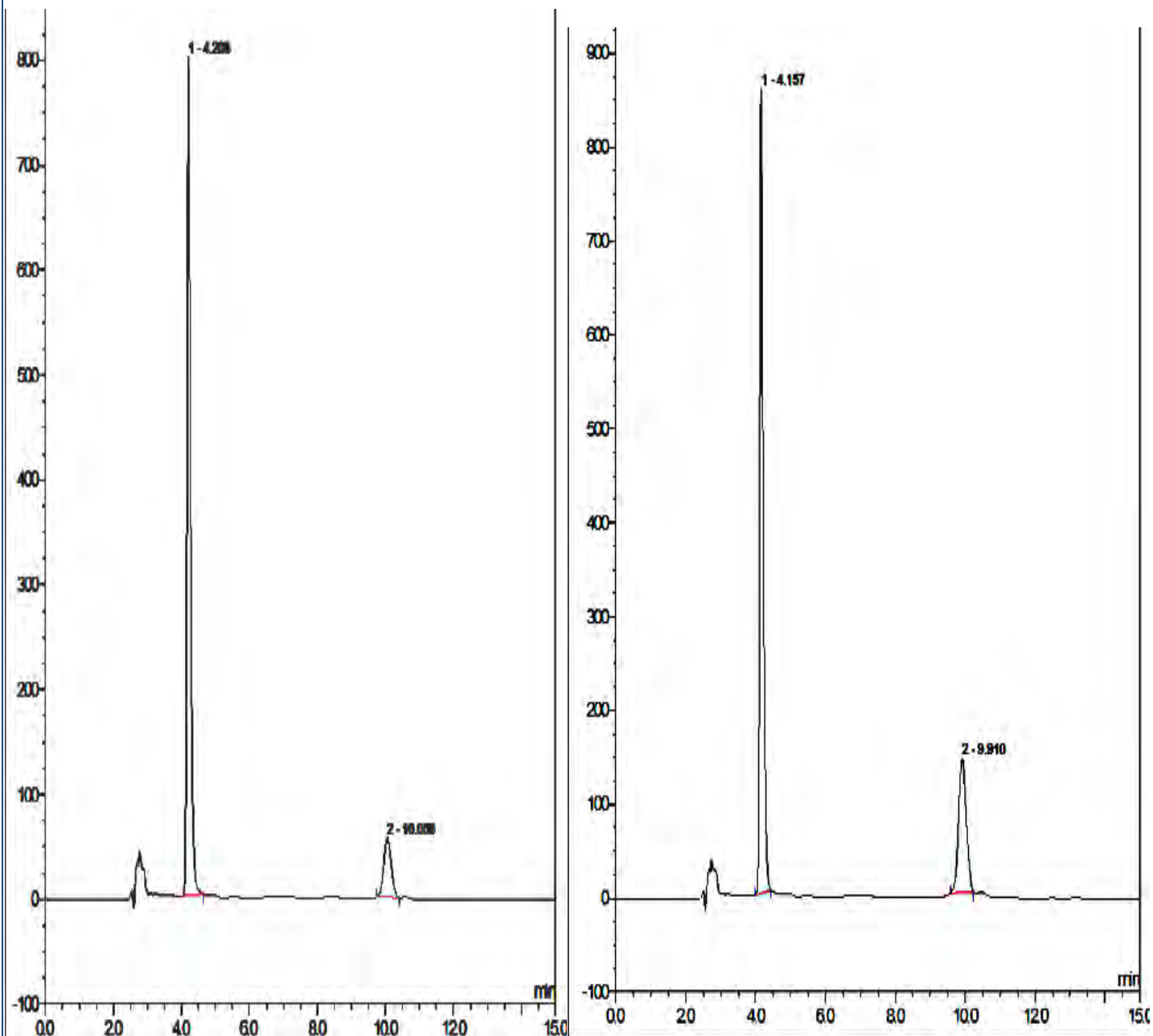
την ερμηνεία των αποτελεσμάτων [κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό Ε(2002) 3044]

18. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001, BP
19. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΜΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΣΤΕΡΕΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ (SOLID DISPERSION), Διδακτορική διατριβή, Μπαρμπαλέξης Παναγιώτης, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής
20. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (LC-MS/MS) ΣΕ ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ ΑΠΟ ΕΠΙΜΥΕΣ, ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ, ΧΗΜΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΑΝ. ΚΑΘ. Γ. ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ, Μεταπτυχιακή εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας
21. Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum, Andreas Tsakalof, Kyriaki Bairachtari, Manolis Georganakis, 2002
22. Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study, Evangelos Gikas, Fotini N. Bazoti, Panagiotis Fanourgiakis, Efstathia Perivolioti, Andreas Roussidis, Athanasios Skoutelis, Anthony Tzarbopoulos, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009
23. Simple and validated UHPLC method coupled to UV detection for determination of daptomycin in human plasma and urine, Takafumi Naito, Takahiro Yamada, Tatsuya Yagi and Junichi Kawakami, Biomedical Chromatography, 2013
24. Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Ι. Παπαδογιάννης, Β. Σαμανίδου, Θεσσαλονίκη (2000)
25. Tally FP, DeBruin MF. Development of daptomycin for Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother 2000
26. Rybak MJ, Bailey EM, Lamp KC et al. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for Gram-positive endocarditis and bacteraemia. Antimicrob Agents Chemother 1992
27. Tedesco KL, Rybak MJ. Daptomycin. Pharmacotherapy 2004
28. Sauermann R, Rothenburger M, Graninger W et al. Daptomycin: a review 4 years after first approval. Pharmacology 2008
29. Benvenuto M, Benziger DP, Yankelev S et al. Pharmacokinetics and tolerability of daptomycin at doses up to 12 milligrams per kilogram of body weight once daily in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother 2006
30. C.A. DeRyke, C. Sutherland, B. Zhang, D.P. Nicolau, J.L. Kuti, Antimicrob. Agents Chemother (2006)
31. J.N. Steenbergen, J. Alder, G.M. Thorne, F.P. Tally, Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious gram-positive infections, J. Antimicrob. Chemother (2005)

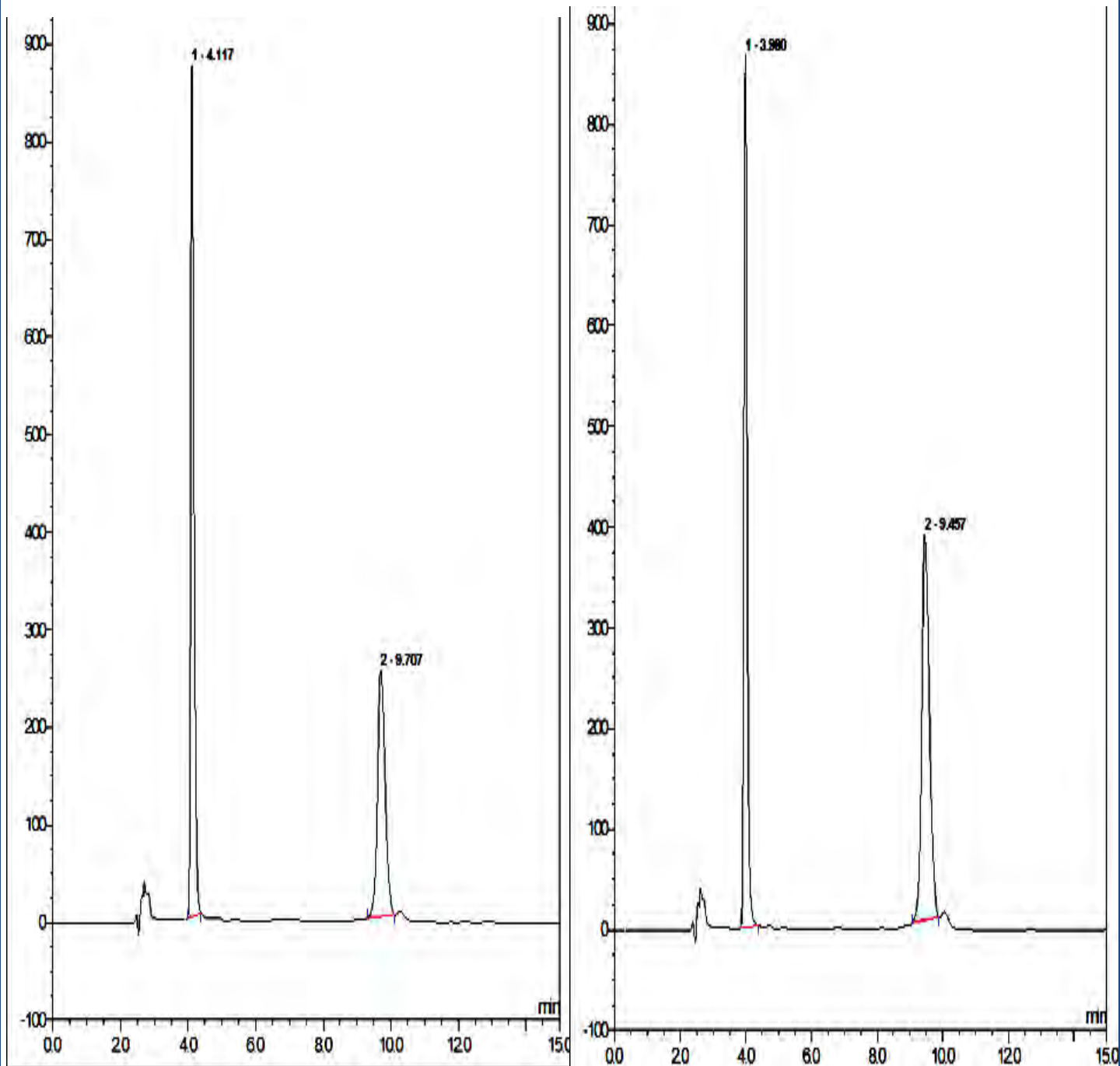
32. R.C. Hartkoorn, S. Khoo, D.J. Back, J.F. Tjia, C.J. Waitt, M. Chavonda, G. Davies, A. Ardrey, S. Ashleigh, S.A. Ward, A rapid and sensitive HPLC–MS method for the detection of plasma and cellular rifampicin, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci* (2007)
33. P.K. Dandekar, P.R. Tessier, P. Williams, C.H. Nightingale, D.P. Nicolau, Pharmacodynamic profile of daptomycin against *Enterococcus* species and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model, *J. Antimicrob. Chemother* (2003)

Παράρτημα

1. Παρατίθενται παρακάτω τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς με υδατικά διαλύματα δαπτομυκίνης στα 224nm

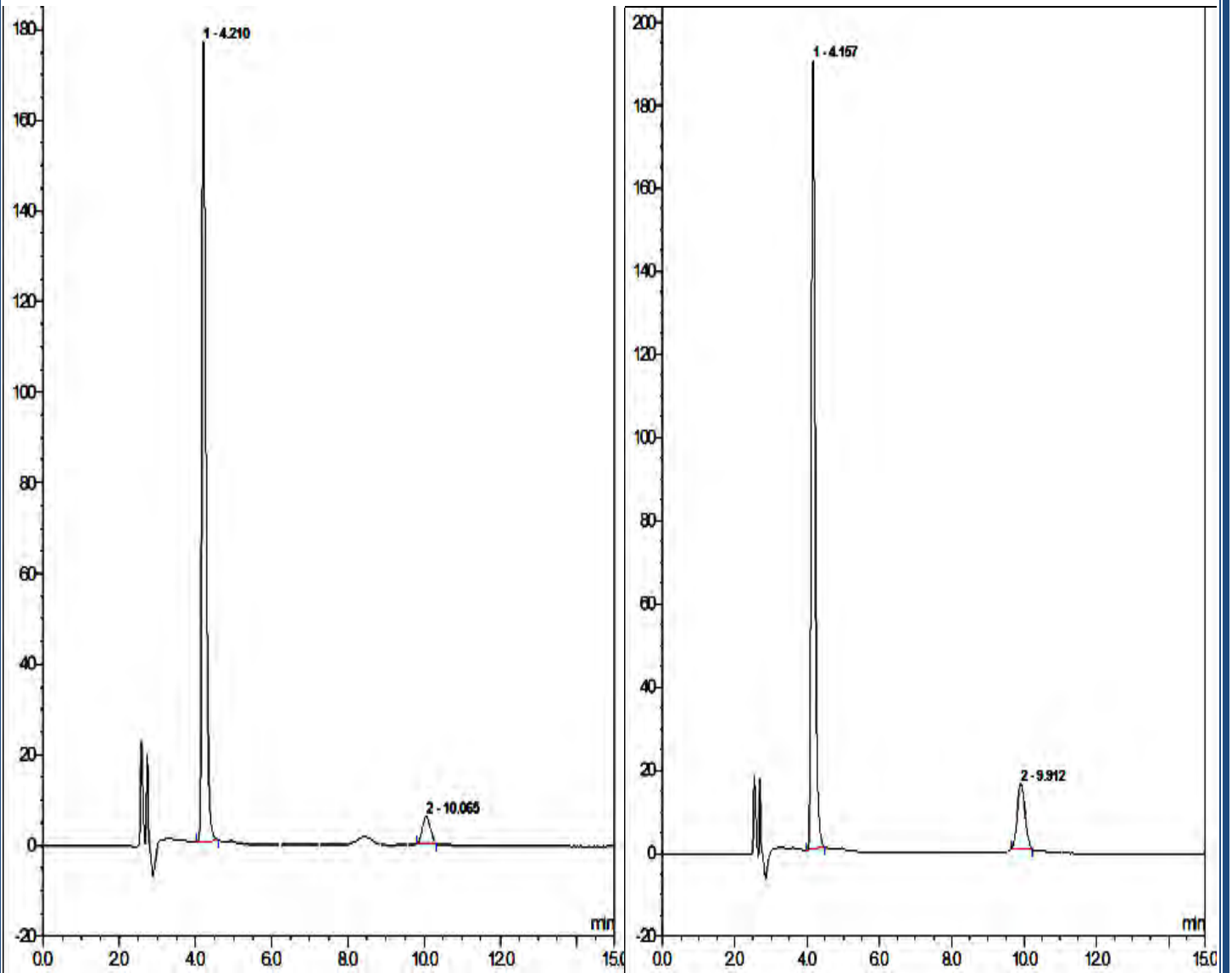


Εικόνα 12: Χρωματογραφήματα των υδατικών διαλυμάτων δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 20 μ g/ml και 40 μ g/ml στα 224nm. Η πρώτη κορυφή που εμφανίζεται στα 4 λεπτά είναι της κινολοξονίνης, δηλαδή του εσωτερικού προτύπου και η δεύτερη στα 10 λεπτά είναι της δαπτομυκίνης.

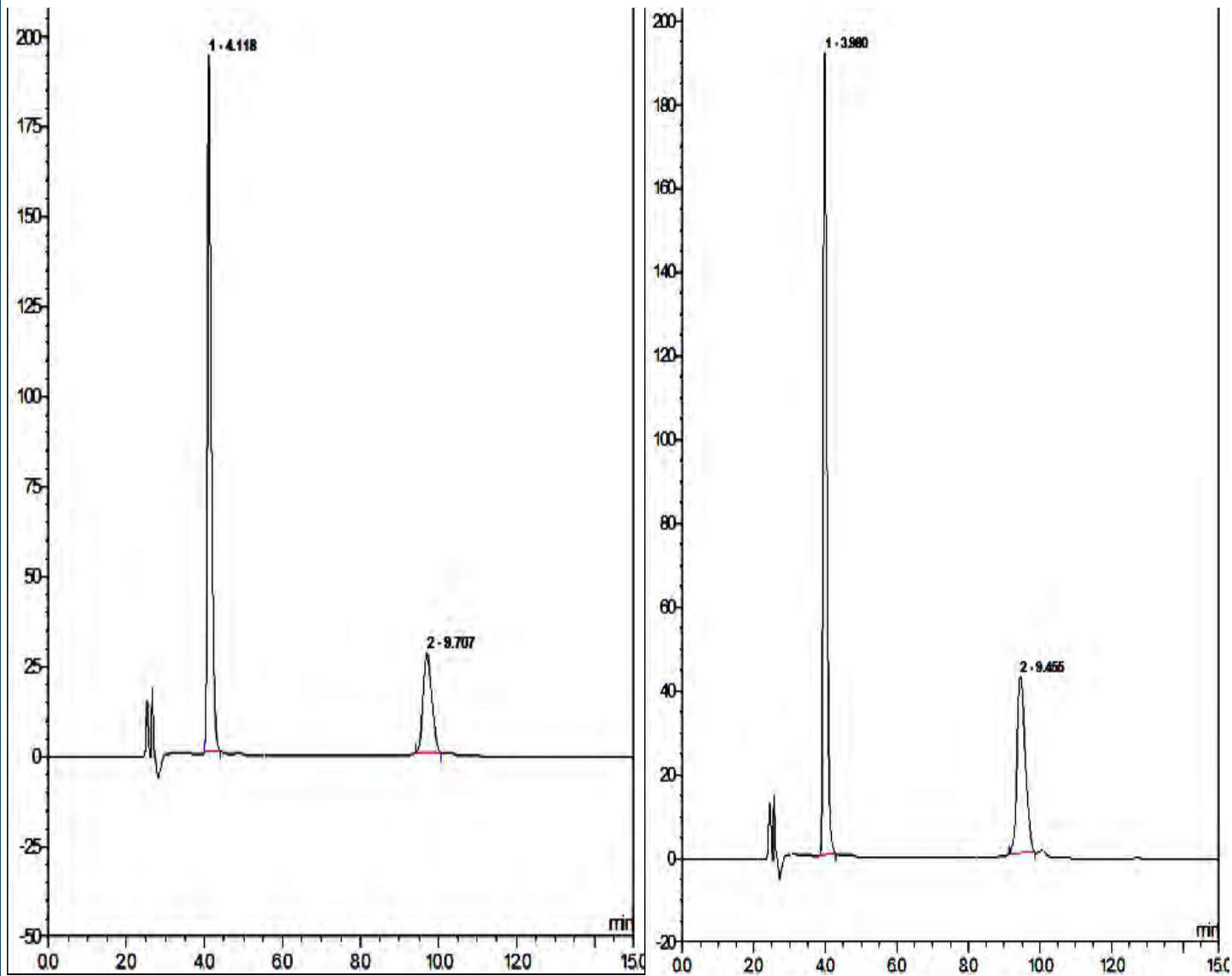


Εικόνα 13: Χρωματογραφήματα των υδατικών διαλυμάτων δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 80μg/ml και 120μg/ml στα 224nm.

2. Παρατίθενται παρακάτω τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς με υδατικά διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm

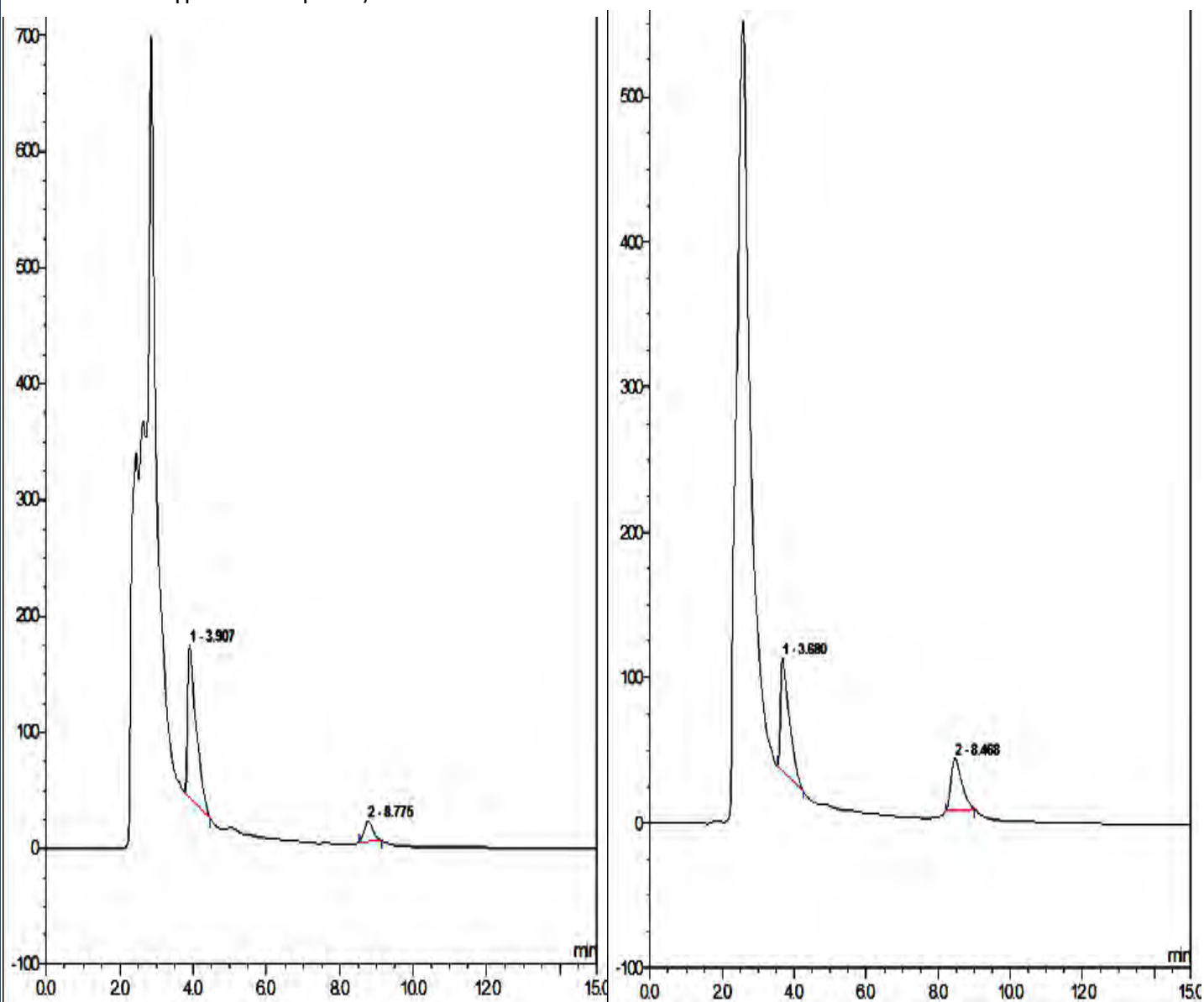


Εικόνα 14: Χρωματογραφήματα των υδατικών διαλυμάτων δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 20μg/ml και 40μg/ml στα 280nm.

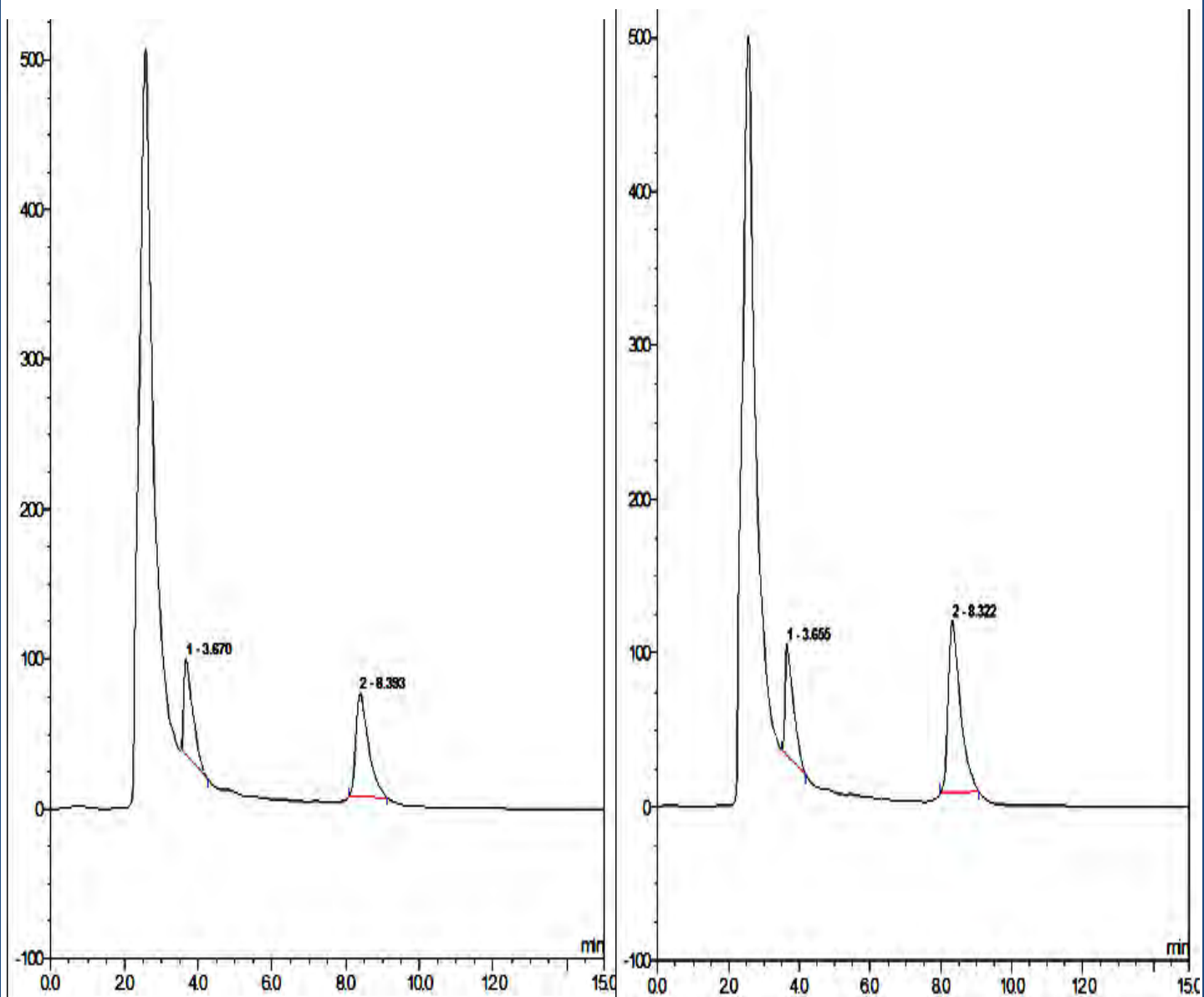


Εικόνα 15: Χρωματογραφήματα των υδατικών διαλυμάτων δαπτομικίνης συγκέντρωσης 80 μ g/ml και 120 μ g/ml στα 280nm.

3. Στη συνέχεια παρατίθενται τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς σε δείγματα πλάσματος στα 224nm

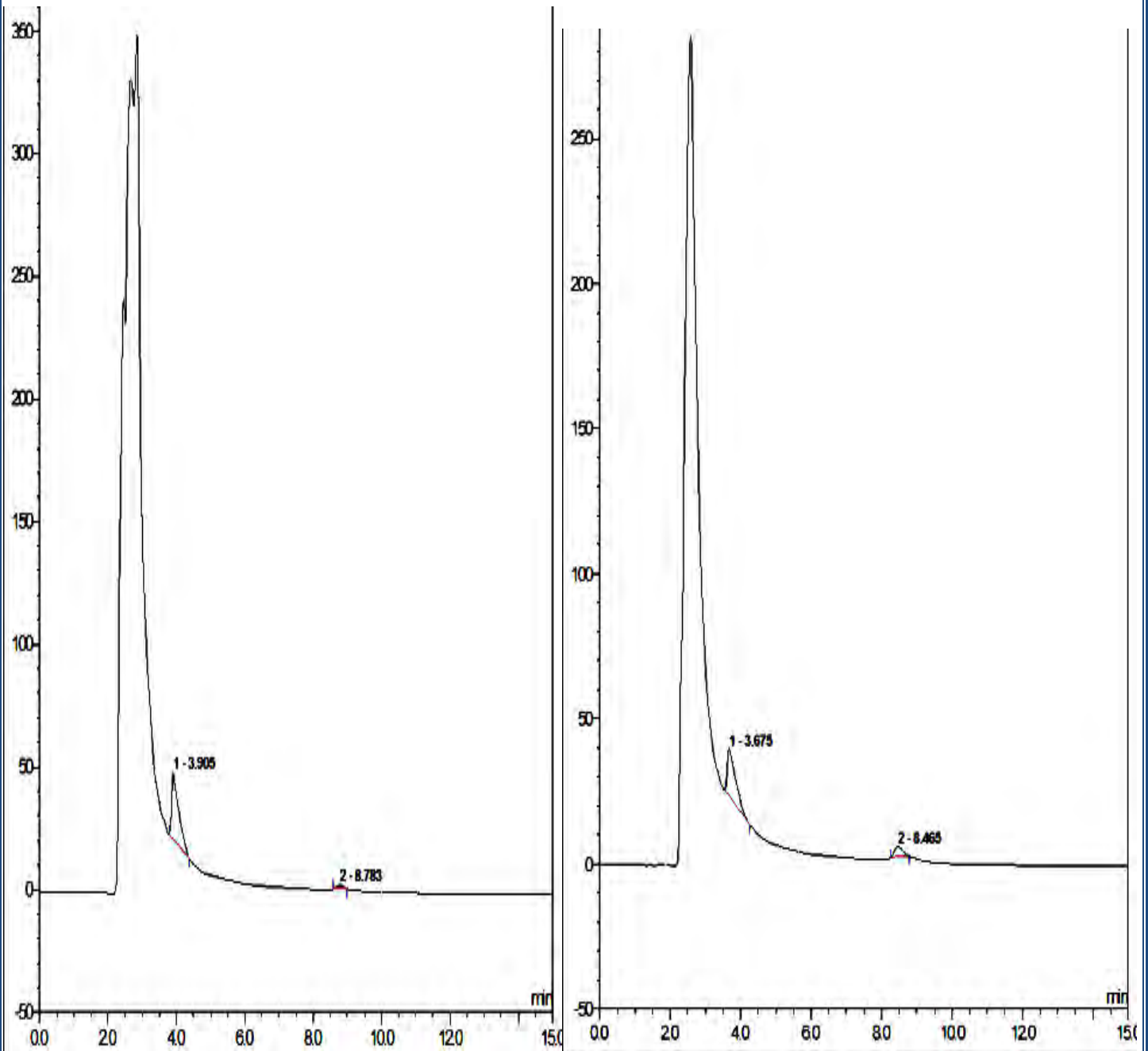


Εικόνα 16: Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 20 μ g/ml και 40 μ g/ml στα 224nm.

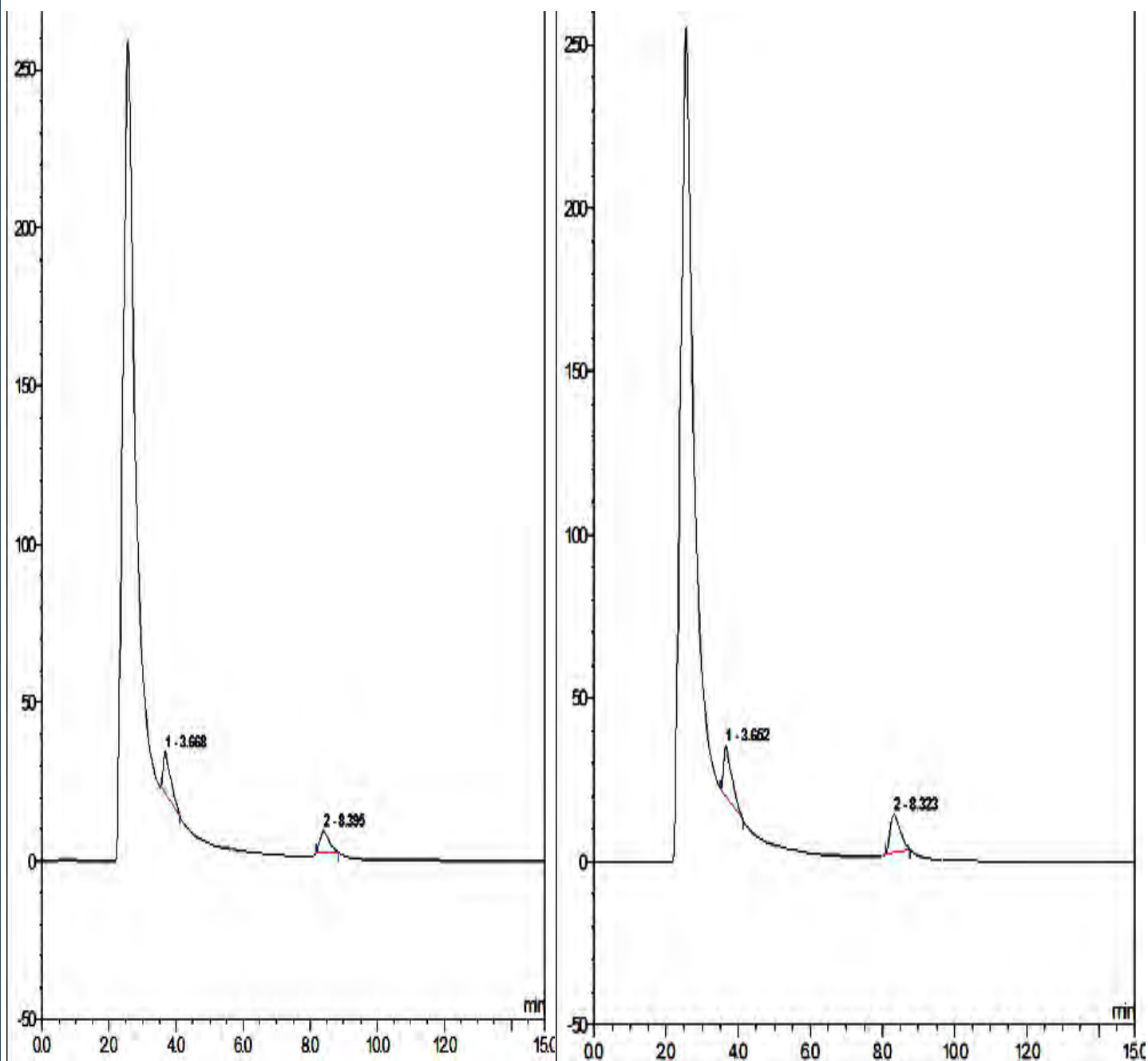


Εικόνα 17: Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 80 μ g/ml και 120 μ g/ml στα 224nm.

4. Παρατίθενται τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς σε δείγματα πλάσματος στα 280nm

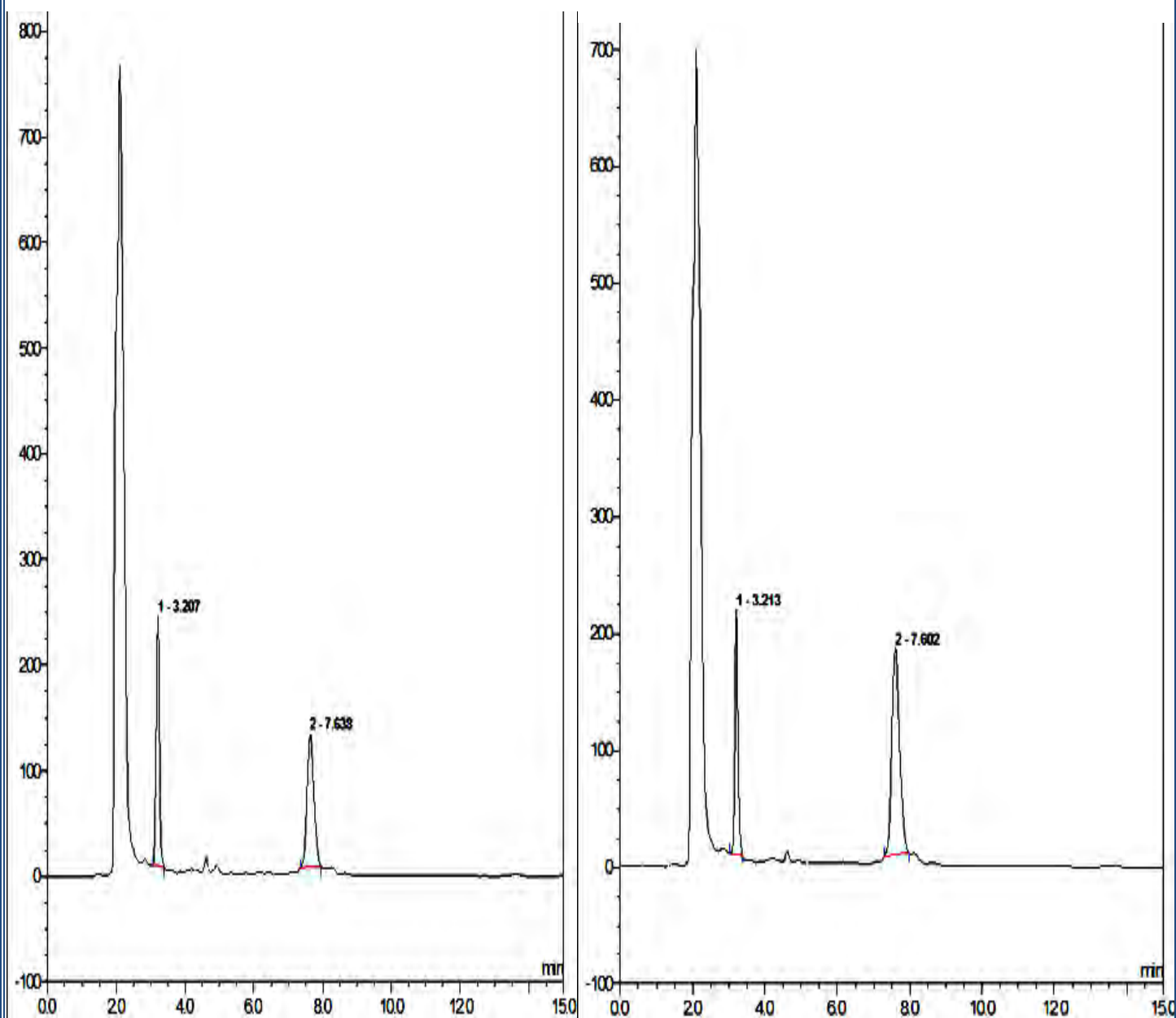


Εικόνα 18: Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 20 μ g/ml και 40 μ g/ml στα 280nm.



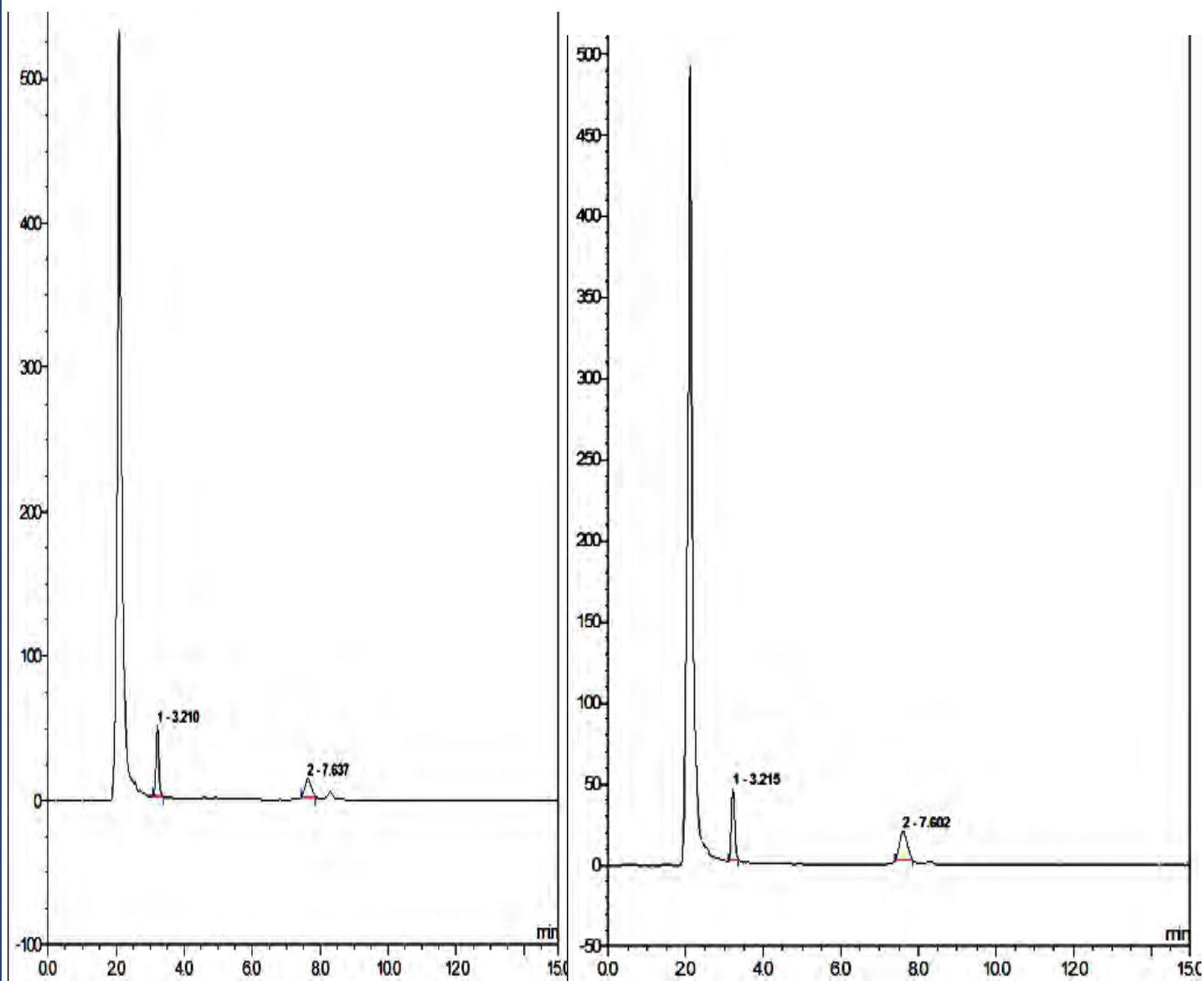
Εικόνα 19: Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 80µg/ml και 120µg/ml στα 280nm.

5. Παρατίθενται τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς σε δείγματα πλάσματος (μετά από επεξεργασία με ακετονιτρίλιο και ultrafiltration) στα 224nm.



Εικόνα 20: Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 80μg/ml και 120μg/ml στα 224nm.

6. Παρατίθενται τα χρωματογραφήματα της καμπύλης αναφοράς σε δείγματα πλάσματος (μετά από επεξεργασία με ακετονιτρίλιο και ultrafiltration) στα 280nm.



Εικόνα21 : Χρωματογραφήματα των διαλυμάτων πλάσματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 80μg/ml και 120μg/ml στα 280nm.