ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ - ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ VANCOMYCIN ΚΑΙ ΤΗΣ DAPTOMYCIN ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΜΑΡΙΝΑ ΙΩΑΝΝΟΥ ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝ/ΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2013

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ - ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ VANCOMYCIN ΚΑΙ ΤΗΣ DAPTOMYCIN ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΜΑΡΙΝΑ ΙΩΑΝΝΟΥ ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝ/ΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2013

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Η Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσακάλωφ Ανδρέας
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Χημείας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής: Χατζηχριστοδούλου Χρήστος
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαλίζος Κωνσταντίνος
Καθηγητής Ορθοπεδικής
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

… στον σύζυγό μου Αχιλλέα και
στον γιο μου Κωνσταντίνο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ VANCOMYCIN ΚΑΙ ΤΗΣ DAPTOMYCIN ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε αναλυτική μεθοδολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιβιοτικών βανκομυκίνη (Vancomycin) και δαπτομυκίνη (Daptomycin) σε βιολογικά δείγματα.

Η βανκομυκίνη είναι ένα σύνθετο γλυκοπεπτίδιο που ενδείκνυται στη θεραπεία σοβαρών ή απειλητικών λοιμώξεων, που προκαλούνται από ευαίσθητα στελέχη, ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη, σταφυλυκόκκων. Η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται για την περιεγχειτική προφύλαξη σε επεμβάσεις με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από gram θετικούς κόκκους.

Η δαπτομυκίνη είναι ένα νέο κυκλικό πολυπεπτίδιο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram θετικούς (+) παθογόνους μικροοργανισμούς στους ιστούς του δέρματος. Η δαπτομυκίνη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ορισμένων λοιμώξεων στους καρδιακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των καρδιακών βαλβίδων (π.χ. ενδοκαρδίτιδα) καθώς και για την αντιμετώπιση αιματολογικών λοιμώξεων που προκαλούνται από τα ίδια βακτήρια όταν σχετίζονται με λοίμωξη στο δέρμα ή στην καρδιά.

Η μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού που αναπτύχθηκε, περιλαμβάνει στάδια απομόνωσης του φαρμάκου από το αρχικό δείγμα πλάσματος του ασθενή και επακόλουθη ποσοτική ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλή Απόδοσης HPLC-DAD. Αναπτύχθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις, που επιτρέπουν τόσο τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο πλάσμα, όσο και του ελεύθερου – μη συνδεδεμένου με τις πρωτεΐνες – κλάσματος του φαρμάκου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Η απομόνωση της συνολικής ποσότητας του φαρμάκου από το δείγμα επιτεύχθηκε με αποδέσμευση - εκχύλιση με ακετονιτρίλιο, ενώ η απομόνωση του ελεύθερου κλάσματος με υπέρ-διήθηση σε συσκευή Centrifree® της Millipore.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης σε στήλη Acclaim 120 C18 (Dionex, USA) και βαθμωτής έκλουσης με σύστημα δύο διαλυτών: ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 pH=4,6 και μεθανόλης. Η ανίχνευση των φαρμάκων έγινε σε 220 και 240nm (βανκομυκίνη) και σε 220 και 280nm (δαπτομυκίνη). Η ταυτοποίηση των φαρμάκων στο χρωματογράφημα έγινε με βάση το χρόνο συγκράτησης τους σε χρωματογραφικό σύστημα t_R και χαρακτηριστικό φάσμα UV-Vis της ουσίας σε περιοχή 200-800nm. Η παραλαβή του φάσματος έγινε ταυτόχρονα από διαφορετικά σημεία της χρωματογραφικής κορυφής για την επικύρωση της καθαρότητάς της.

Η απόκριση του ανιχνευτή και για τα δυο αντιβιοτικά ήταν απολύτως γραμμική των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν με συντελεστή συσχέτισης R>0,99. Οι περιοχές των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν καλύπτουν τις αναμενόμενες θεραπευτικές συγκεντρώσεις της βανκομυκίνης (0-20μg/mL) και της δαπτομυκίνης (0-100μg/mL).

Από τις καμπύλες αναφοράς προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) της βανκομυκίνης (LOD=0,677μg/mL, LOQ = 2,257μg/mL) και της δαπτομυκίνης (LOD = 0,878μg/mL, LOQ=2,927μg/mL). Η ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού εκτιμήθηκε σε 99,68 ± 6,57 % (n=9) για την βανκομυκίνη και 100,32 ± 4,81% (n=9) για δαπτομυκίνη.

Η ακριβής και ευαίσθητη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε δοκιμαστικά σε δείγματα πλάσματος ασθενών που λαμβάνουν την βανκομυκίνη για προληπτικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-PDA METHOD FOR QUANTIFICATION OF ANTIBIOTICS VANCOMYCIN AND DAPTOMYCIN IN PLASMA

ABSTRACT

The aim of this study was the development and validation of an analytical method for the determination of antibiotics Vancomycin and Daptomycin in biological samples.

Vancomycin is a composite glycopeptide, indicated for the treatment of serious or life-threatening infections caused by susceptible, resistant to methicillin, staphylococcal strains. Vancomycin is used for perioperative prophylaxis in operations with increased risk of infection by gram positive cocci.

Daptomycin is a relatively new antibiotic. It is a cyclic polypeptide used to treat infections caused by Gram (+) pathogens in cutaneous tissues. Used also to treat certain infections in cardiac tissues, including heart valves (eg endocarditis), and for haematological infections caused by the same bacteria, when associated with infection of the skin or the heart.

The methodology developed is comprised of two steps of analyte isolation from the original plasma sample of the patient and subsequent quantitative analysis by High Performance Liquid Chromatography HPLC-DAD. Different approaches have been developed, that allow both the quantitative determination of total concentration of the antibiotic in plasma as well that of the free – not bound to the proteins – fraction of the drug.

The isolation of the total quantity of the drug from the sample was achieved by extraction with acetonitrile, and the isolation of the free fraction by ultrafiltration, using a specialized apparatus - Centrifree ® Millipore.

The chromatographic separation was performed utilizing reverse phase chromatography on an Acclaim 120 C18 column (Dionex, USA) and gradient elution system of two solvents: KH_2PO_4 buffer solution pH = 4,6 and methanol. The detection

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

of drugs was achieved at 220 and 240nm (vancomycin) and at 220 and 280nm (daptomycin). The identification of the substances on the chromatogram was based on the typical retention time in the chromatographic system t_R for each drug, and the characteristic UV-Vis spectrum of the substances in the region of 200-800nm. Spectra were simultaneously collected from different points of the chromatographic peak, in order to validate its purity.

The detector response for both antibiotics was absolutely linear for the concentrations tested, with a correlation coefficient of R> 0,99. The investigated range covers the expected therapeutic concentrations of Vancomycin (0-20ug/mL) and Daptomycin (0-100ug/mL).

From the calibration curves acquired, detection limits (LOD) and limits of quantification (LOQ) were determined for Vancomycin (LOD = 0,677ug/mL, LOQ = 2,257ug/mL) and Daptomycin (LOD = 0,878ug/mL, LOQ = 2,927ug/mL). The accuracy of the assay was estimated at 99,68 ± 6,57% (n = 9) for Vancomycin and 100,32 ± 4,81% (n = 9) for Daptomycin.

The accurate and sensitive methodology developed was applied to plasma samples of patients being treated with vancomycin for preventive and therapeutic purposes.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ I

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

A. ΠΙΝΑΚΕΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ……. II

B. ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ……. II

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

A. ΣΧΗΜΑΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ……. V

B. ΣΧΗΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ……. V

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

A. ΕΙΚΟΝΕΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ..……. VII

B. ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ…..…… VII

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

A. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ…….. VIII

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ IX

Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ…….. 1

1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ…….. 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ……. 6

2.2. ΔΟΜΗ…… 7

2.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ…… 9

2.4. ΦΑΣΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ…….. 11

2.5. ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ……. 14

2.6. ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ ΜΕ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΕΓΧΥΣΗ…… 15

2.7. ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ…… 15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗ……..... 18

3.2. ΔΟΜΗ…… 18

3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ…… 19

3.4. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ……. 19

3.5. ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ……. 20

3.6. ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ…… 20

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

3.7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ 21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ……. 22

4.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗΣ……. 25

4.3. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ…… 26

4.4. ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ…… 26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ…… 30

5.2. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ELISA……. 30

5.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ…… 31

5.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ…… 31

5.5. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΘΕΩΡΙΑΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ…….. 32

5.6. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)……. 33

5.7. ΜΕΡΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ…… 38

5.8. ΣΤΗΛΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ…… 40

5.9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ…….. 47

5.10. ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ – ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ…… 49

Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. ΥΛΙΚΑ……..... 53

1.2. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ…… 55

1.3. ΟΡΓΑΝΑ…… 56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ…….. 57

2.2. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ…… 57

2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ…… 59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ- HPLC…….. 69

3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ…… 70

3.3. ΣΤΗΛΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΗΛΗ…… 72

3.4. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ…….. 74

3.5. ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ…… 74

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

3.6. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ…….... 75
3.7. ΑΠΟΔΟΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ……. 77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
4.1. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ……. 80
4.2. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ……. 80
4.3. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ-ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ (Calibration Curve)…… 80
4.4. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (Repeatability)…… 88
4.5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ (Reproducibility)…….. 89
4.6. ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ…… 91
4.7. ΣΧΕΤΙΚΗ ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ (RSD) ΚΑΙ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ % ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ (CV)……. 91
4.8. ΟΡΘΟΤΗΤΑ (Accuracy)……. 92
4.9. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (Sensitivity)…….. 92
4.10. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (Limit of Detection, LOD) - ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (Limit of Quantitation, LOQ)……... 93
4.11. ΑΝΑΚΤΗΣΗ (Recovery)…….. 103
4.12. ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Selectivity)…… 103
4.13. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ (Systematic Error)…… 104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5
5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ…… 105
5.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ 106
5.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ…….. 106
5.4. ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗΣ ΜΕ ΟΡΑ…… 107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
6.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ……. 110
6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ…… 111
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……..….. 113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 114
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 118

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω τον κύριο Τσακάλωφ Ανδρέα, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας εργασίας, για την επιστημονική του καθοδήγηση, την υποστήριξη και την ενθάρρυνση καθώς και την αμέριστη βοήθεια που μου πρόσφερε σε όλα τα στάδια κατά την συνολική διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της Τριμελούς Επιτροπής και διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την συνολική διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της εργασίας, αλλά και την υποστήριξη του κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τον κύριο Μαλίζο Κωνσταντίνο, Καθηγητή Ορθοπεδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, καθώς και την επιστημονική του ομάδα για τη συμβολή του στη συλλογή των δειγμάτων αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Α/Α	*ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ*	*ΣΕΛ.*
	Α. ΠΙΝΑΚΕΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
1	Κατάταξη αντιβιοτικών σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά	3
2	Χαρακτηριστικά της βανκομυκίνης	9
3	Χειρουργικές επεμβάσεις στις οποίες χορηγείται προληπτικά η βανκομυκίνη στους ασθενείς	12
4	In vitro δραστικότητα της βανκομυκίνης έναντι επιλεγμένων μικροβίων	13
5	Ομάδες που μπορούν να αντιδράσουν με την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου προς σχηματισμό μιας χημικά δεσμευμένης φάσης	43
	Β. ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
6	Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων των αντιβοτικών για βαθμονόμηση οργάνου	60
7	Σύγκριση προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένων με αντιβιοτικό για τον προσδιορισμό της ανάκτησης του αντιβιοτικού	63
8	Σύγκριση προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη στα 220nm και 240 nm	66
9	Απορροφήσεις της βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε επιλεγμένα μήκη κύματος	70
10	Απορροφήσεις της δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε επιλεγμένα μήκη κύματος	72
11	Αποτελεσματα βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης την ίδια μέρα στα 220nm	83
12	Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm	84
13	Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm	84
14	Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm	84
15	Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm	85
16	Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για	85

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

	πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm	
17	Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm	86
18	Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm	87
19	Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm	87
20	Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm	87
21	Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm	88
22	Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm	88
23	Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης (220nm)	89
24	Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης (240nm)	89
25	Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου βανκομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (220nm)	90
26	Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου βανκομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (240nm)	90
27	Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνη (220nm)	90
28	Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου δαπτομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (220nm)	91
29	Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη βανκομυκίνη στα 220nm	95
30	Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη βανκομυκίνη στα 240nm	96
31	Προσδιορισμός του ποσοτικοποίησης LOQ για τη βανκομυκίνη από τον θόρυβο του μηχανήματος	96
32	Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη δαπτομυκίνη στα 220nm	99
33	Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη δαπτομυκίνη στα 280nm	100

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

34	Προσδιορισμός του ποσοτικοποίησης LOQ για τη δαπτομυκίνη από τον θόρυβο του μηχανήματος	101
35	Αριθμός δειγμάτων ανά περιοχή λήψης αίματος	110
36	Σωματικά χαρακτηριστικά ασθενών	111
37	Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης δειγμάτων αίματος ασθενών	112

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Α/Α	*ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ*	*ΣΕΛ.*
	Α. ΣΧΗΜΑΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
1	Χημικός τύπος της βανκομυκίνης	8
2	Τρόπος δράσης της βανκομυκίνης	10
3	Χημικός τύπος της Δαπτομυκίνης	18
4	Ο μηχανισμός δράσης της Δαπτομυκίνης	19
5	Ένα γραφικό παράδειγμα του προφίλ της συγκέντρωσης ορού σε συνάρτηση με το χρόνο ενός τυπικού φαρμάκου με υποδόρια έγχυση	23
6	Εικόνες SEM του υλικού πλήρωσης :α) μιας συμβατικής και β) μιας μονολιθικής στήλης	41
7	Δομή της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel)	42
8	Πορεία αντίδρασης μεταξύ της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου και μιας οργανοπυριτικής ένωσης για το σχηματισμό μιας χημικά δεσμευμένης φάσης	44
	Β. ΣΧΗΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
9	Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 10μg/mL σε μήκος κύματος 240nm (t_R=6.176min)	62
10	Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος με δαπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=12.693min)	63
11	Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 15μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=6.528min)	67
12	Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 15μg/mL σε μήκος κύματος 240nm (t_R=6.528min)	67
13	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=5.207min)	78
14	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL σε μήκος κύματος 240nm (t_R=5.207min)	78
15	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=20.833min)	79

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

16	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε μήκος κύματος 280nm (t_R=20.833min)	79
17	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 10μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=6.580min)	97
18	Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη βανκομυκίνης στα 220nm (t_R=6.580min για τη βανκομυκίνη)	97
19	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 10μg/mL στα 240nm (t_R=6.580min)	98
20	Χρωματογράφημα δεείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη βανκομυκίνης στα 240nm (t_R=6.580min για τη βανκομυκίνη)	98
21	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε 220nm (t_R=20.757min)	102
22	Χρωματογράφημα δεείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη δαπτομυκίνης στα 220nm (t_R=20.757min για τη δαπτομυκίνη)	102
23	Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε 280nm (t_R=20.767min)	103
24	Αντίδραση OPA με πρωτοταγή αμίνη	107
25	Χρωματογράφημα δείγματος ασθενούς στα 220nm (t_R=5,806min ο χρόνος έκλουσης και το φάσμα της κορυφής αντιστοιχούν στη βανκομυκίνη)	112

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

Α/Α	*ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ*	*ΣΕΛ.*
	Α. ΕΙΚΟΝΕΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
1	Ο Αλ. Φλέμινγκ στο εργαστήριο του	2
2	Οι τρεις φαρμακοδυναμικοί δείκτες που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της αντιβιοτικής αγωγής	27
3	Διαχωρισμός Υγρής χρωματογραφίας	35
4	Σχηματική αναπαράσταση συστήματος Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	39
	Β. ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
5	Συστατικά αίματος	58
6	Φίλτρα για ultrafiltration	65
7	Συσκευή HPLC – ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση της μεθοδολογίας	69
8	Φάσμα απορρόφησης βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL (λmax =220nm)	71
9	Φάσμα απορρόφησης δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL (λmax =280nm)	72
10	Φωτογραφία των αναλυτικών στηλών HPLC	73
11	Απεικόνιση του φάσματος απορρόφησης υδατικού διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με OPA	108

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Α/Α	*ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ*	*ΣΕΛ.*
	Α. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	
1	Βαθμονόμηση δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη στα 240nm	61
2	Απεικόνιση βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε 3 διαφορετικά μήκη κύματος (λ=204nm, 220nm και 280nm)	71
3	Προφίλ σύστασης διαλύματος έκλουσης κατά την βαθμιδωτή ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης	76
4	Προφίλ σύστασης διαλύματος έκλουσης κατά την βαθμιδωτή ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης	76
5	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm	83
6	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm	84
7	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm	86
8	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm	87
9	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε μήκος κύματος 220nm	94
10	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε μήκος κύματος 240nm	95
11	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης σε μήκος κύματος 220nm	99
12	Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης σε μήκος κύματος 280nm	100
13	Μεταβολή τηςαπορρόφησης υδατικού διαλύματος βανκομυκίνης 100μg/mL με OPA σε συνάρτηση με το χρόνο	109
14	Ποσοστά δειγμάτων αίματος που λήφθησαν από άντρες και γυναίκες και εξετάστηκαν – μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	110

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	*ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ*
RMS	Red man syndrome
i.v.	Ενδοφλέβια
i.m.	Ενδομυϊκά
s.c.	Υποδόρια
o.d.	Μία φορά την ημέρα
b.d.	Δύο φορές την ημέρα
t.d.s.	Τρεις φορές την ημέρα
q.d.s.	Τέσσερις φορές την ημέρα
MIC	Ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα
Vanc	Βανκομυκίνη
Dapt	Δαπτομυκίνη
PPMA	Polymethyl methacrylate acid
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
I.S.	Εσωτερικό πρότυπο
Vd	Όγκος κατανομής
Vss	Ολικός όγκος κατανομής
CLD	Καθαρή κατανομή
Vp	Όγκος του περιφερειακού διαμερίσματος
CLr	Νεφρική κάθαρση
$T_{1/2}$	Χρόνος ημίσεως ζωής
ΔΜΣ	Δείκτη μάζας σώματος
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Α’ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Αντιβιοτικά εννοούνται ουσίες οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς (μύκητες, ακτινομύκητες, κ.α.) και δρουν έναντι άλλων μικροοργανισμών (αντι-βιοτικά). Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από μικρόβια, μύκητες, ρικέτσιες και σπάνια για νόσους από ιούς μεγάλου μεγέθους και από πρωτόζωα. Σήμερα όμως, ο όρος αντιβιοτικό τείνει να αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακό φάρμακο, ο οποίος εκτός από τα φυσικά παράγωγα, περιλαμβάνει ακόμη και τα ημι-συνθετικά (π.χ. ημι-συνθετικές πενικιλλίνες) και τα συνθετικά αντιβιοτικά (λινεζολίδη, κινολόνες). [1]

Από την εποχή της ανακάλυψης των μικροβίων, στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, αρκετοί ερευνητές, και μεταξύ αυτών και ο Παστέρ, είχαν παρατηρήσει το φαινόμενο της αντιβίωσης, ότι δηλαδή ορισμένοι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα οι μύκητες έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Αν και οι ισχυρές αντιβιοτικές ενώσεις για τη θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών που προκαλούνται από τα βακτηρίδια, όπως η φυματίωση, η βουβωνική πανώλη, η λέπρα, δεν ήταν απομονωμένες και προσδιορισμένες μέχρι τον εικοστό αιώνα, η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών ήταν από τους αρχαίους Κινέζους πριν από 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.

Ο όρος αντιβίωση χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τον *Villemin* το 1889. Οι αντιβιοτικές ιδιότητες του *Penicillium sp.* περιγράφηκε αρχικά στη Γαλλία από τον Έρνεστ Ντυσέν (Ernest Duchesne) το 1897. Εντούτοις, η εργασία του δεν επηρέασε την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

επιστημονική κοινότητα μέχρι την ανακάλυψη από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ της πενικιλίνης.

Εικόνα 1: Ο Αλ. Φλέμινγκ στο εργαστήριο του

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, 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. Συγκεκριμένα ο Αλ. Φλέμινγκ πρόσεξε ότι γύρω από έναν μύκητα του γένους των πενικιλλίων, δηλαδή της κοινής πράσινης μούχλας, που τυχαία είχε μολύνει ένα καλλιέργημα σταφυλοκόκκων που μελετούσε, είχε σχηματιστεί μια ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του σταφυλοκόκκου, παρατήρησε επίσης ότι τέτοια ανασταλτική επίδραση είχε και το υγρό θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αυτού του μύκητα, που αποδείχθηκε ότι ήταν το είδος Penicillium notatum. Περισσότερο από δέκα χρόνια 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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, αλλά σήμερα περιλαμβάνει επίσης τα πολλά συνθετικά και ημισυνθετικά φάρμακα που έχουν αντιβακτηριακά αποτελέσματα.[2]

1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα: α) με την χημική δομή τους, β) με τον μηχανισμό δράσης του αντιβιοτικού, γ) με τη δραστικότητα εναντίον συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών.

1η Κατάταξη Αντιβιοτικών

Η ταξινόμηση των αντιβιοτικών φαρμάκων ανάλογα με την χημική δομή τους όπως φαίνεται στον πίνακα 1 σε:

- μικροβιοκτόνα
- μικροβιοστατικά[3]

Πίνακας 1: Κατάταξη αντιβιοτικών σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ		**ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ**
Πενικιλίνες	Βανκομυκίνη	Μακρολίδια[2]
Κεφαλοσπορίνες	Κυκλοσερίνη	Χλωραμφαινικόλη
Αμινογλυκοσίδες	Νεομυκίνη[1]	Τετρακυκλίνες[2]
Νιτροφουράνια	Κινολόνες	Λινοσαμίδες[2]
Τριμεθοπρίμη+	Βανκομυκίνη	Σουλφοναμίδες
Σουλφαδιαζίνη		
Πολυμυξίνες	Τιαμουλίνη	Ριστοσετίνη[2]
		Νοβοβιοκίνη[2]
[1] Δρουν τόσο στη φάση πολλαπλασιασμού, όσο και στη φάση ηρεμίας του βακτηριακού κυττάρου		
[2] Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις δρουν βακτηριοστατικά		

Τα μικροβιοκτόνα φάρμακα θανατώνουν τα βακτήρια (λύση-θάνατος του μικροβιακού κυττάρου) και ο συνολικός αριθμός των βιώσιμων μικροοργανισμών μειώνεται.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Τα μικροβιοστατικά φάρμακα διακόπτουν την ανάπτυξη και τον αναδιπλασιασμό των βακτηρίων (λύση-θάνατος του μικροβιακού κυττάρου) σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στον ορό του ασθενούς και έτσι να περιορίζουν την εξάπλωση της λοίμωξης, ενώ το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού επιτίθεται, ακινητοποιεί και εξολοθρεύει τα παθογόνα μικρόβια. Αν το φάρμακο απομακρυνθεί προτού το ανοσοποιητικό σύστημα εξουδετερώσει τους μικροοργανισμούς, τότε μπορεί να παραμείνουν αρκετοί βιώσιμοι μικροοργανισμοί για να ξεκινήσουν έναν δεύτερο κύκλο λοίμωξης.[1]

Τα γλυκοπεπτίδια, τα β-λακταμικά, οι αμινογλυκοσίδες, και οι κινολόνες είναι μικροβιοκτόνα, ενώ οι μακρολίδες οι λινκοσαμίδες, η τετρακυκλίνη, η λινεζολίδη και οι στρεπτογγραμίνες είναι μικροβιοστατικά. Πάντως, είναι δυνατόν ένα αντιβιοτικό άλλοτε να δρα ως μικροβιοκτόνο και άλλοτε να δρα ως μικοβιοστατικό για αυτό και η ταξινόμηση αυτή ενώ είναι πρακτική χαρακτηρίζεται ως απλοϊκή. Παράδειγμα, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και η βανκομυκίνη, που ενώ κατά βάση θεωρούνται βακτηριοκτόνα, στον εντερόκοκκο έχουν βακτηριοστατική δράση.

<u>2η Κατάταξη Αντιβιοτικών</u>

Τα αντιβιοτικά δρουν σε διάφορα κύρια σημεία του μικροβιακού κυττάρου, δηλαδή με βάση τον μηχανισμό δράσης του. Τα κύρια σημεία του μικροβιακού κυττάρου που μπορούν να δράσουν τα αντιβιοτικά είναι το κυτταρικό τοίχωμα, το γενετικό υλικό, η κυτταροπλασματική μεμβράνη και τα ριβοσώματα. [3] Έτσι διακρίνονται σε:

- Αντιβιοτικά που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα**,** αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, είναι κυρίως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και τα γλυκοπεπτίδια.

- Αντιβιοτικά που δρουν στο γενετικό υλικό των βακτηρίων είναι η τριμεθοπρίμη, οι σουλφοναμίδες, οι κινολόνες, η ριφαμπικίνη.

- Αντιβιοτικά που δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη**,** μεταβάλλοντας τη διαπερατότητά της είναι η πολυμυξίνη, η κολιμυκίνη, η αμφοτερικίνη Β και η νυστατίνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

- Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεινοσύνθεση, μέσω σύνδεσης με την 30S ή 50S υπομονάδα των ριβοσωμάτων είναι οι αμινογλυκοσίδες (30S), η τετρακυκλίνη (30S), η χλωραμφενικόλη (50S), οι μακρολίδες (50S), οι λινκοσαμίδες (50S), οι στρεπτογραμμίνες (50S), και η λινεζολίδη (50S). [4]

3η Κατάταξη Αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά δρουν εναντίον συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί. Παρασιτοκτόνα φάρμακα ονομάζουμε τα φάρμακα εναντίον Ελμίνθων και Πρωτοζώων. Μυκητοκτόνα ή αντιμυκητιασικά φάρμακα ονομάζουμε τα φάρμακα εναντίον των μυκήτων. Οι μύκητες, όπως και οι ιοί, θέτουν ιδιαίτερα εμπόδια σε ότι αφορά την επιτυχή χημειοθεραπευτική τους αντιμετώπιση. Επειδή ανήκουν στα Ευκάρυα, μεγάλο μέρος των κυτταρικών μηχανών τους είναι ίδιο με εκείνο των ζώων και των ανθρώπων. Επομένως, όσοι χημειοθεραπευτικοί παεράγοντες επηρεάζουν τις μεταβολικές οδούς των μυκήτων, επηρεάζουν συχνά και τις αντίστοιχες οδούς των κυττάρων του ξενιστή, γεγονός που καθιστά τοξικούς τους εν λόγω παράγοντες. Για το λόγο αυτό, πολλά αντιμυκητικά φάρμακα χρησιμοποιούνται μόνο τοπικά (επιφανειακά). Ωστόσο, υπάρχουν και φάρμακα με επιλεκτική τοξικότητα έναντι των μηκύτων. Η σημασία των αντιμυκητικών φαρμάκων ολοένα αυξάνεται, σεσομένου ότι οι μυκητιάσεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα είναι ιδιαίτερα έντονες.[1]

Στην εργασία αυτή θα μελετηθούν δύο φάρμακα η βανκομυκίνη και η δαπτομυκίνη για τις εφαρμογές τους στην ιατρική καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στο αίμα των ασθενών στους οποίους χορηγούνται. Το πρώτο φάρμακο που θα μελετηθεί είναι η βανκομυκίνη που ανήκει στα γλυκοπεπτίδια και δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ

Η βανκομυκίνη είναι ένα από τα γλυκοπεπτιδιακά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην προφύλαξη και θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα gram θετικά βακτηρίδια.

Λέγοντας gram θετικά βακτηρίδια εννοούμε αυτά τα βακτηρίδια που αποκτούν μωβ κρυσταλλική χρώση κατά τη διαδικασία gram χρώσης. Τα gram θετικά βακτηρίδια εμφανίζονται μπλε ή μωβ στο μικροσκόπιο ενώ τα gram αρνητικά βακτηρίδια εμφανίζονται ροζ ή κόκκινα. Η gram κατάταξη είναι εμπειρική και βασίζεται κυρίως στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριδίων.

Παραδοσιακά, η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται ως φάρμακο «τελευταίας γραμμής» εκεί που άλλα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν αποτύχει. Ωστόσο η ύπαρξη οργανισμών ανθεκτικών στη βανκομυκίνη κάνει πραγματικότητα την ανάγκη χρησιμοποίησης και άλλων φαρμάκων όπως της λινεζολίδης και της καρβαπενέμης.

Η βανκομυκίνη παράγεται από τον στρεπτομύκητα orientalis ο οποίος απομονώθηκε από δείγματα εδάφους της ζούγκλας του Βόρνεο από έναν ιεραπόστολο στην αρχή της δεκαετίας του 1950. Ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον E.C Kornfeld. Ο συνδυασμός αρχικά ονομάστηκε 05865 αλλά τελικά μετονομάστηκε σε βανκομυκίνη η οποία προέρχεται από τη λέξη vanquished που σημαίνει νίκη. [5,6]

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της βανκομυκίνης ήταν ότι ο σταφυλόκοκκος δεν αναπτύσσει αντοχή απέναντί της. Η ραγδαία αύξηση του ανθεκτικού στην πενικιλίνη σταφυλόκοκκου οδήγησε στην έγκριση της βανκομυκίνης από τον Ομοσπονδιακό Οργανισμό Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) το 1958 και η εταιρεία Lilly έδωσε στην αγορά την Βανκομυκίνη. [6]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

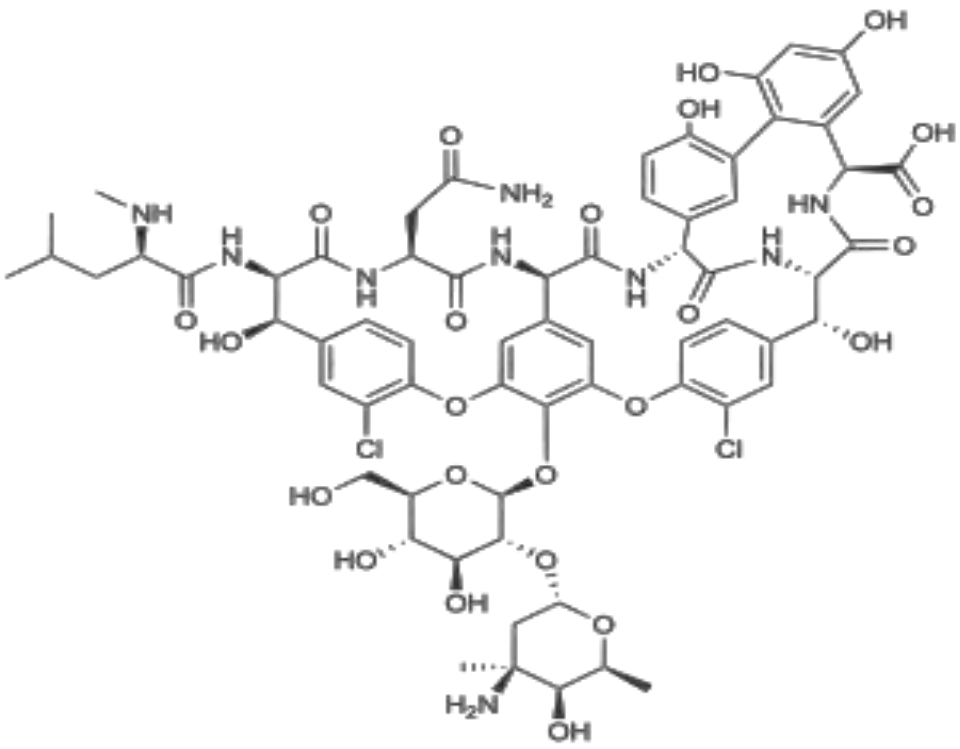
Η βανκομυκίνη δεν έγινε ποτέ πρώτης γραμμής φάρμακο για τη θεραπεία του σταφυλόκοκκου για πολλούς λόγους. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι ότι το φάρμακο πρέπει να δίνεται ενδοφλεβίως και δεν έχει καλή απορρόφηση από του στόματος, επιπλέον αναπτύχθηκαν βήτα-λακταμάσης ανθεκτικές ημισυνθετικές πενικιλίνες όπως είναι η μεθικιλίνη και η κλοξακιλίνη και τέλος οι αρχικές μορφές της βανκομυκίνης είχαν έντονη νεφροτοξική και ωτοτοξική δράση. Τα παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί το φάρμακο ως τελευταία λύση. [7]

Η βανκομυκίνη σήμερα κυκλοφορεί με πολλές εμπορικές ονομασίες. Το παρασκεύασμα διατέθηκε για πρώτη φορά στην αγορά με την εμπορική ονομασία Vancocin, ενώ σήμερα κυκλοφορεί και με την εμπορική ονομασία Voxin και Voncon. Στη διάρκεια των τελευταίων τριάντα ετών έχουν ανακαλυφθεί αντιβιοτικά χημικώς όμοια με τη βανκομυκίνη αλλά που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς και μύκητες.

2.2. ΔΟΜΗ

Η Βανκομυκίνη είναι σύνθετο γλυκοπεπτίδιο που περιέχει έναν αμινοδισακχαρίτη (βανκοζαμίνη) και διάφορα αμινοξέα. Συγκεκριμένα η βανκομυκίνη είναι ένα διακλαδωμένο τρικυκλικά γλυκοσυλιωμένο, μη ριβοσωματικό πεπτίδιο, ένα γραμμικό επταπεπτίδιο που περιέχει πέντε αρωματικούς δακτυλίους, σάκχαρα και ένα κατάλοιπο αμινοξέος. Η δομή του μορίου της παρουσιάζεται διαγραμματικά στο σχήμα 1, ενώ τα χαρακτηριστικά της αναγράφονται στον πίνακα 2 όπου ο Μ.Τ. της είναι $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ και η σχετική μοριακή μάζα είναι 1449,3g/mol.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 1: Χημικός τύπος της Βανκομυκίνης

Η ονομασία της βανκομυκίνης κατά IUPAC είναι:
(1S,2R,18R,19R,22S,25R,28R,40S)- 48- {[(2S,3R,4S,5S,6R)- 3- {[(2S,4S,5S,6S)- 4- amino- 5- hydroxy- 4,6- dimethyloxan- 2- yl]oxy}- 4,5- dihydroxy- 6- (hydroxymethyl)oxan- 2- yl]oxy}- 22- (carbamoylmethyl)- 5,15- dichloro- 2,18,32,35,37- pentahydroxy- 19- [(2R)- 4- methyl- 2- (methylamino)pentanamido]- 20,23,26,42,44- pentaoxo- 7,13- dioxa- 21,24,27,41,43- pentaazaoctacyclo[26.14.2.23,6.214,17.18,12.129,33.010,25.034,39]pentaconta- 3,5,8(48),9,11,14,16,29(45),30,32,34,36,38,46,49- pentadecaene- 40- carboxylic acid.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

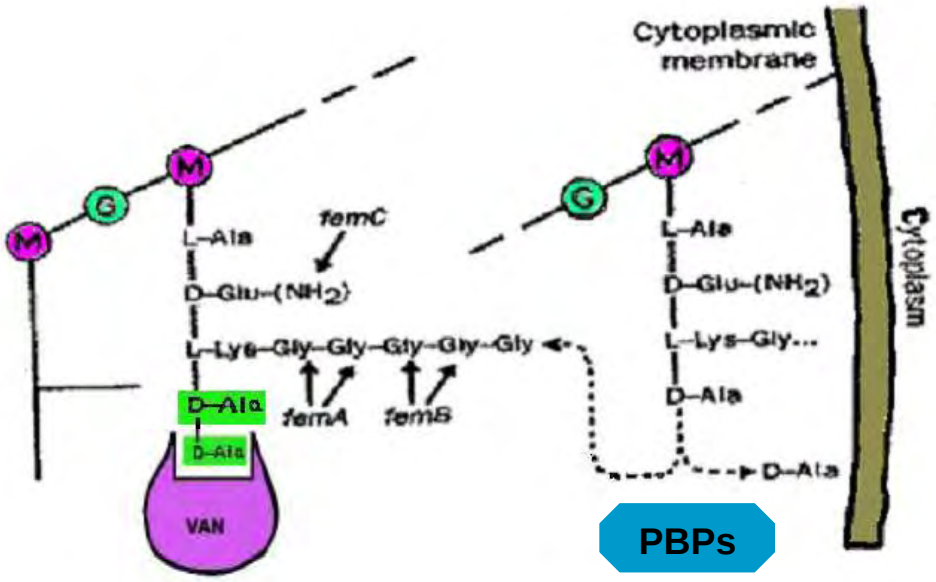
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της βανκομυκίνης

Vancomycin	
Systematic (IUPAC) name	
Indentifiers	
CAS number	1404-90-6
ATC code	A07AA09J01XA01
PubChem	14969
DrugBank	APRD01287
Chemical data	
Formula	$C_{66}H_{75}CL_2N_9O_{24}$
Mol. Mass	1449.3g/mol
Pharmacokinetic data	
Bioavailability	Negligible (oral)
Metabolism	Excreted unchanged
Half life	4-11 hours (adults)
	6-10 days (adults, impaired renal function)
Excretion	Renal
Therapeutic considerations	
Pregnancy cat.	B2 (Au), B (U.S.)
Legal status	S4 (Au), POM (UK), -only (U.S.)
Routes	IV, oral

2.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η βανκομυκίνη είναι μικροβιοκτόνο αντιβιοτικό για τα gram θετικά βακτήρια και δρα με αναστολή της σύνθεσης του μικροβιακού τοιχώματος. Τα γλυκοπεπτίδια στα οποία ανήκει η βανκομυκίνη, ενώ κατά βάση είναι βακτηριοκτόνα για τα περισσότερα βακτήρια, έχουν βακτηριοστατική δράση έναντι των εντεροκόκκων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 2: Τρόπος δράσης της βανκομυκίνης.[3]

Συγκεκριμένα τα gram θετικά βακτήρια διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες, συνήθως υπάρχουν 15-30 στοιβάδες πεπτιδογλυκάνης. Η γλυκάνη της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαρίτη N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλο-μουραμικού οξέος (NAM) που συνδέονται με β-1,4 δεσμούς. Ένα πενταπεπτίδιο συνδέεται στη γλυκάνη. Το κυτταρικό τοίχωμα από πεπτιδογλυκάνη σχηματίζεται από τη διασταύρωση των αλυσίδων της γλυκάνης μέσω των πενταπεπτιδίων. Ένας μεμβρανικός υποδοχέας μεταφέρει το μόριο της γλυκάνης και του πενταπεπτιδίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και οι σακχαρικές μονάδες συνδέονται σε αλληλουχία σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες εναλλασσομένων δισακχαριτών. Το τελικό στάδιο το οποίο λαμβάνει χώρα έξω από την κυτταρική μεμβράνη περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη αντίδραση και καταλύεται από μεμβρανικά ένζυμα που ονομάζονται τρανσπεπτιδάσες. Κατά τη διάρκεια της διασταυρούμενης αντίδρασης το D-ala-D-ala τμήμα του πενταπεπτιδίου αντιδρά με τρανσπεπτιδάση, η οποία διώχνει το τελικό D-ala από τη θέση του σχηματίζοντας ένα ακυλοένζυμο. Το ακυλοένζυμο αυτό είναι δραστικό και συνδέεται εύκολα με την αμινομάδα του πενταπεπτιδίου μιας παρακείμενης αλυσίδας, ολοκληρώνοντας έτσι τη διασταυρούμενη αντίδραση με αποτέλεσμα την ενζυμική αναγέννηση. Ακριβώς σε αυτό το στάδιο της διασταυρούμενης αντίδρασης δρα η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

βανκομυκίνη όπως παριστάνεται στο σχήμα 2. Φυσιολογικά δημιουργείται ένας δεσμός πέντε σημείων μεταξύ των τρανσπεπτιδασών και του αντιβιοτικού. [8]

Στην βανκομυκίνη η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται: α) στη διαφοροποίηση του σημείου σύνδεσής της, όπως είναι η παραγωγή νέου τελικού άκρου του πενταπεπτιδίου, του D-ala-D-lac αντί του D-ala-D-ala, το οποίο δεν μπορεί να δεσμεύσει την βανκομυκίνη και β) την αύξηση των σημείων σύνδεσης. [9], [10]

2.4. ΦΑΣΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ

Η βανκομυκίνη ενδείκνυται για τη θεραπεία λοιμώξεων απειλητικών για τη ζωή που προκαλούνται από gram θετικά μικρόβια και δεν μπορούν να καταπολεμηθούν από λιγότερο τοξικά αντιβιοτικά. Η αυξανομένη εμφάνιση εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη έχει ως αποτέλεσμα τη θέσπιση αυστηρών οδηγιών όσον αφορά στη χρήση της από το κέντρο ελέγχου ασθενειών (CDC). Σύμφωνα με αυτές επιτρέπεται η χρήση της βανκομυκίνης στις ακόλουθες περιπτώσεις [11]:

► Θεραπεία της σοβαρής λοίμωξης που προκλήθηκε από μικροοργανισμό ανθεκτικό στην πενικιλίνη, χρυσίζων σταφυλόκοκκο ανθεκτικό στην πενικιλίνη (MRSA), ανθεκτικό επιδερμικό σταφυλόκοκκο (MRSE) ή σε σοβαρή αλλεργία στην πενικιλίνη.

► Ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα (υποτροπή ή ανθεκτική στη θεραπεία με τρονιδαζόλη).

► Για θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από gram θετικά μικρόβια σε ασθενείς αλλεργικούς σε βήτα-λακταμικά αντιβιοτικά.

► Ως αντιβιοτική βακτηριδιακή προφύλαξη για την ενδοκαρδίτιδα ιδιαίτερα σε άτομα με υπερευαισθησία στις πενικιλίνες.

► Προφυλακτικά χρησιμοποιείται και για περιεγχειτική προφύλαξη σε επεμβάσεις με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από gram θετικούς κόκκους, στην ορθοπεδική χειρουργική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ιδίως όταν τοποθετούνται ξένα σώματα ή στις ακόλουθες χειρουργικές επεμβάσεις οι οποίες παρατίθονται στον πίνακας 3 και σε νοσοκομεία με υψηλά ποσοστά MRSA.

Πίνακας 3: Χειρουργικές επεμβάσεις στις οποίες χορηγείται προληπτικά η βανκομυκίνη στους ασθενείς

Χειρουργική επέμβαση	**Συχνότεροι μικροοργανισμοί**
Ανοικτή ανάταξη ή εσωτερική οστεοσύνθεση κατάγματος	S. aureus, S. Epidermidis, enteric gram-negative bacilli σε επιλεγμένα κατάγματα
Αρθροπλαστική	S. aureus, S. Epidermidis,
Πεταλεκτομή και σπονδυλοδεσία	S. aureus, S. Epidermidis,
Ακρωτηριασμός κ. άκρου λόγω ισχαιμίας	S. aureus, enteric gram-negative bacilli, anaerobic bacteria

► Χρησιμοποιείται στα οστικά τσιμέντα ή πολύ-μεθυλ-μεθακρυλικό οξύ (PPMA) για την σταθεροποίηση προθέσεων, διασφαλίζοντας την υψηλή αρχική στερέωση, καθώς και την ενίσχυση της οστικής δομής, ειδικά σε οστικά ελλείμματα όπως μετά από λοιμώξεις ή αφαίρεση όγκων.

Πιο συχνά χρησιμοποιείται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αρθροπλαστική λόγω ρευματοειδούς αρθρίτιδας, βαριάς οστεαθρίτιδας, μετατραυματικής αρθρίτιδας, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, οστεοπόρωσης, σε ανάγγεια νέκρωση, νοσήματα του κολλαγόνου, αναθεώρηση προηγούμενης αρθροπλαστικής, οστεοσύνθεση παθολογικών καταγμάτων και σπονδυλικών καταγμάτων (κυφοπλαστική). Χρησιμοποιείται επίσης για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων διασφαλίζοντας τη μεταφορά των φορτίων στο οστό.

Η προσθήκη αντιβιοτικών στο μίγμα του PPMA (polymethyl methacrylate acid), είναι συχνή τεχνική, όταν πρέπει να διανεμηθούν τοπικά στους ιστούς αντιβιοτικά. Λόγω της εξώθερμης αντίδρασης που αναπτύσσεται δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλα τα αντιβιοτικά, αλλά αυτά που είναι ανθεκτικά σε αυτές τις θερμοκρασίες π.χ. βανκομυκίνη.

Η ανάμιξη αντιβιοτικού στα οστικά τσιμέντα χρησιμοποιείται για την αποφυγή περιπροθετικών λοιμώξεων, οι οποίες αποτελούν μια από τις σοβαρότερες επιπλοκές ολικών αρθροπλαστικών, ειδικά σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Η αντιβιοτική ουσία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

απελευθερώνεται με μεγάλους ρυθμούς τοπικά τις επόμενες 72h μετά το χειρουργείο και μειώνεται σταδιακά τις επόμενες 2 εβδομάδες. Αυτό έχει σαν συνέπεια την επίτευξη υψηλών μικροβιοκτόνων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού, ειδικά σε ανάγγειο περιβάλλον όπου η συγκέντρωση αντιβιοτικού με την i.v. χορήγηση δεν είναι εφικτή.[12]

Για χειρουργικές επεμβάσεις μικρότερες των 6 ωρών χρειάζεται μόνο μία δόση προεγχειρητικώς. Στον πίνακα 4 φαίνεται η δραστικότητα της βανκομυκίνης σε επιλεγμένα μικρόβια.

Πίνακας 4: In vitro δραστικότητα της βανκομυκίνης έναντι επιλεγμένων μικροβίων

IN VITRO ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ	
Μικροοργανισμοί	**MIC (mg/L)**
Enterococcus faecalis	≤ 4
Enterococcus faecieum	≤ 4
Enterococcus spp	≤ 4
Propionibacterium acne	≤ 2
Staphylococcus aureus	≤ 2
Staphylococcus aureus MRSA	≤ 2
Staphylococcus aureus MSSA	≤ 2
Staphylococcus Capitis	≤ 4
Staphylococcus coagulase negative	≤ 4
Staphylococcus coagulase negative MRSE	≤ 4
Staphylococcus cohnii	≤ 2
Staphylococcus epidermidis	≤ 4
Staphylococcus haemolyticus	≤ 4
Staphylococcus hominis	≤ 4
Staphylococcus intermedius	≤ 4
Staphylococcus lugdunensis	≤ 4
Staphylococcus saprophyticus	≤ 4
Staphylococcus warnerii	≤ 4

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Staphylococcus xylosis	≤ 4
Streptococcus acidominius	≤ 1
Streptococcus mitis	≤ 1
Streptococcus agalactiae	≤ 1
Streptococcus anginosus	≤ 1
Streptococcus costellatus	≤ 1
Streptococcus equinus	≤ 1
Streptococcus group G	≤ 1
Streptococcus group C	≤ 1
Streptococcus pneumoniae	≤ 1
Streptococcus pyogenes	≤ 1

► στην οστεομυελίτιδα που είναι λοίμωξη του οστού με καταστροφή του ιστού του και γύρω ιστών, που συχνά συνοδεύεται από πόνο. Σε μεγαλύτερο κίνδυνο είναι τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι καθώς και σε άτομα με μειωμένη ανοσία. Στα παιδιά τα οστά που προσβάλλονται πιο συχνά είναι οι σπόνδυλοι τα μακρά οστά των άκρων, ενώ στους ενήλικες οι σπόνδυλοι και τα οστά της λεκάνης. Η οξεία οστεομυελίτιδα αναπτύσσεται ξαφνικά και το κύριο αίτιο είναι ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος.

2.5. ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ

Η συνιστώμενη οδός χορήγησης της βανκομυκίνης είναι η ενδοφλέβια έγχυση.

Οι οφειλόμενες στην έγχυση αντιδράσεις σχετίζονται με την συγκέντρωση και το ρυθμό χορήγησης της βανκομυκίνης. Γενικά, η βανκομυκίνη θα πρέπει να χορηγείται σε διάλυμα συγκέντρωσης έως 5mg/ml και με ρυθμό χορήγησης 10mg/min ή μικρότερο. Σε ορισμένους ασθενείς που απαιτείται περιορισμός των χορηγούμενων υγρών, μπορεί να χορηγηθεί διάλυμα συγκέντρωσης έως 10mg/mL, αλλά χρειάζεται προσοχή διότι οι υψηλές συγκεντρώσεις αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αντιδράσεων σχετιζόμενων με την έγχυση. Παρόλα αυτά, οι οφειλόμενες στην έγχυση αντιδράσεις ενδέχεται να παρατηρηθούν με οποιαδήποτε συγκέντρωση και / ή ρυθμό χορήγησης της βανκομυκίνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

2.6. ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ ΜΕ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΕΓΧΥΣΗ

Ενήλικες: Η συνιστώμενη δοσολογία σε ενήλικους ασθενείς είναι 2g κατανεμημένα είτε ως 500mg ανά 6 ώρες ή 1g ανά 12 ώρες με ενδοφλέβια έγχυση. Κάθε δόση πρέπει να χορηγείται με ρυθμό χορήγησης 10mg/min ή σε διάστημα τουλάχιστον 60 λεπτών για παρατεταμένη χορήγηση.
Άλλοι παράγοντες σχετιζόμενοι με τον ασθενή, όπως η ηλικία ή η παχυσαρκία, ενδέχεται να απαιτήσουν τροποποίηση της συνήθους ενδοφλέβιας ημερήσιας δόσης.

Παιδιά: Η συνήθης ημερήσια δόση της βανκομυκίνης σε παιδιά είναι 10mg/Kg-βάρους σώματος ανά 6 ώρες. Κάθε δόση πρέπει να χορηγείται σε χρονικό διάστημα τουλάχιστον 60 λεπτών. Η ολική ημερήσια ενδοφλέβια δόση της βανκομυκίνης στα παιδιά είναι 40mg/Kg-βάρους σώματος και μπορεί διαιρούμενη να ενσωματωθεί στα υγρά που χορηγούνται στο παιδί για την κάλυψη των αναγκών του 24ώρου.

Νεογνά και Βρέφη: Συνιστάται μια αρχική δόση 15mg/Kg ακολουθούμενη από δόση 10 mg/Kg/12ωρο για την πρώτη εβδομάδα της ζωής και κατόπιν 10 mg/Kg/8ωρο για βρέφη ηλικίας ενός μηνός.

2.7. ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου (<1%) σχετίζονται με την ενδοφλέβια χορήγηση της βανκομυκίνης και περιλαμβάνουν τοπικό πόνο άλλοτε άλλης έντασης ή και θρομβοφλεβίτιδα.

Η πρόκληση βλάβης στους νεφρούς και στην ακοή ήταν αποτέλεσμα χρήσης των πρώτων νοθευμένων μορφών της βανκομυκίνης και ήταν συχνή στις κλινικές δοκιμασίες που έγιναν στα μέσα της δεκαετίας του πενήντα. Αργότερα στις κλινικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν αγνότερες μορφές βανκομυκίνης βρέθηκε ότι η νεφροτοξική δράση είναι ασυνήθης. Η νεφροτοξικότητα είναι ανεπιθύμητη ενέργεια σε 0,1-1% ασθενών και γίνεται πιο πιθανή με τη σύγχρονη παρουσία των αμινογλυκοσιδών. [13]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες <1% είναι η αναφυλαξία, η τοξική επιδερμική νεκρόλυση, το ερύθημα, το Red man σύνδρομο, η θρομβοκυττοπενία, η ουδετεροπενία, η λευκοπενία, οι εμβοές, η ζάλη ή ωτοτοξικότητα. [11]

Τελευταία, βρέθηκε ότι η βανκομυκίνη ευοδώνει την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των αιμοπεταλίων στους ασθενείς που χορηγείται, οπότε οδηγεί σε εκσεσημασμένη θρομβοκυττοπενία, αιμορραγίες, πετέχιες εκχυμώσεις και πορφύρα. [14]

Η βανκομυκίνη χορηγείται ενδοφλέβια για τη συστηματική θεραπεία αφού δεν μπορεί να απορροφηθεί από το γαστρεντερικό σωλήνα. Το μεγάλο υδρόφιλο μόριο δεν περνάει μέσα από το γαστρεντερικό βλεννογόνο. Η μόνη ένδειξη για από του στόματος χορήγηση είναι η θεραπεία της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας όπου το φάρμακο πρέπει να δίνεται από του στόματος ώστε να μπορεί να αντιμετωπιστεί η φλεγμονή στο κόλον. Εισπνεόμενη βανκομυκίνη έχει επίσης δοκιμαστεί για θεραπεία λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. [15]

Επιπλέον η ενδοκοιλιακή ή ενδορραχιαία έγχυση βανκομυκίνης σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας είναι ευρέως γνωστή χωρίς όμως σαφή καθορισμό των ακριβών δόσεων.

Η βανκομυκίνη πρέπει να χορηγείται αφού διαλυθεί με αργό ρυθμό και για περισσότερο από εξήντα λεπτά. Ο μέγιστος ρυθμός χορήγησης είναι 10mg/min για δόσεις >500mg. Αυτό πρέπει να γίνεται λόγω της συχνής εμφάνισης πόνου και θρομβοφλεβίτιδας και για να αποφύγουμε μία αντίδραση γνωστή ως red man syndrome (RMS). Αυτό το σύνδρομο συνήθως εμφανίζεται σε τέσσερα έως δέκα λεπτά μετά την έναρξη της χορήγησης ή άμεσα μετά τη λήξη της χορήγησης. Χαρακτηριστικό είναι το αίσθημα flashing, η ερυθρότητα, το ερυθηματώδες εξάνθημα το οποίο επηρεάζει το πρόσωπο, το λαιμό και τον κορμό. Λιγότερο συχνά παρουσιάζεται με υπόταση ή αγγειοοίδημα. Τα συμπτώματα αντιμετωπίζονται με αντιισταμινικά. [16]

Η βανκομυκίνη και η δραστηριότητα της είναι χρονοεξαρτώμενη. Η απλή μικροβιακή δράση της εξαρτάται από τη διάρκεια κατά την οποία το επίπεδο του φαρμάκου υπερβαίνει τη μικρότερη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) η οποία είναι συγκεκριμένη για τον εκάστοτε μικροοργανισμό. Ωστόσο τα υψηλότερα επίπεδα τα οποία επιτυγχάνονται δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με καλύτερη επάρκεια ή τοξικότητα. Θεραπευτική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

παρακολούθηση των επιπέδων του φαρμάκου απαιτείται ειδικά σε ασθενείς που λαμβάνουν επιπλέον θεραπεία με αμινογλυκοσίδες, σε ασθενείς οι οποίοι δυνητικά παρουσιάζουν εναλλαγές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων, σε ασθενείς οι οποίοι κάνουν αιμοδιάλυση ή κατά τη διάρκεια χορήγησης υψηλών ή παρατεταμένων δόσεων του φαρμάκου. Επίσης σε ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία. [11,17,18]

Η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (MRSA) παρότι έχουν ανακαλυφθεί νέα φάρμακα για την καταπολέμηση του σταφυλόκοκκου. Ωστόσο η πιθανή αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) της βανκομυκίνης καθιστά όλο και πιο κρίσιμη για την προσαρμογή της δοσολογίας της, προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής συγκέντρωση στο αίμα και σε άλλες μολυσμένες περιοχές από τον σταφυλόκοκκο, επειδή το φάρμακο αυτό είναι ιδιαίτερα τοξικό.[19] Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται η σχέση μεταξύ της ολικής και της ελεύθερης βανκομυκίνης στο αίμα των ασθενών στους οποίους χορηγείται το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.[19],[20]

Το δεύτερο φάρμακο με το οποίο θα μελετηθεί στην εργασία αυτή είναι η δαπτομυκίνη που ανήκει στην κατηγορία των λιποπεπτιδίων και δρα στην καταστροφή της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης των παθογόνων μικροοργανισμών και χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια στην Ιατρική.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

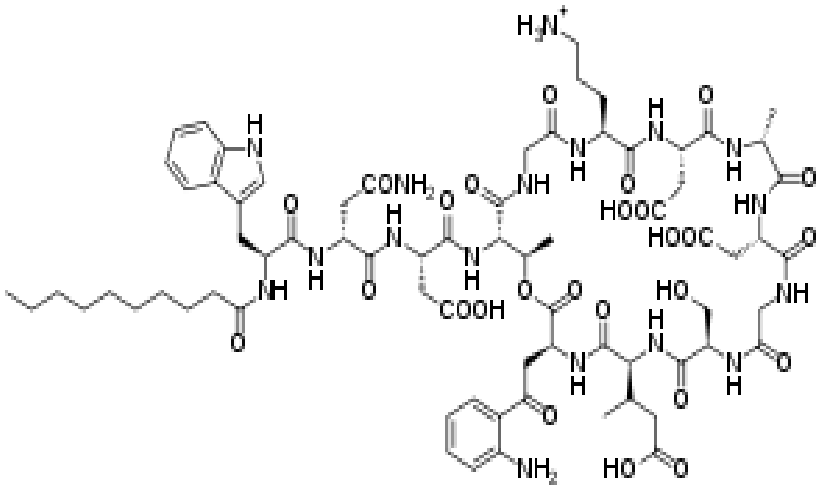
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗ

Η Δαπτομυκίνη (Daptomycin) απομονώθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 1980, και χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram (+) βακτηρίων. Ο οργανισμός που παρήγαγε αυτή την ουσία ήταν ο roseosporus saprotroph και υπήρχε στο έδαφος.
Το παρασκεύασμα διατέθηκε για πρώτη φορά στην αγορά με την εμπορική ονομασία Cubicin.

3.2. ΔΟΜΗ

Η δαπτομυκίνη είναι ένα κυκλικό πολυπεπτίδιο που αποτελείται από δεκατρία αμινοξέα, δέκα από τα οποία είναι διατεταγμένα με κυκλικό τρόπο και τα άλλα τρία δημιουργούν την εξωκυκλική ουρά. Η δομή του μορίου της παρουσιάζεται διαγραμματικά παρακάτω στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Χημικός τύπος της Δαπτομυκίνης

Η ονομασία της δαπτομυκίνης κατά IUPAC είναι:

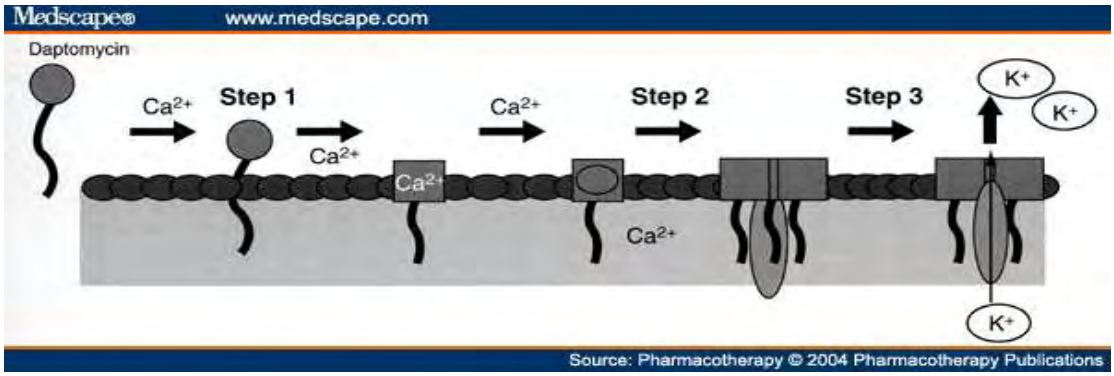
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

N-decanoyl-L-tryptophyl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-threonylglycyl-L-ornithyl-L-aspartyl-D-alanyl-L-aspartylglycyl-D-seryl-threo -3-methyl-L-glutamyl-3-anthraniloyl-L-alanine[egr]1 –lactone

Έχει Μοριακό Τύπο $C_{72}H_{1012}N_{17}O_{26}$ και Μοριακό Βάρος 1619,7086 $g.mol^{-1}$.

3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η δαπτομυκίνη είναι ένα προϊόν ζύμωσης που παράγεται από τον Streptomyces roseosporus και εμφανίζει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι των περισσοτέρων Gram (+) παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων και στη μεθικιλλίνη όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος. Ο μηχανισμός δράσης της οφείλεται στην καταστροφή της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης με εισαγωγή του λιπόφιλου τμήματος της δαπτομυκίνης. Η δαπτομυκίνη συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη των βακτηριδίων και επάγει αποπόλωση αυτής μέσω εξόδου ιόντων K^+ με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των νουκλεϊκών οξέων και της πρωτεϊνοσύνθεσης και το θάνατο του βακτηριδίου όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.[1]



Σχήμα 4. Ο μηχανισμός δράσης της Δαπτομυκίνης

3.4. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Η δαπτομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για λοιμώξεις του δέρματος που οφείλονται σε Gram (+) παθογόνους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

E. faecalis, E. faecium, S. aureus (συμπεριλαμβανομένων των MRSA) και των ιστών του δέρματος. Η δαπτομυκίνη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ορισμένων λοιμώξεων στους ιστούς που βρίσκονται στο εσωτερικό της καρδιάς συμπεριλαμβανομένων των καρδιακών βαλβίδων (π.χ. ενδοκαρδίτιδα) και για την αντιμετώπιση λοιμώξεων στο αίμα που προκαλούνται από τα ίδια βακτήρια όταν σχετίζονται με λοίμωξη στο δέρμα ή στην καρδιά.

3.5. ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ

Η δόση εξαρτάται από το βάρος και το είδος της λοίμωξης για την οποία λαμβάνεται θεραπεία. Η συνηθισμένη δόση για ενήλικες είναι 4mg για κάθε χιλιόγραμμο (Kg) σωματικού βάρους μια φορά την ημέρα για δερματικές λοιμώξεις (4mg/Kg i.v. o.d.) ή 6mg για κάθε χιλιόγραμμο (Kg) σωματικού βάρους μια φορά την ημέρα για λοίμωξη στην καρδιά ή λοίμωξη του αίματος που σχετίζεται με δερματική λοίμωξη ή λοίμωξη στην καρδιά (6mg/Kg i.v. o.d.). Η δόση αυτή χορηγείται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (μέσα στην φλέβα), είτε ως έγχυση διάρκειας περίπου 30 λεπτών, είτε ως ένεση διάρκειας 2 λεπτών.

3.6. ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία με τη χρήση της δαπτομυκίνης είναι οι ακόλουθες:

Καρδιαγγειακές: υπόταση, υπέρταση, οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια, υπερκοιλιακή ταχυκαρδία

Κεντρικό νευρικό σύστημα: κεφαλαλγία, αϋπνία, ζάλη, άγχος, σύγχυση, ίλιγγος, παραισθησία

Δερματολογικά: εξάνθημα, κνησμός, έκζεμα

Ενδοκρινικού συστήματος: υποκαλιαιμία, υπεργλυκαιμία, υπομαγνησιαιμία, αυξημένη διττανθρακικών στον ορό, άλλες διαταραχές των ηλεκτρολυτών

Γαστρεντερικού συστήματος: δυσκοιλιότητα, ναυτία, διάρροια, έμετος, δυσπεψία, κοιλιακό άλγος, ανορεξία, στοματίτιδα, μετεωρισμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Αιματολογικές: αναιμία, λευκοκυττάρωση, θρομβοπενία, θρομβοκυττάρωση, ηωσινοφιλία
Ηπατική: τρανσαμινασαιμία, ίκτερος
Διαταραχές του μυοσκελετικού συστήματος: αυξημένη κινάση της κρεατινίνης (CK), πόνος στα άκρα, αρθραλγία, μυαλγία, μυϊκές κράμπες, μυϊκή αδυναμία, οστεομυελίτιδα
Νεφρική: οξεία νεφρική ανεπάρκεια
Αναπνευστικό: δύσπνοια

3.7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

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.

Υπάρχουν αναφορές ότι σε ασθενείς που λαμβάνουν φάρμακα όπως στατίνες προκαλείται μυοπάθεια και ραβδομυόλυση. Τον Ιούλιο του 2010, το FDA εξέδωσε μια οδηγία ότι η δαπτομυκίνη θα μπορούσε να προκαλέσει ηωσινοφιλική πνευμονία δρώντας απειλητικά για τη ζωή των ασθενών. Ο FDA εντόπισε επτά επιβεβαιωμένα κρούσματα από το 2004 μέχρι το 2010. [21]

Τα αντιβιοτικά απορροφώνται από τον οργανισμό του ασθενούς με διαφορετικό ρυθμό καθώς διαφέρει σε καθένα από αυτά και ο χρόνος που απαιτείται για να απομακρυνθούν από διάφορες οδούς από τον οργανισμό, για το λόγο θα μελετηθούν οι παράμετροι αυτοί εν συντομία στο επόμενο κεφάλαιο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η φαρμακοκινητική περιγράφει την πορεία των επιπέδων ενός φαρμάκου στο αίμα και κατά συνέπεια στους ιστούς και στα βιολογικά υγρά στη διάρκεια του χρόνου. Περιλαμβάνει τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός διαχειρίζεται το φάρμακο μέσω της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης.[22] Ειδικά για τα αντιβιοτικά, η χρονική πορεία των συγκεντρώσεων στο σημείο της λοίμωξης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

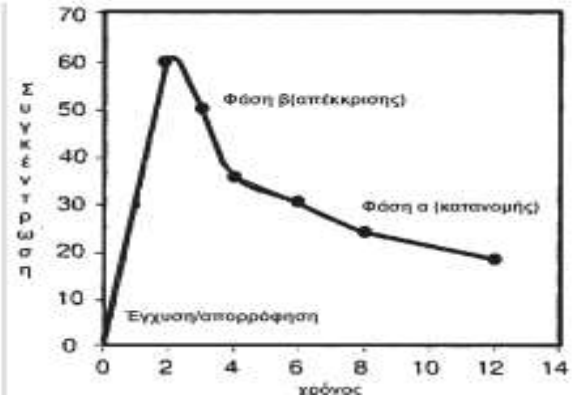
Απορρόφηση: Η απορρόφηση ενός αντιβιοτικού στη συστηματική κυκλοφορία συμβαίνει με την ενδομυϊκή, την υποδόρια και την τοπική χορήγηση, καθώς και τη χορήγηση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως από το στόμα, το ορθό και τον καθετήρα σίτισης. Βεβαίως, το αντιβιοτικό δεν απορροφάται μετά από την απευθείας έγχυσή του στις περιπτώσεις αυτές, από το αίμα και το ΕΝΥ. Το ποσό του φαρμάκου που φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία, εκφράζεται ως ποσοστό της χορηγούμενης δόσης και ορίζεται ως βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability – F).[23] Αυτή ποικίλει αναλόγως με τις φυσικοχημικές ιδιότητές του και τις διάφορες κλινικές καταστάσεις. Με την ενδοφλέβια χορήγηση, το 100% της δόσης είναι βιοδιαθέσιμο. Ο ρυθμός της έγχυσης μπορεί να ποικίλει από εφάπαξ (σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, ένα λεπτό ή και λιγότερο) μέχρι παρατεταμένη (σε πολλές ώρες). Η μέγιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο πλάσμα επιτυγχάνεται στο τέλος της έγχυσης. Το ύψος του μέγιστου επιπέδου καθορίζεται από το ρυθμό της ενδοφλέβιας έγχυσης, το μέγεθος της δόσης, τον όγκο κατανομής του και το ρυθμό αποβολής του.[23]

Κατανομή: Η κατανομή ενός αντιβιοτικού είναι η διαδικασία κατά την οποία αυτό διαχέεται από τον ενδοαγγειακό στον εξωαγγειακό χώρο και περιγράφεται συνήθως από τον όγκο κατανομής (volume of distribution – Vd).[23] Ο όγκος κατανομής δεν αποτελεί έναν πραγματικό ή φυσιολογικό όγκο, αλλά εκφράζει τον υποθετικό όγκο που θα καταλάμβανε η συνολική ποσότητα του φαρμάκου, αν βρισκόταν στην ίδια συγκέντρωση με εκείνη, που μετράται στο αίμα. Παράγοντες που επηρεάζουν τον όγκο κατανομής,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

αποτελούν η λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου, οι συντελεστές διεισδυτικότητάς του στους διάφορους ιστούς, η αιματική ροή στα όργανα, το pH και ο βαθμός σύνδεσης με τις πρωτεΐνες πλάσματος και τα κυτταρικά συστατικά.[24] Ένα αντιβιοτικό με 5 λίτρα όγκο κατανομής σε έναν ενήλικο περιορίζεται στο κυκλοφορικό σύστημα, ενώ με 10-20 λίτρα κατανέμεται στον εξωαγγειακό χώρο. Σε περίπτωση που ο όγκος κατανομής είναι της τάξης των 25-30 λίτρων, τότε η ενδοκυττάρια κατανομή είναι βέβαιη και τέλος αν αυτός φτάνει τα 40 λίτρα, η κατανομή επεκτείνεται σε όλα τα υγρά του σώματος.[22] Όταν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, μετά τη χορήγηση πολλαπλών δόσεων του αντιβιοτικού, τότε ο ολικός όγκος κατανομής αναφέρεται ως Vss και παριστά το άθροισμα των επιμέρους όγκων στο αίμα και στον ΕΝΥ.

Η συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού φτάνει άμμεσα τη μέγιστη τιμή της μετά την ενδοφλέβια χορήγηση και στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται. Η κατανομή και η απέκκριση του φαρμάκου είναι δύο παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το μέγεθος της μέγιστης συγκέντρωσης και το ρυθμό της πτώσης. Συνήθως, η κατανομή ολοκληρώνεται νωρίτερα από την αποβολή. Έτσι, η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης στον ορό σε σχέση με το χρόνο αποτελείται από δύο φάσεις (σχήμα 5).[22] Η πρώτη φάση (α) είναι, συνήθως, σύντομη και αντιπροσωπεύει την είσοδο του αντιβιοτικού στο κυκλοφορικό σύστημα και την κατανομή του στους ιστούς, όπου επιτυγχάνεται γρήγορη ισορροπία. Η δεύτερη φάση (β) αντιπροσωπεύει, συνήθως, την τελική αποβολή και από αυτήν υπολογίζεται ο χρόνος ημίσειας ζωής.



Σχήμα 5: Ένα γραφικό παράδειγμα του προφίλ της συγκέντρωσης ορού σε συνάρτηση με το χρόνο ενός τυπικού φαρμάκου με υποδόρια έγχυση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Ο ρυθμός με τον οποίο ένα αντιβιοτικό μετακινείται από το αίμα στους ιστούς, περιγράφεται από την κάθαρση κατανομής (distributional clearance – CLD).[22] Περιγράφει τον όγκο του αίματος από τον οποίο το φάρμακο μεταφέρεται στους ιστούς ή στο αίμα ή στον ΕΝΥ στη μονάδα του χρόνου. Η συγκέντρωση του φαρμάκου στους ιστούς είναι συνάρτηση της ποσότητας που υπάρχει τοπικά εκεί και του όγκου κατανομής στους ιστούς, που είναι γνωστός ως ο όγκος του περιφερικού διαμερίσματος (volume of the peripheral compartment – Vp). Αυτοί οι όγκοι υπολογίζονται με μαθηματικά μοντέλα, διότι δεν είναι συνήθως εφικτό να λαμβάνονται δείγματα από τα περιφερικά διαμερίσματα και να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις σε αυτά.

Η σύνδεση των αντιβιοτικών με τις πρωτεΐνες του ορού, κυρίως με την αλβουμίνη και την α1-γλυκοπρωτεΐνη, ποικίλει. Θεωρητικά, η σύνδεση με τις πρωτεΐνες είναι ένας σημαντικός παράγοντας προσδιορισμού της δραστικότητας του αντιβιοτικού, αφού μόνο το ελεύθερο κλάσμα είναι δραστικό.[24] Αυτό συμβαίνει επειδή το σύμπλεγμα πρωτεΐνη-αντιβιοτικό είναι πολύ μεγάλο για να περάσει μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες. Μεταβολές στα επίπεδα του αδέσμευτου κλάσματος μπορεί να προκληθούν λόγω παρεκτόπισής του από τις πρωτεΐνες εξαιτίας άλλων φαρμάκων, λόγω αυξομειώσεων των πρωτεϊνών του ορού και λόγω συσσώρευσης ενδογενών ουσιών, όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Εντούτοις, αυτές οι μεταβολές κατά κανόνα δεν οδηγούν σε αξιοσημείωτες μεταπτώσεις στη συγκέντρωση του ελεύθερου αντιβιοτικού, χάρη σε διάφορες διαδικασίες εξισορρόπησης. Έτσι λοιπόν, παρόλο που αλλαγές στη σύνδεση με τις πρωτεΐνες μπορεί να μεταβάλουν τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά ενός αντιβιοτικού, αξιοσημείωτες μεταβολές στη φαρμακοδυναμική δε συμβαίνουν, οπότε και είναι σπάνια κλινικά αξιόλογες.[25]

Μεταβολισμός. Τα αντιβιοτικά μεταβολίζονται μέσω διαφόρων διαδικασιών και κυρίως στο ήπαρ. Απαιτείται η παρουσία ενζύμων, τα οποία έχουν μια πεπερασμένη ικανότητα για το μεταβολισμό υποστρώματος.[22] Έτσι, αν η δόση του αντιβιοτικού δεν ξεπερνά το μέγιστο ρυθμό μεταβολισμού, διαπιστώνεται γραμμική φαρμακοκινητική. Αν, όμως, η δόση υπερβαίνει την ποσότητα που μπορεί να μεταβολισθεί, τότε θα συσσωρευτεί το αντιβιοτικό στον οργανισμό με κίνδυνο την εμφάνιση τοξικών παρενεργειών. Ο μεταβολισμός λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις και στοχεύει στην αλλαγή του φαρμάκου σε ουσία τέτοια, που να μπορεί ευκολότερα να αποβληθεί.[24] Οι αντιδράσεις φάσης Ι περικλείουν την οξείδωση του φαρμάκου και τη μετατροπή του σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ένα πιο πολικό υπόστρωμα. Καταλύονται από το σύστημα του κυτοχρώματος P-450. Οι αντιδράσεις φάσης ΙΙ περιλαμβάνουν τη σύζευξη του φαρμάκου με μικρά, ενδογενή μόρια, συνήθως γλυκουρονικό οξύ ή θειικές ομάδες. Το αποτέλεσμα είναι να προκύπτει ένα ιδιαιτέρως πολικό και ανενεργές φάρμακο.

Απέκκριση. Η αποβολή ενός αντιβιοτικού από τον οργανισμό συμβαίνει μέσω μηχανισμού. Η νεφρική κάθαρση (renal clearance – CLr) περιγράφει το ρυθμό με τον οποίο ο οργανισμός απεκκρίνει ένα φάρμακο διαμέσου των νεφρών.

Η έννοια της κάθαρσης είναι εξαιρετικά χρήσιμη στην κλινική φαρμακοκινητική, γιατί η τιμή της για ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό συνήθως παραμένει σταθερή στο εύρος των συγκεντρώσεων που απαντώνται στην κλινική πράξη.[24]

Η κάθαρση επηρεάζει επίσης και το χρόνο ημίσειας ζωής (half-life – $T_{1/2}$), ο οποίος ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση ενός φαρμάκου στο μισό της αρχικής της.[24]

4.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗΣ

Η βανκομυκίνη δεν απορροφάται καλά από τη γαστρεντερική οδό. Απομακρύνεται αναλλοίωτη από τα ούρα, σχεδόν καθ' ολοκληρίαν ($T_{1/2}$=8 ώρες). Λόγω της τοξικότητας της, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται i.v. σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία (κάθαρση κρεατινίνης κάτω από 50mL/λεπτό). Ο μέσος χρόνος ημιζωής της βανκομυκίνης από το πλάσμα είναι 4 έως 6 ώρες σε άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Εντός των πρώτων 24 ωρών, το 75%, περίπου της χορηγηθείσης δόσης βανκομυκίνης απεκκρίνεται στα ούρα με σπειραματική διήθηση. Η μέση κάθαρση πλάσματος είναι περίπου 0,058L/Kg/h και η μέση νεφρική κάθαρση είναι, περίπου 0,048 L/Kg/h. Η νεφρική δυσλειτουργία επιβραδύνει την απέκκριση της βανκομυκίνης. [25]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

4.3. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ

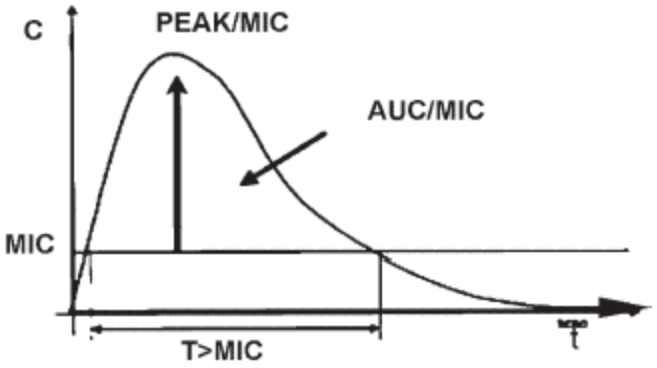
Η δαπτομυκίνη κατά κύριο λόγο αποβάλλεται ως αμετάβλητο φάρμακο από τους νεφρούς (78%). Απομακρύνεται αναλλοίωτη από τα ούρα, σχεδόν καθ' ολοκληρίαν ($T_{1/2}$=8,1 ώρες).

4.4. ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η φαρμακοδυναμική είναι η σχέση μεταξύ της χρονικής πορείας των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο αίμα, δηλαδή της φαρμακοκινητικής του, και της φαρμακολογικής και τοξικής δράσης του. Περιγράφει τις βιοχημικές και τις φυσιολογικές επιδράσεις του φαρμάκου, καθώς και το μηχανισμό δράσης του.[26] Ειδικά για τα αντιβιοτικά, το πρωταρχικό ενδιαφέρον είναι η σχέση που υπάρχει μεταξύ των συγκεντρώσεων, στις οποίες εκτίθενται τα μικρόβια στα διάφορα σημεία της λοίμωξης και της αντιμικροβιακής δράσης. Η φαρμακοδυναμική μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη δοσολογικών σχημάτων που θα βελτιστοποιήσουν το κλινικό αποτέλεσμα και να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της αντοχής των μικροβίων.

Η έκβαση της θεραπείας φαίνεται ότι σχετίζεται, από μελέτες σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους, με μια από τις τρεις φαρμακοδυναμικές παραμέτρους: α) το λόγο της μέγιστης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στον ορό (Cmax ή peak) προς την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου για το συγκεκριμένο μικρόβιο (minimum inhibitory concentration – MIC) (Cmax/MIC ή peak/MIC), β) το λόγο της περιοχής κάτω από την καμπύλη, που περιγράφει τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού ως προς το χρόνο για 24 ώρες (area under the curve – AUC) προς την MIC του φαρμάκου για το συγκεκριμένο μικρόβιο (AUC/MIC) και γ) το χρόνο (T) της έκθεσης του παθογόνου σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, που ξεπερνούν την MIC του για το συγκεκριμένο μικρόβιο (T>MIC) (εικόνα 2).[26]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Εικόνα 2: Οι τρεις φαρμακοδυναμικοί δείκτες που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της αντιβιοτικής αγωγής

Τα δύο σημαντικότερα χαρακτηριστικά για τη φαρμακοδυναμική εκτίμηση ενός αντιβιοτικού, είναι το αν η δράση του εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του ή από τη διάρκεια της έκθεσης και το αν αυτή παραμένει και μετά την έκθεση.[27] Αυτό το δεύτερο χαρακτηριστικό ορίζεται ως μετααντιβιοτική επίδραση (postantibiotic effect – PAE) και περιλαμβάνει την επίμονη καταστολή της αύξησης ή της επανεμφάνισης των μικροοργανισμών μετά το πέρας της έκθεσής τους στο αντιβιοτικό.[27] Έτσι λοιπόν, τα αντιβιοτικά κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη φαρμακοδυναμική παράμετρο, που περιγράφει καλύτερα το in vivo μοντέλο της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας, σε χρόνο-εξαρτώμενα (time-dependent) και σε δόσο-εξαρτώμενα (concentration-dependent). [28]

Χρόνο-εξαρτώμενα αντιβιοτικά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες, τα μακρολίδια, η βανκομυκίνη, η λινεζολίδη, η κλινδαμυκίνη και η τιγεκυκλίνη.[27] Η μέγιστη βακτηριοκτόνος δράση αυτών των αντιβιοτικών παρατηρείται όταν οι συγκεντρώσεις τους στον ορό υπερβαίνουν την MIC του υπεύθυνου παθογόνου κατά τέσσερις φορές. [29], [30] Εμφανίζουν σύντομη μετα-αντιβιοτική επίδραση για τους Gram-θετικούς κόκκους και σχεδόν καθόλου για τους Gram-αρνητικούς βακίλους, με εξαίρεση τις καρβαπενέμες.[31], [32]

Ο φαρμακοδυναμικός δείκτης, ο οποίος σχετίζεται με το καλύτερο κλινικό και μικροβιολογικό αποτέλεσμα για τα αντιβιοτικά αυτά, είναι ο χρόνος που η συγκέντρωση του φαρμάκου παραμένει πάνω από την MIC του μικροβίου (T>MIC).[27] Ο στόχος για τη βακτηριακή εκρίζωση έχει αποδειχθεί από μελέτες σε πειραματόζωα ότι πρέπει να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

είναι περίπου 40-50% του μεσοδιαστήματος των δόσεων.[33] Υπέρ των ανωτέρω συνηγορούν και αποτελέσματα από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, που υποδεικνύουν ότι για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά απαιτείται ο T>MIC να είναι 40-50% του μεσοδιαστήματος των δόσεων για ποσοστό κλινικής ίασης 80-85%.[27] Το μέγεθος της φαρμακοδυναμικής παραμέτρου, που απαιτείται για τη θεραπευτική επιτυχία, είναι συνήθως παρόμοιο μεταξύ των αντιβιοτικών της ίδιας τάξης και για τους διάφορους μικροοργανισμούς.

Δόσο-εξαρτώμενα αντιβιοτικά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι φθοριοκινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι κετολίδες, η μετρονιδαζόλη και η δαπτομυκίνη.[33] Η μέγιστη βακτηριοκτόνος δράση αυτών των αντιβιοτικών παρατηρείται όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό φτάσει τη Cmax. Καθώς η συγκέντρωση μειώνεται στην πορεία, ελαττώνεται και ο ρυθμός μικροβιακής εξόντωσης. Όταν τα επίπεδα του αντιβιοτικού στο σημείο της λοίμωξης πέσουν κάτω από την MIC του υπεύθυνου μικροοργανισμού, θα συνεχίσει να λαμβάνει χώρα η καταστολή της μικροβιακής ανάπτυξης λόγω της μετα-αντιβιοτικής επίδρασης (PAE) που εμφανίζουν αυτά τα αντιβιοτικά. Η διάρκεια αυτής της επίδρασης θα είναι μακρύτερη, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση, με αποτέλεσμα να παραμένουν λιγότεροι υπολειμματικοί πληθυσμοί βακτηρίων κατά τη στιγμή της επόμενης δόσης.[33] Ο στόχος, λοιπόν, της στρατηγικής χορήγησης αυτών των αντιβιοτικών, είναι η μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης με τη χορήγηση μεγάλων δόσεων σε αραιά χρονικά διαστήματα. [34]

Στην εργασία αυτή θα προσδιοριστεί η συσχέτιση μεταξύ της ολικής και της ελέθευρης βανκομυκίνης στο πλάσμα των ασθενών. Λόγω της μεγάλης τοξικότητας της βανκομυκίνης καθίσταται απαραίτητη η εξασφάλιση της ελάχιστης αναγκαίας συγκέντρωσης της, τόσο στο αίμα όσο και στην μολυνθείσα περιοχή, ώστε να επιτευχθεί η ίαση των ασθενών. Συνήθως μετράται η συνολική ποσότητα της βανκομυκίνης στο αίμα και με βάση αυτή υπολογίζεται η δοσολογία που θα χρησιμοποιηθεί. Σύμφωνα με μελέτες το ποσοστό της ελέθευρης προς την ολική ποσότητα της βανκομυκίνης είναι περίπου 50% και για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η μελέτη του προσδιορισμού του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. [35,36] Επίσης θα μελετηθούν τα είπεδα των συγκεντρώσεων της δαπτομυκίνης που χορηγείται σε ασθενείς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Για αυτό πρέπει να παρακολουθούνται τα επίπεδα των αντιβιοτικών που χορηγούνται σε ασθενείς και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές που θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Ο προσδιορισμός των φαρμάκων μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

- με ανοσοενζυμικές τεχνικές
- με την βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών

5.2. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ELISA

Η μέθοδος ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) χρησιμοποιείται στην ανάλυση των αντιβιοτικών. Η τεχνολογία της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ικανότητα ενός ειδικού ενζύμου αντισώματος να διακρίνει την τρισδιάστατη δομή του αντιβιοτικού.[37]

Η ELISA είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται κυρίως σε επίπεδο ελέγχου διαλογής χάρη στα πολλαπλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει όπως η ταχύτητα, η ευκολία στην εφαρμογή και το χαμηλό κόστος. Ο συνδυασμός της υψηλής ειδίκευσης της ένωσης των αντιγόνων με τα ειδικά για αυτά αντισώματα καθώς και η ευαισθησία της ανίχνευσης ενός ενζύμου καθιστούν τη μέθοδο ELISA ιδανική στον προσδιορισμό των αναλυτών σε σύνθετα δείγματα πολλαπλών συστατικών χωρίς να χρειάζεται να προηγηθεί κάποιος διαχωρισμός ή απομάκρυνση προσμείξεων. [37]

Η μέθοδος της ELISA προτιμάται ιδιαίτερα γιατί απαιτεί μικρούς όγκους δείγματος, λιγότερες διαδικασίες καθαρισμού και προετοιμασίας του δείγματος συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Η ευαισθησία και η ειδίκευση της ELISA βασίζονται στη φύση των αντισωμάτων, τα οποία είναι κυρίως μονοκλωνικά αντισώματα αν και πρόσφατα χρησιμοποιούνται και ανασυνδυασμένα.[37]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

5.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η χρωματογραφική ανάλυση, γνωστή ως χρωματογραφία περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού των συστατικών μείγματος ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Ο διαχωρισμός 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 φορτίων κ.ά.

Οι απαιτήσεις σε νευραλγικούς τομείς της ζωής του ανθρώπου, όπως στην υγεία, στη διατροφή, στο περιβάλλον, στη βιομηχανία κ.α. απαιτούσαν την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, στα οποία ένας σημαντικός αριθμός συστατικών έπρεπε να προσδιοριστεί σε πάρα πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Επίσης το κόστος των αναλύσεων θα έπρεπε να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα και τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και άμεσα διαθέσιμα.

Έτσι, οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες της εποχής για αναλύσεις υψηλών προδιαγραφών σε συνδυασμό με τη ραγδαία ανάπτυξη της Τεχνολογίας οδήγησαν στην κατασκευή αυτοματοποιημένων οργάνων υψηλής τεχνολογικής στάθμης, τα οποία από μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα όργανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη χημική ανάλυση. Από τη στιγμή που άρχισαν να κατασκευάζονται όργανα ακριβείας, άρχισε να αναπτύσσεται η ενόργανη χημική ανάλυση. Η ενόργανη χημική ανάλυση περιλαμβάνει μεθόδους που στηρίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυόμενων ουσιών. Μία σημαντική κατηγορία ενόργανων μεθόδων ανάλυσης είναι οι διαχωριστικές τεχνικές. Από τις διαχωριστικές τεχνικές εξέχουσα θέση με πάρα πολλές εφαρμογές κατέχει η χρωματογραφία.

5.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903), στην προσπάθεια του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Αυτός εκχύλισε τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα σε στήλη από κονιοποιημένο ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$), οπότε τα συστατικά - χλωροφύλλες διαχωρίστηκαν σε διακριτές έγχρωμες ζώνες. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, η τεχνική ονομάσθηκε διεθνώς «χρωματογραφία», από τις ελληνικές λέξεις ‘χρώμα’ και ‘γράφω’, αν και τα χρώματα είναι συμπωματικά και καμία σχέση έχουν με τις αρχές της τεχνικής. Από τότε η τεχνική βελτιώθηκε και διαμορφώθηκαν και άλλες τεχνικές, ώστε σήμερα η χρωματογραφία να αποτελεί την καλύτερη τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης πολύπλοκων μειγμάτων και απομόνωσης ευπαθών ουσιών, έγχρωμων και άχρωμων, με εφαρμογές όχι μόνο στη Χημεία, αλλά και σε άλλες επιστήμες, όπως Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Επιστήμη Περιβάλλοντος, Επιστήμη Τροφίμων, Γεωπονία, κλπ. Σπουδαιότεροι σταθμοί στην ανάπτυξη της χρωματογραφίας είναι η σύνθεση της πρώτης ιονανταλλακτικής ρητίνης από τους Adams και Holmes το 1935, η ανάπτυξη της υγρής - υγρής χρωματογραφίας κατανομής από τους Martin και Synge το 1941 (για την εργασία τους αυτή πήραν βραβείο Νόμπελ το 1954), η ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας από τους Martin και James το 1952, και η ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης τα τελευταία χρόνια.

5.5. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΘΕΩΡΙΑΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών και φαρμακευτικών ενώσεων. 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 (για ιονικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν την σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι η κινητή φάση, διερχόμενη μέσα από την στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση πάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και συνήθως εξέρχονται από την στήλη, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

εκτός από το διαχωρισμό και παράλληλα με αυτό, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών. [38,39]

Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή ή αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση.[40]

Η χρωματογραφία ταξινομείται αρχικά σε :

- Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)
- Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)
- Υπερκρίσιμη Ρευστή χρωματογραφία (Supercritical Fluid Chromatography, SFC)

5.6. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) άρχισε ουσιαστικά να αναπτύσσεται τη δεκαετία του 1960 με την πρόοδο της τεχνολογίας, οπότε και άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης και σταθερής παροχής.

Η υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολλών χημικών ενώσεων, όπως αμινοξέων, αλκαλοειδών, αντιβιοτικών, αφλατοξινών, βαρβιτουρικών, υδατανθράκων, κατεχολαμινών, βιταμινών, πρωτεϊνών, ενζύμων, στεροειδών φαρμάκων κ.α., καθώς και για την ποσοτική ανάλυσή τους. Έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων καθώς και των μεταβολιτών τους. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων.

Στην υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μία χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και στηρίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση των ουσιών σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, μια στατική και μια κινητή. Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες

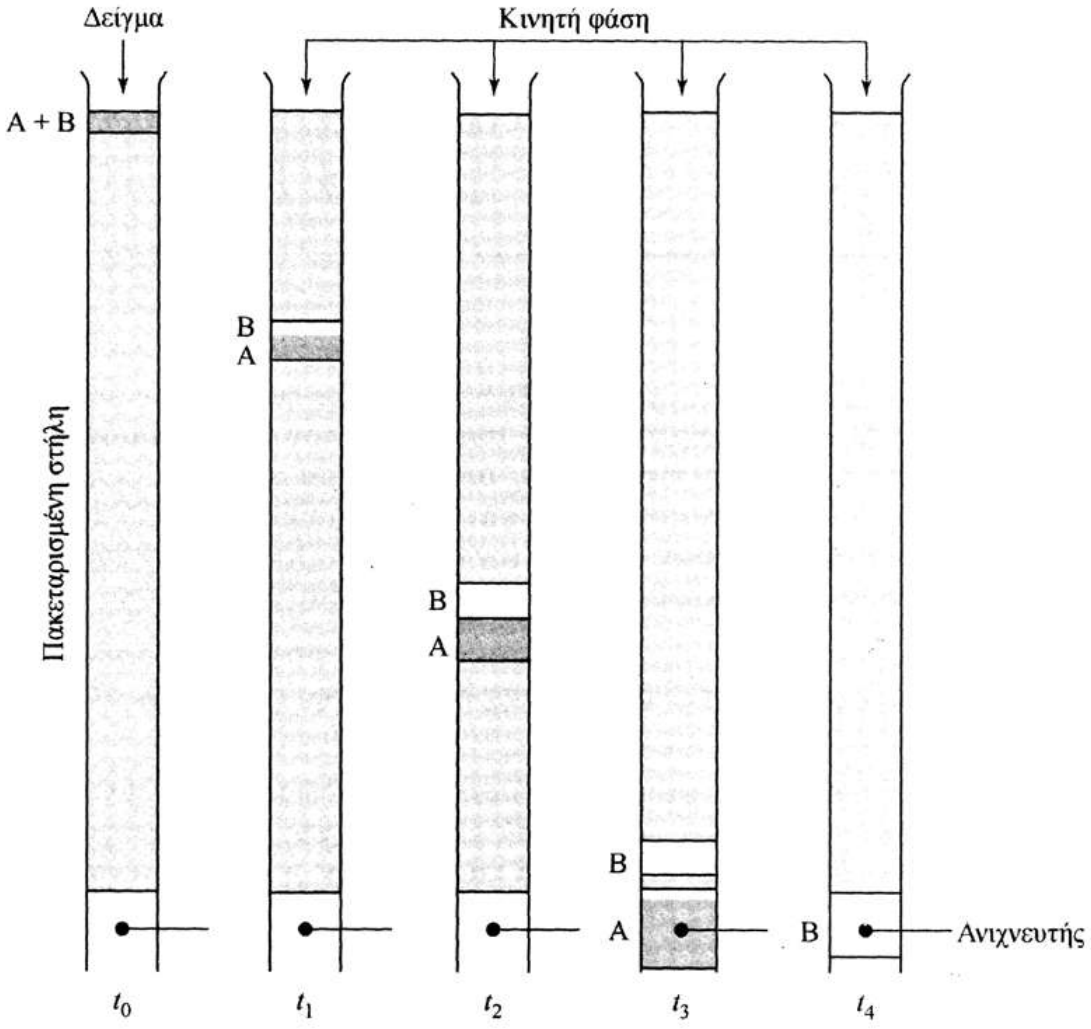
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και με τη χρήση μικρότερων σωματιδίων ως υλικών πλήρωσης της στήλης. Το εύρος ροής στην HPLC είναι από 0.5 έως 5 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500 psi. Οι αρχικές πειραματικές συνθήκες περιλαμβάνουν συνήθως στήλες με υλικό πλήρωσης 5 μm, που λειτουργούν με ροή 1.5-2ml/min και πιέσεις < 2000 psi .[38]

Στην υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) οι δύο φάσεις: α) η στατική φάση, η οποία αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη και β) η κινητή φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά.

Για την καλύτερη κατανόηση της βασικής αρχής της χρωματογραφίας και συγκεκριμένα της υγρής χρωματογραφίας, δίνεται στην εικόνα 3 το σχηματικό διάγραμμα ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Εικόνα 3: Διαχωρισμός Υγρής Χρωματογραφίας

Ορισμένη ποσότητα δείγματος δύο συστατικών, Α και Β, προστίθεται στην κινητή φάση στην κορυφή ή αρχή της στήλης. Καθώς το δείγμα μετακινείται στη στήλη, τα συστατικά του κατανέμονται, με κάποιο μηχανισμό, μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Το κλάσμα κάθε συστατικού, που βρίσκεται στην κινητή φάση, μετακινείται στη στήλη, ερχόμενο σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης, οπότε συμβαίνει νέα κατανομή. Κατά τον ίδιο χρόνο, το κλάσμα του συστατικού, που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της κινητής φάσης, οπότε υφίσταται περαιτέρω κατανομή. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές, καθώς διαβιβάζεται συνεχώς, και συνήθως με σταθερή παροχή και νέα κινητή φάση στη στήλη. Τα συστατικά μετακινούνται μέσα από τη στήλη, μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

η ταχύτητα μετακινήσεως τους εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους σε αυτή, το οποίο είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής τους σε δύο φάσεις. Έτσι, συστατικά με διαφορετικούς συντελεστές κατανομής θα μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη στήλη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. Στο τέλος τα διαχωρισμένα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη, όπου μπορούν να ανιχνευθούν ή / και να συλλέγουν. [39]

Η κινητή φάση (υγρό) ονομάζεται υγρό έκλουσης (eluent), ενώ το διάλυμα, που εξέρχεται από τη στήλη, έκλουσμα (eluate). Η διαδικασία αυτή, δηλαδή η διαβίβαση υγρού εκλούσεως μέσα από τη χρωματογραφική στήλη, ονομάζεται έκλουση και αν αυτή γίνεται με σταθερή παροχή, τότε η διαδικασία ονομάζεται ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), διαφορετικά αν γίνεται με συνεχείς αλλαγές της παροχής, τότε θα ονομαστεί βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Στο τέλος της στήλης τοποθετείται συνήθως ένας ανιχνευτής που παρακολουθεί μια αναλυτική ιδιότητα του εκλούσματος και παράγει ένα σήμα, κάθε φορά που εκλούεται ένα συστατικό (χρωματογραφική κορυφή).

Υπάρχουν δύο ειδών HPLC:

- το προπαρασκευαστικό HPLC (preparative HPLC) που αναφέρεται στη διαδικασία της απομόνωσης και της αφαίρεσης ξένων ουσιών που υπάρχουν στις ενώσεις. Σημαντικός είναι ο βαθμός καθαρότητας της διαλυτής ουσίας και του ρυθμού απόδοσης, ο οποίος είναι το ποσό ένωσης που παράγεται ανά μονάδα χρόνου.
- αναλυτικό HPLC (analytical HPLC), όπου η εστίαση είναι να ληφθούν πληροφορίες για το δείγμα ένωσης. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται, περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ουσίας, τον προσδιορισμό της ποσότητας της, και την ανάλυση μιας ένωσης.

Οι χημικοί διαχωρισμοί μπορούν να γίνουν με HPLC, μια και οι χημικές ενώσεις δίνουν διαφορετικούς χρόνους έκλουσης σε μια συγκεκριμένη στήλη και σε μια κινητή φάση. Κατά συνέπεια, ο χρωματογράφος μπορεί να διαχωρίσει τις ενώσεις τη μια από την άλλη χρησιμοποιώντας το HPLC, η έκταση ή ο βαθμός διαχωρισμού καθορίζεται συνήθως από την επιλογή της στάσιμης φάσης και της κινητής φάσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Η αφαίρεση ξένων ουσιών αναφέρεται στη διαδικασία διαχωρισμού ή στην αφαίρεση ένωσης από άλλες (ενδεχομένως δομικά σχετικές) ενώσεις ή μολυσματικούς παράγοντες. Κάθε ένωση πρέπει να έχει μια χαρακτηριστική κορυφή υπό ορισμένες χρωματογραφικές συνθήκες. Ανάλογα με αυτό που πρέπει να διαχωριστεί και πόσο πολύ χημικά όμοιες είναι οι ενώσεις, ο χρωματογράφος μπορεί να επιλέξει τις συνθήκες, όπως η κατάλληλη κινητή φάση, για να επιτρέψει στον επαρκή διαχωρισμό προκειμένου να συλλέξει ή να εξάγει την επιθυμητή ένωση. Η έκλουση των ενώσεων και οι μολυσματικοί παράγοντες μέσω της στήλης πρέπει να διαφέρουν αρκετά έτσι ώστε η καθαρή επιθυμητή ένωση να μπορεί να συλλεχθεί ή να εξαχθεί χωρίς να υποστεί οποιαδήποτε άλλη ανεπιθύμητη αλλοίωση.

Ο προσδιορισμός των ενώσεων με χρήση HPLC είναι ένα κρίσιμο μέρος οποιασδήποτε συστήματος HPLC. Προκειμένου να προσδιοριστεί οποιαδήποτε ένωση από το HPLC επιλέγουμε πρώτα τον τύπο του ανιχνευτή. Μόλις επιλεχτεί ο ανιχνευτής και τεθεί στις βέλτιστες ρυθμίσεις ανίχνευσης, μπορούμε να αναπτύξουμε μια ανάλυση διαχωρισμού. Οι παράμετροι αυτής της ανάλυσης πρέπει να είναι τέτοιες που να παρατηρείται μια καθαρή κορυφή του γνωστού δείγματος στο χρωματογράφημα. Η προσδιοριζόμενη κορυφή πρέπει να έχει έναν λογικό χρόνο διατήρησης και πρέπει να διαχωριστεί καλά από ξένες κορυφές στα επίπεδα ανίχνευσης, στα οποία εκτελούμε την ανάλυση. Διάφορες παράμετροι επηρεάζουν το χρόνο διατήρησης μιας ένωσης στην στήλη. Ο πρώτος είναι η επιλογή της στήλης, άλλος παράγοντας είναι η επιλογή της κινητής φάσης, και τελευταίος είναι η επιλογή της ταχύτητας ροής.

Ο προσδιορισμός μιας ένωσης από το HPLC ολοκληρώνεται με την έρευνα της βιβλιογραφίας και με τεχνικές δοκιμής – λάθους. Ένα δείγμα μιας γνωστής ένωσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να βεβαιωθεί ο προσδιορισμός της άγνωστης ένωσης. Ο προσδιορισμός των ενώσεων μπορεί να βεβαιωθεί με το συνδυασμό δύο ή περισσότερων μεθόδων ανίχνευσης.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας των ενώσεων από το HPLC είναι η διαδικασία προσδιορισμού άγνωστης συγκέντρωσης μιας ένωσης σε ένα γνωστό διάλυμα. Περιλαμβάνει την έγχυση μιας σειράς γνωστών συγκεντρώσεων ενός σταθερού διαλύματος ενώσεων στο HPLC για την ανίχνευση. Ο χρωματογράφος αυτών των γνωστών συγκεντρώσεων θα δώσει μια σειρά κορυφών που συσχετίζονται στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

συγκέντρωση της ένωσης που εγχέεται. Το διάγραμμα αυτό ως συνάρτηση του όγκου του εκλούσεως ονομάζεται χρωματογράφημα. Τα χρωματογραφήματα εκλούσεως παρέχουν πληροφορίες, χρήσιμες για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση, επειδή ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εκλουσθεί, είναι χαρακτηριστικός για το συστατικό αυτό, ενώ το ύψος ή η ολοκληρωμένη επιφάνεια της κορυφής του σήματος μπορεί να συσχετισθεί με την συγκέντρωση του συστατικού.

Μια άλλη ταξινόμηση στην υγρή χρωματογραφία μπορεί να γίνει με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού, και υπάρχουν οι ακόλουθες κατηγορίες για την υγρή χρωματογραφία :[41]

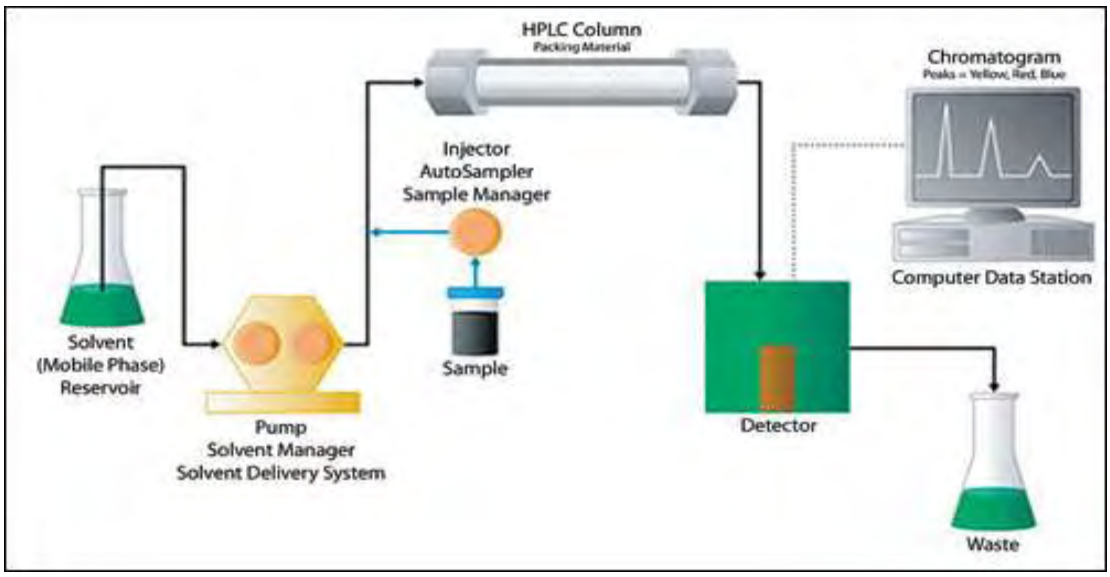
1) Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption Chromatography)
2) Χρωματογραφία Κατανομής (Partition Chromatography), η οποία διακρίνεται σε:
    i) Χρωματογραφία Κανονικής φάσης (Normal-Phase Chromatography)
    ii) Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed-Phase Chromatography)
3) Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography)
4) Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography)
5) Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (Size-Exclusion Chromatography)

5.7. ΜΕΡΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ένα σύστημα HPLC απεικονίζεται σχηματικά στην εικόνα 4 και αποτελείται από:

1) αντλία (pump)
2) μονάδα απαέρωσης διαλυτών (degasser)
3) σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve) ή αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler)
4) στήλη και προστήλη (column, precolumn)
5) μονάδα ρύθμισης – διατήρησης θερμοκρασίας στήλης
6) ανιχνευτή (detector)
7) υπολογιστή – εκτυπωτή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Το δείγμα εισάγεται κάθε φορά από τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος. Στις φιάλες αποθήκευσης βρίσκονται οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται κάθε φορά για την έκλουση των προσδιοριζόμενων ουσιών, δηλαδή αποτελούν την κινητή φάση. Η κινητή φάση προωθείται με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης στη χρωματογραφική στήλη, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ουσιών. Οι ουσίες μετά την έκλουσή τους από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας οδηγούνται σε ένα σύστημα ανίχνευσης. Το σήμα που δίνουν στον ανιχνευτή οι προσδιοριζόμενες ουσίες καταγράφεται από ένα σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων και λαμβάνεται τελικά το χρωματογράφημα.

Από τα εξαρτήματα των διατάξεων της HPLC που προαναφέρθηκαν, σημαντικότατο ρόλο παίζουν στην ποιότητα ενός διαχωρισμού ουσιών η χρωματογραφική στήλη και το σύστημα ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί. Η στήλη και ο ανιχνευτής ποικίλλουν ανάλογα με τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν, επηρεάζοντας καθοριστικά το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης. Ένας άλλος παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του διαχωρισμού των ουσιών ενός δείγματος είναι το εάν κατά την ανάπτυξη ενός χρωματογραφήματος εφαρμόζονται ή όχι συνθήκες βαθμωτής έκλουσης. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε σκόπιμο να αναφερθούν πιο εκτενώς κάποια επιπλέον στοιχεία για τις χρωματογραφικές στήλες, τα συστήματα ανίχνευσης, καθώς και για τα είδη της βαθμωτής έκλουσης στην HPLC.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

5.8. ΣΤΗΛΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά ενός χρωματογραφικού συστήματος. Πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές.[42] Το υλικό πλήρωσης (ή στατική φάση) βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν.

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)
χωρίζονται ως προς :
i) το υπόστρωμά τους
ii) τη διάμετρό τους
iii) το μηχανισμό διαχωρισμού τους

<u>Ως προς το υπόστρωμα</u>

Ο πρώτος μεγάλος διαχωρισμός των στηλών της υγρής χρωματογραφίας γίνεται με βάση το υπόστρωμά τους και διακρίνονται σε:

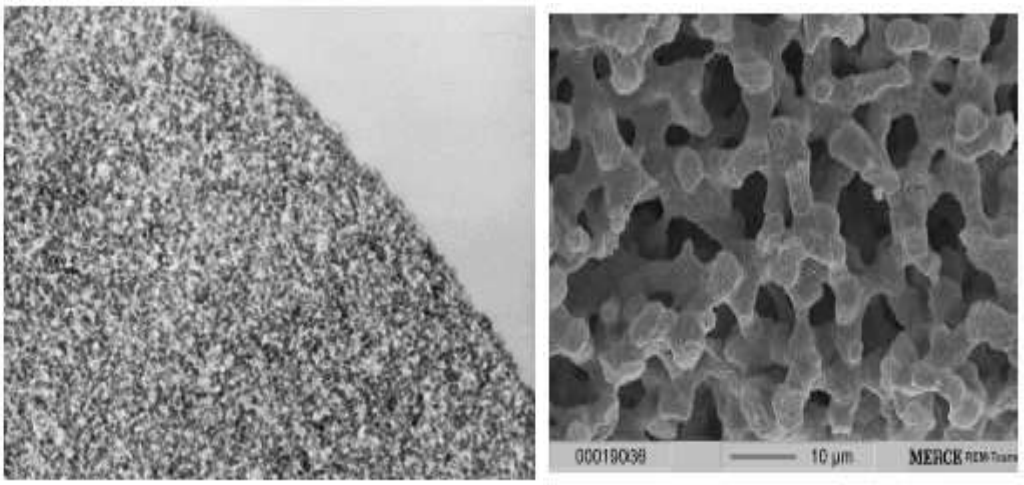
- συμβατικές και
- μονολιθικές στήλες[43]

Εδώ και παρά πολλά χρόνια οι διαχωρισμοί ουσιών με τη μέθοδο της HPLC γίνονταν σχεδόν αποκλειστικά με σωματιδιακά υλικά πλήρωσης (μορφής σφαιρικού ή ακανόνιστου σχήματος). Τα τελευταία χρόνια, όμως, άρχισαν να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο οι μονολιθικές στήλες. Οι μονόλιθοι είναι ένας νέος τύπος στατικής φάσης και πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών στηλών λόγω των ιδιοτήτων τους. Η μονολιθική στατική φάση παρουσιάζει μια συνεχή πορώδη δομή, η οποία συνήθως παρασκευάζεται με in situ πολυμερισμό ή με σταθεροποίηση μέσα στο σωλήνα της στήλης.[41] Κύριο χαρακτηριστικό των στηλών αυτών λόγω του μεγάλου πορώδους που παρουσιάζουν είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγάλες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης σε σχέση με τις συμβατικές στήλες, χωρίς να αναπτύσσονται υψηλές πιέσεις, μειώνοντας έτσι σημαντικά το χρόνο της ανάλυσης[43], όμως συχνά μειονεκτούν στη διαχωριστική ικανότητα. Το σχήμα 6 δείχνει απεικονίσεις ηλεκτρονικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) του υλικού πλήρωσης μιας συμβατικής (α) και μιας μονολιθικής στήλης (β)

(α) (β)



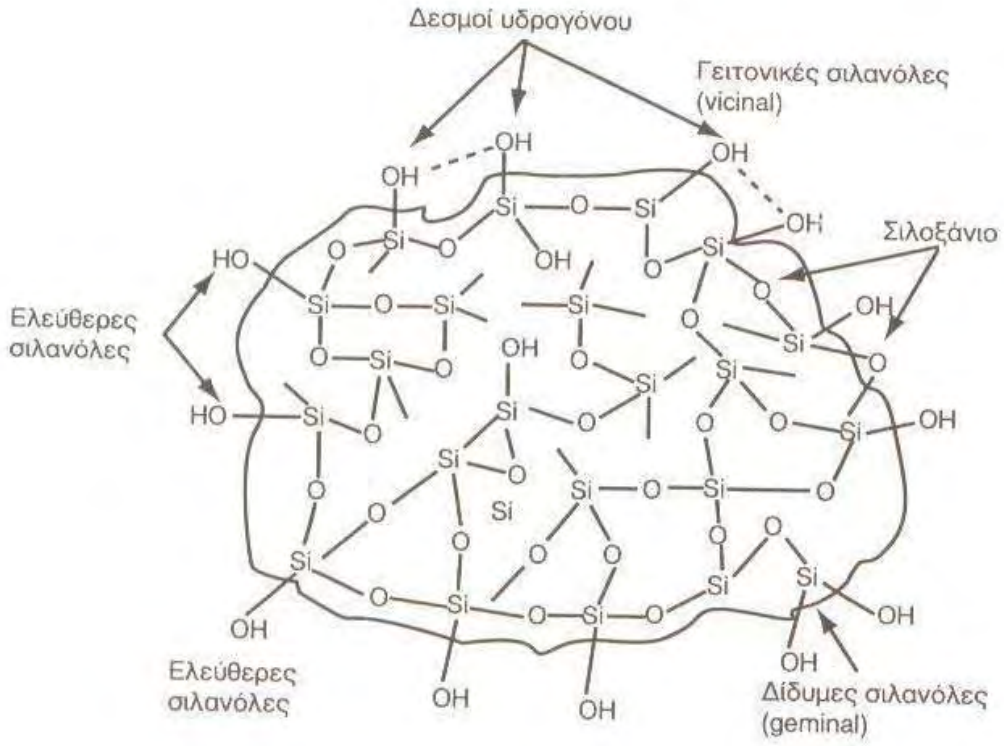
Σχήμα 6: Εικόνες SEM του υλικού πλήρωσης: α) μιας συμβατικής και β) μιας μονολιθικής στήλης.

Τα περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά πλήρωσης των συμβατικών στηλών της HPLC είναι:[41]

1) Ανόργανα οξείδια και ιδιαίτερα το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)
2) Οργανικά πολυμερή
3) Γραφιτικός άνθρακας
4) Ορυκτά φωσφορικού ασβεστίου
5) Διάφοροι πολυσακχαρίτες

Η πορώδης πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) αποτελεί το σημαντικότερο υλικό που χρησιμοποιείται ως στατική φάση στη χρωματογραφία στερεού-υγρού. Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης έχουν ως βάση την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) γιατί έχει χαμηλό κόστος, δεν καταστρέφεται εύκολα και μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν σωματίδια της πηκτής αυτής σε μια ευρεία περιοχή μεγεθών και διαμέτρων πόρων κατάλληλα για χρωματογραφία. Η επιφάνειά του αποτελείται από σιλανολικές (-SiOH) και σιλαξονικές (-Si-OSi-) ομάδες. Μερικές σιλανολικές ομάδες είναι ελεύθερες, ενώ άλλες είναι ενωμένες ανά δύο με δεσμούς υδρογόνου.[41] (Σχήμα 7).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 7: Δομή της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel).

Το υλικό αυτό αποτελεί επίσης το υπόστρωμα πάνω στο οποίο αντιδρούν χημικά διάφορες ομάδες, δίνοντας έτσι μια ξεχωριστή θέση στη σύγχρονη τεχνολογία παρασκευής στηλών. Στον πίνακα 5 [41] αναγράφονται οι κυριότερες ομάδες που αντιδρούν χημικά με την πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου.

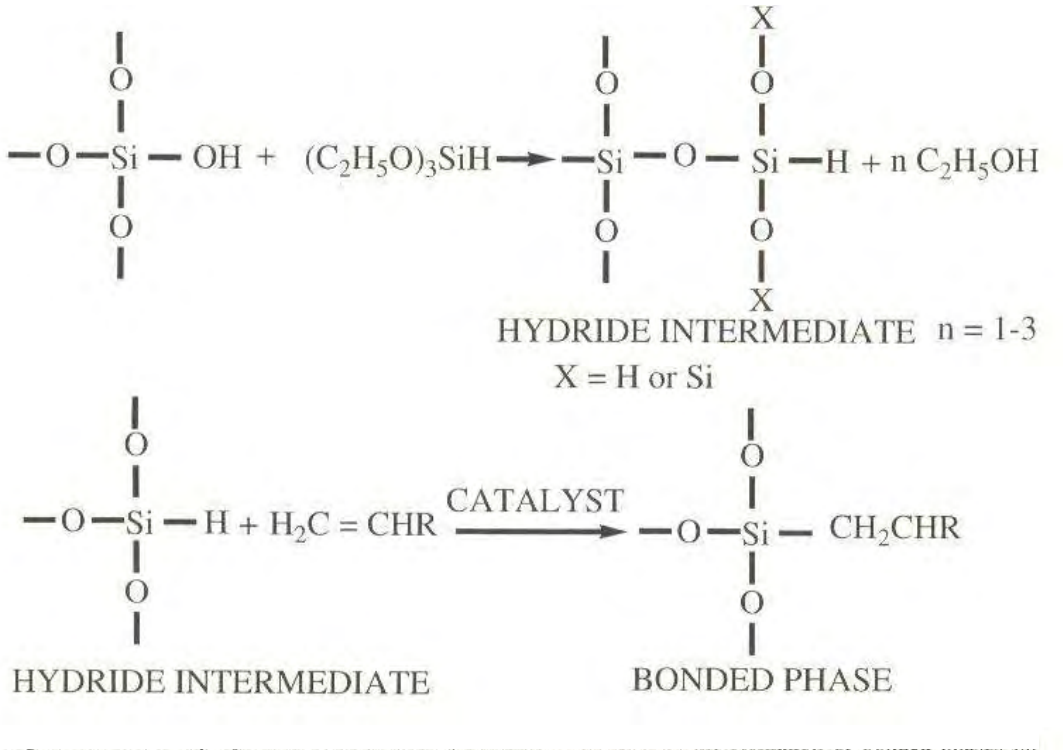
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 5: Ομάδες που μπορούν να αντιδράσουν με την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου προς σχηματισμό μιας χημικά δεσμευμένης φάσης.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
Alkyl	- CH_3 - C_4H_9 - C_8H_{17} - $C_{18}H_{37}$ - $C_{30}H_{61}$
Fluoroalkyl	- $(CH_2)_2(CF_2)_5CF_3$ - $(CH_2)_2C(CF_3)_2C_3F_7$
Phenyl	- C_6H_5 - C_6F_5
Cyano	- $(CH_2)_3CN$
Amido	- $(CH_2)_3NH_2$
Amide	- $(CH_2)_3NHCOC_{13}H_{27}$
Carbamate	- $(CH_2)_3OCONHC_8H_{17}$
Sulfonic acid	- $(CH_2)_3SO_3H$ - $(CH_2)_3C_6H_4SO_3H$ - $C_6H_4SO_3H$
Carboxylic acid	- $(CH_2)_3OCH_2COOH$ - $(CH_2)_3COOH$ - $(CH_2)_3C_6H_4\ CH_2COOH$
Dimethylamine	- $(CH_2)_3N(CH_3)_2$
Quaternary amine	- $(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$

Η χημική δέσμευση των ομάδων αυτών μπορεί να γίνει με διάφορες αντιδράσεις. Η κυριότερη από αυτές είναι η αντίδραση μεταξύ των επιφανειακών σιλανολών με οργανοπυριτικές ενώσεις. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε δύο στάδια και στο σχήμα 8 [41] που ακολουθεί δίνεται ένα παράδειγμα μιας τέτοιας αντίδρασης, στην οποία φαίνεται η πορεία της.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 8: Πορεία αντίδρασης μεταξύ της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου και μιας οργανοπυριτικής ένωσης για το σχηματισμό μιας χημικά δεσμευμένης φάσης.

Στο πρώτο στάδιο η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου αντιδρά με τριαιθοξυ - υδρίδιο του πυριτίου και σχηματίζει ένα ενδιάμεσο προϊόν, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με ένα αλκένιο (με το διπλό δεσμό σε ακραίο άνθρακα) σχηματίζοντας έναν ανθρακοπυριτικό δεσμό (C-Si).[41]

Γενικά, όμως, εκτός από τα πλεονεκτήματα που έχει το υλικό αυτό όταν χρησιμοποιείται ως στατική φάση στη χρωματογραφία, παρουσιάζει και τα εξής μειονεκτήματα :

- έχει μεγάλη διαλυτότητα σε αλκαλικά διαλύματα (pH > 8)
- οι δεσμευμένες σιλοξανικές φάσεις δεν είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα (pH < 2)
- οι στατικές φάσεις της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου, καθώς και οι δεσμευμένες φάσεις αυτής, παρουσιάζουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με βασικές ενώσεις έχοντας ως αποτέλεσμα την παραμόρφωση του σχήματος των κορυφών που καταγράφονται.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα χρησιμοποιούνται και άλλα υλικά ως στατική φάση στην υγρή χρωματογραφία. Τέτοια υλικά είναι κάποια ανόργανα οξείδια, όπως αυτά του αργιλίου, του ζιρκονίου και του τιτανίου, τα οποία έχουν μεγάλη μηχανική αντοχή και είναι πιο σταθερά στην υδρόλυση από την πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, εκτός από τις συμβατικές στήλες τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και οι μονολιθικές στήλες. Τα μονολιθικά υλικά παρασκευάζονται είτε από οργανικά πολυμερή, όπως πολυστυρένια είτε από ανόργανα πολυμερή, όπως η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου.

Τα τελευταία χρόνια οι μονολιθικές στήλες βρίσκουν εφαρμογή σε ολοένα και περισσότερα πεδία. Οι μονολιθικές στήλες είναι πλέον οι πιο κατάλληλες για το διαχωρισμό μεγαλομορίων, όπως πρωτεϊνών, πεπτιδίων, ολιγο- και πολύ-νουκλεοτιδίων κ.α. Ακόμη βρίσκουν εφαρμογή στο διαχωρισμό ναρκωτικών ουσιών και μεταβολιτών τους, σε ουσίες περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος, πρόσθετων τροφίμων, καθώς και σε αναλύσεις βιοαναλυτικών διαχωρισμών. Οι μονολιθικές στήλες είναι συμβατές, εκτός από την HPLC, με την αέρια χρωματογραφία και την τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία και βρίσκουν εφαρμογές και με αυτές τις τεχνικές.

Ως προς τη διάμετρο

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας μπορούν να χωριστούν και ως προς τη διάμετρό τους. Έτσι διακρίνονται σε στήλες μεγάλης διαμέτρου για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα, σε μικροδιαμετρικές (μικροστήλες), σε νανοδιαμετρικές, σε τριχοειδείς και στήλες τόσο μικρής διαμέτρου, όσο το μέγεθος ενός chip. Μια τυπική αναλυτική στήλη έχει μήκος 250mm, εσωτερική διάμετρο (I.D.) 4,6 mm και είναι πακτωμένη με σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 3,5μm.[43]

Ως προς το μηχανισμό διαχωρισμού

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας διακρίνονται και ως προς το μηχανισμό διαχωρισμού με τον οποίο λειτουργούν σε διάφορες κατηγορίες που αναφέρονται προηγούμενα και δίνουν και το όνομά τους στις διάφορες μεθόδους της υγρής χρωματογραφίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Γενικά, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC) είναι η πιο διαδεδομένη από τις μεθόδους της υγρής χρωματογραφίας λόγω της ευρείας περιοχής εφαρμογών που έχει, καθώς και της απλότητας λειτουργίας της [44]. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των στηλών της αντίστροφης φάσης είναι η μεγαλύτερη πολικότητα της κινητής φάσης σε σχέση με τη στατική, η οποία θεωρητικά θα πρέπει να συμπεριφέρεται σαν μια ιδανική μη πολική στατική φάση[43,45]. Ως κινητές φάσεις σε αυτόν τον τύπο διαχωρισμού χρησιμοποιούνται συνήθως μίγματα οργανικών διαλυτών με νερό, καθώς επίσης και μίγματα οργανικών διαλυτών με ρυθμιστικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH. Η RPLC είναι η πλέον κατάλληλη για το διαχωρισμό πολικών ή μη πολικών μορίων. Επίσης με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ταυτόχρονος διαχωρισμός ουδέτερων και ιονικών ενώσεων [45]. Η δυνατότητα πολλών αλλαγών στην κινητή φάση και η γρήγορη αποκατάσταση της ισορροπίας στατικής και κινητής φάσης διευκολύνει την ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων βαθμωτής έκλουσης [45]

Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα των στηλών αυτών είναι ότι μπορούν χρησιμοποιηθούν κάτω από διάφορες συνθήκες [45], οπότε προκύπτουν οι παρακάτω τεχνικές χρωματογραφίας :

i) **Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων** (Ion Pair Chromatography, IPC). Η τεχνική αυτή της χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων, καθώς και για το διαχωρισμό μιγμάτων ιοντικών και ουδέτερων ενώσεων [46]. Η τεχνική αυτή απαιτεί την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και ενός ιοντικού συστατικού (ion-pair reagent), στην κινητή φάση.

ii) **Χρωματογραφία Συμπίεσης Ιόντων** (Ion Suppression Chromatography, ISC). Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ασθενών οξέων και βάσεων [46], καθώς και μίγματα αυτών με ουδέτερες ενώσεις. Ανάλογα με τις τιμές των σταθερών pK_a και pK_b των οξέων και των βάσεων επιλέγεται και η τιμή του pH της κινητής φάσης. Μάλιστα, η τιμή του pH της κινητής φάσης είναι ένας παράγοντας ο οποίος επιλέγεται για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού.

iii) **Χρωματογραφία Μικκυλίων** (Micellar Liquid Chromatography, MLC). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί μια υδατο-οργανική κινητή φάση που περιέχει μια τασενεργή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ουσία [46]. Η προσθήκη του τασενεργού συστατικού στην κινητή φάση τροποποιεί τη σταθερά κατανομής των ουσιών μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός.

iv) **Χρωματογραφία Υδρόφοβης Αλληλεπίδρασης** (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί μία ασθενώς υδρόφοβη στατική φάση και εφαρμόζεται βαθμωτή έκλουση ενός υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, με συνεχώς ελαττούμενη ιονική ισχύ για το διαχωρισμό πρωτεϊνών [47].

v) **Χρωματογραφία Συμπλοκοποίησης Μετάλλου** (Metal Complexation Chromatography). Με την τεχνική αυτή μπορούν να διαχωριστούν μεταλλικά ιόντα αφού πρώτα μετατραπούν σε ουδέτερα σύμπλοκα με τη βοήθεια κατάλληλων υποκαταστατών (ligand) που προστίθενται στην κινητή φάση.

5.9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Ένα από τα βασικά συστατικά του εξοπλισμού μιας διάταξης υγρής χρωματογραφίας είναι ο ανιχνευτής. Ένας ανιχνευτής HPLC, ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις[48]:

► Χαμηλό επίπεδο θορύβου.
► Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής.
► Μικρός χρόνος απόκρισης.
► Μικρός νεκρός όγκος (να μη συνεισφέρει στη διεύρυνση των κορυφών).
► Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής.
► Σταθερότητα σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης.
► Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
► Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους.
► Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος.

Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συχνά στην HPLC είναι οι παρακάτω:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

i) **Ανιχνευτής ορατού – υπεριώδους** (UV-Vis). Ο ανιχνευτής UV [2] είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος στην υγρή χρωματογραφία. Λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες οργανικές ενώσεις απορροφούν σε ορισμένο βαθμό στην περιοχή UV του φάσματος, δικαιολογημένα ο ανιχνευτής αυτός είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος. Αυτοί μετρούν την απορρόφηση της ακτινοβολίας μιας χημικής ένωσης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Σύμφωνα με το νόμο Beer - Lambert η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης στην κυψελίδα συνεχούς ροής. Η απόκριση του ανιχνευτή, εξαρτάται από το πόσο ισχυρά απορροφά το δείγμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, καθώς και πόσο απορροφά η κινητή φάση που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό. Οι οργανικές ενώσεις απορροφούν ισχυρά στην περιοχή των μηκών κύματος 180-210nm. Στην περιοχή αυτή, όμως, οι περισσότεροι διαλύτες έχουν ισχυρές ταινίες απορρόφησης, κάνοντας έτσι δύσκολη την ανίχνευση σε αυτή την περιοχή. Στην πράξη συνήθως χρησιμοποιούνται μεγαλύτερα μήκη κύματος, ελαττώνοντας έτσι την ευαισθησία.

ii) **Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων** (photodiode array detection). Ο ανιχνευτής αυτός συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους. Η ουσιαστική διαφορά του με τον κλασσικό ανιχνευτή UV-Vis είναι η παρουσία του ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Το δείγμα δέχεται ακτινοβολία ολόκληρου του φάσματος και η ακτινοβολία που βγαίνει από την κυψελίδα, αφού αναλυθεί στο ολογραφικό φράγμα, προσπίπτει σε παράταξη φωτοδιόδων, η οποία περιλαμβάνει από 35-512 ή και παραπάνω φωτοευαίσθητα στοιχεία. Κάθε δίοδος δέχεται την ακτινοβολία ενός και μόνο nm και το σήμα αφού ενισχυθεί μετατρέπεται σε ψηφιακό και αποθηκεύεται στον υπολογιστή [48].

iii) **Φθορισμομετρικός ανιχνευτής**. Ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής χρησιμοποιείται για ενώσεις που φθορίζουν και δίνει σήμα ανάλογο προς τη συγκέντρωση του συστατικού που φθορίζει. Ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής είναι αδιαμφισβήτητα πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή UV αλλά έχει μια περιορισμένη περιοχή εφαρμογών. Μόνο ένα μικρό μέρος των οργανικών ενώσεων που απορροφούν το φως είναι και φθορίζοντες ταυτόχρονα, ενώ ένα ακόμη μικρότερο μέρος αυτών είναι ισχυρά φθορίζοντες. Ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής δεν είναι μόνο πολύ ευαίσθητος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

αλλά και πολύ εκλεκτικός. Αυτό συμβαίνει γιατί χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά μήκη κύματος, διέγερσης και εκπομπής. [45].

iv) **Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής**. Εδώ και χρόνια έχει επικρατήσει για τον αμπερομετρικό ανιχνευτή ο όρος ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, ο οποίος στηρίζεται στη μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται κατά την οξείδωση ή αναγωγή του συστατικού στην επιφάνεια ηλεκτροδίων μιας κυψέλης συνεχούς ροής. Κατά την οξείδωση γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το συστατικό στο ηλεκτρόδιο, ενώ κατά την αναγωγή συμβαίνει το αντίστροφο [45].

v) **Αγωγιμομετρικός ανιχνευτής**. Στον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή εφαρμόζεται εναλλασσόμενη διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια της κυψέλης συνεχούς ροής. Εδώ μετριέται η ειδική αγωγιμότητα του ιόντος, η οποία είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση [45].

vi) **Φασματογράφος μάζας**. Τα συστατικά που μας ενδιαφέρει να προσδιοριστούν καθώς εκλούονται από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας εισάγονται με τη μορφή διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, όπου εξατμίζονται, ιονίζονται και στη συνέχεια λαμβάνονται τα φάσματα μάζας για την αποτίμηση των αποτελεσμάτων [48].

5.10. ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ – ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η έκλουση των ουσιών στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μπορεί να γίνει είτε ισοκρατικά είτε βαθμιδωτά. Στον απλό τύπο ισοκρατικής έκλουσης, οι χρωματογραφικές συνθήκες παραμένουν σταθερές, δηλαδή η σύσταση της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής και η θερμοκρασία της στήλης. Πολλά πολύπλοκα δείγματα περιέχουν συστατικά που διαφέρουν πολύ στη συγκράτηση, δηλαδή άλλα συγκρατούνται ασθενώς και άλλα ισχυρά. Αν οι ισοκρατικές συνθήκες επιλεγούν με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά να εκλούονται σε έναν ικανοποιητικό και σχετικά μικρό χρόνο, τότε τα συστατικά που συγκρατούνται ασθενώς στη στατική φάση θα εκλουστούν πολύ νωρίς και είναι πολύ πιθανόν κάποια από αυτά να εκλουστούν στο νεκρό χρόνο της στήλης. Από την άλλη, αν οι ισοκρατικές συνθήκες επιλεγούν με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

συγκρατούνται ασθενώς να διαχωρίζονται ικανοποιητικά, τότε τα συστατικά που συγκρατούνται ισχυρά εκλούονται σε μεγάλο χρόνο, οι κορυφές τους είναι ευρείες και η ολοκλήρωση των κορυφών για την ποσοτική τους αποτίμηση γίνεται πολύ δύσκολη ή ακόμη και αδύνατη. Έτσι όταν απαιτείται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός πολύπλοκου δείγματος, ο απλός τύπος ισοκρατικής έκλουσης δεν οδηγεί σε επιτυχή διαχωρισμό των συστατικών του. Για την αποφυγή όλων αυτών των προβλημάτων χρησιμοποιείται πολύ συχνά η βαθμιδωτή έκλουση. Η βαθμιδωτή έκλουση μπορεί να γίνει :

► Με μεταβολή της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη της κινητής φάσης και γενικότερα με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης.

► Με μεταβολή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.

► Με μεταβολή της θερμοκρασίας της στήλης διαχωρισμού.

Το πιο συνηθισμένο είδος βαθμωτής έκλουσης είναι η μεταβολή της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη της κινητής φάσης. Σε αυτό το είδος βαθμωτής έκλουσης αρχικά χρησιμοποιείται μια κινητή φάση με μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη, έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των ασθενώς συγκρατούμενων ενώσεων. Στη συνέχεια η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη της κινητής φάσης αυξάνεται, έτσι ώστε να εκλουστούν και να διαχωριστούν σε μικρό χρόνο και οι ενώσεις που συγκρατούνται ισχυρά στη στατική φάση. Η ελάττωση του χρόνου έκλουσης των συστατικών συνεπάγεται μικρού εύρους κορυφές (σε σχέση με την ισοκρατική έκλουση). Η αρχική ιδέα για την εφαρμογή της βαθμιδωτής έκλουσης ήταν του A. Tiselius το 1950 [56]. Η θεωρία της βαθμωτής έκλουσης έχει αναπτυχθεί σε γενικές γραμμές από τα μέσα της δεκαετίας του ’60 και μετά [57-60]. Τότε ο εξοπλισμός για την εφαρμογή της βαθμιδωτής έκλουσης ήταν διαθέσιμος στο εμπόριο και το είδος αυτό της έκλουσης εφαρμόστηκε για να λύσει ποικίλα προβλήματα της υγρής χρωματογραφίας.

Τα πλεονεκτήματα της βαθμιδωτής έκλουσης είναι :

► Βελτίωση του διαχωρισμού δειγμάτων με πολλά συστατικά και διαφορετική συμπεριφορά στη συγκράτηση (ασθενής και ισχυρή συγκράτηση).

► Αύξηση του αριθμού των συστατικών που διαχωρίζονται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

► Διαχωρισμός μιγμάτων με ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, όπως συνθετικά πολυμερή, πρωτεΐνες και άλλα βιοπολυμερή των οποίων η συγκράτηση αλλάζει αξιοσημείωτα με μικρές αλλαγές της σύστασης της κινητής φάσης.
► Οικονομία στη χρήση διαλυτών και ταχύτητα στο χρόνο ανάλυσης δειγμάτων με μεγάλο αριθμό συστατικών
► Ελάττωση της εμφάνισης των κορυφών με «ουρά», ιδιαίτερα σε δείγματα που περιέχουν βασικές ενώσεις.

Η βαθμιδωτή έκλουση υπό συνθήκες μεταβολής της συγκέντρωσης του διαλύτη της κινητής φάσης είναι γενικά πολύ πιο αποτελεσματική στη μείωση του χρόνου συγκράτησης σε σχέση με τη βαθμιδωτή έκλουση υπό συνθήκες μεταβολής της θερμοκρασίας διαχωρισμού της στήλης. Για παράδειγμα, οι παράγοντες συγκράτησης k των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους στην αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία μειώνονται στο μισό ή στο ένα τρίτο της αρχικής τιμής με μια αύξηση 10% της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη σε υδατο-οργανικές κινητές φάσεις, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10^{o}C συνήθως οδηγεί σε μείωση του παράγοντα συγκράτησης k των ιονικών ενώσεων κατά 10 – 20%. Επιπλέον, πολλές στήλες του εμπορίου δεν αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες.[39] Η βαθμιδωτή μεταβολή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης συνήθως δεν βρίσκει πρακτική εφαρμογή από μόνη της, τουλάχιστον για τις συμβατικές στήλες υγρής χρωματογραφίας, διότι η αύξηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στις στήλες αυτές οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της πίεσης της στήλης, η οποία είναι μη επιτρεπτή.

Το προφίλ, δηλαδή το σχήμα του προγράμματος της βαθμιδωτής μεταβολής ενός χρωματογραφικού παράγοντα, μπορεί να περιλαμβάνει :
α) γραμμικές βαθμιδωτές μεταβολές,
β) μη γραμμικές βαθμιδωτές μεταβολές με καμπύλο προφίλ,
γ) βηματικές βαθμιδωτές μεταβολές και
δ) βαθμιδωτές μεταβολές που αποτελούνται από διάφορα γραμμικά τμήματα με διαφορετικές κλίσεις και χρονικά διαστήματα όπου λαμβάνουν χώρα ισοκρατικές συνθήκες συχνά στην αρχή ή / και στο τέλος της έκλουσης.

Η χρήση γραμμικών βαθμιδωτών μεταβολών είναι η πιο συνηθισμένη για λόγους απλότητας σε θεωρητικό αλλά και σε πειραματικό επίπεδο. Όμως, στην RPLC η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

εφαρμογή γραμμικών βαθμιδωτών μεταβολών δεν οδηγεί απαραίτητα σε απλές και σαφείς εκφράσεις του χρόνου συγκράτησης όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του τύπου της βαθμωτής μεταβολής. Αυτό είναι δυνατό μόνο στην περίπτωση που το lnk μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση, φ, του οργανικού διαλύτη της υδατο-οργανικής κινητής φάσης, όπου k είναι ο παράγοντας συγκράτησης της ουσίας υπό ισοκρατικές συνθήκες και δίνεται από τη σχέση :

$$k = (t_R - t_o)/ t_o$$

όπου

t_R είναι ο χρόνος συγκράτησης της υπό μελέτη ουσίας και

t_o ο νεκρός χρόνος

Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά και με καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα αντιβιοτικά με βαθμιδωτή έκλουση και το κατάλληλο εκλουστικό μέσο, όπως θα αποδειχθεί στο πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής.[49],[50].[51]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Β' ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούν τα υλικά, τα όργανα και ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των αντιβιοτικών, της βανκομυκίνης και της δαπτομυκίνης σε δείγματα πλάσματος αίματος.

1.1. ΥΛΙΚΑ

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες πρότυπες ουσίες, τα αντιδραστήρια, οι διαλύτες και τα διαλύματα που αναφέρονται παρακάτω.

Πρότυπες ουσίες

Βανκομυκίνη (Vancomycin, καθαρότητας 80%, Sigma – Aldrich)
Δαπτομυκίνη (Daptomycin, καθαρότητας 90%, Sigma – Aldrich)

Διαλύτες - Αντιδραστήρια

Μεθανόλη (Methanol Chromatography HPLC grade, Sigma – Aldrich)
Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile Chromatography HPLC grade, Sigma – Aldrich)
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (Potassium phosphate monobasic, Sigma – Aldrich)
Νερό (Water Chromasolv Plus for HPLC,Sigma – Aldrich)
Υδροξείδιο του Νατρίου (Sodium Hydroxyde, Merck)
ο- φθαλδιαλδεύδη, OPA (o-phthaldialdehyde, OPA, Uptima)
Βορικό οξύ (Boric acid, Sigma – Aldrich)
Τριχλωροοξικό οξύ (TCA, Sigma – Aldrich)
Μερκαπτο-αιθανόλη (Sigma – Aldrich)

Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα ως εξής:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

1.Διάλυμα Παρακαταθήκης Βανκομυκίνης συγκέντρωσης 1mg/ml

Διαλύθηκαν 0,0125g Vancomycin (Sigma) καθαρότητας 80% σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

2. Διάλυμα Παρακαταθήκης Ερυθρομυκίνης συγκέντρωσης 1mg/ml

Διαλύθηκαν 0,0100g erythromycin (Sigma) σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

3. Διάλυμα Παρακαταθήκης Δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 0.1mg/ml

Διαλύθηκαν 0,0125g Daptomycin (Sigma) καθαρότητας 90% σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα εργασίας και τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν :

1. Ρυθμιστικό Διάλυμα Δισόξινου Φωσφορικού Καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 0,2M

Ζυγίστηκαν 2,71962g στερεού KH_2PO_4 (Sigma) διαλύθηκαν σε 100 mL νερού και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 4,6 με υδροχλωρικό οξύ.

2. Διάλυμα εργασίας Βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL

Το διάλυμα προέκυψε από την αραίωση του διαλύματος παρακαταθήκης της βανκομυκίνης σε αναλογία 1:10, δηλαδή 100μl του διαλύματος παρακαταθήκης της βανκομυκίνης αραιώθηκαν με 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

3. Διάλυμα εργασίας Ερυθρομυκίνης με συγκέντρωση 100μg/mL

Το διάλυμα προέκυψε από την αραίωση του διαλύματος παρακαταθήκης της ερυθρομυκίνης σε αναλογία 1:10, δηλαδή 100μl του διαλύματος παρακαταθήκης της Ερυθρομυκίνης αραιώθηκαν με 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

4.Διάλυμα NaOH 0.1N

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Το διάλυμα αυτό προέκυψε από τη διάλυση 0,4g στερεού Υδροξειδίου του Νατρίου (NaOH) σε 100mL νερού.

5. Διάλυμα εργασίας Δαπτομυκίνης συγκέντρωσης c=100μg/mL

Το διάλυμα αυτό προέκυψε από την διάλυση 1,2mg φαρμάκου Cubicin σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 0,2M και pH=4,5.

6. Διάλυμα Βανκομυκίνης σε βορικό οξύ συγκέντρωσης 100μg/mL

Από το διάλυμα παρακαταθήκης της Βανκομυκίνης χρησιμοποιήθηκαν 200μL τα οποία αραιώθηκαν με 1800μL διαλύματος ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος μέχρι τελικού όγκου 2mL σε δοκιμαστικό σωλήνα.

7. Διάλυμα OPA συγκέντρωσης 0,7mg/mL

Το διάλυμα αυτό με διάλυση 7,0mg OPA σε 0,1ml Μεθανόλης και σε 9,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος Βορικού οξέος με την προσθήκη 20μL 2-μερκαπτο-αιθανόλης ώστε να έχει συνολικό όγκο 10mL.

8. Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος H_3BO_3 25g/L με pH =10,5

Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με διάλυση 2,5g βορικού οξέος σε 100mL νερού και έγινε έλεγχος του pH. Βρέθηκε ότι είχε την τιμή 5 και πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στην τιμή 10 με την βοήθεια διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.1M (4g/1000mL)

9. Υδατικό διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος TCA 30%w/v

Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με διάλυση 30g τριχλωροοξικού οξέως σε 100mL νερού.

1.2. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αναλώσιμα από τις αντίστοιχες εταιρίες που αναφέρονται μέσα στις παρενθέσεις:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Centrifugal Filter Units (Millipore, 4104)
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)
Γυάλινα φιαλίδια (1.5mL with red PTFE/SIL , GRACE)
Γυάλινα φιαλίδια (15mL Clear vial, screw top hole cap PTFE/Silicone septa SUPELCO)
Σύριγγες πλαστικές των 5mL

1.3. ΟΡΓΑΝΑ

Τα όργανα - μικροόργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της εργασίας αυτής ήταν:

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf Centrifuge 5810R)
- Συσκευή διήθησης διαλυτών με αντλία κενού
- Λουτρό υπερήχων Branson 1510
- Φασματοφωτόμετρο Hitachi (U-1800)
- Πιπέτα διακριβωμένη Gilson 200-1000μL
- Πιπέτα διακριβωμένη Biohit 10-100μL
- Πιπέτα διακριβωμένη Biohit 1-10μL
- Αναλυτικός ζυγός Shimadzu
- Συσκευή ανάδευσης Vortex
- Σύστημα HPLC Dionex Ultimate 3000 με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

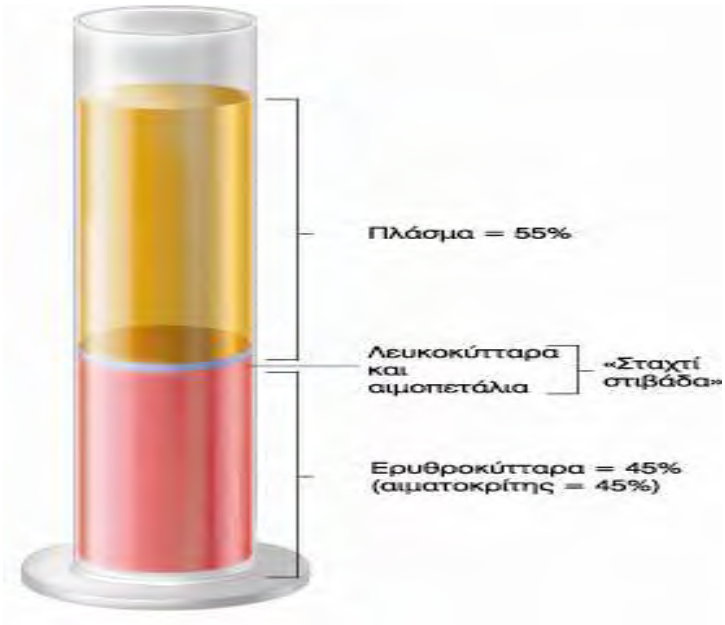
Τα δείγματα του αίματος λήφθηκαν από ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί στην Α΄ Ορθοπεδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό. Συμπληρώθηκε το παραπεμπτικό – ερωτηματολόγιο που υπάρχει στο παράρτημα Α και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δόση χορήγησης των φαρμάκων, τον αριθμό των δόσεων, την λήψη άλλων φαρμάκων, την περιοχή λήψης του αίματος και τον δείκτη μάζας – σώματος του ασθενούς.

2.2. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η φύση της προς εξέταση ουσίας καθορίζει, αν θα εξεταστούν τα ερυθροκύτταρα, ο ορός ή το πλάσμα, ενώ από πρακτική άποψη δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση ουσιών στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος.[52]

Το αίμα αποτελείται από δύο μέρη: τα έμμορφα (κύτταρα και κυτταροειδείς δομές) και το πλάσμα (υγρό που περιέχει διαλυμένες ουσίες). Τα έμμορφα συστατικά αποτελούν περίπου το 45% του όγκου του αίματος ενώ το πλάσμα αποτελεί περίπου το 55% όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Εικόνα 5: Συστατικά αίματος

Το πλάσμα είναι το υγρό μέρος του αίματος. Πρόκειται για υδατικό διάλυμα με χρώμα ωχροκίτρινο, που περιέχει ανόργανα άλατα (Ca^{+2}, K^{+}, Na^{+}, Cl^{-}, Mg^{+2}), πρωτεΐνες, λιποειδή, υδατάνθρακες, χρωστικές, βιταμίνες, ένζυμα, ορμόνες και διλυμένα αέρια. [53]

Τα δείγματα του αίματος έρχονται στο εργαστήριο αμέσως μετά τη συλλογή τους σε κατάλληλο δοχείο που περιέχει EDTA για να υποστούν την φυγοκέντριση και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός του πλάσματος από τον ορό του αίματος. Το αίμα διαχωρίζεται σε πλάσμα και αυτό αποχωρίζεται από τα κυτταρικά συστατικά με φυγοκέντριση για 15 λεπτά στις 3500rpm σε θερμοκρασία των 4^{o}C με τη βοήθεια της ψυχόμενης φυγοκέντρου. Στη συνέχεια τα δείγματα πλάσματος αποθηκεύονται και φυλάσσονται είτε στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4-6^{o}C αν πρόκειται να αναλυθούν σε λίγες ώρες από την συλλογή τους ή καταψύχονται στους -18^{o}C για να αναλυθούν την επόμενη ημέρα. Τα περισσότερα φάρμακα που βρίσκονται στο αίμα ή στο πλάσμα του αίματος κατόπιν χορηγήσεως τους σε ασθενείς διατηρούνται σταθερά για μήνες αν αποθηκευτούν σωστά.[52] Στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν δείγματα πλάσματος που έχουν διαχωριστεί κατάλληλα όπως προαναφέρθηκε από τα δείγματα του αίματος που ελήφθησαν από τους ασθενείς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Η προετοιμασία των δειγμάτων πλάσματος έχει σκοπό την απομάκρυνση ουσιών (π.χ. πρωτεϊνών με καθίζηση) που μπορούν να δημιουργήσουν βλάβη κατά την χρωματογραφική ανάλυση τόσο στην στήλη που χρησιμοποιείται όσο και να παρεμποδίζουν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη.

Κατά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας του ποσοτικού προσδιορισμού των αντιβιοτικών, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος από ασθενείς που δεν έκαναν χρήση των αντιβιοτικών (blank sample) και εμβολιάστηκαν με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά (spike). Εν συνεχεία δοκιμάστηκαν διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας των δειγμάτων για την απομόνωση του αναλύτη, την απομάκρυνση των παρεμβαλλόντων συστατικών και την επίτευξη της συμβατότητας του δείγματος με το χρωματογραφικό σύστημα.

1η Μέθοδος

Προκατεργασία του δείγματος με καταβύθιση πρωτεινών

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση εσωτερικού προτύπου. [54] Το εσωτερικό πρότυπο (I.S.) είναι μια ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα δείγματα, τα τυφλά και τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης κατά την ανάλυση Χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η ερυθρομυκίνη.

- Παρασκευάστηκαν δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με αντιβιοτικό για τη βαθμονόμηση του οργάνου. Σε τελικό όγκο δείγματος - πλάσματος 500μL προστέθηκε η ποσότητα διαλύματος εργασίας του αντιβιοτικού (c=100μg/mL), καθώς και 25μL εσωτερικού πρότυπου διαλύματος εργασίας της ερυθρομυκίνης (100μg/mL IS). Τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος (spike plasma) είχαν συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στον πίνακα 6.
- Τα δείγματα αναδεύτηκαν με συσκευή ανάδευσης για 10s.
- Στα δείγματα έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών αρχικά με την προσθήκη 2mL ακετονιτριλίου και ανάδευση με συσκευή για 30s και στη συνέχεια με φυγοκέντριση στις 3,500rpm για 15 λεπτά.
- Τα 1500μL του υπερκείμενου υγρού μεταφέρθηκαν σε νέο γυάλινο σωλήνα και εξατμίστηκαν με ρεύμα αερίου αζώτου. Έγινε ανασύσταση του εξεταζόμενου δείγματος με τη χρήση 500μL μεθανόλης και με ανάδευση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

- Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα σύριγγας 0.2μm και όγκος δείγματος 500μL αναλύθηκε χρωματογραφικά.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων των αντιβιοτικών για βαθμονόμηση οργάνου

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	Συγκεντρώσεις διαλυμάτων για βαθμονόμηση οργάνου (μg/mL)
Βανκομυκίνη	1, 5, 10, 15, 20
Δαπτομυκίνη	3, 10, 25, 50, 100

Παρατηρήθηκε ότι στα χρωματογραφήματα δεν εμφανίστηκε κορυφή που να αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο. Οι μορφές των χρωματογραφημάτων (η μορφή των κορυφών έκλουσης – peaks) δεν ήταν οι αναμενόμενες (καμπύλες Gauss), με συνέπεια να ακολουθηθεί άλλη μέθοδος για την προετοιμασία των δειγμάτων και να αποκλειστεί η μέθοδος ως μέθοδος προετοιμασίας των δειγμάτων του πλάσματος για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών.

2η Μέθοδος

Προκατεργασία του δείγματος με καταβύθιση πρωτεινών με ακετονιτρίλιο και αραίωση 1:4

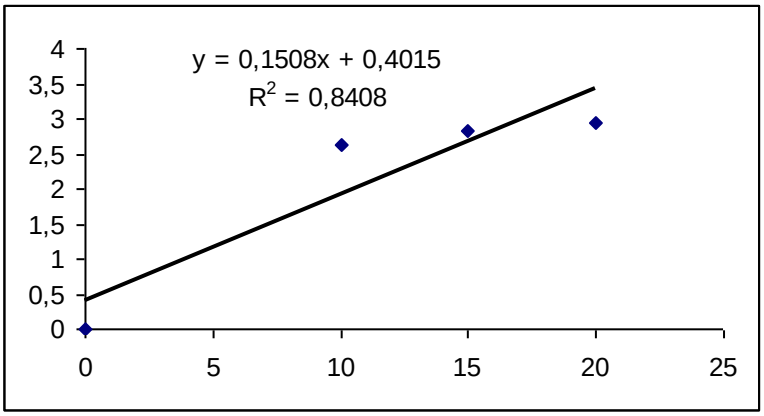
Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών του πλάσματος με καταβύθιση τους με τη χρήση του ακετονιτριλίου. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται αραίωση του δείγματος με συντελεστή αραίωσης 4 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Παρασκευάστηκαν δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με αντιβιοτικό για τη βαθμονόμηση του οργάνου. Προστέθηκε ποσότητα διαλύματος εργασίας των αντίστοιχων αντιβιοτικών σε πλάσμα μέχρι ο τελικός όγκοστου δείγματος να είναι 500μL, και παρασκευάστηκαν τα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με το αντιβιοτικό στις συγκεντρώσεις μετά την αραίωση που αναγράφονται στον πίνακα 6 αντίστοιχα, δηλαδή οι αρχικές συγκεντρώσεις ήταν πολλαπλασιασμένες με τον συντελεστή αραίωσης 4.
- Στα δείγματα έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών με προσθήκη 500μL ακετονιτριλίου και ανάδευση για 30s, εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκε στις 3,500rpm για 15 λεπτά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

- Τα 500μL του υπερκείμενου υγρού φιλτραρήστηκαν με φίλτρα σύριγγας 0.2μm και αναμείχτηκαν με 500μL από το ρυθμιστικό διάλυμα του KH_2PO_4 και εν συνεχεία έγινε έγχυση στο σύστημα HPLC για ανάλυση.

Από τη βαθμονόμηση του οργάνου προέκυψε η ευθεία που απεικονίζεται στο διάγραμμα 1. Δεν υπάρχει γραμμικότητα και υπάρχει απόκλιση της καμπύλης από την αρχή των αξόνων. Η βαθμονόμηση του οργάνου δεν γίνεται αποδεκτή.



Διάγραμμα 1: Βαθμονόμηση δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη στα 240nm

3η Μέθοδος

Προκατεργασία του δείγματος με καταβύθιση πρωτεινών με ακετονιτρίλιο και αραίωση 1:2

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών του πλάσματος με καθίζηση τους με τη χρήση του ακετονιτριλίου. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται αραίωση του δείγματος με συντελεστή αραίωσης 2.

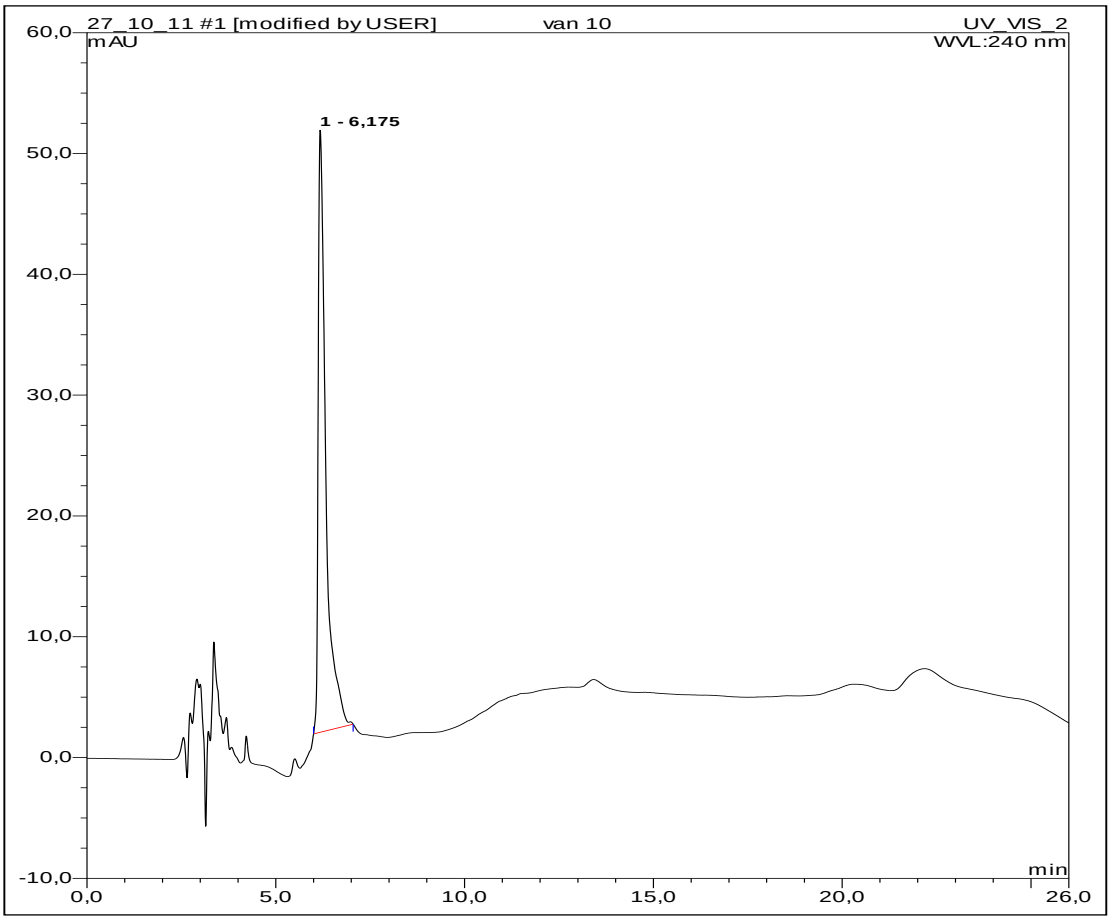
- Παρασκευάστηκαν δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με αντιβιοτικό για τη βαθμονόμηση του οργάνου. Σε 500μL δείγματος πλάσματος προστέθηκε ποσότητα διαλύματος εργασίας του κατάλληλου αντιβιοτικού (c=100μg/mL) και παρασκευάστηκαν τα δείγματα πλάσματος με συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στον πίνακα 6, οι αρχικές συγκεντρώσεις ήταν πολλαπλασιασμένες με τον συντελεστή αραίωσης 2.
- Στα δείγματα επιτεύχθηκε καταβύθιση πρωτεϊνών με προσθήκη 500μL ακετονιτριλίου και ανάδευση για 30s, εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν στις 3,500rpm για 15 λεπτά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

- 500μL του υπερκείμενου υγρού φιλτραρίστηκαν με φίλτρα σύριγγας 0.2μm και τοποθετήθηκαν σε νέο γυάλινο φιαλίδιο στον δειγματολήπτη προς ανάλυση στο σύστημα HPLC.

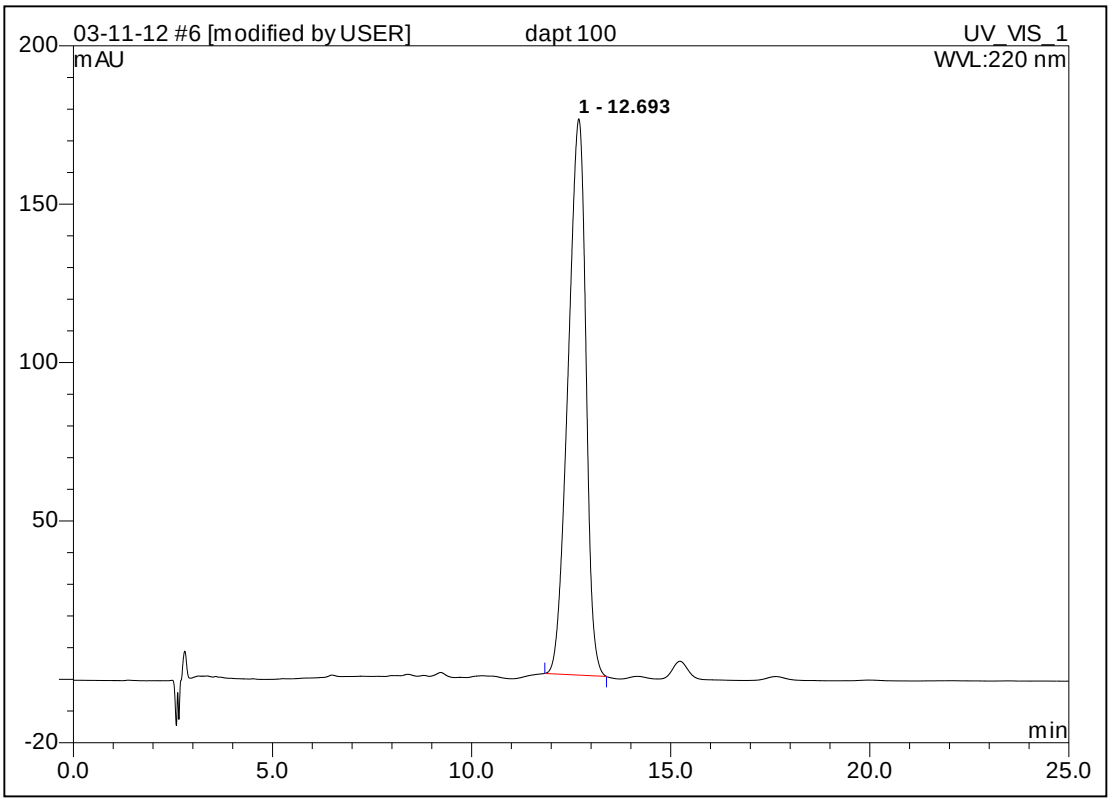
Η ανάκτηση για τη βανκομυκίνη σε μήκος κύματος των 220nm ήταν 91% ενώ σε μήκος κύματος 240nm προσδιορίστηκε σε 85,5% ενώ για τη δαπτομυκίνη ήταν στα 220nm 106% και στα 280nm 92%. Οι ποσότητες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο αυτή αντιστοιχούν στη συνολική ποσότητα του αντιβιοτικού που έχει χορηγηθεί στον ασθενή. Οι μορφές των χρωματογραφήματων ήταν όπως φαίνεται στα σχήματα 9 και 10 αντίστοιχα για τα δύο αντιβιοτκά. Στον πίνακα 7 αναφέρονται οι ανακτήσεις της βανκομυκίνης και της δαπτομυκίνης για την προαναφερθήσα μέθοδο καθίζησης των πρωτεϊνών σε δείγμα πλάσματος εμβολιασμένα με το κατάλληλο αντιβιοτικό

.



Σχήμα 9: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένο με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 10μg/mL σε μήκος κύματος 240nm (t_R=6.176min)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 10: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένο με δαπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=12.693min)

Πίνακας 7: Σύγκριση προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένων με αντιβιοτικό για τον προσδιορισμό της ανάκτησης του αντιβιοτικού

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος ή δείγματος πλάσματος εμβολισμένου με το αντιβιοτικό (μg/mL)	mAU*min σε πρότυπα διαλύματα	mAU*min σε δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με το αντιβιοτικό	Recovery %
Βανκομυκίνη	20	25.6614	23.2690	**90.67%**
Δαπτομυκίνη	100	91.9234	48.3491	**106%**

4η Μέθοδος

Προκατεργασία του δείγματος με καταβύθιση πρωτεινών με τριχλωροοξικό οξύ (TCA)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών του πλάσματος με καθίζηση τους με τη χρήση του τριχλωροοξικού οξέως.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

- Για την παρασκευή των δειγμάτων πλάσματος για τη βαθμονόμηση του μηχανήματος προστέθηκε σε 500μL δείγματος ποσότητα διαλύματος εργασίας των αντιβιοτικών (c=100μg/mL), και παρασκευάστηκαν τα δείγματα πλάσματος σε συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα 6.
- Στα δείγματα έγινε καταβύθιση πρωτεϊνών με προσθήκη 300μL τριχλωροοξικού οξέως 30%w/v και ανάδευση για 30s στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3,500rpm για 15 λεπτά.
- 500μL από το υπερκείμενο υγρό φιλτραρίστηκαν με φίλτρα σύριγγας 0.2μm, όμως δεν προέκυψαν διαυγή δείγματα και δεν αναλύθηκαν χρωματογραφικά γιατί μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβη στην στήλη του χρωματογραφικού συστήματος.

Ο λόγος της ελλιπούς απομάκρυνσης - καθίζησης των πρωτεϊνών από τα δείγματα του πλάσματος κατέστησαν την μέθοδο αυτή ως μη αποτελεσματική, άρα και δεν χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα για περαιτέρω ανάλυση και για το λόγο αυτό η μέθοδος αυτή και δεν χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης.

5η Μέθοδος

Προκατεργασία του δείγματος με απομάκρυνση των πρωτεινών με υπερδιήθηση (ULTRAFILTRATION)

Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στην υπερδιήθηση.[19] Η υπερδιήθηση γίνεται με ειδικά φίλτρα τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα 6. 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.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Εικόνα 6: Φίλτρα για ultrafiltration

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^o 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.

ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΙΛΤΡΑ ULTRAFILTRATION

Σε κάθε φιλτράκι ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Προστίθεται 1mL διαλύματος NaOH 0.1N
- Φυγοκεντρήθηκε στα 2000g στους 20ºC για 30min
- Έγινε απόχυση του κλάσματος της φυγοκέντρισης
- Έκπλυση με 1mL νερού και επανάληψη της φυγοκέντρισης στα 2000g στους 20ºC για 30min
- Έγινε απόχυση του κλάσματος της έκπλυσης της φυγοκέντρισης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

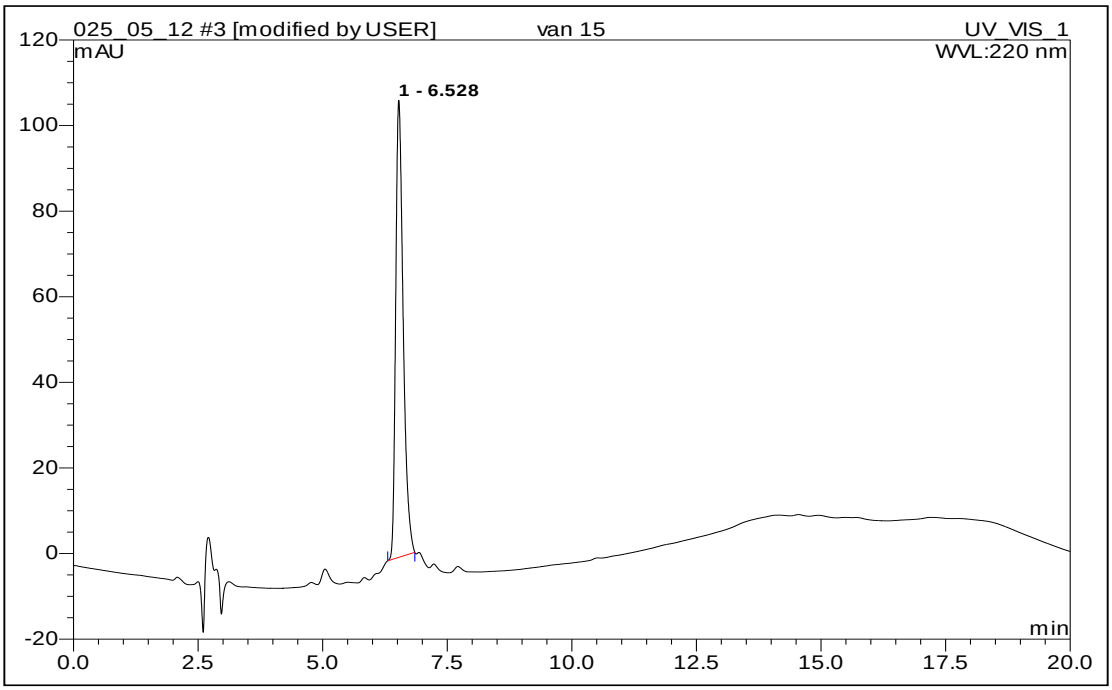
Εν συνεχεία γίνεται η τοποθέτηση του εξεταζόμενου δείγματος πλάσματος στο φιλτράκι, φυγοκεντρείται στα 2000g στους 20ºC για 30min. Τέλος τοποθετούνται τα 120μL που προκύπτουν από την υπερδιήθησή του, σε φιαλίδια στον δειγματολήπτη του μηχανήματος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ακολουθείται χρωματογραφική ανάλυση.

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η ποσότητα του ελεύθερου (free) αντιβιοτικού που υπάρχει στο αίμα των ασθενών. Η σχέση του ελεύθερου αντιβιοτικού με το συνολικό (total) είναι διαφορετική σε κάθε αντιβιοτικό.[19] Από μελέτες προκύπτει ότι η σχέση αυτή είναι περίπου 41% για τη βανκομυκίνη κατά μέσο όρο και έχει μεγάλη διακύμανση από ασθενή σε ασθενή. Από τον πίνακα 8 φαίνεται η ανάκτηση για την ελεύθερη βανκομυκίνη σε δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη. Τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα απεικονίζονται στα σχήματα 11 και 12.

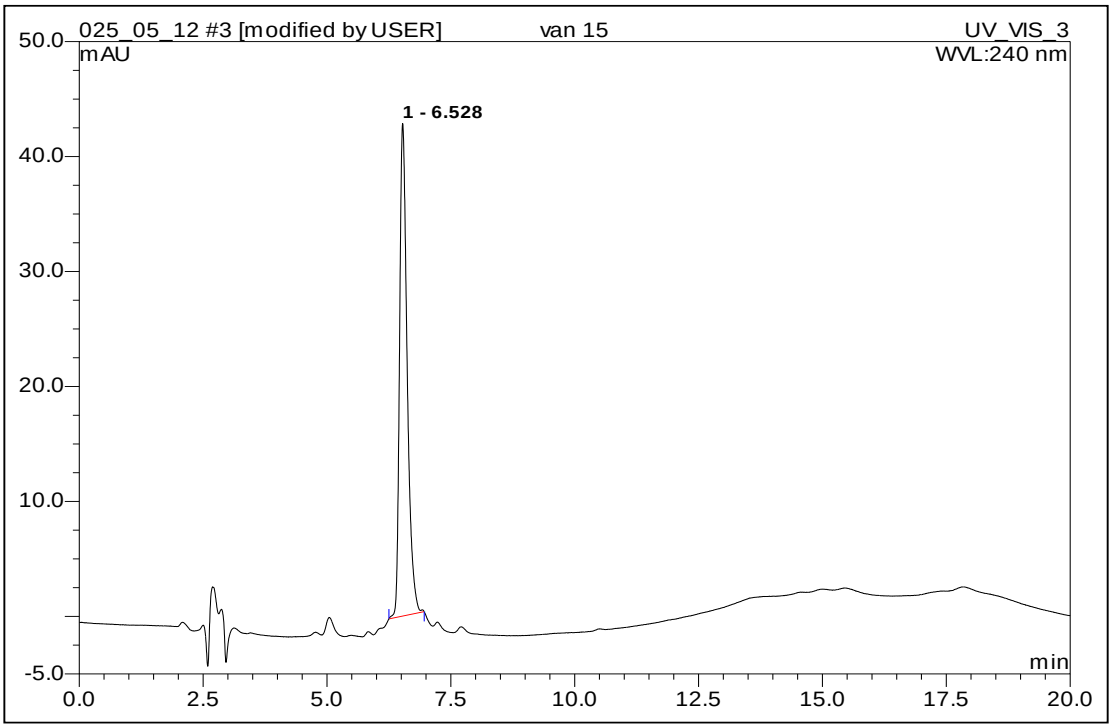
Πίνακας 8: Σύγκριση προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη στα 220nm και 240nm

Συγκέντρωση σε βανκομυκίνη (μg/mL)	Μήκος Κύματος (nm)	mAU*min σε πρότυπα διαλύματα	mAU*min σε δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με το αντιβιοτικό	Recovery %
15	220	17,099	11,5703	**67,6**
15	240	6,6015	2,067	**31,3**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 11: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 15μg/mL σε μήκος κύματος 220nm (t_R=6.528min)



Σχήμα 12: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 15μg/mL σε μήκος κύματος 240nm (t_R=6.528min)

Η μέθοδος αυτή δεν είναι αποτελεσματική για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης, γιατί η μορφή των χρωματογραφημάτων δεν είναι η αποδεκτή (καμπύλες Gauss). Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ελεύθερης βανκομυκίνης και όχι για τη δαπτομυκίνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Η προκατεργασία των δειγμάτων πλάσματος εμβολιασμένα με αντιβιοτικό επιτυγχάνεται με τη χρήση του ακετονιτριλίου και αραίωση 1:2 για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας βανκομυκίνης και δαπτομυκίνης, ενώ όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος της υπερδιήθησης-ultrafitration προσδιορίζεται η ελεύθερη βανκομυκίνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – HPLC

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών και φαρμακευτικών ενώσεων. Με την υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μία χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην HPLC διακρίνονται δύο φάσεις: α) η στατική φάση, η οποία αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη και β) η κινητή φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων, καθώς και για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή τους. Έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων καθώς και των μεταβολιτών τους.

Στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιούνται οι αρχές της κλασσικής χρωματογραφίας στήλης σε αναλυτικά όργανα με αντλίες υψηλής πίεσης, μεταλλικές στήλες μικρής διαμέτρου, με υλικό πλήρωσης μικρού μεγέθους και με ανιχνευτή που καταγράφει συνεχώς τη συγκέντρωση του δείγματος.

Τα κύρια μέρη ενός συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC, εικόνα 7) είναι οι φιάλες των διαλυτών, το σύστημα αντλιών μαζί με σύστημα βαθμωτής έκλουσης, ο εγχυτής, η αναλυτική στήλη με μονάδα θερμοστάτησης, ο ανιχνευτής, η μονάδα καταγραφής και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.

► Διαλύτες

► Αντλία

► Αυτόματος Δειγματολήπτης

► Φούρνος με χρωμ/κή στήλη

►Ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Εικόνα 7: Συσκευή HPLC – ULTIMATE 3000 με ανιχνευτή PDA που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση της μεθοδολογίας

3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

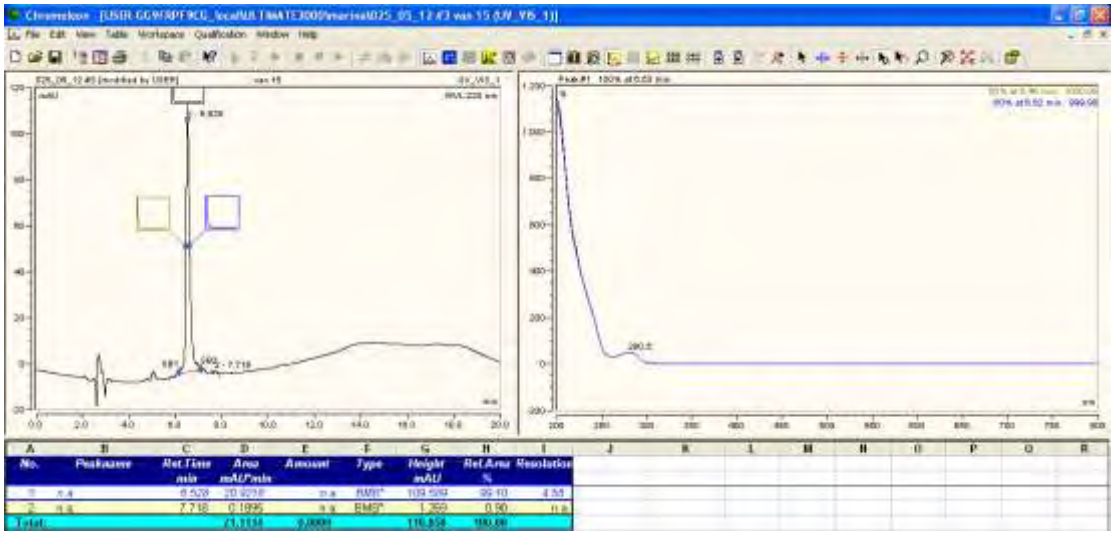
Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των αντιβιοτικών που αναλύονται και προσδιορίζονται στην εργασία αυτή, έπρεπε να επιλεγεί το μήκος κύματος ή τα μήκη κύματος στα οποία θα απορροφούσαν οι αναλυόμενες ουσίες και όχι οι διαλύτες και οι τυχόν προσμίξεις που θα υπήρχαν στο δείγμα. Για το σκοπό αυτό έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των μηκών κύματος απορρόφησης των αντιβιοτικών, της βανκομυκίνης και της δαπτομυκίνης αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Hitachi (U-1800).

Για τη βανκομυκίνη παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 100μg/mL από το διάλυμα παρακαταθήκης της βανκομυκίνης συγκέντρωσης 1mg/mL με αραίωση και το διάλυμα αυτό φωτομετρήθηκε με το Hitachi (U-1800) από την περιοχή των 190nm μέχρι τα 400nm με ταχύτητα 200nm/min και προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 9 καθώς και στην εικόνα 8 απεικονίζεται το φάσμα του προτύπου διαλύματος της βανκομυκίνης. Από τα δεδομένα του πίνακα 9 προκύπτει ότι τα μήκη κύματος τα οποία αντιστοιχούν για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης είναι αυτά που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες απορροφήσεις. Έτσι επιλέχθηκαν τα 204, 220 και 280nm ως μήκη κύματος για την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων.

Πίνακας 9: Απορροφήσεις της βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε επιλεγμένα μήκη κύματος

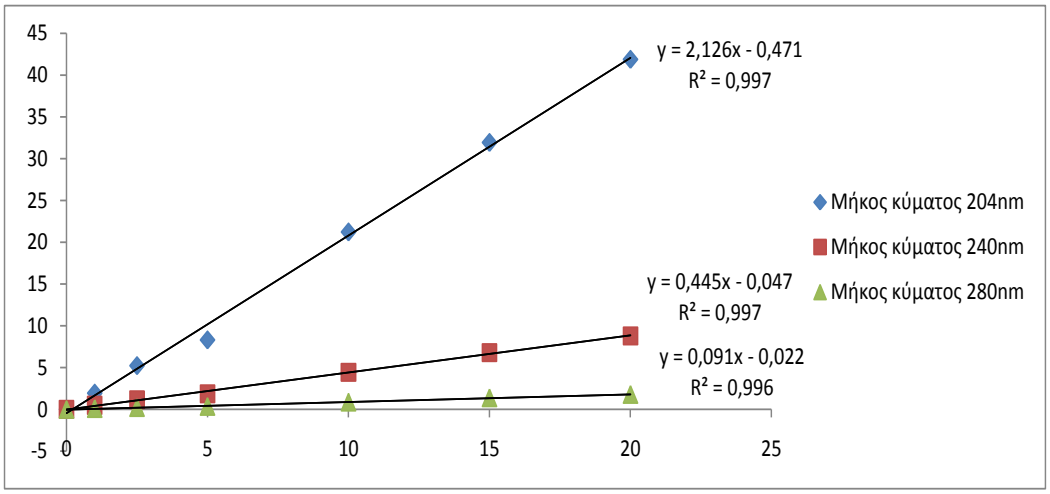
Μήκος Κύματος Απορρόφησης (nm)	Απορρόφηση (Abs)
204	2,377
220	2,797
237	2,482
280	0,536
394	0,004

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Εικόνα 8: Φάσμα απορρόφησης βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL (λmax =220nm)

Από την απεικόνιση των βαθμονομήσεων του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 στα προαναφερθέντα μήκη κύματος επιβεβαιώνονται ότι έπρεπε να πραγματοποιηθούν αλλαγές στα μήκη κύματος έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα στη μέθοδο. Το μήκος κύματος των 204nm απορρίφθηκε γιατί, σε αυτό απορροφά ο διαλύτης και το μήκος κύματος των 280nm επίσης αντικαταστάθηκε με το μήκος κύματος των 240nm γιατί η ευαισθησία της μεθόδου είναι πολύ μικρή στα 280nm, οπότε τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 220nm και τα 240nm.



Διάγραμμα 2: Απεικόνιση βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε 3 διαφορετικά μήκη κύματος (λ=204nm, 220nm και 280nm)

Η ίδια με την προαναφερθείσα διαδικασία ακολουθήθηκε και για το δεύτερο αντιβιοτικό, υδατικό διάλυμα της Δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL φωτομετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο Hitachi (U-1800) από την περιοχή των 190nm μέχρι τα 400nm με

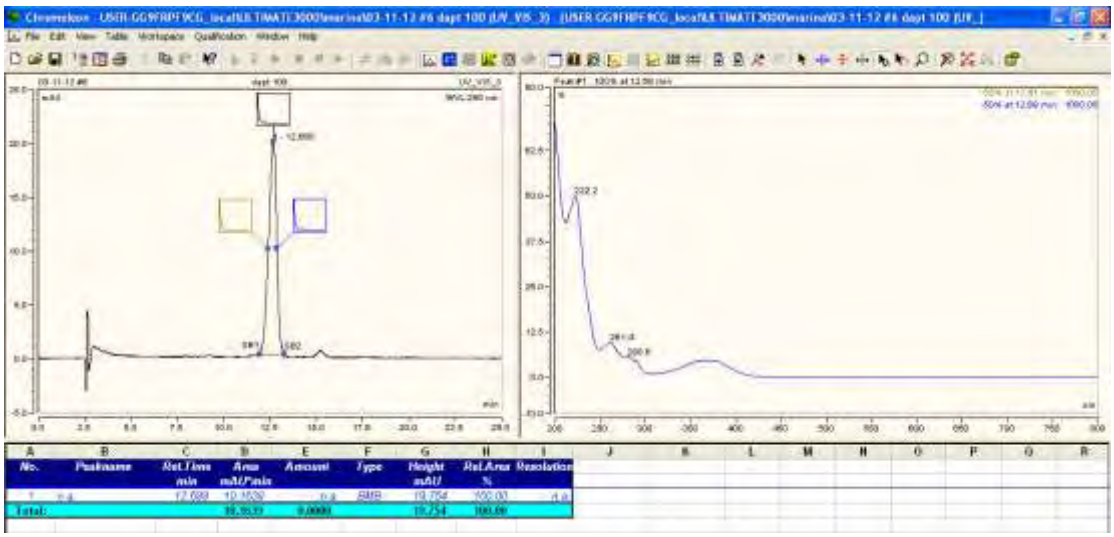
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ταχύτητα 200nm/min και προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 10 καθώς και στην εικόνα 9 απεικονίζεται το φάσμα του προτύπου διαλύματος της δαπτομυκίνης.

Πίνακας 10: Απορροφήσεις της δαπτομυκίνη συγκέντρωσης 100μg/mL σε επιλεγμένα μήκη κύματος

Μήκος Κύματος Απορρόφησης (nm)	Απορρόφηση (Abs)
220	0,247
280	0,047
367	0,027

Από τα δεδομένα του πίνακα 10 προκύπτει ότι τα μήκη κύματος κύματος τα οποία αντιστοιχούν για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης είναι αυτά που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες απορροφήσεις. Έτσι επιλέχθηκαν ως μήκη κύματος που θα χρησιμοποιηθούν κατά την χρωματογραφική ανάλυση τα 220 και 280nm.



Εικόνα 9: Φάσμα απορρόφησης δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL (λmax =280nm)

3.3. ΣΤΗΛΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΗΛΗ

Οι στήλες (εικόνα 10) κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, έχουν συνήθως μήκος 5-25cm, εσωτερική διάμετρο 1-4.6mm και είναι πληρωμένες με μικρά σωματίδια στατικής φάσης παρόμοιου μεγέθους (3-10μm). Η πορώδης ουσία χρησιμοποιείται σαν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

μια στερεή ακίνητη φάση ή καλύπτεται με ένα πολύ λεπτό στρώμα υγρής ακίνητης φάσης με πολύ μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας. Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται στήλες με στατική φάση που περιέχει χημικά προσδεδεμένη πλευρική αλυσίδα C8 ή C18 ή C4, C12, NO_2, C_6H_5.[40] Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η στήλη Hypersil Gold της εταιρείας Thermo Scientific που είναι C18 με μήκος 150mm και εσωτερική διάμετρο 4,6mm, ενώ το μέγεθος των σωματιδίων της στατικής φάσης είναι 5μm. [55], [56]

Οι προστήλες (guard columns) χρησιμοποιούνται για να προστατεύσουν τις στήλες που έχουν σημαντικό οικονομικό κόστος και να παρατείνουν το χρόνο χρήσης τους. Οι στήλες αυτές, που είναι αρκετά μικρότερες από τις κύριες στήλες, τοποθετούνται μετά τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος και πριν από την κύρια στήλη. Έτσι, προφυλάσσεται η κύρια στήλη από ανεπιθύμητες παρεμποδίσεις και προσμίξεις, με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερη επαναληψιμότητα. Ο όγκος της προστήλης σε σχέση με αυτόν της κύριας στήλης είναι 1/15 έως 1/125. Το υλικό πλήρωσής τους στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ίδιο με το υλικό πλήρωσης της κύριας στήλης, με μόνη ίσως διαφορά το μέγεθος των κόκκων, μπορεί όμως να είναι και διαφορετικό. Οι προστήλες έχουν ορισμένη χωρητικότητα, δηλαδή σημείο κορεσμού, που γίνεται αντιληπτό από την αντίστροφη πίεση που δημιουργείται και από την κακή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων. Η προστήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Acclaim 120 C18-4.3x10mm της εταιρείας Dionex. [55], [56]

Εικόνα 10. Φωτογραφία των αναλυτικών στηλών HPLC

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

3.4. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ

Στην HPLC χρησιμοποιούνται κυρίως ανιχνευτές συνεχούς παρακολούθησης του υγρού που βγαίνει από τη στήλη, μέσω μιας κυψέλης συνεχούς ροής. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στη μέτρηση μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων ενώσεων ή της κινητής φάσης. Χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων Ultimate 3000 Photodiode Array Detector, διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψέλη του ανιχνευτή, η προκύπτουσα ακτινοβολία διαθλάται και στη συνέχεια προσπίπτει σε σειρά φωτοδιόδων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μια διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των διόδων «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από ένα μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας, συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία – βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα, ενώ η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (π.χ. 220nm, 240nm και 280nm). [25,57]

3.5. ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ

Είναι μίγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών (συνήθως μέχρι τέσσερις) με ή χωρίς προσθήκη πρόσθετων ουσιών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα). Οι παράμετροι για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι η πολικότητά τους και η εκλεκτικότητα. Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης, οπότε και να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύεται. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς της, ενώ στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης συμβαίνει το αντίθετο. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την ικανότητά τουνα δρα ως πρωτονιοδέκτης, πρωτονιοδότης ή με ισχυρές διπολικές ροπές σε σχέση με τις διάφορες ουσίες. Οι συνήθεις διαλύτες, που χρησιμοποιούνται στην HPLC, είναι το νερό, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, η ισοπροπανόλη, το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το ισοοκτάνιο και το χλωροφόρμιο.[58]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση με δύο διαλύτες και συγκεκριμένα:

Διαλύτης Α: Ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 5mM με pH=3 Ζυγίστηκαν 0,8425g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) και διαλύθηκαν σε 1 λίτρο νερού. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αρχικά ήταν 4,14 και ρυθμίστηκε με την προσθήκη πυκνού υδροχλωρικού οξέος 35% στην τιμή pH=3.

Διαλύτης Β: Μεθανόλη

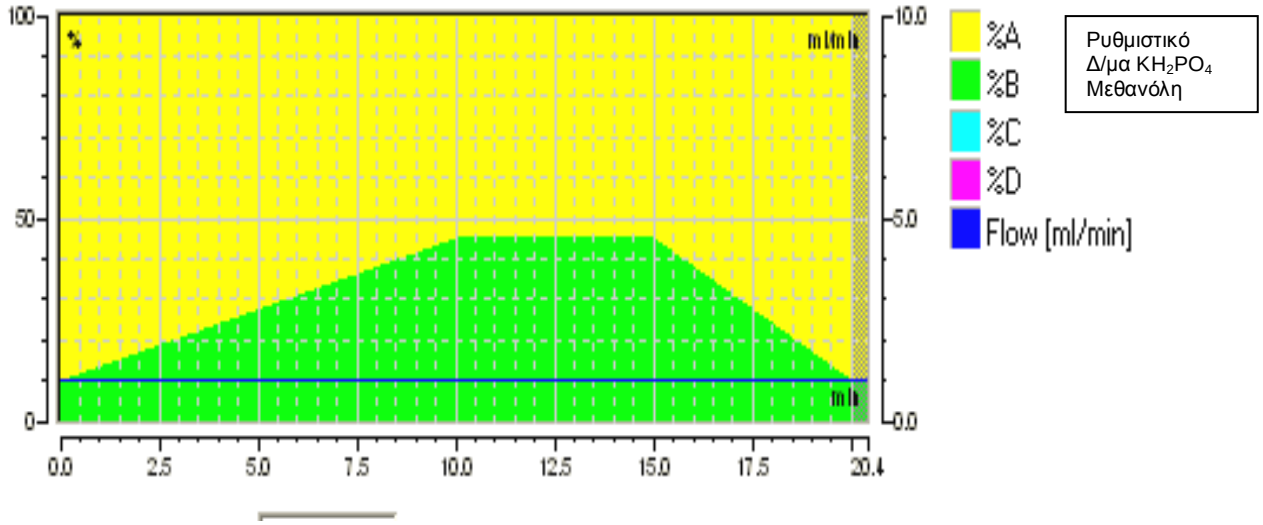
Οι διαλύτες πριν την χρήση τους διηθήθηκαν με κατάλληλη συσκευή διήθησης διαλυτών με αντλία κενού χρησιμοποιώντας ηθμούς διαμέτρου 0,45um για την απομάκρυνση ξένων ουσιών καθώς και είχαν τοποθετηθεί σε λουτρό υπερήχων για την απομάκρυνση φυσαλίδων που τυχόν περιείχαν.

3.6. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

Από το πρόγραμμα του μηχανήματος Chromeleon 6.80 επιλέχθηκαν οι παράμετροι που έπρεπε να ελεγχθούν κατά την διάρκεια της εκτέλεσης του προγράμματος χρωματογραφικής ανάλυσης. Οι παράμετροι αυτοί είναι η ταχύτητα ροής, ο τύπος της έκλουσης, η θερμοκρασία, τα μήκη κύματος και η διάρκεια του προγράμματος. Κατασκευάστηκαν δύο προγράμματα, ένα για τον προσδιορισμό του κάθε αντιβιοτικού.

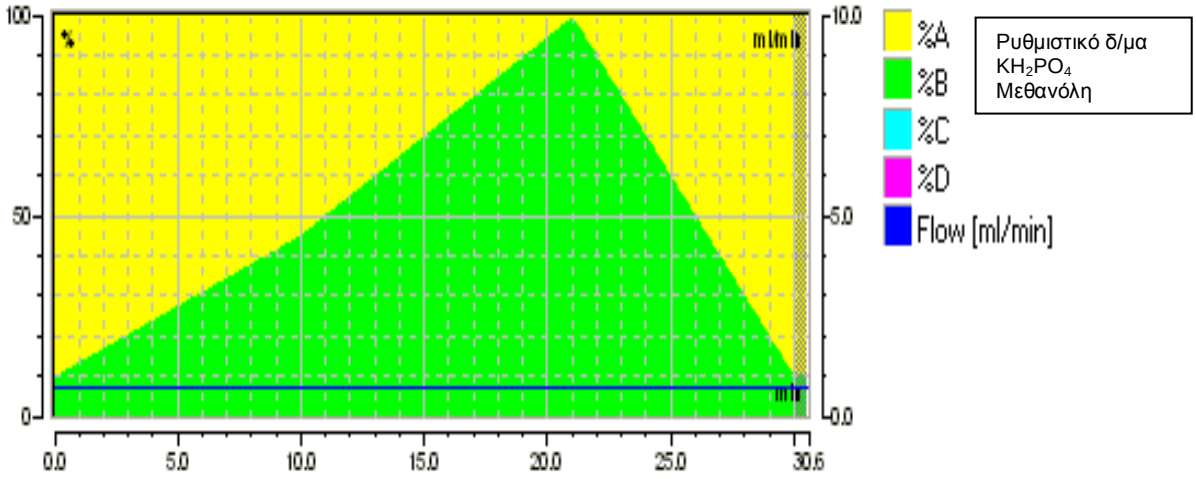
Για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα στο οποίο η ταχύτητα ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,0mL/min, η έκλουση ήταν βαθμιδωτή, τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν τα 220m και 240nm και υπήρχε θερμοστάτιση στους 40^{o}C, έτσι ώστε η θερμοκρασία του μηχανήματος να είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η διάρκεια της ανάλυσης του εκάστοτε δείγματος ήταν 20 λεπτά. Η σύσταση του εκλουστικού μέσου για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης μεταβάλλεται όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 3.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Διάγραμμα 3: Προφίλ σύστασης διαλύματος έκλουσης κατά την βαθμιδωτή ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης.

Για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα στο οποίο η ταχύτητα ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,0mL/min, η έκλουση ήταν βαθμιδωτή, τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν τα 220m και 280nm και υπήρχε θερμοστάτιση στους 40^{o}C, έτσι ώστε η θερμοκρασία του μηχανήματος να είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η διάρκεια ανάλυσης του εκάστοτε δείγματος είναι 30 λεπτά. Η σύσταση του εκλουστικού μέσου για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης απεικονίζεται στο διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4: Προφίλ σύστασης διαλύματος έκλουσης κατά την βαθμιδωτή ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

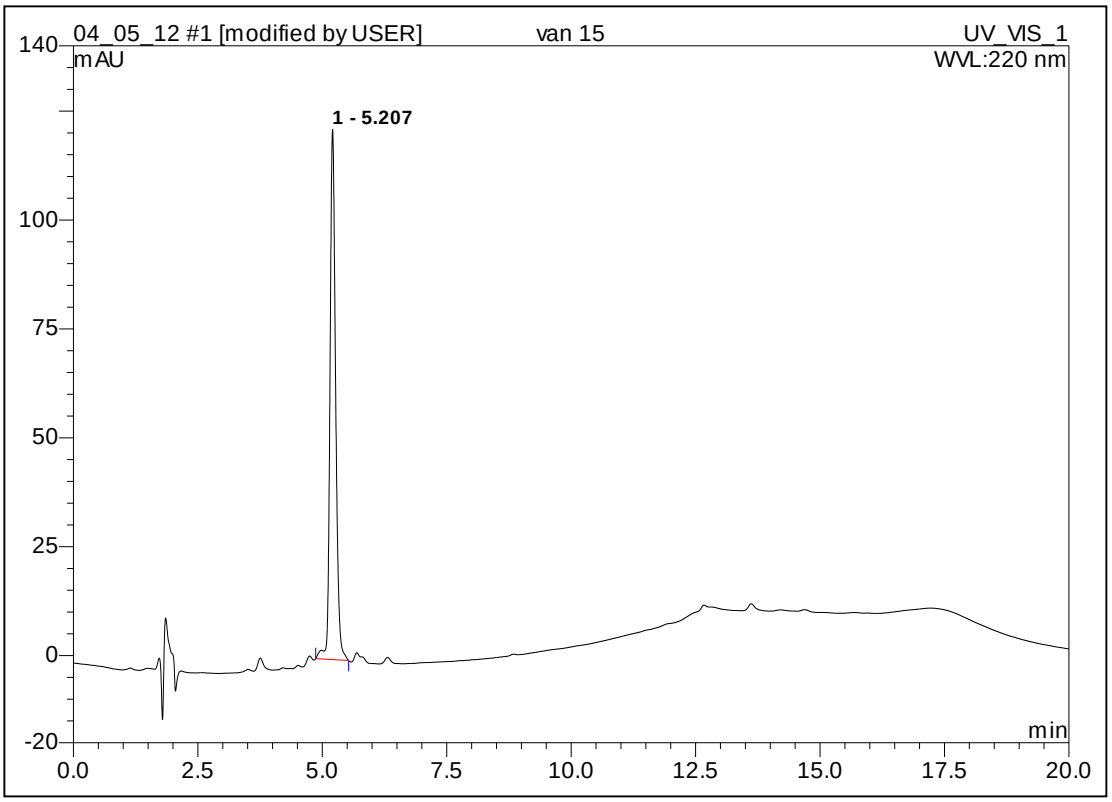
3.7. ΑΠΟΔΟΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Ως χρωματογράφημα ορίζεται η γραφική απεικόνιση του συνεχόμενου σήματος που καταγράφεται από τον ανιχνευτή για τη σύσταση της κινητής φάσης, συμπεριλαμβανομένων και των προσδιοριζόμενων ενώσεων, οι οποίες βγαίνουν κάθε στιγμή από την έξοδο της αναλυτικής στήλης σε σχέση με το χρόνο. Το κάθε συστατικό του δείγματος που εκλούεται, έχει στο χρωματογράφημα την κατανομή κατά Gauss. Όσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται μια ένωση για να κινηθεί και να εξέλθει από τη στήλη, τόσο πιο διευρυσμένη εμφανίζεται η κορυφή της. Ο χρόνος συγκράτησης (retention time) είναι ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να διέλθει από τη στήλη και να φτάσει στον ανιχνευτή, με σταθερή ροή κινητής φάσης. Ο παράγοντας συγκράτησης k (retention factor) αποτελεί πιο πρακτικό μέγεθος για την περιγραφή των χαρακτηριστικών χρόνων συγκράτησης των συστατικών του δείγματος.

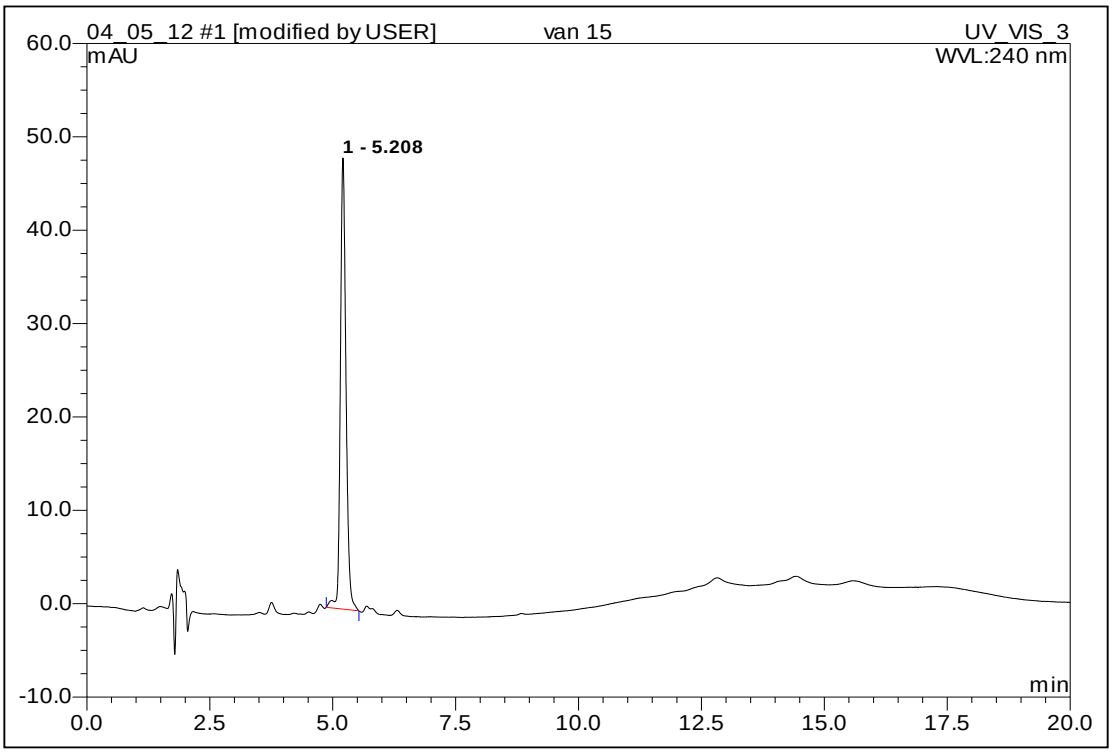
Η απόδοση μιας αναλυτικής στήλης καθορίζεται από την ικανότητά της να δίνει οξείες και συμμετρικές κορυφές, ανεξαρτήτως του χρόνου συγκράτησης. Μέτρο απόδοσης και χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N. Η θεωρητική πλάκα είναι μια τεχνητή, χωρίς υπόσταση έννοια μέσα στη στήλη, που αντιπροσωπεύει την περιοχή μέσα στη στήλη, όπου επιτυγχάνεται ισορροπία του συστατικού μεταξύ των δύο φάσεων και αναφέρεται σε καθορισμένες συνθήκες του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η ικανότητα της αναλυτικής στήλης να διαχωρίσει δύο συστατικά Α και Β, προσδιορίζεται από τη σχετική τους κατανομή μέσα στη στήλη. Ο παράγοντας διαχωρισμού α (separation factor) είναι ο λόγος των παραγόντων συγκράτησης των συστατικών αυτών. Η διακριτική ικανότητα (resolution) δύο κορυφών, θεωρείται ικανοποιητική όταν ξεπερνάει το 1.5. Όταν είναι μικρότερη από 1, τότε οι κορυφές επικαλύπτονται. Οι κορυφές στα χρωματογραφήματα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο συμμετρικές και να προσεγγίζουν τη μορφή της κανονικής κατανομής Gauss. Η συμμετρία μιας κορυφής περιγράφεται από τον παράγοντα ουράς (tailing factor) και τον παράγοντα ασυμμετρίας.

Στα σχήματα 13 και 14 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος της βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL με ανίχνευση στα 220nm και 240nm αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



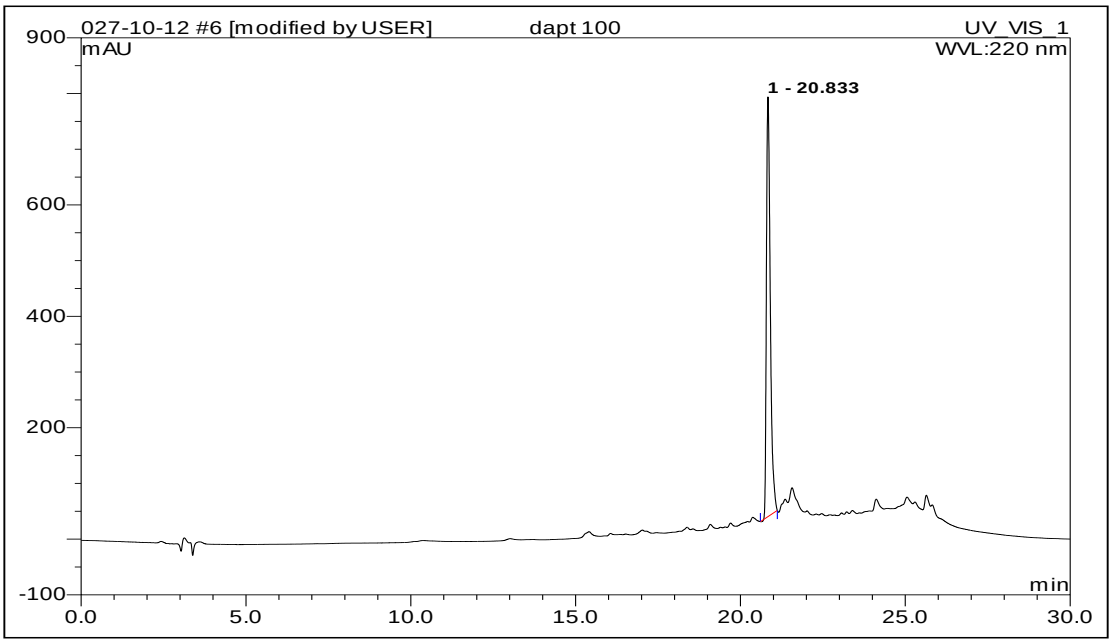
Σχήμα 13: Χρωματογράφημα δείγματος πρότυπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL με ανίχνευση στα 220nm (t_R=5.207min)



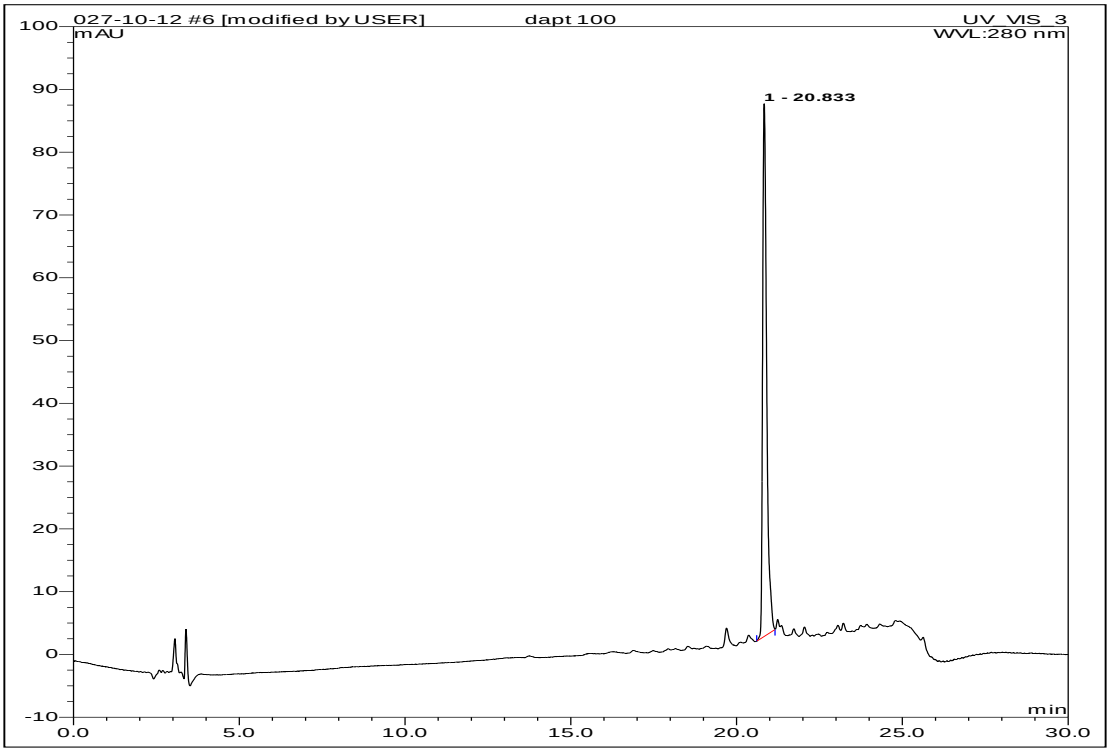
Σχήμα 14: Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 15μg/mL με ανίχνευση στα 240nm (t_R=5.208min)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Στα σχήματα 15 και 16 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με ανίχνευση στα 220nm και 280nm αντίστοιχα.



Σχήμα 15: Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με ανίχνευση στα 220nm (t_R=20.833min)



Σχήμα 16: Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με ανίχνευση στα 280nm (t_R=20.833min)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1.ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επικύρωση είναι η «επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων (τεκμηρίων), ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση».

Η επικύρωση μιας μεθόδου είναι μια από τις βασικές απαιτήσεις για την απόδειξη ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό που απαιτείται και τα αποτελέσματα που περιέχει είναι εντός των απαιτήσεων αξιοπιστίας και ιχνηλασιμότητας. Πρέπει να είναι τόσο εκτεταμένη, όσο είναι απαραίτητο για να ικανοποιήσει τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής. Δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού των συμφυών συνεισφορών αβεβαιότητας από τη διαδικασία μέτρησης, οπότε στη συνέχεια γίνεται δυνατή η εκτίμηση της συνολικής αβεβαιότητας κατά την ανάλυση τυχόντος δείγματος. [59]

4.2. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Γενικά η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνει μελέτες για την εξειδίκευση της μεθόδου, τη γραμμική απόκριση του ανιχνευτή και την περιοχή των συγκεντρώσεων που εμφανίζουν αυτή τη γραμμική απόκριση, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα, το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης και την ανθεκτικότητα.

4.3. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ - ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ (Calibration Curve)

Γραμμικότητα είναι η ικανότητα της μεθόδου, σε δεδομένη κλίμακα συγκεντρώσεων, να παρέχει αποδεκτή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων και της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δείγματα. Η γραμμικότητα των προτεινόμενων μεθόδων, σε κατάλληλη περιοχή τιμών, πρέπει να προσδιορίζεται και να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

αναφέρεται. Για τον προσδιορισμό της καθαρής δραστικής ουσίας, η περιοχή βαθμονόμησης πρέπει να εκτείνεται (τουλάχιστον κατά 20 %) πέραν της υψηλότερης και χαμηλότερης ονομαστικής συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας σε σχετικά διαλύματα για ανάλυση. Η γραμμικότητα πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου. Μπορεί να αποδειχθεί με απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία με αραιώσεις από το αρχικό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (standard stock solution), ή με διαδοχικές αυξανόμενες ενισχύσεις (spiking) λευκού δείγματος (πλάσματος) και εφαρμογής της αναλυτικής μεθόδου.

Για τις ποσοτικές μετρήσεις στη χρωματογραφία κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς. Κάνοντας γραφική παράσταση του λαμβανόμενου σήματος από τον ανιχνευτή συναρτήσει της γνωστής συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας παίρνουμε την καμπύλη βαθμονόμησης. Η γραμμικότητα αποδεικνύεται από τα εμβαδά των κορυφών των χρωματογραφημάτων (σε μονάδες mAU*min) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η γραμμική σχέση που υπάρχει μεταξύ των μετρούμενων παραμέτρων και των συγκεντρώσεων, τα πειραμαμτικά δεδομένα πρέπει να υποστούν μαθηματική επεξεργασία πριν την ανάλυση συμμεταβολής.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της βανκομυκίνης παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης (vanc) με συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον πίνακα 6 και σε τελικό όγκο διαλύματος 1ml. Για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται ατον πίνακα 6 με τελικό όγκο 1mL. Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων. Για κάθε μία από τις ανωτέρω συγκεντρώσεις πραγματοποιηθήκαν τρεις επαναλήψεις την ίδια μέρα. Το πρότυπο διάλυμα του εκάστοτε αντιβιοτικού με τη χαμηλότερη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό της ανιχνευσιμότητας του αντιβιοτικού. Οι αναφορές που υποβάλλονται πρέπει να περιλαμβάνουν την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου, το συντελεστή συσχέτισης, καθώς και αντιπροσωπευτικά αποδεικτικά της ανάλυσης, π.χ. χρωματογραφήματα.

Χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων που αντιστοιχούν σε καθορισμένες συγκεντρώσεις αλλά και τις συγκεντρώσεις αυτές, είναι δυνατή η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου για τα δύο αντιβιοτικά. Η καμπύλη αυτή περιγράφει τις τιμές των εμβαδών των κορυφών έναντι των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων των αντιβιοτικών που επαναλήφθηκαν τρεις φορές κατά την ίδια μέρα. Η ευθεία αποτελείται από πέντε (5) σημεία και προκύπτει από την ανάλυση των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

τεσσάρων προτύπων διαλυμάτων εφαρμόζοντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η μορφή της θα είναι :

$$\mathbf{(\ Area) = a\ C_{αντιβ} + b}$$

όπου

$C_{αντιβ}$:η περιεκτικότητα του αντιβιοτικού στο πρότυπο διάλυμα ή δείγμα πλάσματος,

a :η κλίση της ευθείας

b :η τεταγμένη επί την αρχή της καμπύλης βαθμονόμησης και

Area :το εμβαδόν της κορυφής του αντιβιοτικού όπως λαμβάνεται από το χρωματογράφημα.

Κάθε φορά που εκτελείται μια βαθμονόμηση πρέπει να αναλύονται και δείγματα ελέγχου (QC) τα οποία είναι σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης. Το χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης αντιστοιχεί στο τριπλάσιο από το όριο ανίχνευσης ή στο τριπλάσιο από την χαμηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύεται, η μεσαία συγκέντρωση αντιστοιχεί στη μέση του εύρους τιμών των αναλυόμενων συγκεντρώσεων και η μεγαλύτερη τιμή αντιστοιχεί στο 80% της μεγαλύτερης αναλυόμενης συγκέντρωσης κατά τη βαθμονόμηση του οργάνου. Για τη βανκομυκίνη τα δείγματα ελέγχου που αναλύθηκαν ήταν 3, 10 και 15μg/mL, ενώ για την δαπτομυκίνη ήταν τα 9, 50 και 80μg/mL. Στους πίνακες 15 και 16 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων ελέγχου κατά τη βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα αντίστοιχα μήκη κύματος, η ανάκτηση κυμαίνεται από 90 έως 110%. Στους πίνακες 21 και 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων ελέγχου κατά τη βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα αντίστοιχα μήκη κύματος όπου η ανάκτηση κυμαίνεται από 90 έως 110%.

Στους πίνακες 11 και 13 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την βαθμονόμηση του οργάνου που αντιστοιχεί στα πρότυπα διαλύματα της βανκομυκίνης στα 220nm και 240nm όταν η κάθε βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές την ίδια μέρα. Διαπιστώνεται ότι οι μετρήσεις παρουσιάζουν πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η σχετική τυπική απόκλιση έχει πολύ μικρές τιμές σε όλα σχεδόν το εύρος των συγκεντρώσεων. Όπως φαίνεται και από την καμπύλη βαθμονόμησης το τετράγωνο του συντελεστή συσχετισμού στην ευθεία των ελαχίστων τετράγωνων, πλησιάζει πάρα πολύ την τιμή της μονάδας, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει πάρα πολύ καλός συσχετισμός μεταξύ των εμβαδών των κορυφών και της περιεκτικότητας των πρότυπων διαλυμάτων της βανκομυκίνης.

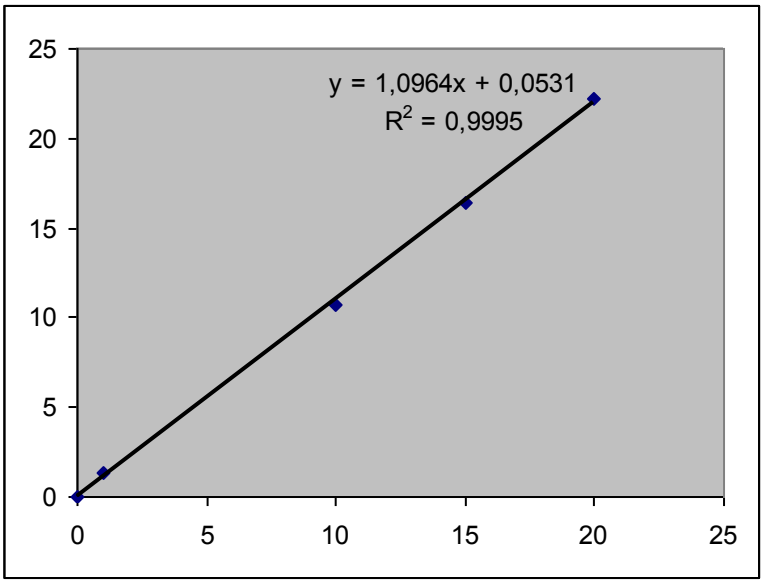
Μετά την χρωματογραφική ανάλυση των προτύπων και την εξαγωγή της καμπύλης βαθμονόμησης, υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel, ο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

συντελεστής συσχέτισης. Στους πίνακες 12 και 14 παραθέτονται τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων βαθμονομήσεων του οργάνου σε πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm και 240nm αντίστοιχα. Σε αυτούς έχουν πραγματοποιηθεί υπολογισμοί και παρουσιάζονται η κλίση της ευθείας και η τεταγμένη επί την αρχή. Στην συνέχεια στα διαγράμματα 5 και 6 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε μήκος κύματος 220nm και 240nm αντίστοιχα.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης την ίδια μέρα στα 220nm

Συγκέντρωση σε μg/mL στα 220nm	**1 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**2 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**3 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)
0	0	0	0
1	1,375	1.275	1,258
10	10,761	10.6998	11,1099
15	16,365	15.995	16,870
20	22,1967	22.0195	23,466



Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm

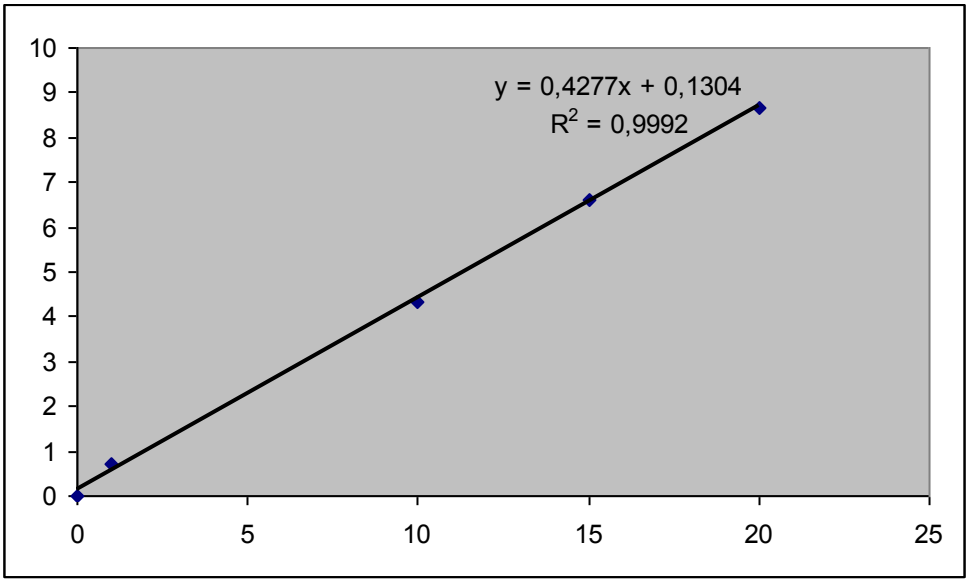
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 12: Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm

	Εξίσωση	a	b	R^2
1 Πείραμα	y=1.0964x+0.0531	1.0964	0.0531	0.9995
2 Πείραμα	y=1.0855x+0.0113	1.0855	0.0113	0.9993
3 Πείραμα	y=1.1554x-0.0888	1,1554	-0,0888	0,9987

Πίνακας 13: Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης την ίδια μέρα στα 240nm

Συγκέντρωση σε μg/mL στα 240nm	**1 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**2 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**3 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)
0	0	0	0
1	0.711	0.803	0,779
10	4.350	4.162	4,1606
15	6.600	6.367	6,3483
20	8.664	8.698	8,8958



Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm

Πίνακας 14: Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm

	Εξίσωση	a	b	R^2
1 Πείραμα	y=0.4277x+0.1304	0.4277	0.1304	0.9992
2 Πείραμα	y=0.4214x+0.1288	0.4214	0.1288	0.9974
3 Πείραμα	y=0.4288x+0.9963	0.4288	0.0919	0,9963

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 220nm

	1 Πείραμα			2 Πείραμα			3 Πείραμα		
	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	Mg/mL	Recovery %
QC 3μg/mL	3,562	3.20	**106**	3,610	3.32	**110**	3,844	3.25	**108**
QC 10μg/mL	10,640	9.66	**96.5**	10,553	9.71	**97.1**	10,484	9.15	**91.5**
QC 15μg/mL	16,365	14.88	**99.2**	16,578	15.26	**101.7**	16,009	13.93	**92.88**

Πίνακας 16: Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης στα 240nm

	1 Πείραμα			2 Πείραμα			3 Πείραμα		
	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %
QC 3μg/mL	1.467	3.125	**104**	1.5943	3.47	**115.9**	2.3685	3.2	**107**
QC 10μg/mL	4.0231	9.10	**91**	4.1465	9.53	**95.3**	5.2414	9.9	**99**
QC 15μg/mL	6.1127	13.99	**93.2**	5.8536	13.59	**90.6**	7.5141	15.2	**101**

Στους πίνακες 17 και 19 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την βαθμονόμηση του οργάνου που αντιστοιχεί στα πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm και 280nm όταν η κάθε βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές την ίδια μέρα. Διαπιστώνεται ότι οι μετρήσεις παρουσιάζουν πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η σχετική τυπική απόκλιση έχει πολύ μικρές τιμές σε όλα σχεδόν το εύρος των συγκεντρώσεων. Όπως φαίνεται και από την καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου το τετράγωνο του συντελεστή συσχετισμού στην ευθεία των ελαχίστων τετράγωνων, πλησιάζει πάρα πολύ την τιμή της μονάδας, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει πάρα πολύ καλός συσχετισμός μεταξύ των εμβαδών των κορυφών και της περιεκτικότητας των πρότυπων διαλυμάτων της δαπτομυκίνης.

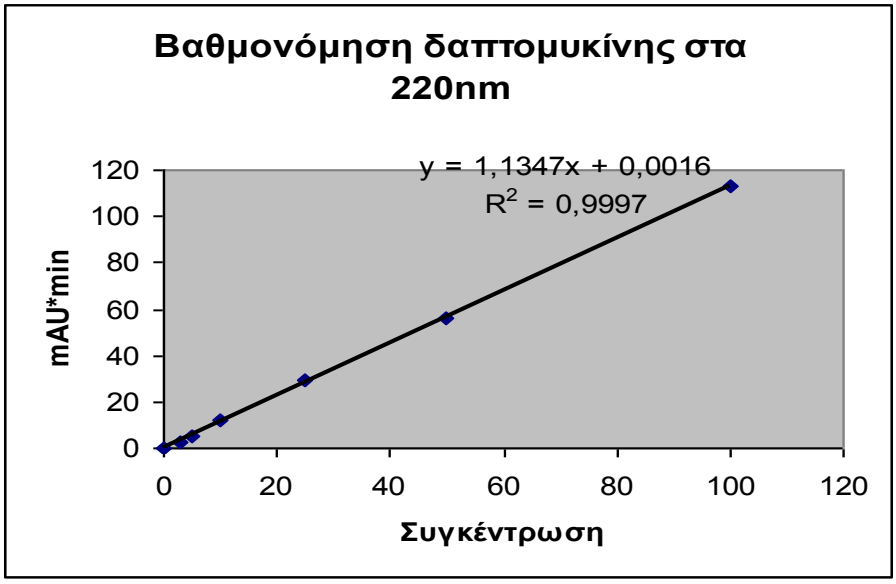
Μετά την χρωματογραφική ανάλυση των προτύπων και την εξαγωγή της καμπύλης βαθμονόμησης, υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel, ο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

συντελεστής συσχέτισης. Στους πίνακες 18 και 20 παραθέτονται τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων βαθμονομήσεων του οργάνου σε πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm και 280nm αντίστοιχα. Σε αυτούς έχουν πραγματοποιηθεί υπολογισμοί και παρουσιάζονται η κλίση της ευθείας και η τεταγμένη επί την αρχή. Στην συνέχεια στα διαγράμματα 7 και 8 παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης για τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν κατά την χρωματογραφική ανάλυση.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης την ίδια μέρα στα 220nm

Συγκέντρωση σε μg/mL	**1 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**2 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**3 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)
0	0	0	0
3	2,6559	3.3566	5.6429
5	5,2594	7.5939	8.7606
10	11,7952	11.3978	15.0288
25	29,6426	25.8463	34.9875
50	56,2696	49.8310	67.5988
100	113,3846	104.3304	136.9520



Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm

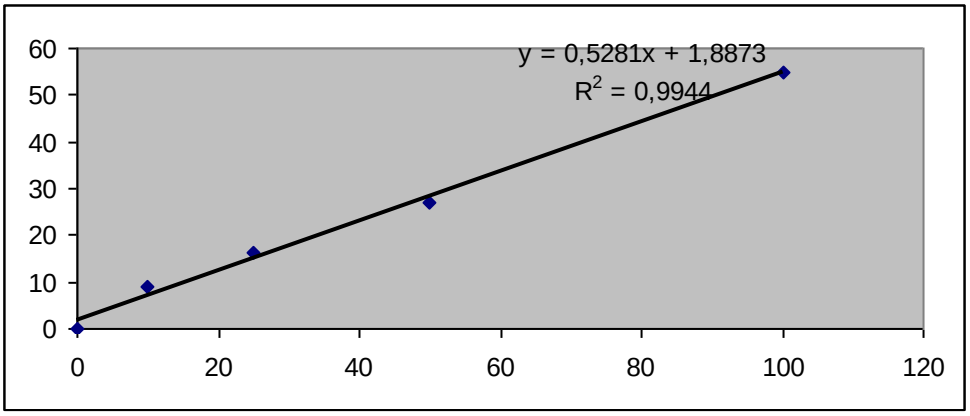
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 18: Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm

	Εξίσωση	a	b	R^2
1 Πείραμα	y=1.0958x+5.167	1,0958	5,167	0,9926
2 Πείραμα	y=1.1347x+0.0016	1,1347	0,0016	0,9997
3 Πείραμα	y=1.1347x+0.587	1,1347	0,587	0,9988

Πίνακας 19: Αποτελέσματα βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης την ίδια μέρα στα 280nm

Συγκέντρωση μg/mL	**1 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**2 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)	**3 Πείραμα** Εμβαδόν (mAU*min)
0	0	0	0
10	2,5481	9,124	2,6481
25	4,6099	16,109	4,7609
50	7,9599	27,018	7,9990
100	14,403	54,884	14,303



Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου με πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm

Πίνακας 20: Αποτελέσματα επαναληπτικών βαθμονομήσεων του οργάνου την ίδια μέρα σε πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm

	Εξίσωση	a	b	R^2
1 Πείραμα	y=0,139x+0,7616	0,139	0,7616	0,9918
2 Πείραμα	y=0,5281x+1,8873	0,5281	1,8873	0,9944
3 Πείραμα	y=0.1374x+0,8594	0,1374	0,8594	0,9894

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 220nm

	1 Πείραμα			2 Πείραμα			3 Πείραμα		
	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	mAU*min	Εμβαδό mAU*min	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %
QC 9μg/mL	8,2391	9,34	103,8	8,2391	9,34	103,8	9,2394	8,423	93,6
QC 50μg/mL	56,9635	50,2	100,4	56,9635	50,2	100,4	50,5237	48,614	97,2
QC 80μg/mL	92,2527	81,3	101,6	92,2527	81,3	101,6	81,3914	78,6647	98,33

Πίνακας 22: Αποτελέσματα ανάκτησης των δειγμάτων ελέγχου για τις επαναληπτικές βαθμονομήσεις του οργάνου την ίδια μέρα για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης στα 280nm

	1 Πείραμα			2 Πείραμα			3 Πείραμα		
	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %	Εμβαδό mAU*min	μg/mL	Recovery %
QC 9μg/mL	2.0299	9.125	101	6.8887	9.47	105.2	2.1235	9.2	102.2
QC 50μg/mL	7.7255	50.10	100.2	28.572	50.53	101.1	7.9904	51.9	103.8
QC 80μg/mL	12.0192	80.99	101.2	44.9749	81.59	102	12.0162	81.2	101.5

4.4. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (Repeatability)

Επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι το μέτρο της διασποράς των μετρήσεων των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα ή πρότυπο διάλυμα, στο ίδιο εργαστήριο, από τον ίδιο αναλυτή, με τις ίδιες συσκευές, την ίδια μέρα ή σε σύντομο χρονικό διάστημα. Υπό τις συνθήκες αυτές αναφερόμαστε σε **repeatability** της μεθόδου δηλαδή, στην πιστότητα υπό συνθήκες εργαστηρίου που είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων ελέγχων στο ίδιο δείγμα και για το λόγο αυτό έγινε την ίδια μέρα βαθμονόμηση με τα κατάλληλα διαλύματα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

4.5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ (Reproducibility)

Αναπαραγωγιμότητα ορίζεται ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και το ίδιο δείγμα, στο ίδιο εργαστήριο, αλλά σε διαφορετικούς χρόνους με διαφορετικό αναλυτή. Για να προσδιοριστεί χρησιμοποιείται ως μέτρο η τυπική απόκλιση (standard deviation) S_L

Από τις αναλύσεις των δειγμάτων προτύπων για αναπαραγωγιμότητα και την επαναληψιμότητα που πραγματοποιούνται την ίδια μέρα και σε διαφορετικές μέρες αντίστοιχα προκύπτουν τα αποτελέσματα των ακόλουθων πινάκων 25 έως και 30 για τα προσδιοριζόμενα αντιβιοτικά.

Πίνακας 23: Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης (220nm)

Πειράματα	y=ax+b			
	R^2	R	a	b
1	0,9995	0,9997	1,0964	0,0531
2	0,9993	0,9996	1,0855	0,0113
3	0,9987	0,9993	1,1554	-0,0888
4	0,9993	0,9996	1,1108	0,3202
5	0,9988	0,9993	1,126	0,1846
Mean	0,99912	0,9995	0,11482	0,09608
SD	0,000349	0,000187	0,027326	0,159123
C.V.(%)	0,0349	0,0187	2,7326	15,9123

Πίνακας 24: Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης (240nm)

Πειράματα	y=ax+b			
	R^2	R	a	b
1	0,9992	0,9995	0,4277	0,1304
2	0,9974	0,9986	0,4214	0,1288
3	0,9963	0,9981	0,4288	0,9963
4	0,9987	0,9993	0,4358	0,1549
5	0,9988	0,9993	0,4366	0,1588
Mean	0,99808	0,99896	0,43006	0,31384
SD	0,001203	0,00059	0,006282	0,381753
C.V.(%)	0,1203	0,59	0,6282	38,1753

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 25: Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου βανκομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (220nm)

Συγκεντρώσεις δειγμάτων ελέγχου (μg/mL)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias (%)
	Μέση τιμή	SD	C.V.%		
Intra- day (n=6)					
3	3.22375	0.069269	2.15	107.5	7.5
10	9.98	0.462478	4.63	99.8	-0.2
15	14.83	0.573936	3.87	98.9	-1.1
Inter – day (n=3)					
3	3.218	0.041062	1.27	107.26	7.26
10	10,032	0.480813	4.78	100.32	0.32
15	14.771	0.546931	3.702	98.47	-1.53

Πίνακας 26: Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου βανκομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (240nm)

Συγκεντρώσεις δειγμάτων ελέγχου (μg/mL)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias (%)
	Μέση τιμή	SD	C.V.%		
Intra- day (n=6)					
3	3.2118	0.131582	4.10	107.1	7.1
10	10.1675	0.618033	6.08	101.7	1.7
15	14.3337	0.48656	3.39	95.5	-4.5
Inter – day (n=3)					
3	3.216	0.072081	2.24	107.2	7.2
10	10,235	0,652476	6.37	102.35	2.35
15	14.356	0.155067	1.08	95.7	-4.3

Πίνακας 27: Παλινδρομική ανάλυση βαθμονόμσης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης (220nm)

Πείραματα	y=ax+b			
	R^2	R	a	b
1	0,9926	0,9962931	1,0958	5,167
2	0,9997	0,9998499	1,1347	0,0016
3	0,9988	0,9993998	1,1347	0,587
4	0.9997	0.9998499	1,3537	1,1021
5	0,9998	0,9998999	1,0395	-0,5444
Mean	0,997725	0,998860675	1,15168	1,26266
SD	0,003446	0,001726427	0,1197347	2,268364221
C.V.(%)	0,3446	0,1726427	11,97347	226,8364221

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 28: Αποτελέσματα από δείγματα ελέγχου δαπτομυκίνης για την πιστότητα και την ακρίβεια που πραγματοποιούνται εντός της ημέρας και εντός της εβδομάδας (220nm)

Συγκεντρώσεις δειγμάτων ελέγχου (μg/mL)	Found concentration			Accuracy(%)	Bias (%)
	Μέση τιμή	SD	C.V.%		
Intra- day (n=6)					
9	8,661	0,224907	2,5968	96,23	-3,77
25	47,758	0,837647	1,7539	95,52	-4,48
80	80,69157	1,801435	2,2325	100,86	0,86
Inter – day (n=3)					
9	9,005	0,480126	5,3344	100,05	0,05
25	48,979	1,726755	3,5255	97,958	-2,042
80	76,34579	6,145868	8,05	95,43	-4,57

4.6. ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ

Η τυπική απόκλιση (S_L) των δεδομένων ενός δείγματος περιορισμένου μεγέθους δίνεται από την εξίσωση

$$S_L = [\Sigma(x_i - x_\mu)^2/(N-1)]^{1/2}$$

όπου :

x_μ :η μέση τιμή των μετρήσεων

x_i :η μετρούμενη τιμή

N :ο αριθμός των μετρήσεων

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% και αν ο αριθμός μετρήσεων δεν είναι μικρός ορίζεται από τον τύπο:

$$R_L = 2,8 * S_L$$

4.7. ΣΧΕΤΙΚΗ ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ (RSD) ΚΑΙ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ % ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ (CV)

Η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) παρέχει συχνά καλύτερη πληροφόρηση σε σχέση με την απόλυτη τυπική απόκλιση. Η σχετική τυπική απόκλιση ενός δείγματος αναλυτικών δεδομένων δίνεται από τη σχέση:

$$RSD = (S_L / x_\mu) * 10^z$$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Όταν z =2, η σχετική τυπική απόκλιση δίνεται ως επί τοις εκατό, ενώ για z =3 η απόκλιση δίνεται ως μέρη στα χίλια. Όταν η σχετική τυπική απόκλιση εκφράζεται ως επί τοις εκατό (%) αναφέρεται και ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) των δεδομένων. Δηλαδή,

$$CV=(S_L / x_\mu)*100\%$$

όπου :

x_μ :η μέση τιμή των μετρήσεων

4.8. ΟΡΘΟΤΗΤΑ (Accuracy)

Ορθότητα ορίζεται η εγγύτητα που υπάρχει μεταξύ πειραματικής – μετρούμενης τιμής και της πραγματικής - αποδεκτής τιμής για ένα συγκεκριμένο δείγμα. Για να προσδιοριστεί ως μέγεθος με μεγαλύτερη βεβαιότητα χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές:

α) Πιστοποιημένα υλικά αναφοράς(CRM)

β) Εμβολιασμένα δείγματα σε λευκά δείγματα

γ) Μέθοδος αναφοράς

Η ορθότητα μπορεί να εκφραστεί με πολλούς τρόπους:

1. Απόλυτο σφάλμα (absolute error).
2. Σχετικό σφάλμα (relative error).
3. Μεροληψία (bias).

4.9. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (Sensitivity)

Η ευαισθησία εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

- το όριο ανίχνευσης (LOD)
- το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

4.10. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (Limit of Detection, LOD) - ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (Limit of Quantitation, LOQ)

Όριο ανίχνευσης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας η οποία μπορεί να προσδιοριστεί, όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί, κάτω από τις καθορισμένες συνθήκες της δοκιμής. Το όριο ανίχνευσης μπορεί να προσδιοριστεί με δύο τρόπους:

- από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης
- από το σήμα θορύβου του μηχανήματος

Από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί τρεις φορές στην τυπική απόκλιση αποτελεί και το όριο ανίχνευσης. Από την καμπύλη βαθμονόμησης προσδιορίζεται η τεταγμένη επί την αρχή, η κλίση και η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή. Στη συνέχεια το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

LOD = 3(τυπική απόκλιση τεταγμένης επί την αρχή / κλίση της καμπύλης αναφοράς)*

$$LOD = 3*\sigma/s$$

Το όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας που θεωρείται πραγματική στατιστικά και έχει προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο με ένα αποδεκτό επίπεδο ακρίβειας και ορθότητας κάτω από τις καθορισμένες συνθήκες διενέργειας της δοκιμής. Υπολογίζεται από την σχέση:

LOQ = 10(τυπική απόκλιση τεταγμένης επί την αρχή / κλίση της καμπύλης αναφοράς)*

$$LOQ = 10*\sigma/s$$

Το σήμα θορύβου του μηχανήματος αποτελεί τον δεύτερο τρόπο για να υπολογιστεί το όριο ποσοτικοποίησης είναι από τον θόρυβο του μηχανήματος με τον τύπο για τον προσδιορισμό του Signal to Noise. Από τις οδηγίες του μηχανήματος της HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εργασία αυτή Ultimate 3000 (DIONEX) προέκυψε ότι χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι τύποι:

$$S/N = 2*\text{Peak Height (H)} / \text{Noise (h)} \quad (1)$$

όπου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Peak Height: το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής
Noise: το ύψος του θορύβου στο τρέχων δείγμα που αναλύεται

Ο τύπος για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD) είναι

LOD = 1ug/mL *3 / (S/N) (2)

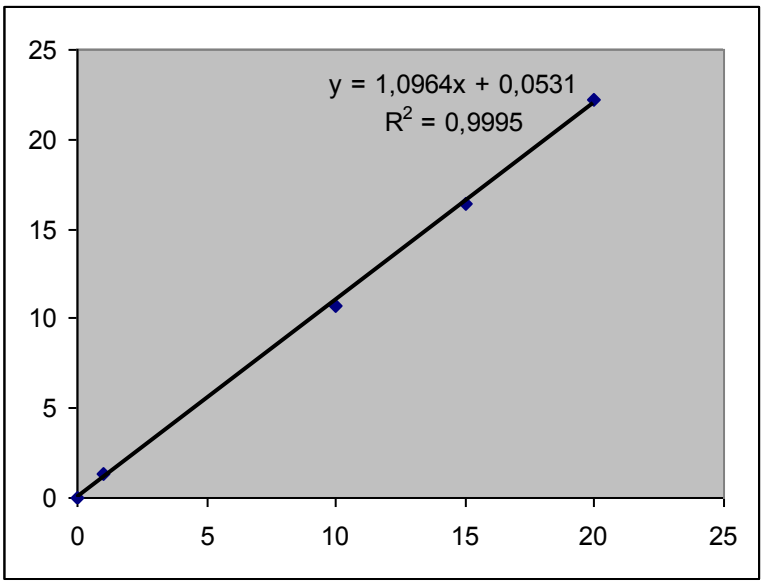
Ο τύπος για τον προσδιορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι

LOQ=3*LOD (3)

Συνήθως το όριο ποσοτικοποίησης που προσδιορίζεται από την κλίση βαθμονόμησης είναι μεγαλύτερο από αυτό που προσδιορίζεται από τον θόρυβο του μηχανήματος.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ LOQ ΓΙΑ ΤΗ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ

Έγινε ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης της βανκομυκίνης με τη βοήθεια της κλίσης βαθμονόμησης του οργάνου στα αντίστοιχα μήκη κύματος των 220nm και 240nm που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αναφέρονται στους πίνακες 29 και 30 αντίστοιχα.



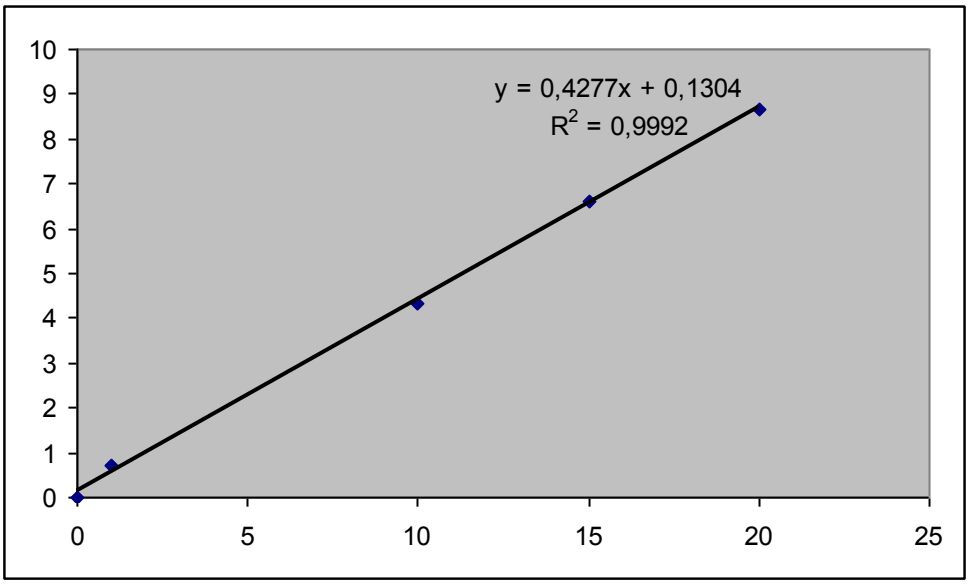
Διάγραμμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε μήκος κύματος 220nm.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Για τον προσδιορισμό αυτό απαιτήθηκε να γίνει βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων της βανκομυκίνης στα 220nm και προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 9 **y=1.0964x+0.0531.** Από τους προαναφερθέντες τύπους προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την βανκομυκίνη είναι 0,677μg/mL, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης είναι το 2,257 μg/mL. (Πίνακας 29)

Πίνακας 29: Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη βανκομυκίνη στα 220nm

C, ug/mL	Y (Area)	Yi (Area from calibration graph)	Y-Yi	(Y-Yi)^2	σ	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
0	0	0,0531	-0,0531	0,00281961			
1	1,375	1,1495	0,2255	0,05085025			
10	10,761	11,0171	-0,2561	0,06558721	0,247	0,677	2,257
15	16,365	16,4991	-0,1341	0,01798281			
20	22,1967	21,9811	0,2156	0,04648336			
			SUM	0,18372324			



Διάγραμμα 10: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε μήκος κύματος 240nm.

Επίσης για τον προσδιορισμό αυτό απαιτήθηκε να γίνει βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων της βανκομυκίνης στα 240nm και προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 10 **y=0.4277x+0.1304.** Από τους προαναφερθέντες τύπους προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την βανκομυκίνη είναι 0,878μg/mL, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης είναι το 2,927μg/mL. (Πίνακας 30)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 30: Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη βανκομυκίνη στα 240nm

C, ug/mL	Y (Area)	Yi (Area from calibration graph)	Y-Yi	(Y-Yi)^2	Σ	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
0	0	0,1304	-0,1304	0,01700416			
1	0.711	0,5581	0,1529	0,02337841			
10	4.350	4,4074	-0,0574	0,00329476	0,1251	0,878	2,927
15	6.600	6,5459	-0,0541	0,00292681			
20	8.664	8,6844	-00204	0,00041616			
			SUM	0,0470203			

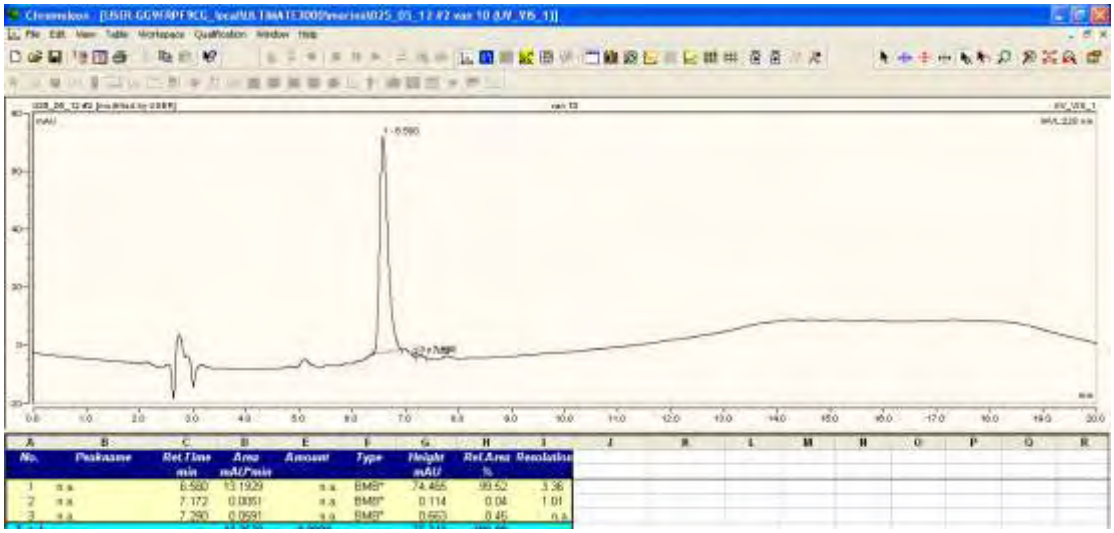
Στον πίνακα 31 φαίνονται οι τιμές των παραμέτρων και τα αποτελέσματα από τους τύπους 1,2,3 για τον προσδιορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) για την βανκομυκίνη στα 220nm και στα 240nm αντίστοιχα με τη βοήθεια του θορύβου του μηχανήματος. Παρατηρούμε ότι το όριο ποσοτικοποίησης για την βανκομυκίνη είναι μικρότερο με αυτόν τον τρόπο υπολογισμού και η τιμή του στα 220nm είναι 0,87μg/mL και 0,99μg/mL στα 240nm.

Πίνακας 31: Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) για την βανκομυκίνη από τον θόρυβο του μηχανήματος

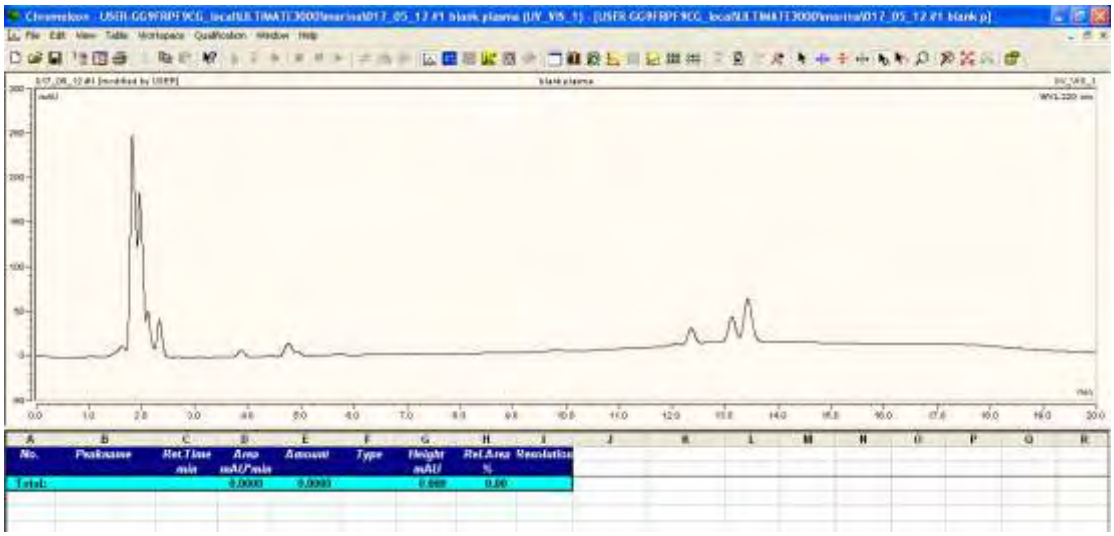
A/A	Συγκέντρωση διαλύματος	**Peak Height**	**Noise**	**S/N**	**LOD** (μg/mL)	**LOQ** (μg/mL)
220nm						
1	Πρότυπο διάλυμα c=10ug/mL	74.465	0.663	224.63	0.13355	**0.40**
2	Πρότυπο διάλυμα c=15ug/mL	119.589	0.773	154.7	0.29	**0.87**
3	Πρότυπο διάλυμα c=20ug/mL	123.310	1.076	229.2	0.26178	**0.78**
240nm						
1	Πρότυπο διάλυμα c=10ug/mL	30.586	0.273	224.07	0.133	**0.40**
2	Πρότυπο διάλυμα c=15ug/mL	43.802	0.539	162.53	0.2768	**0.83**
3	Πρότυπο διάλυμα c=20ug/mL	49.896	0.565	176.623	0.33	**0.99**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων της βανκομυκίνης και του τυφλού δείγματος στα 220nm απεικονίζονται στα σχήματα 17 έως και 20. Είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της βανκομυκίνης με τη χρήση τυφλού δείγματος, δηλαδή δείγματος που δεν περιέχει καμία ποσότητα του εξεταζόμενου φαρμάκου.



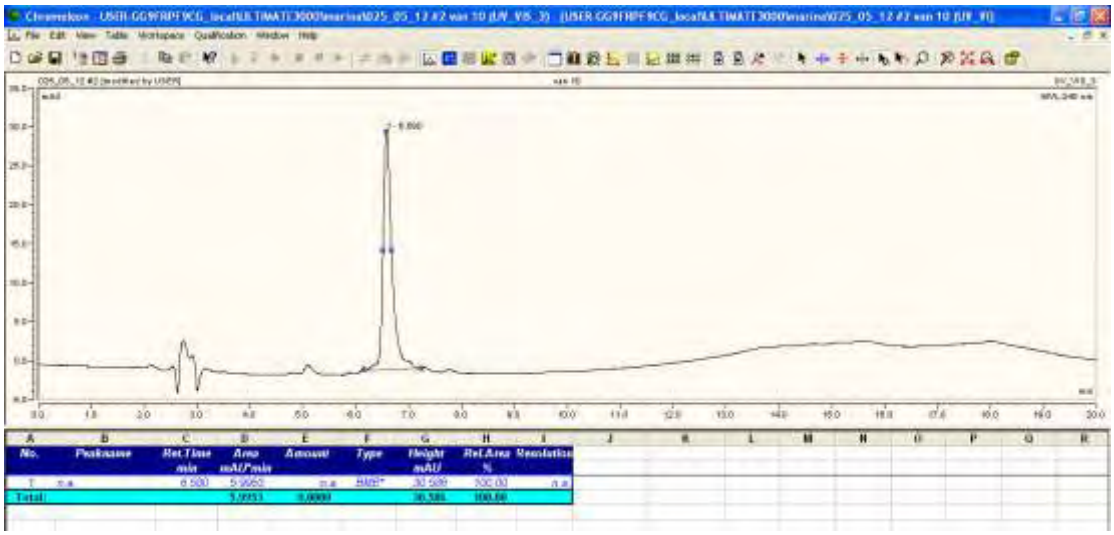
Σχήμα 17: Χρωματογράφημα δείγματος πρότυπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 10μg/mL στα 220nm (t_R=6.580min)



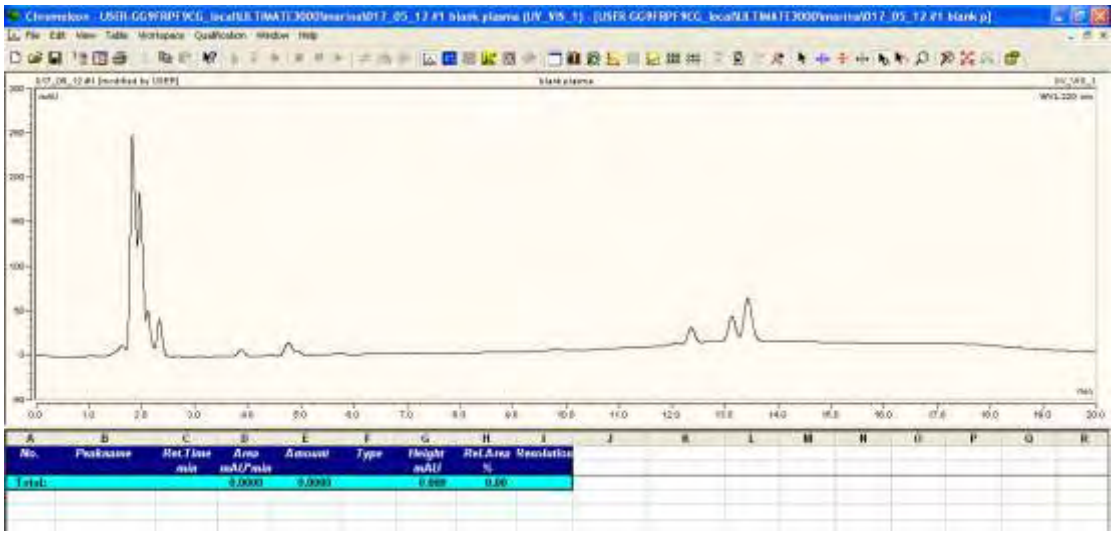
Σχήμα 18: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη βανκομυκίνης στα 220nm (t_R=6.580min για τη βανκομυκίνη)

Στο σχήμα 18 απεικονίζεται το χρωματογράφημα ενός δείγματος πλάσματος χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τη βανκομυκίνη όπου παρατηρείται ότι στον χρόνο έκλουσης του φαρμάκου δεν εμφανίζεται καμία κορυφή άρα δεν εκλούεται καμία ουσία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 19: Χρωματογράφημα δείγματος πρότυπου διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 10μg/mL στα 240nm (t_R=6.580min)



Σχήμα 20: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη βανκομυκίνης στα 240nm (t_R=6.580min για τη βανκομυκίνη)

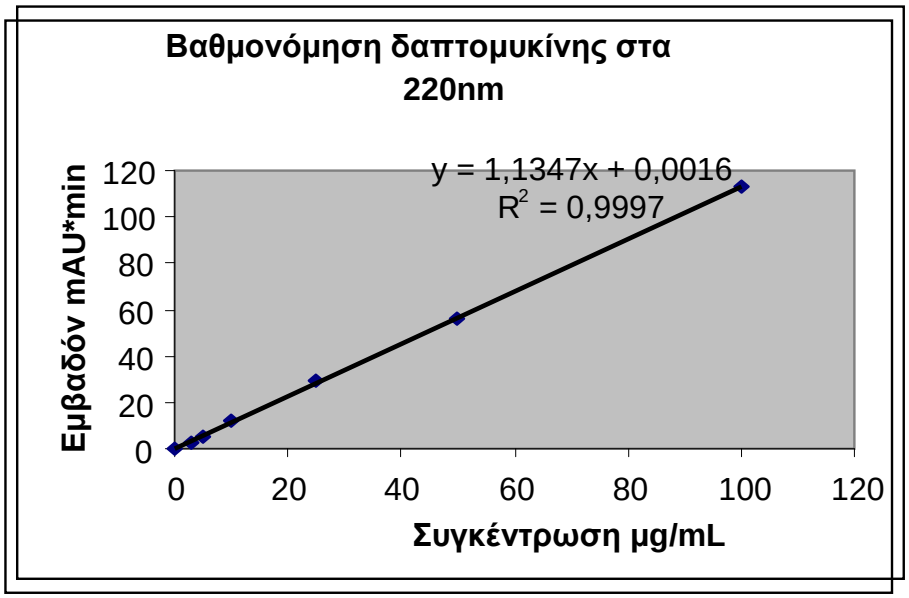
Στο σχήμα 20 απεικονίζεται το χρωματογράφημα ενός δείγματος πλάσματος χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τη βανκομυκίνη όπου παρατηρείται ότι στον χρόνο έκλουσης του φαρμάκου δεν εμφανίζεται καμία κορυφή άρα δεν εκλούεται καμία ουσία.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ LOQ ΓΙΑ ΤΗ ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗ

Έγινε ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης της δαπτομυκίνης με τη βοήθεια της κλίσης βαθμονόμησης στα αντίστοιχα μήκη κύματος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

των 220nm και 280nm που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αναφέρονται στους πίνακες 10 και 11 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης σε μήκος κύματος 220nm.

Για τον προσδιορισμό αυτό απαιτήθηκε να γίνει βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων της δαπτομυκίνης στα 220nm και προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 11 **y=1.1347x+0.0016.** Από τους προαναφερθέντες τύπους προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την βανκομυκίνη είναι 1,510μg/mL, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης είναι το 5,034μg/mL. (Πίνακας 32)

Πίνακας 32: Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη δαπτομυκίνη στα 220nm

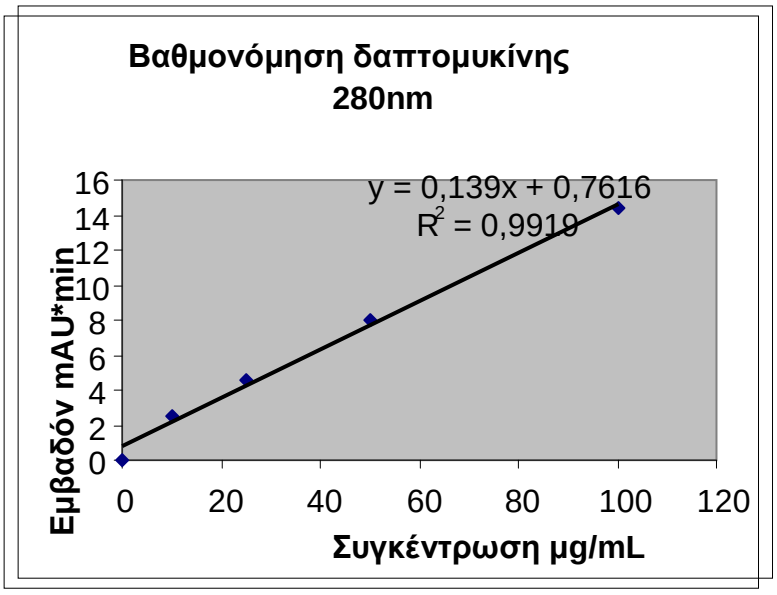
C, ug/mL	Y (Area)	Yi (Area from calibration graph)	Y-Yi	(Y-Yi)^2	Σ	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
0	0	0,0016	-0,0016	0,0000025			
3	2,6559	3,4057	-0,7498	0,5622			
5	5,2594	5,6751	-0,4157	0,1728064			
10	11,7952	11,3486	0,4466	0,1994515	0,571	1,510	5,034
25	29,6426	28,3691	1,2735	1,6218022			
50	56,2696	56,7366	-0,467	0,218089			
100	113,3846	113,4716	-0,087	0,007569			
			SUM	2,7819206			

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Επίσης για τον προσδιορισμό αυτό απαιτήθηκε να γίνει βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων της δαπτομυκίνης στα 280nm και προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 12 **y=0.139x+0.7616.** Από τους προαναφερθέντες τύπους προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για την δαπτομυκίνη είναι 4,66μg/mL, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης είναι το 15,53μg/mL. (Πίνακας 33)

Πίνακας 33: Προσδιορισμός του LOD και του LOQ για τη δαπτομυκίνη στα 280nm

C, ug/mL	Y (Area)	Yi (Area from calibration graph)	Y-Yi	(Y-Yi)^2	Σ	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
0	0	0,7616	-0,7616	0,58003456			
10	2,5481	2,1516	0,3965	0,15721225			
25	4,6099	4,2366	0,3733	0,13935289	0,216	4,66	15,53
50	7,9599	7,7116	0,2483	0,06165289			
100	14,403	14,6616	-0,2586	0,06687396			
			SUM	1,005127			



Διάγραμμα 12: Καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για πρότυπα διαλύματα δαπτομυκίνης σε μήκος κύματος 280nm.

Στον πίνακα 34 φαίνονται οι τιμές των παραμέτρων και τα αποτελέσματα από τους τύπους 1,2,3 για τον προσδιορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) για την δαπτομυκίνη στα 220nm και στα 280nm αντίστοιχα με τη βοήθεια του θορύβου του μηχανήματος. Παρατηρούμε ότι το όριο ποσοτικοποίησης για την δαπτομυκίνη είναι μικρότερο με αυτόν τον τρόπο υπολογισμού και η τιμή του στα 220nm είναι 0,171μg/mL και 0,281μg/mL στα 280nm.

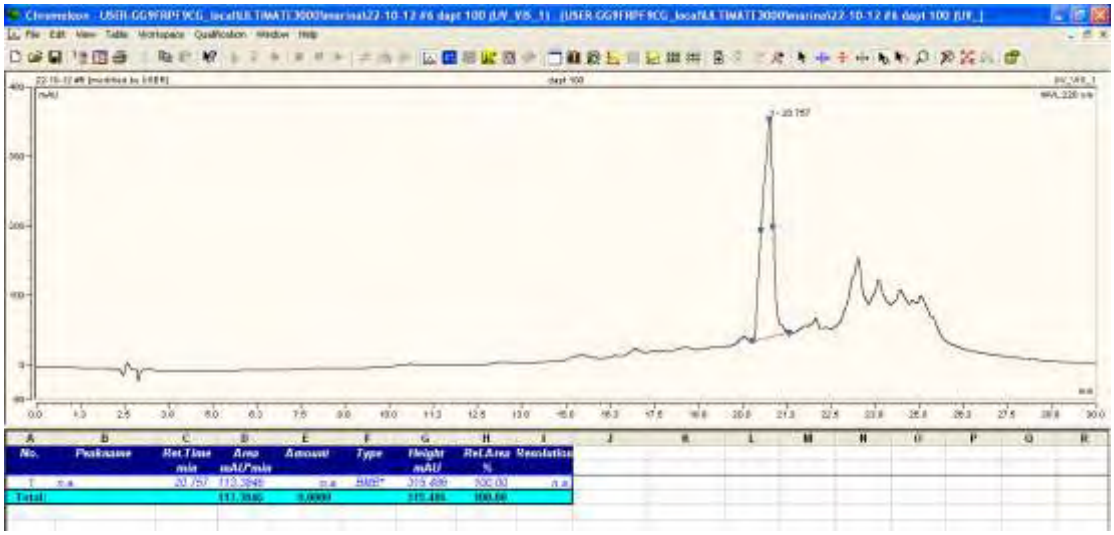
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 34: Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) για την δαπτομυκίνη από τον θόρυβο του μηχανήματος

A/A	Συγκέντρωση διαλύματος	**Peak Height**	**Noise**	**S/N**	**LOD** (μg/mL)	**LOQ** (μg/mL)
220nm						
1	Πρότυπο διάλυμα c=5ug/mL	10.652	8.730	2.44032	1.229	**3.688**
2	Πρότυπο διάλυμα c=10ug/mL	45.045	11.113	8.1067	0.370	**1.110**
3	Πρότυπο διάλυμα c=25ug/mL	86.416	9.500	18.193	0.165	**0.495**
4	Πρότυπο διάλυμα c=50ug/mL	117.500	8.152	28.827	0.104	**0.312**
5	Πρότυπο διάλυμα c=100ug/mL	315.486	12.021	52.489	0.057	**0.171**
280nm						
1	Πρότυπο διάλυμα c=10ug/mL	12.438	0.805	30.902	0.097	**0.291**
2	Πρότυπο διάλυμα c=25ug/mL	16.109	2.868	11.234	0.267	**0.801**
3	Πρότυπο διάλυμα c=50ug/mL	27.018	2.832	19.081	0.157	**0.472**
4	Πρότυπο διάλυμα c=100ug/mL	41.884	2.618	31.997	0.094	**0.281**

Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων των προτύπων διαλυμάτων της δαπτομυκίνης και του τυφλού δείγματος στα 220nm και 280nm αντίστιοχα απεικονίζονται στα σχήματα 21 έως και 23. Είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της δαπτομυκίνης με τη χρήση τυφλού δείγματος δηλαδή δείγματος που δεν περιέχει τα αναλυόμενο φάρμακο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

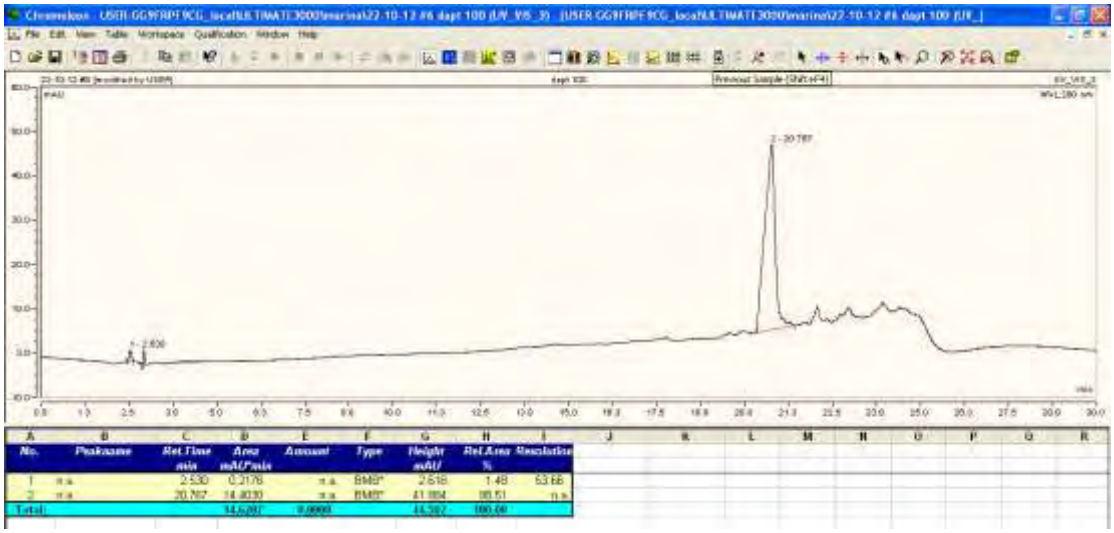


Σχήμα 21: Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL σε 220nm (t_R=20.757min)

Σχήμα 22: Χρωματογράφημα δείγματος πλάσματος χωρίς την προσθήκη δαπτομυκίνης στα 220nm (t_R=6.580min για τη δαπτομυκίνη)

Στο σχήμα 22 απεικονίζεται το χρωματογράφημα ενός δείγματος πλάσματος χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τη δαπτομυκίνη όπου παρατηρείται ότι στον χρόνο έκλουσης του φαρμάκου δεν εμφανίζεται καμία κορυφή άρα δεν εκλούεται καμία ουσία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



Σχήμα 23: Χρωματογράφημα δείγματος προτύπου διαλύματος δαπτομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL στα 280nm (t_R=20.767min)

4.11. ΑΝΑΚΤΗΣΗ (Recovery)

Εμβολιάζεται δείγμα με την αναλυόμενη ουσία και εφαρμόζεται η αναλυτική μέθοδος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύγκριση της προσδιοριζόμενης τιμής της συγκέντρωσης με αυτή που έχει αρχικά εισαχθεί. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η δοκιμή της ανάκτησης. Τα όρια ανάκτησης παρουσιάζονται στους πίνακες 15 και 16 για τα πρότυπα διαλύματα της βανκομυκίνης σε μήκη κύματος 220nm και 240nm όπου βρέθηκε η ανάκτηση να είναι από 91.5% έως 110%. Για τα πρότυπα διαλύματα της δαπτομυκίνης η ανάκτηση παριστάνεται στους πίνακες 21 και 22 και προκύπτει ότι η ανάκτηση είναι από 91.5% έως 110% και εν κατακλείδι η μεθοδολογία που χησιμοποιήθηκε παρείχε ανάκτηση από 91.5% έως 110% και για τα δύο αντιβιοτικά.

4.12. ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Selectivity)

Ως επιλεκτικότητα ορίζεται ο βαθμός με τον οποίο μια δεδομένη αναλυτική μέθοδος επιτρέπει το διαχωρισμό της αναλυόμενης ουσίας από οποιαδήποτε άλλη ουσία που περιέχεται μέσα στο δείγμα της δοκιμής. Από τα σχήματα 13 και 14 που είναι χρωματογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων της βανκομυκίνης παρατηρούμε ότι έχουμε πολύ καλή επιλεκτηκότητα αφού οι κορυφές εμφανίζουν την κατανομή κατά Gauss και δεν παρεμποδίζονται από άλλες ουσίες. Το ίδιο ακιβώς συμβαίνει και για τα πρότυπα διαλύματα της δαπτομυκίνης όπως φαίνεται και στα σχήματα 15 και 16, όπου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

οι κορυφές είναι καθαρές και δεν παρεμποδίζονται από κορυφές που να αντιστοιχούν σε άλλες ουσίες.

4.13. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ (Systematic Error)

Η διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής που επιτεύχθηκε από ένα μεγάλο αριθμό αποτελεσμάτων και της αληθινής τιμής. Η αξιοπιστία μπορεί να μετρηθεί από την παρακάτω σχέση:

$$X = Xw + \delta + \varepsilon$$

όπου

χ :η μετρούμενη τιμή

Xw :η αληθινή τιμή΄

δ: συστηματικό σφάλμα

ε :τυχαίο σφάλμα

Το άθροισμα δ+ε, δηλαδή **ορθότητα**+**ακρίβεια** δίνει την **αξιοπιστία** της μεθόδου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται τρόποι που μελετήθηκαν για τη βελτίωση της μεθόδου προσδιορισμού των αντιβιοτικών και τη συστηματική αύξηση της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας της μεθόδου. Οι μέθοδοι βασίζονται στην χημική τροποποίηση του αναλύτη με πρόσδεση στο μόριο χαρακτηριστικών ομάδωνπου έχουν αυξημένη απορροφητικότητα σε συγκεκριμένο και χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται παραγωγοποίηση. Συγκεκριμένα η βανκομυκίνη και η δαπτομυκίνη έχουν πρωτοταγείς αμινομάδες που μπορούν να αντιδράσουν με κατάλληλα αντιδραστήρια και προκύπτουν προιόντα παραγωγοποίησης με αυξημένη μοριακή απορροφητικότητα..

5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ (Derivatization)

Η παραγωγοποίηση περιλαμβάνει χημική αντίδραση μεταξύ του αναλύτη και ενός αντιδραστηρίου-παραγωγοποιητή, και αποσκοπεί στην αλλαγή των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του αναλύτη.

Οι τέσσερις κύριες χρήσεις της παραγωγοποίησης είναι:
1. Βελτίωση της ανιχνευσιμότητας
2. Αλλαγή της μοριακής δομής ή της πολικότητας του αναλύτη για βελτίωση των χρωματογραφικών του χαρακτηριστικών
3. Αλλαγή της μήτρας για καλύτερο διαχωρισμό
4. Σταθεροποίηση ενός ευαίσθητου αναλύτη

Ιδανικά, η αντίδραση της παραγωγοποίησης πρέπει να είναι γρήγορη, ποσοτική και να παράγει ελάχιστα παραπροϊόντα. Περίσσεια αντιδραστηρίου δε θα πρέπει να παρεμποδίζει την ανάλυση ή θα πρέπει να απομακρύνεται εύκολα από τη μήτρα της αντίδρασης.

Είναι το τελευταίο καταφύγιο κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου, διότι η εισαγωγή μιας αντίδρασης πριν ή μετά τη στήλη προσθέτει πολυπλοκότητα, πηγές σφάλματος στην ανάλυση και χρόνο ανάλυσης. Στην HPLC η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως για την αύξηση της ανιχνευσιμότητας του αναλύτη. Το πρώτο μέλημα είναι η επιλογή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

του είδους της ανίχνευσης (συνήθως UV ή φθορισμός κάποτε και ηλεκτροχημικός) και το δεύτερο η επιλογή της αντίδρασης πριν ή μετά τη στήλη.

5.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Τα κριτήρια για την επιλογή του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης είναι:

- Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης να είναι σταθερό και εάν είναι εφικτό μη τοξικό
- Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και τα σχηματιζόμενα κατά την παραγωγοποίηση παραπροϊόντα να μην είναι ανιχνεύσιμα ή να διαχωρίζονται από τον αναλύτη
- Ο αναλύτης πρέπει να αντιδρά με το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης κάτω από πρόσφορες συνθήκες
- Η διαδικασία πρέπει να αυτοματοποιείται
- Η επιλογή του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης γίνεται βάσει της μεθόδου ανίχνευσης (UV ή φθορισμός) και βάσει των χαρακτηριστικών ομάδων του αναλύτη

5.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ

Πλεονεκτήματα για παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη (και πριν από τον ανιχνευτή)

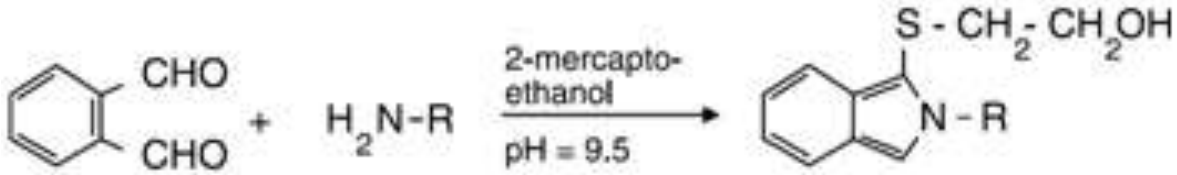
Πριν τη στήλη η παραγωγοποίηση έχει λιγότερους οργανολογικούς και χημικούς περιορισμούς. Ο αναλύτης πραγματοποιεί την παραγωγοποίηση και μεταφέρει το δείγμα στον κατάλληλο περιέκτη. Μπορεί να είναι αυτοματοποιημένη ή μη. Δεν υπάρχουν χρονικοί περιορισμοί στην κινητική της αντίδρασης παραγωγοποίησης, εφ' όσον όλα τα αντιδραστήρια και οι συμμετέχουσες ουσίες είναι σταθερές. Τέλος, οποιαδήποτε μέθοδος προκατεργασίας δείγματος για την απομάκρυνση παραπροϊόντων και παρεμποδιζουσών ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Επίσης, εάν είναι απαραίτητο για συμβατότητα με την κινητή φάση της HPLC, μπορεί να μεταβληθεί ο διαλύτης του δείγματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Μειονεκτήματα της πριν από τη στήλη παραγωγοποίησης

Εισαγωγή μολύνσεων και απώλεια του αναλύτη λόγω προσρόφησης, ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων, πιθανής διάσπασης του δείγματος, μεταφοράς του δείγματος και ημιτελών αντιδράσεων. Επιπλέον, επιπρόσθετος χρόνος για την παραγωγοποίηση και πολυπλοκότητα που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως παραγωγοποιητής το OPA (o-Phthalaldehyde) γιατί εμφανίζει τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν. Το OPA (o-phthalaldehyde) είναι το πλέον διαδεδομένο αντιδραστήριο για την ανάλυση των αμινοξέων και πρωτοταγών αμινών και χρησιμοποιείται για παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη. Η αντίδραση παραγωγοποίησης είναι η ακόλουθη όπως φαίνεται στο σχήμα 35 και βασίζεται στο ότι μετά την αντίδραση το προϊόν φθορίζει ή θα μπορεί να ανιχνευθεί από τον ανιχνευτή UV κατά την HPLC ανάλυση.



Σχήμα 24 : Αντίδραση OPA με πρωτοταγή αμίνη

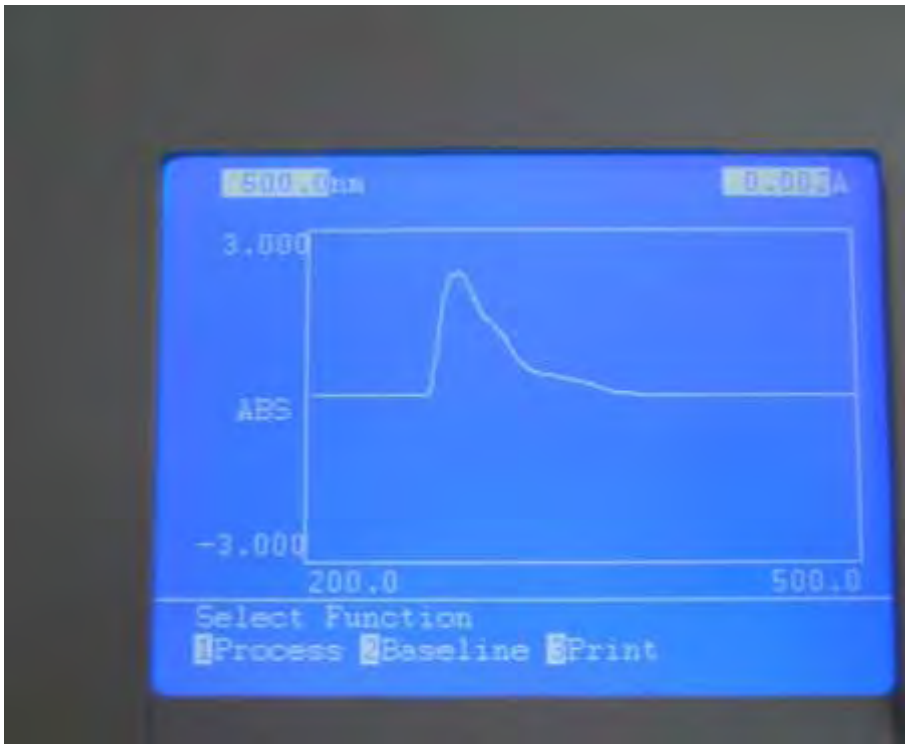
5.4. ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗΣ ΜΕ OPA

Η διαδικασία της παραγωγοποίησης είναι σχετικά απλή και συμβαίνει σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικά διαλύματα. Για να γίνει η αντίδραση της παραγωγοποίησης είναι απαραίτητη η παρουσία μιας θειόλης σε αλκαλικό pH και δίνει ισχυρά φθορίζοντα και συγχρόνως ηλεκτροχημικά ενεργά παράγωγα. Επίσης, σε περίπτωση που χρησιμοποιείται μόνο ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής για την ανίχνευση των παραγώγων, δεν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της περίσσειας του OPA από το μίγμα της παραγωγοποίησης διότι δε φθορίζει. Τα παράγωγα του OPA είναι λιγότερο πολικά από τα ελεύθερα αμινοξέα και για το λόγο αυτό είναι ικανός ο διαχωρισμός τους με την τεχνική της αντίστροφης φάσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (RP-HPLC). Μειονεκτήματα του αντιδραστηρίου είναι : α) αντιδρά μόνο με τις πρωτοταγείς αμίνες και όχι με τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς και β) τα παράγωγά του είναι ασταθή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πρωτόκολλο για OPA με την βανκομυκίνη

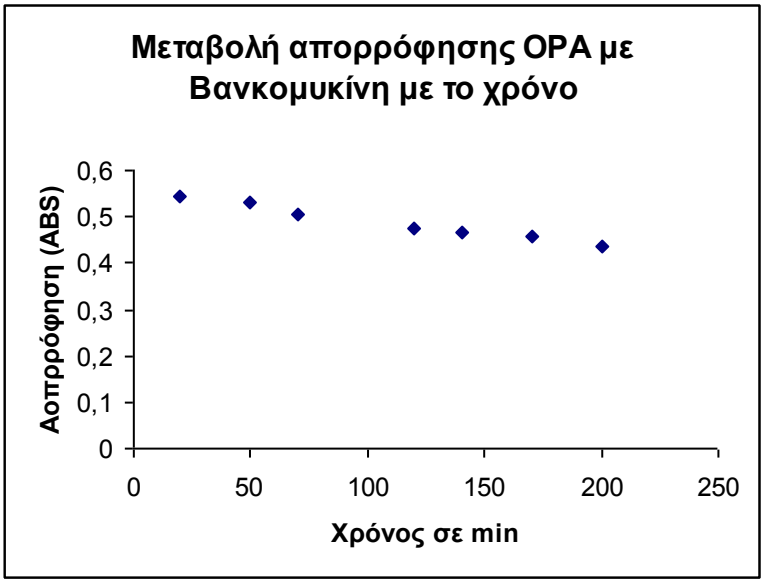
Σε υδατικό διάλυμα βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL προστέθηκε ίση ποσότητα διαλύματος OPA και μετά από είκοσι λεπτά (20 min) πραγματοποιήθηκε και ολοκληρώθηκε η αντίδραση μεταξύ του OPA και του αντιβιοτικού. Το διάλυμα αυτό φωτομετρήθηκε με το Hitachi (U-1800) από την περιοχή των 190nm μέχρι τα 400nm με ταχύτητα 200nm/min και προέκυψε η απεικόνιση από το φασματοφωτόμετρο για την βανκομυκίνη μαζί με το OPA που παριστάνεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του φάσματος απορρόφησης υδατικού διαλύματος βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με OPA

Το υδατικό διάλυμα βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με το OPA απορροφά σε μήκος κύματος 330nm. Από το διάγραμμα 13 της απορρόφησης του OPA με το υδατικό διάλυμα της βανκομυκίνης συγκέντρωσης 100μg/mL με το χρόνο, παρατηρούμε ότι μειώνεται σταδιακά η απορρόφηση του διαλύματος με την πάροδο του χρόνου και μετά τα 120 λεπτά η μείωση είναι μεγαλύτερη και συνεχόμενη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30



.

Διάγραμμα 13: Μεταβολή απορρόφησης υδατικού διαλύματος βανκομυκίνης 100μg/mL με OPA σε συνάρτηση με το χρόνο

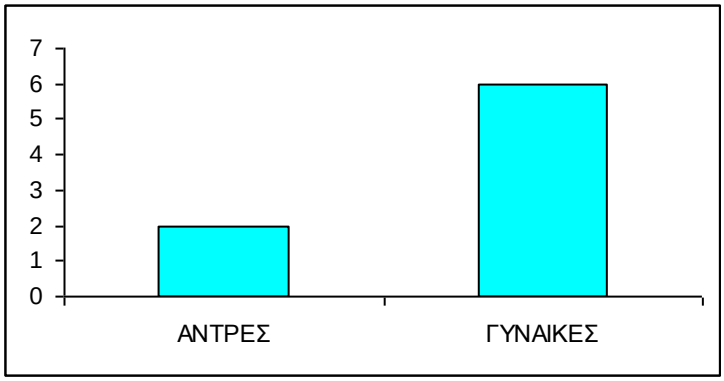
Επειδή η ουσία OPA φθορίζει και μεταβάλλει την απορρόφηση της με το χρόνο δεν μπορεί να αναλυθούν χρωματογραφικά τα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα με βανκομυκίνη με το μηχάνημα της υγρής χρωματογραφίασς που διαθέτει το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Αναλύθηκαν συνολικά 8 δείγματα από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπεδική Κλινική. Από τα δείγματα αυτά τα 6 αντιστοιχούσαν σε γυναίκες δηλαδή σε ποσοστό 75% επί των συνολικών δειγμάτων και τα 2 αντιστοιχούσαν σε άντρες δηλαδή ποσοστό 25% όπως παριστάνεται στο διάγραμμα 14.



Διάγραμμα 14: Ποσοστά δειγμάτων αίματος που λήφθηκαν από άντρες και γυναίκες και εξετάστηκαν-μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Κατηγοροποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση την περιοχή λήψης του δείγματος αίματος όπως φαίνεται στον πίνακα 35, καθώς και εξετάζοντας τη σχέση του βάρους του ασθενή με το ύψος του, δηλαδή με το δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ)όπως φαίνεται και στον πίνακα 36.

Πίνακας 35: Αριθμός δειγμάτων ανά περιοχή λήψης αίματος

Αριθμός Δειγμάτων Αίματος	**Περιοχή Λήψης Αίματος**		
	ΚΝΗΜΗ	ΜΗΡΟΣ	ΚΟΤΥΛΗ ΜΗΡΟΥ
	2	4	2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 36: Σωματικά χαρακτηριστικά ασθενών

Αριθμός δειγμάτων	Βάρος (Kg)	Ύψος (m)	Δείκτης Μάζας σώματος (ΔΜΖ)	Χαρακτηρισμός ατόμου
1	84	1.62	32.0	Παχύσαρκο
2	84	1.62	32.0	Παχύσαρκο
3	90	1.65	33.1	Παχύσαρκο
4	90	1.65	33.1	Παχύσαρκο
5	95	1.63	35.8	Παχύσαρκο
6	95	1.63	35.8	Παχύσαρκο
7	72	1.63	27.1	**Υπέρβαρο**
8	72	1.63	27.1	**Υπέρβαρο**

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

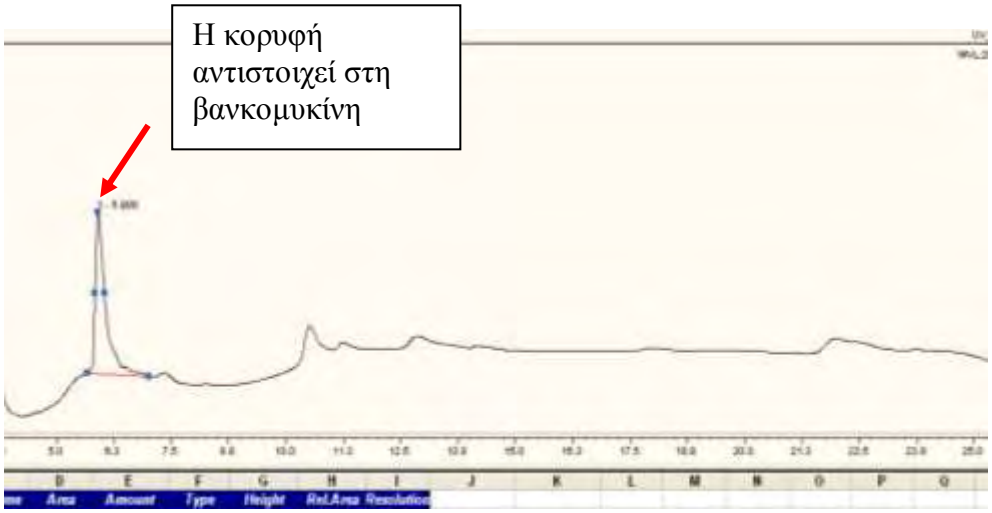
Για λόγους οικονομίας η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης και όχι με εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος με βανκομυκίνη. Προσδιορίστηκε ότι η ανταπόκριση των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος είναι κατά μέσο όρο 1.66 φορές μικρότερη από την ανταπόκριση των προτύπων διαλυμάτων της βανκομυκίνης. Επομένως ο αριθμός 1.66 αποτελεί τον συντελεστή διόρθωσης που χρησιμοποιείται για την αναγωγή των συγκεντρώσεων που βρίσκονται από την καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης σε πραγματικές συγκεντρώσεις πλάσματος. Ο συντελεστής αυτός προκύπτει, από απώλειες του φαρμάκου κατά τη επεξεργασία των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος με βανκομυκίνη.

Από την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων βρέθηκαν ότι στα δείγματα 1, 2, 3, 5, 6 και 7 η ποσότητα της βανκομυκίνης δεν μπορεί να προσσδιριστεί. Στο δείγμα 4 η ποσότητα της βανκομυκίνης βρέθηκε ότι είναι 3.63μg/mL, ενώ στο δείγμα 8 η συγκέντρωση της βανκομυκίνης ήταν 6.04 μg/mL όπως φαίνεται στον πίνακα 37 και το χρωματογράφημα του δείγματος 8 απεικονίζεται στο σχήμα 25. Οι συγκεντρώσεις αυτές προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου σε πρότυπα διαλύματα βανκομυκίνης που έγινε την ίδια μέρα και αφού πολλαπλασιάστηκαν με τον συνελεστή διόρθωσης που ισούται με 1.66.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Πίνακας 37: Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης δειγμάτων αίμτος ασθενών

Αριθμός δείγματος	Εμβαδόν χρ. Κορυφής (mAU*min 220nm)	Συγκέντρωση (μg/mL)	Περιοχή Λήψης Αίματος
4	1.0309	3.63	Μηρός
8	1.8300	6.04	Μηρός



Σχήμα 25: Χρωματογράφημα δείγματος ασθενούς στα 220nm (t_R=5,806min ο χρόνος έκλουσης και το φάσμα της κορυφής αντιστοιχούν στη βανκομυκίνη)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε η αναλυτική μεθοδολογία για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιβιοτικών φαρμάκων της βανκομυκίνης (Vancomycin) και της δαπτομυκίνης (Daptomycin) σε βιολογικά δείγματα.

- Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει στάδια απομόνωσης του φαρμάκου από το αρχικό δείγμα πλάσματος του ασθενή και επακόλουθη ποσοτική ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλή Απόδοσης HPLC-DAD.

- Οι διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν επιτρέπουν τόσο τον ποσοτικό προσδιορισμό της (συν)ολικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο πλάσμα, όσο και του ελεύθερου, μη συνδεδεμένου με τις πρωτεΐνες, κλάσματος του φαρμάκου.

- Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε έχει ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης (LOD) - 0,677μg/mL για τη βανκομυκίνη και 0,878μg/mL για τη δαπτομυκίνη -, όρια ποσοτικού προδιορισμού (LOQ) - 2,257μg/mL για τη βανκομυκίνη και 2,927μg/mL για τη δαπτομυκίνη -, υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα (99,68 ± 6,57 % για την βανκομυκίνη και 100,32 ± 4,81% για δαπτομυκίνη) και καλύπτει όλο το αναμενόμενο θεραπευτικό εύρος των συγκεντρώσεων της βανκομυκίνης και της δαπτομυκίνης στο πλάσμα των ασθενών που λαμβάνουν τα προαναφερόμενα αντιβιοτικά.

- Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε δοκιμαστικά σε δείγματα ασθενών και είναι κατάλληλη για ευρεία εφαρμογή στην παρακολούθηση των επιπέδων της βανκομυκίνης και της δαπταμυκίνης με τελικό στόχο να συμβάλλει στην αποδοτικότητα της θεραπείας με τα προαναφερόμενα αντιβιοτικά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

Reference List

[1] Θεοχαρίδης Θ.Κ. Φαρμακολογία βασικές έννοιες στην κλινική πράξη. Ιατρικές Εκδόσεις Λιτσας ed. 2001.

[2] Tortora G, Funke B, Case C. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. 2009.

[3] Grahame-Smith D.G., Aronson J.K. Κλινική Φαρμακολογία Φαρμακοθεραπεία. Πανεπιστήμιο Οξφόρδης 2η έκδοση ed. 2001.

[4] Madigan M, Martinko J, Parker J. Βιολογία των Μικροοργανισμών. 2005.

[5] Donald P. Vancomycin:A History. Clin Infect Dis 42 ed. 2006.

[6] Moellering RJ. Vancomycin A 50-Year reassessment. Clin Infect Dis 42 ed. 2006.

[7] Griffith RS. Introduction to vancomycin. Rev Infect dis 3 ed. 21981.

[8] Page MI. The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactams. Curr Pharm 1999.

[9] Furuta I, Kitahashi T. [Glycopeptides (vancomycin, teicoplanin)]. Nihon Rinsho 2004;62 Suppl 12:423-6.

[10] Filburn BH, Shull VH, Tempera YM, et al. Evaluation of an automated fluorescence polarization immunoassay for vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 1983;24:216-20.

[11] Rybak MJ, Abate BJ, Kang SL, et al. Prospective evalyation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity. Antimicrob Agents Chemother ed. 1999.

[12] Linehan CM, Gioe T. Serum and breast milk levels of PMMA following surgeon exposure during arthropalsty. JBJS Am ed. 2006.

[13] Faber BF, Moellering RC Jr. Retrospective study of the toxicity of preparations of vancomycin from 1974 to 1981. Antimicrob Agents Chemother 23 ed. 1983.

[14] Drygalski A, Curtis BR. Vancomycin - Induced Immune Thrombocytopenia. N Engl Med 356 ed. 2007.

[15] Mueller BA, Scott MK, Clark WR. More information on vancomycin clearance by new hemodialysis membranes. Am J Health Syst Pharm 1996;53:1339-40, 1348.

[16] Smith RW, Alksne JF. Infections complicating the use of external ventriculostomy. J Neurosurg 44 ed. 1976.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

[17] Moellering RJ. Monitoring serum vancomycin levels: climbing the mountain because it is there? Clin Infect Dis ed. 1994.

[18] Karam CM, Mc Kinnon PS, Neuhauser MM, et al. Outcome assessment of minimizing vancomycin monitoring and dosing adjustments. Pharmacotherapy ed. 1999.

[19] Berthoin K., Ampe Els, Tulkens P., et al. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. 2009.

[20] Butterfield J, Patel N, Pai M., et al. Refining Vancomycin Protein Binding Estimates Identification of clinical factors that influence protein binding. 2011.

[21] Polillo M, Tascini C, Lastella M, et al. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma. Ther Drug Monit 2010;32:200-5.

[22] Amsden GW, Ballow CH, Bertino JS Jr, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents. 7th edition. ; ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier 2010.

[23] Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am ; 2009.

[24] Brunton LL, Lazo JS, ParkerKL. The dynamics of drug absorption, distribution,metabolism and elimination. 11th edition. McGraw-Hill; ed. **New York:** 6 A.D.

[25] Rouan MC. Antibiotic monitoring in body fluids. J Chromatogr 1985;340:361-400.

[26] Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. 2 ed. 1998.

[27] Andes D, Craig WA. Understanding pharmacokinetics and pharmacodynamics:application to the antimicrobial formulary decision process. New York 2005.

[28] Luer MS, Neill KK, Gurley BJ, et al. Fluctuations in vancomycin CNS tissue concentrations following intermittent and continuous infusions in the rat. Neurol Res 2004;26:312-5.

[29] Wu XJ, Zhang J, Yu JC, et al. Establishment of norvancomycin fluorescence polarization immunoassay for therapeutic drug monitoring. J Antibiot (Tokyo) 2011.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

[30] Somerville AL, Wright DH, Rotschafer JC. Implications of vancomycin degradation products on therapeutic drug monitoring in patients with end-stage renal disease. Pharmacotherapy 1999;19:702-7.

[31] Wenk M, Vozeh S, Follath F. Serum level monitoring of antibacterial drugs. A review. Clin Pharmacokinet 1984;9:475-92.

[32] Feferbaum R, Kobol Machado JK, de Albuquerque Diniz EM, et al. Vancomycin monitoring in term newborns: comparison of peak and trough serum concentrations determined by high performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2001;56:149-52.

[33] Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. 2 ed. 2009.

[34] Kitahashi T. [Antimicrobial drug therapy and microbial sensitivity tests--measurement of antibiotics concentration in body fluids]. Rinsho Byori 1997;Suppl 105:196-202.

[35] Liu W, Dai YC, Deng N, et al. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the determination of venlafaxine enantiomers and application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. Biomed Chromatogr 2011;25:412-6.

[36] Berthoin K, Ampe E, Tulkens PM, et al. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. Int J Antimicrob Agents 2009;34:555-60.

[37] Crowther R John. The Elisa Guidebook, Method in Molecular Biology. Second ed. 2012.

[38] Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmacentical scientists. New York 2007.

[39] Χατζηιωάννου Θ.Π., Κουππάρη Μ.Α. Ενόργανη Ανάλυση. Αθήνα 2003.

[40] Δεληγιαννάκης Ι, Χελλά Δημ, Κωνσταντίνου Ι. Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση. ed. Θεσσαλονίκη 2010.

[41] Poole C.F. The Essence of Chromatografhy. 2003.

[42] ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ Ι.Ν, ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ Β.Φ. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ. ΠΗΓΑΣΟΣ ed. 2003.

[43] Jandera P., Novotna K. Analytical Letters 2006;2095.

[44] Dorsey J, Cooper W.T. Anal.Chem. 66 (1994) 857A. 1994.

[45] Poole C.F. The Essence of Chromatography. 2003.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

[46] Gennaro M, Angelino S. J. Chromatogr. A . New York 1997.

[47] Mant C., Hodges R. *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins : Separation, Analysis and Conformation*. 2002.

[48] Παπαδογιάννης I.N, Σαμανίδου Β.Φ. Ενόργανη Χημική Ανάλυση. ΠΗΓΑΣΟΣ ed. 2003.

[49] Liu W, Dai YC, Deng N, et al. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the determination of venlafaxine enantiomers and application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. Biomed Chromatogr 2011;25:412-6.

[50] Lopez KJ, Bertoluci DF, Vicente KM, et al. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;860:241-5.

[51] Tanaka M, Orii T, Gomi T, et al. Clinical estimation of vancomycin measurement method on hemodialysis patient. Yakugaku Zasshi 2002;122:269-75.

[52] Tortora J.G. Ανατομία του Ανθρώπινου Σώματος. 7 ed. Αθήνα 2001.

[53] Αποστολάκης Μ. Στοιχεία Φυσιολογίας του Ανθρώπου. Τόμος Α ed. Θεσσαλονίκη 1991.

[54] Khalid Hamad, Abu-Shandi. Determination of vancomycin in human plasma using high – performance liquid chromatography with fluorescence detection. 2009.

[55] motes-Mainard F, Labat L, Vincon G, et al. Column-switching high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in serum. Ther Drug Monit 1994;16:293-7.

[56] Li L, Miles MV, Hall W, et al. An improved micromethod for vancomycin determination by high-performance liquid chromatography. Ther Drug Monit 1995;17:366-70.

[57] Jehl F, Gallion C, Thierry RC, et al. Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography. Antimicrob Agents Chemother 1985;27:503-7.

[58] Kazakevich Y, LoBrutto R. Normal-phase chromatography (NP HPLC). New York: John Wiley & Sons Inc 2007.

[59] Koupparis M. Validation of analytical methods. Athens 2002.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30

ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Επώνυμο:

Όνομα:

Ηλικία:

Βάρος ασθενούς: Ύψος ασθενούς:

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Κλινική που νοσηλεύεται:

Νόσημα:

Φάρμακο που λαμβάνει: Δόση φαρμάκου:

Αριθμός δόσεων / ημέρα:

Ημέρες που λαμβάνει την φαρμακευτική αγωγή:

Αριθμός δόσεων φαρμάκου βανκομυκίνης που έχουν χορηγηθεί:

Λήψη άλλων φαρμάκων:

ΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ

Αίμα: Ποσότητα αίματος:

Περιοχή λήψης του αίματος:

Ημερομηνία παραλαβής πλάσματος:

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΣΧΟΛΙΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/09/2024 01:20:52 EEST - 3.137.218.30