ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ&ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΑΡΡΗ ΑΝΝΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ HPLC-FLD ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων
ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΑΚΑΛΩΦ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη **3**

Θεωρητικό μέρος **4**

1.Αντιβιοτικα 5

1.1 Κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών 5

2.Κολιστινη **9**

2.1 Ανακάλυψη της κολιστινης 9

2.2 Χημική δομή και χημικά χαρακτηριστικά της κολιστινης..... 10

2.3 Μηχανισμός δράσης 12

2.4 Κλινικές χρήσεις & ανάγκη παρακολούθησης της κολιστινης 14

3**. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού**..... 15

3.1. Υγρή χρωματογραφία 16

3.2. Φθορισμούς 16

3.2.1Ανιχνευτής Φθορισμού 17

3.2.2. Προσδιορισμός του βέλτιστου μήκους κύματος εκπομπής και διέγερσης 24

3.3. Ευαισθησία ανιχνευτή φθορισμού 26

4. **Τεχνολογία συμπαγούς πυρήνα(Core-shell)** **28**

5. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-Προσδιορισμός κολιστινης με την χρήση υγρής χρωματογραφίας & ανιχνευτή φθορισμού..... 30

Πειραματικό μέρος..... 34

Αντιδραστήρια-Όργανα-Συσκευές..... 35

1.Παραγωγοποιήση της κολιστίνης με φθορίζοντα ιχνηθέτη..... 37

1.1. Παραγωγοποιήση της κολιστίνης στο διάλυμα χωρίς την απομόνωση του παραγωγοποιημένου προϊόντος..... 38

a)Επίδραση του χρόνου αντίδρασης..... 40

b)Επίδραση θερμοκρασίας αντίδρασης..... 40

c)Επίδραση της προσθήκης γλυκίνης στην αντίδραση..... 41

1.2Παραγωγοποιήση σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και απομόνωση της παραγωγοποιημένης κολιστίνης 42

2. Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC-FLD 43

2.1. Ισοκρατική έκλουση 43

2.2. Βαθμιδωτή έκλουση 46

2.2.1 Κατασκευή καμπυλών αναφοράς..... 48

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

3. **Επιλογή διαφορετικού παραγωγοποιητή ……51**

4. Αλλαγή Χρωματογραφικής Στήλης(Πυρήνα-κελύφους/Core shell)……53

5. Εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου……..55

6. Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις……....57

Βιβλιογραφία……59

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό που συχνά αναφέρεται ως αντιβιοτικό έσχατής ανάγκης (last-resort antibiotic) που εφαρμόζεται για την καταπολέμηση πολυανθεκτικών Gram(-) βακτηρίων. Λόγω της νευροτοξικότητας και νεφροτοξικότητας του φαρμάκου είναι σημαντική η παρακολούθηση της στάθμης του στο πλάσμα του ασθενή για την σωστή προσαρμογή της δόσης.

Η ερευνητική αυτή εργασία αφιερώθηκε στην ανάπτυξη μεθοδολογίας χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κολιστίνης στο πλάσμα των ασθενών. Διερευνηθήκαν διαφορετικές προσεγγίσεις για την παραγωγοποίηση του φαρμάκου με φθορίζοντα ιχνηθέτη και αποδείχθηκαν καλύτερα αποτελέσματα με την χρήση της Όρθο-φθαλαλδεϋδης (OPA).Για τον καθορισμό των παραγόντων χρησιμοποιήθηκε τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) ενώ ο βέλτιστος χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη χρήση της χρωματογραφικής στήλης τεχνολογίας πυρήνας-κέλυφος (core-shell) C18 2.6u 10cm x 300mm με βαθμιδωτή έκλουση με σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο:νερό:τετραϋδροφουράνιο.

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Τοξικολογίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσακάλωφ.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Ανδρέα Τσακάλωφ για την ερευνητική καθοδήγηση του, την κ. Μαρίνα Χατζηνίκου και τον κ. Δημήτρη Γκαγτζή για την βοήθεια τους σε όλη την διάρκεια της πραγμάτωσης των πειραμάτων μου, καθώς και τους γονείς και τους φίλους μου για τη στήριξη, εμπιστοσύνη, αγάπη, ηθική και υλική συμπαράσταση που δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

1. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα αντιβιοτικά-επίσης γνωστά με τον όρο αντιμικροβιακά-είναι μια κατηγορία φαρμάκων για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριάκων λοιμώξεων. Έχουν τη δυνατότητα να καταστρέφουν (βακτηριολυτικά) ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων (βακτηριοστατικά). Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια όπως η σύφιλη, η φυματίωση, η σαλμονέλα και ορισμένες μορφές μηνιγγίτιδας. Σε περιπτώσεις οπού το ανοσοποιητικό σύστημα δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τα συμπτώματα κάποιας ασθένειας κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση αντιβιοτικού. Το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε ήταν η πενικιλίνη στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ενώ ακολουθήσαν και τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη, αμοξικιλλίνη και βενζυλ-πενικιλλίνη.Απο τότε και μέχρι σήμερα ανθεκτικότητα των βακτηρίων έχει μεγαλώσει καθώς τα βακτήρια αλλάζουν και γίνονται πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων που προκαλουν. Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό κέντρο πρόληψης και ελέγχου νοσημάτων(ECDC European Centre for Disease Prevention and Control) η αντίσταση στα αντιβιοτικά εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρή απειλή για την δημοσιά υγειά σε όλο τον κόσμο. Σε μια δημοσίευση που έγινε το 2012,το ECDC ενημέρωσε ότι περίπου 25.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση από βακτηριακές λοιμώξεις που αδυνατούν να καταπολεμηθούν με αντιβιοτικά.[1]

1.1. Κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών

Τα περισσότερα αντιβιοτικά εμπίπτουν σε επιμέρους κατηγορίες. Μια κατηγορία αντιβιοτικών αποτελεί την ομαδοποίηση διαφορετικών φαρμάκων που έχουν παρόμοιες χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Ταυτόχρονα στην ιδιά κατηγορία ανήκουν φάρμακα των οποίων οι χημικές δομές είναι συγκρίσιμες καθώς και φάρμακα που ανήκουν στην ιδιά τάξη, δηλαδή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

σκοτώνουν ιδιά ή συναφή βακτήρια. Οι κυριότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών είναι οι εξής:

I. *Πενικιλίνες*

Ένα άλλο όνομα για αυτήν την κατηγορία είναι β-λακταμικά αντιβιοτικά, αναφερόμενα με τον συντακτικό τους τύπο. Η τάξη της πενικιλίνης περιέχει πέντε ομάδες αντιβιοτικών: αμινοπενικιλλίνες, αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες, αναστολείς β-λακταμάσης, φυσικές πενικιλίνες και ανθεκτικές πενικιλίνες.

II. *Τετρακυκλίνες*

Οι τετρακυκλίνες έχουν ένα ευρύ φάσμα εναντίον πολλών βακτηρίων και την θεραπεία παθήσεων όπως η ακμή, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις της εντερικής οδού, λοιμώξεις του οφθαλμού, σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων και άλλων βακτηριών μολύνσεων.

III. *Κεφαλοσπορίνες*

Υπάρχουν πέντε γενιές των κεφαλοσπορινών,η αύξηση των οποίων επεκτάθηκε ώστε να καλύπτει όλες τις λοιμώξεις των gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι κεφαλοσπορίνες χορηγούνται για θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού, του δέρματος, της αναπνευστικής οδού, των αυτιών, και μηνιγγίτιδας. Η πέμπτη γενιά κεφαλοσπορινών ceftaroline (Teflaro) είναι δραστική έναντι του Staphylococcus aureus.

IV. *Κινολόνες*

Οι κινολόνες ή φθοροκινολόνες είναι ένα συνθετικό βακτηριοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης. Οι κινολόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δύσκολες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, νοσοκομειακή πνευμονία, βακτηριακή προστατίτιδα,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

και ακόμη για άνθρακα ή πανώλη. Το 2016,ο FDA εξέδωσε μια ισχυρή προειδοποίηση για την κατηγορία αυτή.

V. *Λινκομυκίνες*

Αυτή η κατηγορία δρα εναντίον των gram-θετικών αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων, καθώς και σε ορισμένα gram-αρνητικά αναερόβια. Τα παράγωγα της λινκομυκίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία λοιμώξεων όπως η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, των οστών και των αρθρώσεων.

VI. *Μακρολίδες*

Οι μακρολίδες χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πνευμονίας ή επιλεγμένων λοιμώξεων του δέρματος. Παρόλα αυτά η βακτηριακή ανοχή στις μακρολίδες είναι μεγάλη γι αυτό σταδιακά αναπτύχθηκε μια νέα γενιά αντιβιοτικών, οι κετολίδες.

VII. Σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες είναι αποτελεσματικές έναντι μερικών gram-θετικών και πολλών gram-αρνητικών βακτηρίων, αλλά η αντίσταση των βακτηρίων σε αυτές είναι ευρέως διαδεδομένη. Κοινή χρήσεις για τις σουλφοναμίδες περιλαμβάνουν ουρολοιμώξεις, τη θεραπεία ή την πρόληψη της πνευμονίας και λοιμώξεις του αυτιού (μέση ωτίτιδα).

VIII. Γλυκοπεπτίδια

Μέλη αυτής της ομάδας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του σταφυλόκοκκου, επιλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και λοιμώξεις εντερόκοκκου, οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται με την χρήση β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

IX. *Αμινογλυκοσίδες*

Οι αμινογλυκοσίδες αναστέλλουν την βακτηριακή σύνθεση με την δέσμευση των 30S ριβοσωμάτων και ενεργούν ταχύτατα ως βακτηριοκτόνα. Η χορήγηση τους είναι συνήθως ενδοφλέβια.[2]

X. Πολυπεπτίδια

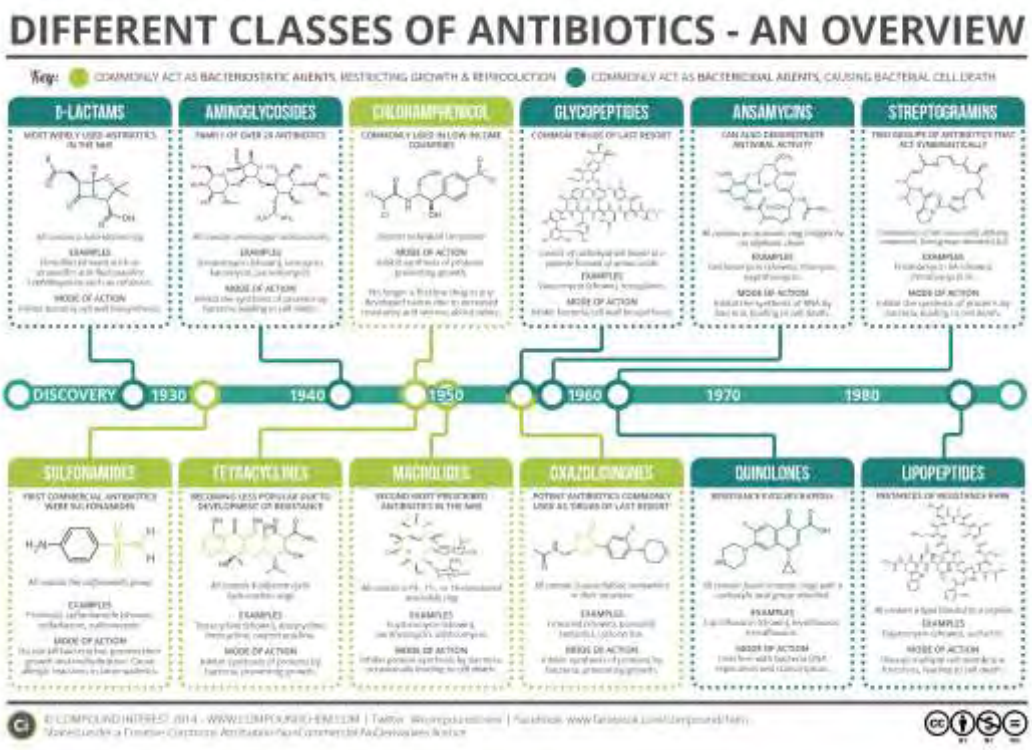
Τα πολυπεπτίδια δρουν κατά των gram-αρνητικών βακτηρίων διαταράσσοντας την κυτταρική τους μεμβρανη.[3]

Τέλος τα αντιβιοτικά χωρίζονται και σε δυο μεγάλες κατηγορίες στις οποίες περιέχονται όλα τα παραπάνω:

- **Βακτηριοκτόνα**: αντιμικροβιακά που προκαλούν ταχεία θανάτωση των παθογόνων μικροβίων σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις.
  Σε αυτά ανήκουν:
  β-λακταμικά αντιβιοτικά
  Γλυκοπεπτίδια
  Αμινογλυκοσίδες
  Κινολόνες
  Απαραίτητη η χορήγηση τους σε απειλητικές για το άτομο λοιμώξεις, π.χ. μηνιγγίτιδα.

- **Βακτηριοστατικά**: αντιμικροβιακά που προκαλούν αναστολή του πληθυσμού των παθογόνων μικροβίων σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις.
  Σε αυτά ανήκουν:
  Τετρακυκλίνες
  Μακρολίδες
  Λινκομυκινες
  Σουλφοναμίδες[4]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 1.1 Βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών και χρονοδιάγραμμα της ανακάλυψής τους.[26]

2. ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

2.1. Ανακάλυψη της κολιστίνης

Η κολιστίνη είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό το οποίο ανακαλύφθηκε το 1949. Παράγεται από τον αερόβιο μικροοργανισμό Bacillus Polymyxa, υποείδος Colistinus και ανήκει στην κατηγορία των πολυμιξινών.[5]Οι πολυμιξίνες είναι μια παλιά τάξη κυκλικών αντιβιοτικών πολυπεπτιδίων που απομονώθηκε το 1949 από το Bacillus polymyxa[6]. Πολυμιξίνη Β (PMB) και κολιστίνη(πολυμιξίνη Ε) είναι δευτερογενή μεταβολικά μη ριβοσωμικά πεπτίδια που παράγονται από τα βακτήρια του εδάφους P. Polymyxae. Η διαφορά των δυο αυτών ουσιών έγκειται στην 6η θέση της πεπτιδικής αλληλουχίας οπού στην κολιστίνη υπάρχει την D-Leu αντί για D-Phe που υπάρχει στην PMB.[7]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Η κολιστίνη έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των περισσοτέρων Gram (-) βακτηρίων όπως Escherichia coli, Acinetobacter baumanni, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, and Enterobacter sp και έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιψευδομοναδικό αντιβιοτικό από την δεκαετία του 1960. Η κολιστίνη,ειναι ένα αντιβιοτικό που είχε εγκαταληφθεί για πολλά χρόνια εξαιτίας της τοξικότητας της, και πρόσφατα επανεισήχθη στην κλινική πράξη λόγω της επικράτησης πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων και της έλλειψης νέων αντιβιοτικών. Εξαίρεση αποτελούσαν οι ασθενείς με κυστική ίνωση, στους οποίους η κολιστίνη αποτελούσε συχνά το μόνο διαθέσιμο αντιβιοτικό για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από πολυανθεκτική ψευδομονάδα.[7,8,16]

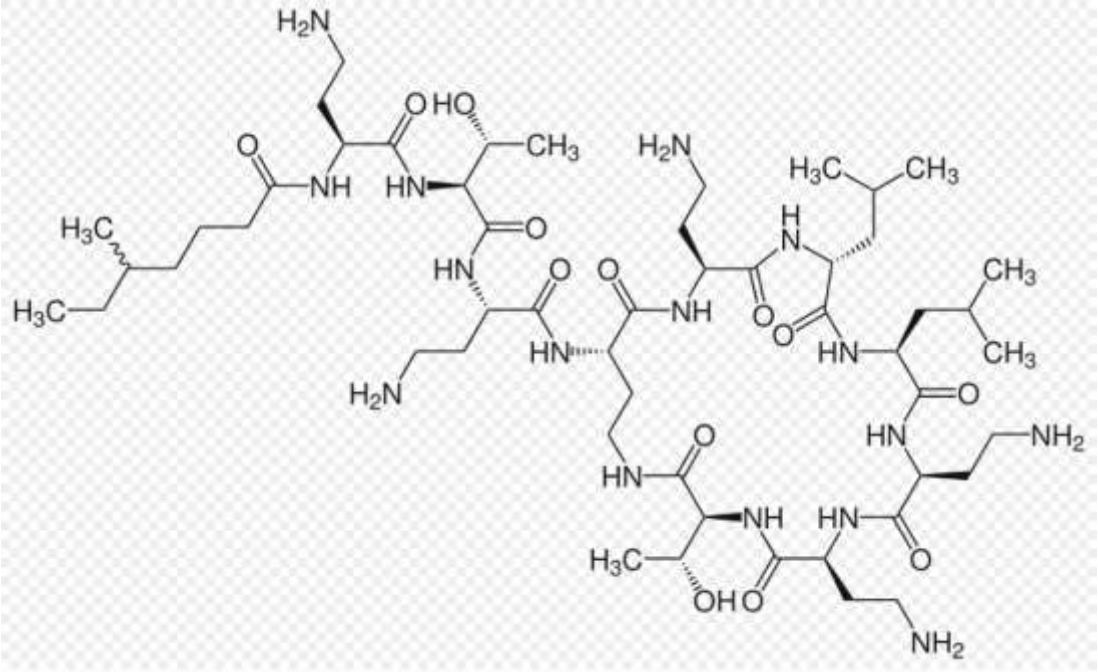
Ωστόσο λόγω της αύξησης της βακτηριακής αντίστασης και της ανάγκης αντιμετώπισης σοβαρών λοιμώξεων από P. Aeruginosa και A. Baumanii, η κολιστίνη χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως θεραπεία τελευταίας γραμμής ειδικά σε περιπτώσεις που επιτάσσεται εντατική θεραπεία. Το πρόβλημα με αυτήν την εκ νέου εισαγωγή είναι η εξέλιξη των τεχνικών αξιολόγησης των φαρμάκων από το 1960,και ως εκ τούτου οι μειωμένες γνώσεις για την σωστή δοσολογία που απαιτείται για την αποτελεσματική καταπολέμηση της λοίμωξης, περιορίζοντας ταυτόχρονα την πιθανότητα εμφάνισης αντίστασης από τα βακτήρια καθώς και τοξικές παρενέργειες.[2,5,15]

2.2. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ & ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ

Η κολιστίνη(εικόνα 2.1) αποτελείται από σύνθετο μείγμα 30 ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια δομή. Από τις 30 ενώσεις έχουν αναγνωριστεί μόνο 13. Συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο το οποίο φέρει μια πλευρική αλυσίδα, η οποία αποτελείται από 3 αμινοξέα και ένα λιπαρό οξύ ενωμένο στο αμινοτελικό άκρο της. Οι διαφορές αναμεσά στις πολυμιξίνες οφείλονται στα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

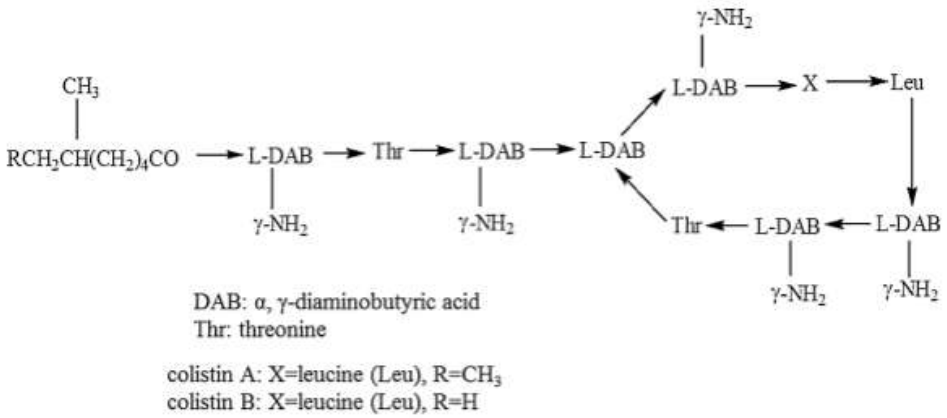
διαφορετικά αμινοξέα και στο διαφορετικό λιπαρό οξύ που αποτελούνται.[9,10]



Εικονα2.1.:Κολιστινη: N - [(2S) -4- αμινο- 1 - [[(2S, 3R) -1 - [[(2S) -4-αμινο- 1-οξο- 1 - [[(3S, 6S, 9S, 12S , 15R, 18S , 21S) -6,9,18 -τρις (2-αμινοαιθυλο) -3 - [(1 R) -1- υδροξυαιθυλο] -12,15 -δις (2 -μεθυλπροπυλ) -2,5,8,11 , 14,17,20 - επταοξο - 1,4,7,10,13,16,19 - heptazacyclotricos -21- υλ] αμινο] βουταν-2- υλ] αμινο] -3- υδροξυ-1- οξοβουταν -2- υλ] αμινο] -1- οξοβουταν -2-υλ] -5- μεθυλοεπταναμιδιο.(PubMed)

Χαρακτηριστικό των πολυμιξινών είναι η ύπαρξη τμημάτων α,γ-διαμινο-βουτυρικου οξέος και λιπόφιλου αμινοξέος D-λεύκινης.[5] Η κολιστίνη Α(πολυμιξίνη Ε1) και η κολιστίνη Β(πολυμιξίνη Ε2) είναι τα δυο κυριά συστατικά στο μείγμα σε ποσοστό που ξεπερνά το 85 %.Η αναλογία τους στα εμπορικά σκευάσματα κυμαίνεται από 3:1 έως 1:1 κολιστίνη Α προς κολιστίνη Β.[11] Η κολιστίνη Α φέρει 6-μεθυλοοκτανοικο οξύ και η κολιστίνη Β 6-μεθυλοεπτονοϊκο οξύ.(εικόνα 2.2).[12] Οι μορφές της κολιστίνη που διατίθενται στην αγορά είναι η θειική κολιστίνη για per os και τοπική χορήγηση και η μεθανοσουλφονικη κολιστίνη για παρεντερική και για από αναπνοής χορήγηση.[13]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 2.2:Χημικη δομή κολιστίνης A & κολιστίνης B[7]

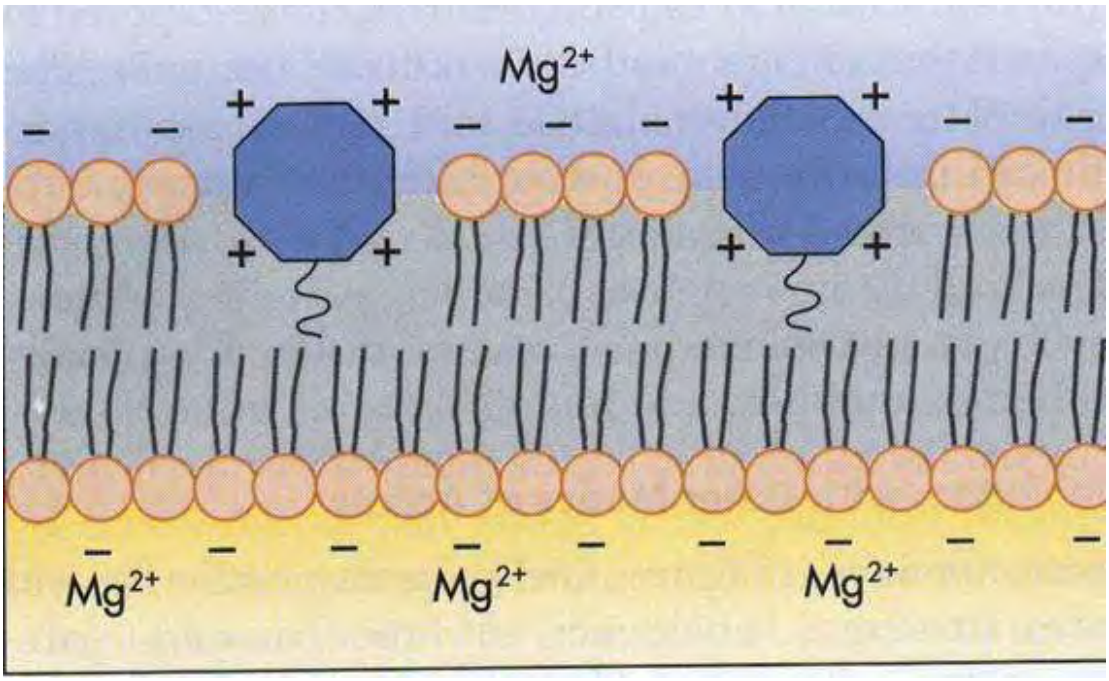
Η κολιστίνη κατανέμεται εξίσου καλά σε πολικό και μη πολικό περιβάλλον εξαιτίας των λιπόφιλων και των υδρόφιλων ομάδων που διαθέτει, με αποτέλεσμα η κατανομή της να είναι ικανοποιητική σε νερό(πολικό περιβάλλον) αλλά και σε προκαρυωτικές και ευκαρυωτικές μεμβράνες(μη πολικό περιβάλλον)[8]. Το λιπαρό οξύ της πλάγιας αλυσίδας είναι υπεύθυνο για τις λιπόφιλες ιδιότητες, ενώ οι πέντε ελεύθερες γ-αμινομάδες των μορίων του α,γ-διαμινοβουτυρικού οξέος είναι υπεύθυνες για τις υδροφιλικές ιδιότητες.[5]

2.3. Μηχανισμός δράσης

Η κολιστίνη δρα ως κατιοντικό απορρυπαντικό ή επιφανειοδραστικη ουσία. Αυτό οφείλεται στις υδρόφιλες θετικά φορτισμένες γ-αμινομαδες του α,γ-διαμινοβουτυρικου οξέος που παραμένουν ελεύθερες στο υδατικό περιβάλλον ενώ το λιποφιλο τμήμα της κολιστινης ενώνεται με τα φωσφολιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβίου. Η ευαισθησία των μικροβίων στην κολιστίνη αυξάνεται με τη αύξηση της περιεκτικότητας της μεμβράνης σε φωσφολιπιδια.Η ένωση της κολιστινης με την εξωτερική στιβάδα των μικροβίων είναι μη ειδική και στηρίζεται αφενός στο ηλεκτροθετικό της φορτίο και αφετέρου στο ηλεκτροαρνητικό φορτίο των gram- αρνητικών μικροβίων. Βρέθηκε ότι ο υποδοχέας της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχωματος,για την μη ειδική συνδεση,βρισκεται στο μόριο των λιποσακχαριτών και συγκεκριμένα στο λιποειδές Α ή στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

εσώτατο μέρος του κορμού της πολυσακχαρικής αλυσιδας.[5] Η περιοχή αυτή φέρει πολλά ιόντα φωσφόρου και καλείται «θέση μαγνησίου» επειδή στα μόρια των πολυσακχαριτών οι θέσεις αυτές είναι συνδεδεμένες με ιόντα μαγνησίου.Με τον τρόπο αυτό στα gram- αρνητικά μικρόβια τα παρακείμενα μόρια των λιποπολυσακχαριτων ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες μαγνησίου που εκτείνονται μεταξύ των φωσφορικών ομάδων. Η κολιστίνη με το θετικό φορτίο που φέρει εκτοπίζει τα ιόντα του μαγνησίου από τις θέσεις αυτές και παρεμβάλλεται μεταξύ των μορίων των πολυσακχαριτών διαταράσσοντας την συνοχή και την διαπερατότητα της μεμβράνης. Στην συνέχεια αφού διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη, προσδένεται στην αρνητικά φορτισμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή λέγεται αυτοπροαγόμενη οδός.(self-promoted pathway). Αποτέλεσμα είναι να εξέρχονται από το κύτταρο πολύτιμα ενδοκυττάρια συστατικά και να ακολουθεί ο θάνατος του βακτηριου.[14]



Εικόνα 2.3:Αντιμικροβιακος τρόπος δράσης της κολιστινης κατά των gram αρνητικών βακτηρίων-LPS:Λιποπολυσακχαριτης[14]

Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί και τον λόγο για τον οποίο η κολιστίνη όπως και όλες οι άλλες πολυμιξινες δεν δρουν εναντίον των Gram θετικών βακτηρίων αφού αυτά δεν έχουν λιποπολυσακχαρίτες. Επίσης εξηγείται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

και η μεγαλύτερη δραστικότητα της κολιστινης για τον pseudomonas aeruginosa, καθώς οι λιποπολυσακχαρίτες αυτού του μικροοργανισμού έχουν πολλές θέσεις μαγνησίου σε σύγκριση με αλλά Gram αρνητικά μικροβια.[13]Παραλληλα έχει αναφερθεί ότι τα δισθενή καίοντα μαγνησίου και ασβεστίου δρουν ανταγωνιστικά με την κολιστινη[5]

2.4. Κλινικές χρήσεις και ανάγκη παρακολούθησης της κολιστινης

Για παρεντερική χρήση, η κολιστίνη χορηγείται ως μεθανοσουλφονική κολιστίνη ή CMS.Η χρήση της μεθανοσουλφονικής κολιστινης ξεκίνησε στην δεκαετία του 1990 και χορηγήθηκε ενδοφλεβίως ή μέσω της αναπνοής σε παιδιά και ενήλικες που έπασχαν από κυστική ίνωση και είχαν προσβληθεί από βακτήρια, όπως το P.aeruginosa που παρουσίαζε πολλαπλή αντίσταση σε φάρμακα.

Πρόσφατα η μεγαλύτερη μελέτη για την χρήση της ενδοφλέβιας κολιστινης, έδειξε ότι η κολιστίνη είναι πολύτιμο αντιβιοτικό με αποδεκτή νεφροτοξικότητα και σημαντική αποτελεσματικότητα η οποία εξαρτάται από την ημερήσια δοσολογία και το βαθμό της μόλυνσης. Αυτή η μελέτη αναφέρει την εξέταση 258 ασθενών, στους οποίους χορηγούνται η κολιστίνη για τουλάχιστον 72 ώρες. Συνολικά 79,1 % των ασθενών θεραπευτήκαν ενώ νεφροτοξικότητα παρουσίασε μόλις το 10%.[17]

Η κολιστίνη έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την θεραπεία ενός είδους πνευμονίας(ventilator-associated pneumonia) και βακτηριαιμίας που προκαλείται από βακτήρια που παρουσιάζουν πολλαπλή αντίσταση. Σε μελέτη ασθενών με πνευμονία οπού είχαν προσβληθεί από το βακτήριο A. Baumanii,υπήρξε θεραπεία στο 57% του πληθυσμού, ύστερα από χορήγηση της κολιστινης. Ενώ παράλληλα άλλη μια μελέτη για τον καθορισμό της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της κολιστινης έδωσε ευνοϊκή απόκριση στο 75% των ασθενών που συμμετείχαν σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

αυτήν, σημειώνοντας κανένας από τους ασθενείς δεν εμφάνισε νεφρική ανεπάρκεια.

Τέλος μελέτες έχουν σχετίσει την κολιστίνη με την θεραπεία εγκαυμάτων, την θεραπεία κοίλων του εγκέφαλου λόγω της προσβολής από το βακτήριο A. Baumanii και την θεραπεία λοιμώξεων, από βακτήρια που παρουσιάζουν πολλαπλή αντίσταση, σε καρκινοπαθεις[15]

Παρόλα τα οφέλη που μπορεί να αποφέρει η χορήγηση της κολιστινης λόγω της πιθανότητας εμφάνισης νευροτοξικότητας και νεφροτοξικότητας χρειάζεται η παρακολούθηση των επιπέδων της κολιστινης στον ορό του αίματος, ώστε να προσαρμοστεί η δόση της. Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών προτύπων (CLSI) η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της κολιστινης για τα gram-αρνητικά βακτήρια που προσβάλλει είναι μικρότερη του 2mg/L.Η προτεινομένη συγκέντρωση της κολιστινης στο αίμα κυμαίνεται από 1 έως 5μg/ml Ωστόσο, η δοσολογία δεν είναι ακόμη σαφής για ορισμένους ειδικούς πληθυσμούς ασθενών, όπως ασθενείς τελικού σταδίου νεφρικής νόσου, και πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των κολιστίνης σε αυτούς τους πληθυσμούς ασθενών. Λόγω της νευροτοξικότητας και της νεφροτοξικότητας της κολιστινης είναι σημαντικό να προσδιοριστών τα επίπεδο δόσεων στο αίμα. Υπάρχουν αρκετές αναλυτικές μέθοδοι που έχουν συσταθεί για την ανάλυση της κολιστινης. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν:

- την ένζυμο-ανοσο δοκιμασία
- τη μικροβιολογική ανάλυση
- την υψηλής απόδοσης ανίχνευση υγρής χρωματογραφίας-φθορισμού (HPLC-FLD)
- την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση(CE)-επαγόμενη από λέιζερ φθορισμό (LIF)
- την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS).

Παρά το γεγονός ότι, η LC-MS παρέχει υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα, εξακολουθεί να είναι μια ακριβή αναλυτική πλατφόρμα και μπορεί να μην είναι διαθέσιμη σε πολλά εργαστήρια. Η μέθοδος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

HPLC-FLD που αναπτύχθηκε έχει εφαρμοστεί ευρέως για την ανάλυση των κολιστίνη. Ωστόσο, οι προκαταρκτικές μελέτες μας αποκάλυψαν ότι η έλλειψη επιλεκτικότητας σε αυτή τη μέθοδο μπορεί να αυξήσει το σφάλμα ποσοτικοποίησης.[16]

3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού

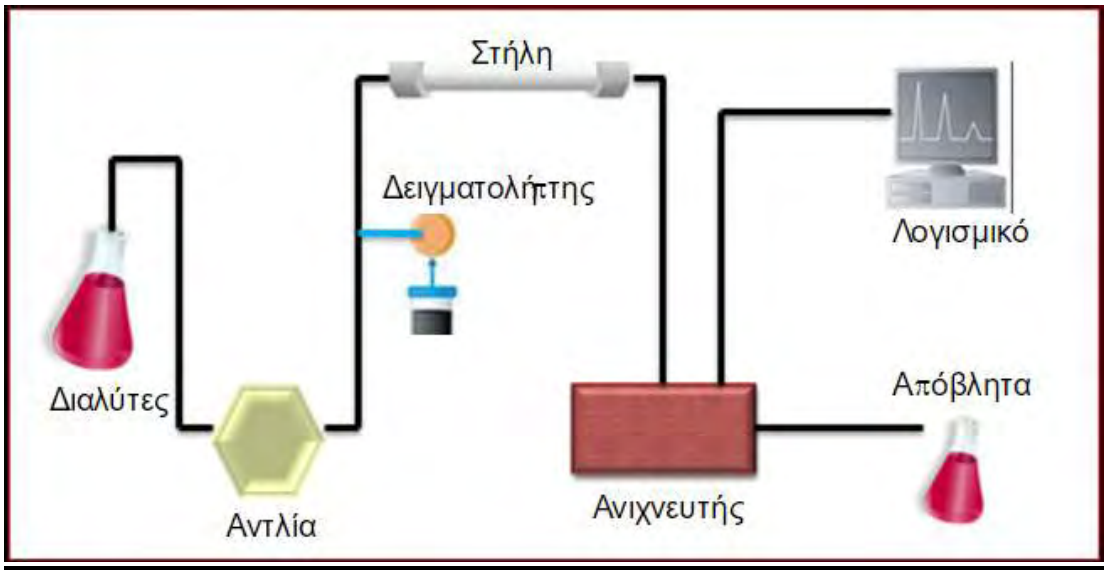
3.1. Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία αποτελεί την εξέλιξη της κλασσικής χρωματογραφίας είναι μια διαχωριστική τεχνική που διαχωρίζει το αρχικό μείγμα στα επιμέρους συστατικά βάση άνισης κατανομής τους μεταξύ μιας κινητής και ακίνητης φάσης που βρίσκονται στην χρωματογραφική στήλη. Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά μετακινούνται με την μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης, να βγαίνουν σε διαφορετικό χρόνο από την χρωματογραφική στήλη και ανιχνεύονται με κατάλληλο ανιχνευτή. Στο σχήμα 3.1 απεικονίζεται γενική διάταξη ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η κινητή φάση (ο διαλυτής) προωθείται με την βοήθεια της αντλίας υψηλής πίεσης ενώ το δείγμα μας εισάγεται μέσω αυτομάτου δειγματοληπτη. Το δείγμα συμπαρασύρεται από τον διαλυτή και τα συστατικά του μετακινούνται μέσα στην στήλη με την μορφή ζωνών και τελικά εκλούονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φασης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στηλης. Κάθε συστατικό δίνει ένα σήμα στον ανιχνευτή που εμφανίζεται ως κορυφή μέσω ενός λογισμικου. Επιπλέον υπάρχει και μια έξοδος αποβλήτων οπού εκεί καταλήγουν όλες οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

ουσίες και οι φάσεις που έχουν περάσει μέσα από το σύστημα μας. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Ο χρόνος ανάλυσης με την τεχνική της HPLC είναι συνήθως μικρός, της τάξης των μερικών λεπτών, γεγονός το οποίο εξαρτάται από την σύσταση του μείγματος, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της είναι πολύ καλές.

Γενικά η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφίες τεχνικές. Για τον λόγο αυτό με την πάροδο του χρόνου η τεχνική αυτή έχει συζευχθεί με νέα είδη ανιχνευτών όπως ορατού-υπεριώδους, παράταξης φωτοδιοδίων, φθορισμού, ηλεκτροχημικούς, κ.α.[22]



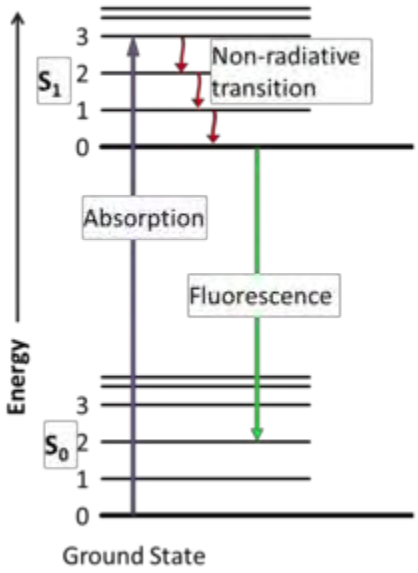
Εικόνα 3.1:Αναπαρασταση της γενικής διάταξης της υγρής χρωματογραφίας

3.2. ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση φωτονίων δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, συνήθως με τη μορφή θερμότητας αλλά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας η οποία χαρακτηρίζεται με τον γενικό όρο φωταύγεια.Η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός όταν η εκπομπή γίνεται σε χρόνο 10^{-9}-10^{-6} sec μετά τη διέγερση και ως φωσφορισμός όταν μεσολαβεί καθυστέρηση 10^{-4}-10 sec.Το στάδιο φωτοδιέγερσης του μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου ακολουθεί η αποβολή ενέργειας και επαναφορά των διεγερμένων ηλεκτρονίων στη βασική κατάσταση.Αυτη ακριβώς η ενέργεια είναι που κάνει τα μόρια να φθορίζουν.



Εικόνα 3.2:Ενεργειακες στάθμες και μεταπτώσεις μορίου φθορίζουσας ενώσεως. Το στάδιο S_0 αποτελεί την βασική κατάσταση ενώ το S_1 την διεγερμένη.

Το μήκος κύματος διέγερσης εκφράζει το σύνολο των φωτονίων που μπορούν να διεγείρουν το μόριο μας από την βασική στην διεγερμένη κατάσταση, ενώ το μήκος κύματος εκπομπής, το σύνολο των μηκών κύματος των φωτονίων όταν αυτό εκπέμπουν, δηλαδή όταν διεγειρονται.[23]

Κάποιοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την απόδοση του φθορισμού είναι

- ✓ *Η δομή των ουσιών*:
  - ουσίες με μεγάλη ακαμψία στο μόριο του εμφανίζουν το φαινόμενο του φθορισμού. παράδειγμα αποτελούν οι ενώσεις με αρωματικούς πυρήνες ή οι ενώσεις με πολλαπλούς συζυγιακούς δεσμούς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

- Οι ηλεκτρονιοδότες(-NH_2,-OH),αυξάνουν τον φθορισμό, ενώ οι ηλεκτρονιοφιλες ομάδες μειώνουν η εξαλείφουν τον φθορισμό

- ✓ *Διαλυτές:* Η πολικότητα και το ιξώδες του διαλυτή αυξάνουν την ένταση του φθορισμού.
- ✓ *pH:* Επιδρά στο φορτίο του χρωμοφόρου και φθορίζει μια από τις δυο μορφές π.χ. η ανιλίνη φθορίζει σε pH 7-12 (μη φορτισμένο μόριο) και δεν φθορίζει σε pH 2 (κατιονικό μόριο)
- ✓ *Θερμοκρασία:* Αύξηση της θερμότητας συνεπάγεται μείωση του φθορισμού, καθώς αυξάνονται οι συγκρούσεις των μορίων και αποδιεγείρονται με έκλυση θερμότητας.
- ✓ *Οξυγόνο: Προκαλεί άμεση οξείδωση φθορίζουσας ουσίας σε μη φθορίζον προϊόν*
- ✓ *Συγκέντρωση: Σε διαλύματα μεγάλης συγκέντρωσης εμφανίζεται μεγάλη ένταση φθορισμού, έως ένα σημείο κορεσμού οπού δεν υπάρχει άλλη αύξηση.*[24]

3.2.1. Ανιχνευτής Φθορισμού

Ο ανιχνευτής φθορισμού αποτελεί σήμερα την πιο ευαίσθητη κατηγορία ανιχνευτή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην HPLC.Είναι δυνατόν να ανιχνεύσει ακόμη και την παρουσία ενός απλού μορίου του αναλυτή στην κυψέλη ροής.[17] Η ευαισθησία του ανιχνευτή φθορισμού είναι 10-1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ανιχνευτή UV,ενώ η εκλεκτικότητα του υπερέχει μεταξύ των άλλων ανιχνευτών. Ο ανιχνευτής φθορισμού εμφανίζει μεγάλη επιλεκτικότητα και μεγάλη πειραματική ευελιξία, καθώς έχει δυο είδη φασμάτων. Πέρα όμως από τα παραπάνω πλεονεκτήματα, ο ανιχνευτής φθορισμού μειονεκτεί ως προς την ακρίβεια, η οποία είναι σχετικά μικρή, την εμφάνιση ανεπιθύμητων επιδράσεων μεταξύ των διεγερμένων μορίων, καθώς και τον περιορισμένο αριθμό ουσιών που μπορούν να φθορίσουν και έτσι να ανιχνευτούν από τον ανιχνευτή αυτό.[22]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

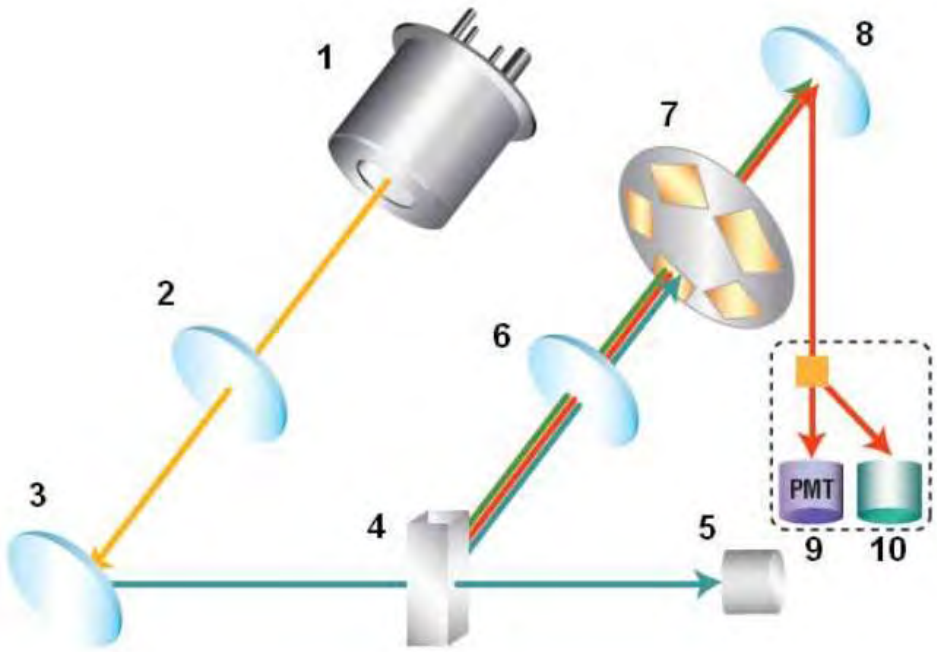
Περίπου το 15% των υπαρχουσών ενώσεων έχουν έναν φυσικό φθορισμό. Η παρουσία του συζευγμένου pi-ηλεκτρονίου, ειδικά στις αρωματικές ενώσεις δίνει την πιο έντονη φθορίζουσα δραστηριότητα. Άλλες ουσίες οι οποίες φθορίζουν, αλλά λιγότερο, είναι αλειφατικές και αλεικυκλικές ενώσεις με ομάδες καρβονυλίου, καθώς και οι ενώσεις με συζευγμένους διπλούς δεσμούς. Για την ανίχνευση των υπολοίπων ουσιών πρέπει να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση με κάποια ουσία η οποία προσδενόμενη στο χημικό μόριο θα φθορίζει.

Η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης της εκπομπής, επιτρέποντας την επιλεκτική ανίχνευση κάποιων ουσιών, ενώ καταστέλλει την εκπομπή των άλλων. Κάθε ουσία ανιχνεύεται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής. [21]

Ο ανιχνευτής φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι ένα όργανο υψηλής ποιότητας σχεδιασμένο για την ανάλυση HPLC ως μέρος του ULTIMATE 3000 συστήματος

Εικόνα 3.3:Απεικόνιση ανιχνευτή φθορισμού της Dionex

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 3.4.:Διάταξη του ανιχνευτή φθορισμού ο οποίος αποτελείται:

1. Λάμπα ξένου (Xenon lamp)
2. Οπτικό σύστημα λάμπας (Lamp optics)
3. Μονοχρωμάτορας διέγερσης (Excitation monochromator)
4. Κυψέλη ροής (Flow cell)
5. Ανιχνευτής αναφοράς (Reference detector)
6. Σύστημα οπτικής εκπομπής (Emission optics)
7. Τροχός φίλτρων (Filter wheel)
8. Μονοχρωμάτορας εκπομπής (Emission monochromator)
9. Φωτοπολλαπλασιαστής (Photomultiplier tube (PMT))
10. Δεύτερος προαιρετικός κόκκινο-ευαίσθητος φωτοπολλαπλασιαστής. (Second optional red-sensitive photomultiplier tube).

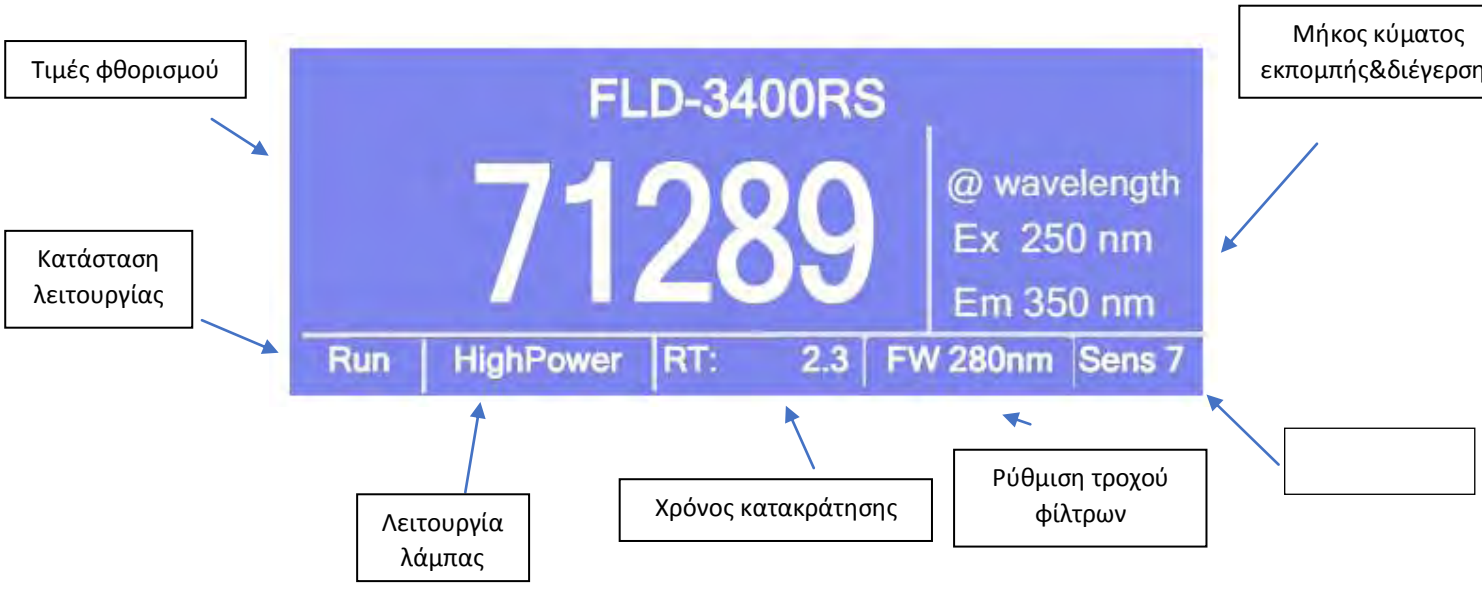
Οι αρχές λειτουργίας του συγκεκριμένου συστήματος έχουν ως εξής: Η ακτινοβολία εκπέμπεται από μια πηγή φωτός(λάμπα ξένου),περνάει από το οπτικό σύστημα της λάμπας και εν συνέχεια από το μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος επιτρέπει μόνο την δίοδο της δέσμης που έχει επιλεγεί και αυτή είναι η μονή που περνάει μέσα από την κυψελίδα ροής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

και διεγείρει το δείγμα. Το εξερχόμενο φως εστιάζεται από το οπτικό σύστημα εκπομπής προς τον μονοχρωμάτορα εκπομπής, ενώ ανάμεσα τους μεσολαβεί ένα φίλτρο αποκοπής, το οποίο επιτρέπει να περάσει φως μόνο πάνω από ένα ορισμένο μήκος κύματος. Ο τροχός αυτών των φίλτρων διαθέτει πέντε θέσεις με διαφορετικά μήκη κύματος αποκοπής το καθένα. Η επιλογή του φίλτρου επιτυγχάνει καλύτερη ευαισθησία και ευελιξία για την μέθοδο. Τέλος το φως με το επιλέξιμο μήκος κύματος προσπίπτει πάνω στον ανιχνευτή(φωτοπολλαπλασιαστη) και μετράται .

Κατά την έναρξη λειτουργίας του μηχανήματος γίνεται ένας αυτοέλεγχος για την εξισορρόπηση όλων των παραμέτρων και με το πέρας αυτού η αρχική οθόνη αλλάζει στην οθόνη κατάστασης η οποία μας ενημερώνει για:

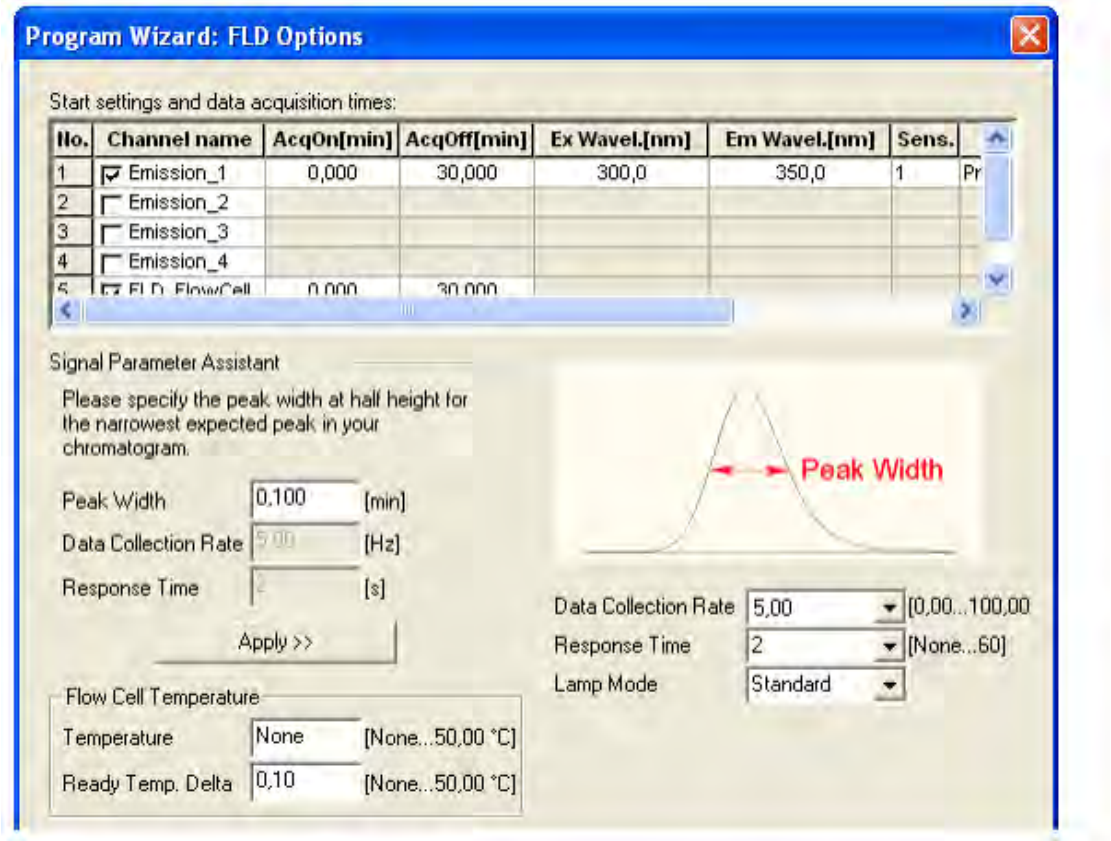
- Τιμές φθορισμού
- Μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης
- Κατάσταση λειτουργίας
- Λειτουργία λάμπας
- Χρόνο κατακράτησης
- Ρύθμιση του τροχού φίλτρων & ευαισθησία.



Εικόνα 3.5:Οθόνη ανιχνευτή φθορισμού με τα δεδομένα βασικών ρυθμίσεων του (παράδειγμα)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

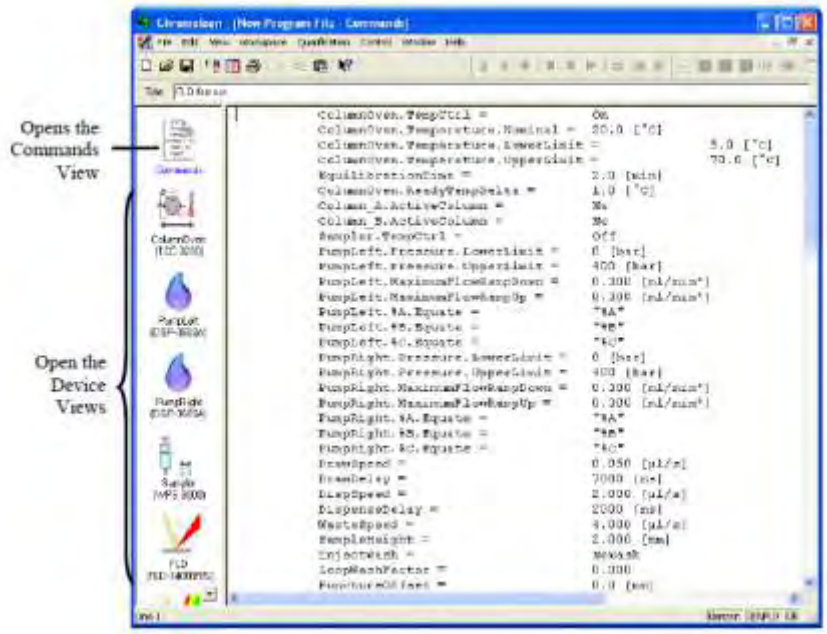
Οι παράμετροι του προγράμματος του φθορισμού που θα τρέξει κάθε φορά ρυθμίζεται μέσω του οδηγού FLD.Μέσω αυτού του οδηγού μπορούμε να επιλέξουμε ένα η περισσότερα κανάλια εκπομπής. Αν επιλεγεί μόνο ένα κανάλι εισάγετε το αναμενόμενο ελάχιστο πλάτος κορυφής. Το πρόγραμμα chromeleon υπολογίζει τον κατάλληλο ρυθμό συλλογής δεδομένων και τον χρόνο απόκρισης βάση αυτών των δυο παραμέτρων. Επιπλέον δίνεται δυνατότητα επέμβασης τόσο στην λειτουργία του λαμπτήρα όσο και στην θερμοκρασία της κυψέλης ροής.



Εικόνα 3.6:Σελίδα επίλογων των βασικών παραμέτρων του ανιχνευτή φθορισμού στο πρόγραμμα FLD.

Σε περίπτωση δημιουργίας ενός νέου προγράμματος ανοίγεται το παρακάτω παράθυρο στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παράμετροι της μεθόδου που θα ακολουθήσουμε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 3.7:Απεικόνιση παραμέτρων του προγράμματος

3.2.2. Προσδιορισμός του βέλτιστου μήκους κύματος εκπομπής και διέγερσης

Οι πιο σημαντικές παράμετροι που πρέπει να βελτιστοποιηθούν κατά την ανάλυση είναι το μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής. Βασικά κριτήρια για την βελτιστοποίηση αυτή αποτελούν:

- Το μήκος κύματος διέγερσης, η επιλεγόμενη τιμή του οποίου θα πρέπει να περιέχει το εύρος των μέγιστων απορροφήσεων όλων των συστατικών του δείγματος.
- Η κινητή φάση, η οποία θα πρέπει να είναι «διάφανης», δηλαδή να δείχνει μικρή ή καθόλου απορρόφηση στο επιλεγμένο μήκος κύματος.
- Το μήκος κύματος εκπομπής, το οποίο επιβάλλεται να είναι τουλάχιστον κατά 20nm μεγαλύτερο από το μήκος διέγερσης.

Παρακάτω θα περιγράφουν οι δυο μέθοδοι καθορισμού των βέλτιστων μηκών κύματος. Αφού προσδιορίσουμε τα βέλτιστα μήκη κύματος καθώς και τους χρόνους κατακράτησης των ουσιών, συνίσταται άλλο ένα «τρέξιμο» της μεθόδου για τα καθορίσουμε και την κατάλληλη ευαισθησία στην οποία θα αναφερθούμε λίγο παρακάτω.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Μέθοδος 1η:*ρυθμιση με την χρήση ενός δείγματος στον ανιχνευτή φθορισμού*

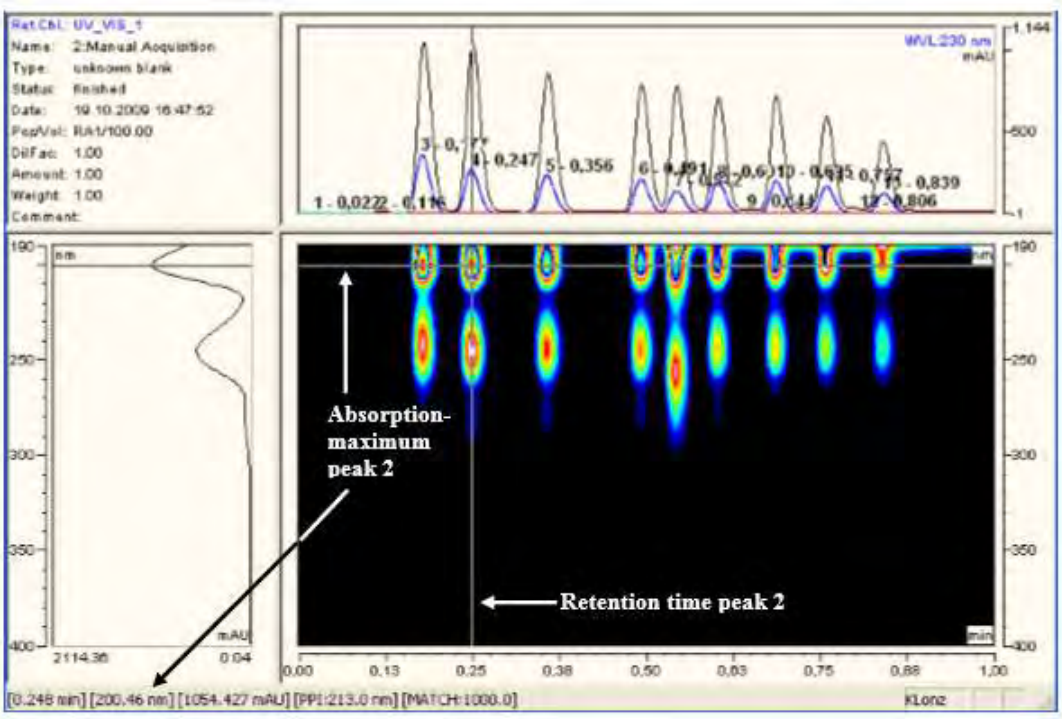
Ρυθμίζεται το μήκος κύματος διέγερσης σε μια τιμή στην οποία απορροφούν τα περισσότερα συστατικά του δείγματος(Πολλά φθορίζοντα μόρια απορροφούν στα 250nm),ενώ παράλληλα ρυθμίζεται και ο τροχός των φίλτρων σε ένα μήκος κύματος τουλάχιστον 30nm μεγαλύτερο από το μήκος κύματος διέγερσης. Εκτελείται μια ανάλυση σε κατάσταση αυτομάτου μηδενισμού και αναμένεται μια αιχμή για κάθε συστατικού του δείγματος μας, με την προϋπόθεση ότι το μήκος κύματος της εκπομπής δεν είναι πολύ μικρότερο του μήκους κύματος του φίλτρου. Έπειτα αφού μέσω την πρώτης ανάλυσης έχουν εντοπιστεί και οι χρόνοι κατακράτησης των συστατικών εκτελείται μια δεύτερη σάρωση ώστε να εντοπιστούν τα βέλτιστα μήκη κύματος εκπομπής του κάθε συστατικού του δείγματος. Τέλος εκτελείται μια σάρωση διέγερσης για κάθε συστατικό, χρησιμοποιώντας τα βέλτιστα μήκη κύματος εκπομπής, ώστε να ορίσουμε και τα βέλτιστα μήκη διέγερσης του κάθε συστατικού(μεγαλύτερη κορυφή).

Μέθοδος 2η:*ρυθμιση με την χρήση δυο δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και ανιχνευτή φθορισμού.*

Αν το σύστημα Ultimate 3000 περιλαμβάνει έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD-3000 ή DAD-3000RS),μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το υπεριώδες φάσμα UV,για να βρούμε τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και τους χρόνους κατακράτησης των ουσιών. Χρησιμοποιούμε ένα δείγμα κατάλληλης συγκέντρωσης για ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και εκτελούμε μια ανάλυση, μέσω της οποίας εξάγονται οι χρόνοι κατακρατήσεις, τα μέγιστα απορρόφησης και ως εκ τούτου και τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης του κάθε συστατικού του δείγματος. Έπειτα χρησιμοποιούμε ένα δείγμα συγκέντρωσης κατάλληλης για φθορισμό(έως και 10^3 μικρότερης συγκέντρωσης)και πραγματοποιούμε μια σάρωση εκπομπών για κάθε συστατικό του δείγματος, με την χρήση των χρονών κατακράτησης και των μηκών διέγερσης που βρέθηκαν παραπάνω. Σημειώνουμε ότι μπορεί να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

χρειάζεται να προσθέσουμε μια χρονική μετατόπιση μεταξύ του ανιχνευτή UV και του ανιχνευτή φθορισμού κατά των προσδιορισμό των χρονών κατακράτησης αν οι δυο ανιχνευτές συνδέονται σε σειρά. Με αυτόν τον τρόπο θα πάρουμε τα βέλτιστα μήκη κύματος εκπομπής(μεγαλύτερη κορυφή)για κάθε συστατικό.



Εικόνα 3.8: 3D δεδομένα από ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.

3.3. Ευαισθησία ανιχνευτή φθορισμού

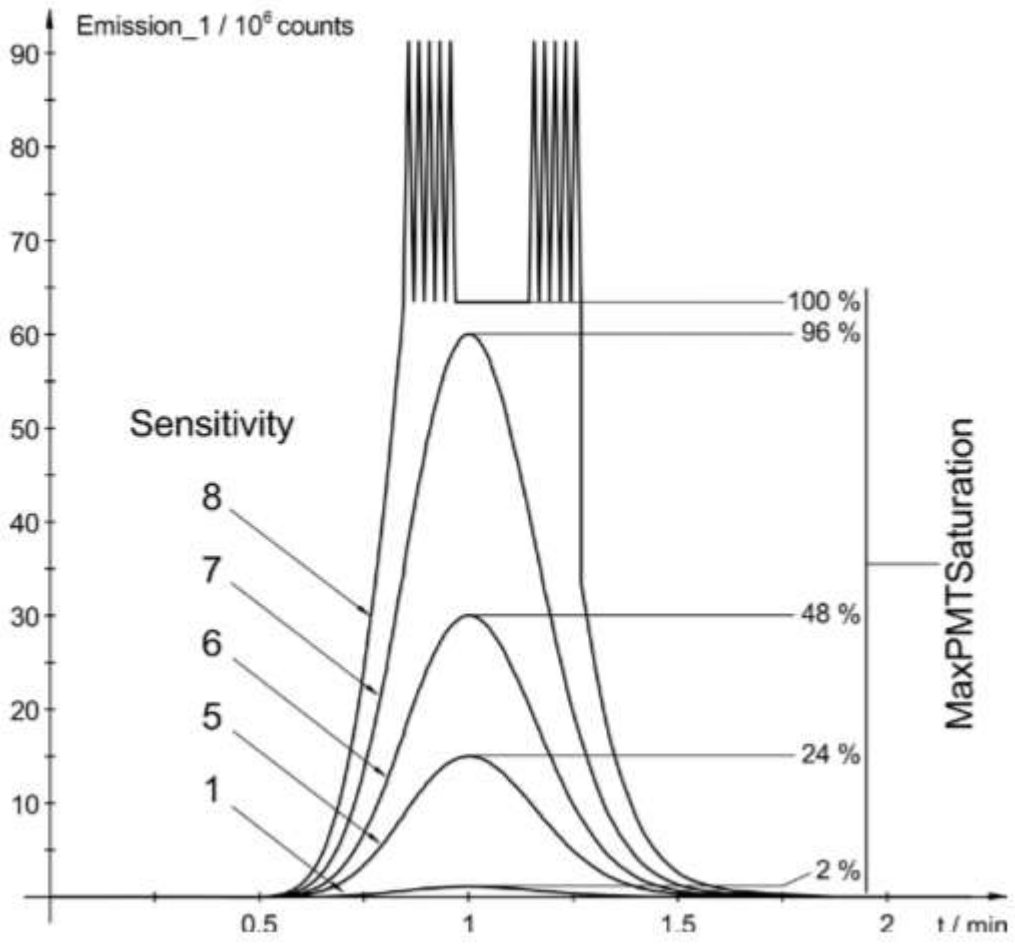
Η ευαισθησία χρησιμοποιείται για την βελτιστοποίηση του λογού σήματος προς τον θόρυβο σε ένα χρωματογράφημα. Ανάλογα με την ένταση του φθορισμού μπορεί να κρίνεται απαραίτητη η ρύθμιση της ευαισθησίας αρκετές φορές κατά την διάρκεια μιας ανάλυσης. Για να βρούμε σωστά την ευαισθησία, απαιτείται να προσδιορίσουμε την μέγιστη ένταση εκπομπής. Ο φωτοπολλαπλασιαστής μετρά την ένταση του φωτός εκπομπής και μπορεί να ρυθμιστεί σε 8 βήματα(επιλογή ευαισθησίας 1 έως 8).

- Αν η επιλεγμένη ευαισθησία είναι πολύ μικρή, το ύψος της κορυφής μειώνεται και η αναλογία θορύβου-σήματος δεν είναι η βέλτιστη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

- Αν η επιλεγμένη ευαισθησία είναι πολύ μεγάλη το σήμα του φωτοπολλαπλασιαστή θα κορεστεί και θα μειώσει αυτόματα το μετρό της ευαισθησίας.

Κάθε εναλλαγή στην ευαισθησία κατά μια μονάδα έχει σαν αποτέλεσμα των διπλασιασμό του μέτρου των κορυφών. Για παράδειγμα αν η ευαισθησία ισούται με 5 το ύψος κορυφών που ανιχνεύονται είναι δεκαπέντε εκατομμύρια μονάδες ενώ με την αύξηση της ευαισθησίας στο 6 έχουμε αύξηση στα τριάντα εκατομμύρια. Η βαθμονόμηση του οργάνου εξαρτάται από τον φωτοπολλαπλασιαστή και ως εκ τούτου η βαθμονόμηση και η ποσοτικοποίηση πρέπει να γίνονται πάντα με τον ίδιο φωτοπολλαπλασιαστή.[28]



Εικόνα 3.9:Αποτελέσματα ρύθμισης της ευαισθησίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

4. Τεχνολογία συμπαγούς πυρήνα(Core-shell)

Ένας από τους στόχους τους οποίους πρέπει να επαληθεύει η χρωματογραφική ανάλυση είναι ο γρήγορος και αποτελεσματικός διαχωρισμός για ένα ευρύ φάσμα ενώσεων. Ο γρήγορος διαχωρισμός οδηγεί συχνά σε αύξηση της πίεσης της ανάλυσης και κατά συνέπεια σε επιβάρυνση του οργάνου της HPLC.Τα τελευταία χρονιά για την πλήρωση των χρωματογραφικών στηλών χρησιμοποιούνται μικροσφαιρίδια συμπαγούς πυρηνα(με έναν στερεό πυρήνα και με ένα πορώδες κέλυφος), επιτυγχάνοντας έτσι αποτελεσματικό και γρήγορο διαχωρισμό σε μικρή πίεση, τόσο μικρών και μεγαλύτερων μορίων, όσο και πολύπλοκων δειγμάτων. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης στήλης οφείλεται στην πολύ στενή κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων συμπαγούς πυρηνα σε σχέση με τα συμβατικά σωματίδια πλήρους πορώδους.[25]

Τα σωματίδια συμπαγούς πυρήνα, συγκριτικά με τα παραδοσιακά πορώδη

σωματίδια, εμφανίζουν:

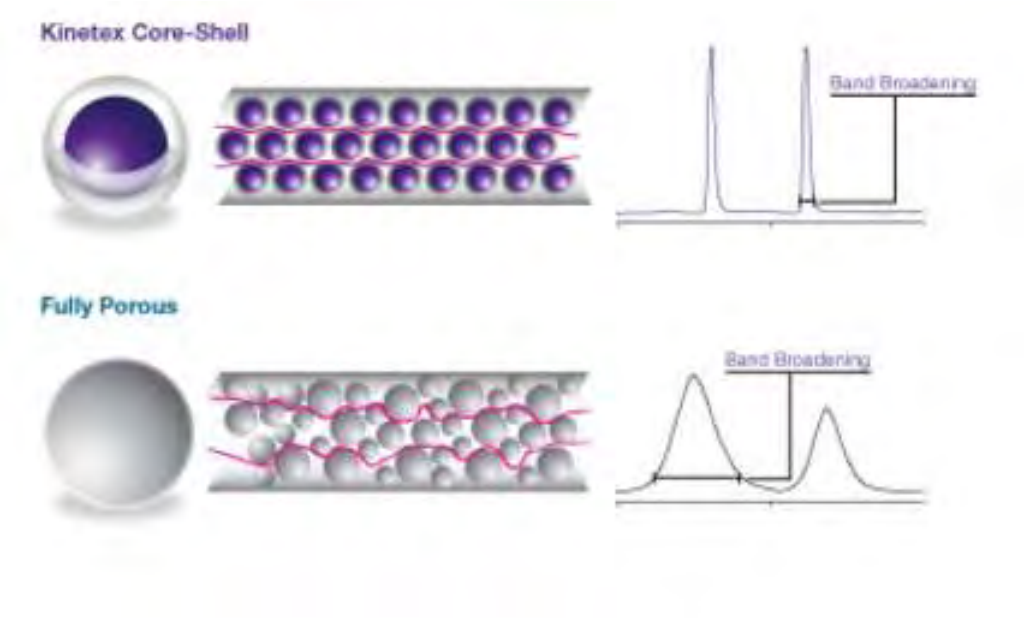
• Μικρότερη κατανομή του μεγέθους σωματιδίων.

• Πιο αποτελεσματική πάκτωση του πληρωτικού υλικού στο εσωτερικό της στήλης.

• Γρήγορη έκλουση των συστατικών από τη στήλη - περιορισμό της διάχυσης.[27]

.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 4.1: Αποτελέσματα χρωματογραφικού διαχωρισμού με χρίση σωματιδίων πυρήνας-κέλυφος (core-shell) η συμβατικού υλικού πλήρους πορώδους

Για την καλύτερη κατανόηση της μορφολογίας του πυρήνα των στέρεων σωματιδίων και πως επιδρά βελτιωτικά στην χρωματογραφική απόδοση, είναι απαραίτητο να διερευνηθούν οι επιμέρους οροί της εξίσωσης Van Deemter,για να προσδιοριστεί η επίδραση της διασποράς των μορίων της διαλυμένης ουσίας μέσα σε ένα πακτωμένο περιβάλλον.

$$h = \frac{B}{v} + A + Cv$$

Οπού το h το ισοδύναμο ύψος προς θεωρητική πλάκα, v η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και τα A,B,C αριθμητικοί συντελεστές που σχετίζονται με της παραμέτρους της στήλης.[25] Ο παράγοντας A της εξίσωσης van Deemter μειώνεται, εξαιτίας της ομοιογένειας του συνόλου του υλικού πλήρωσης που παρατηρείται στις στήλες τεχνολογίας συμπαγούς πυρήνα ενώ ο παραγοντας C που εκφραζει την αντίσταση στη μεταφορά μάζας, με επακόλουθη την εφαρμογή υψηλών ροών που συνεπάγεται μείωση του χρόνου ανάλυσης, χωρίς σημαντική μείωση της χρωματογραφικής απόδοσης, οδηγεί στον σχηματισμό καθαρότερων κορυφών. Επιπλέον Τα σωματίδια συμπαγούς πυρήνα έχουν ανώτερη θερμική απορρόφηση σε σχέση με τα πλήρως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

πορώδη σωματίδια και απορροφούν αποτελεσματικά αυτού του είδους την θερμότητα.[25]

Οι στήλες τεχνολογίας συμπαγούς πυρήνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές για την ασφάλεια των τροφίμων, όπως στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων,
αντιβιοτικών, αφλατοξινών ή αζωχρωμάτων. Το ίδιο ισχύει και για τις περιβαλλοντικές αναλύσεις, όπως η ανίχνευση εκρηκτικών, τα φυτοφάρμακα και
καρβαμιδικά χλωριούχα ζιζανιοκτόνα. Τέλος, προσφέρουν άριστα και σύντομα αποτελέσματα στην εγκληματολογία, καθώς μπορούν να εφαρμοστούν στην ανίχνευση των οπιούχων και άλλων παράνομων ναρκωτικών.
Συμπερασματικά, τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν σε σχέση με τα υλικά πλήρωσης των συμβατικών στηλών, είναι:

- Αυξημένη ταχύτητα ροής.
- Αυξημένη διαχωριστική ικανότητα.
- Εξαιρετική ανθεκτικότητα, σε σύγκριση με στήλες με υλικά πλήρωσης μικρότερα των 2 μm.
- Αυξημένη ευαισθησία μεθόδων, λόγω της καλύτερης μορφής των κορυφών.
- Ελαχιστοποίηση φαινομένων διάχυσης και μεταφοράς μάζας.[27]

5. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-Προσδιορισμός κολιστινης με την χρήση υγρής χρωματογραφίας & ανιχνευτή φθορισμού.

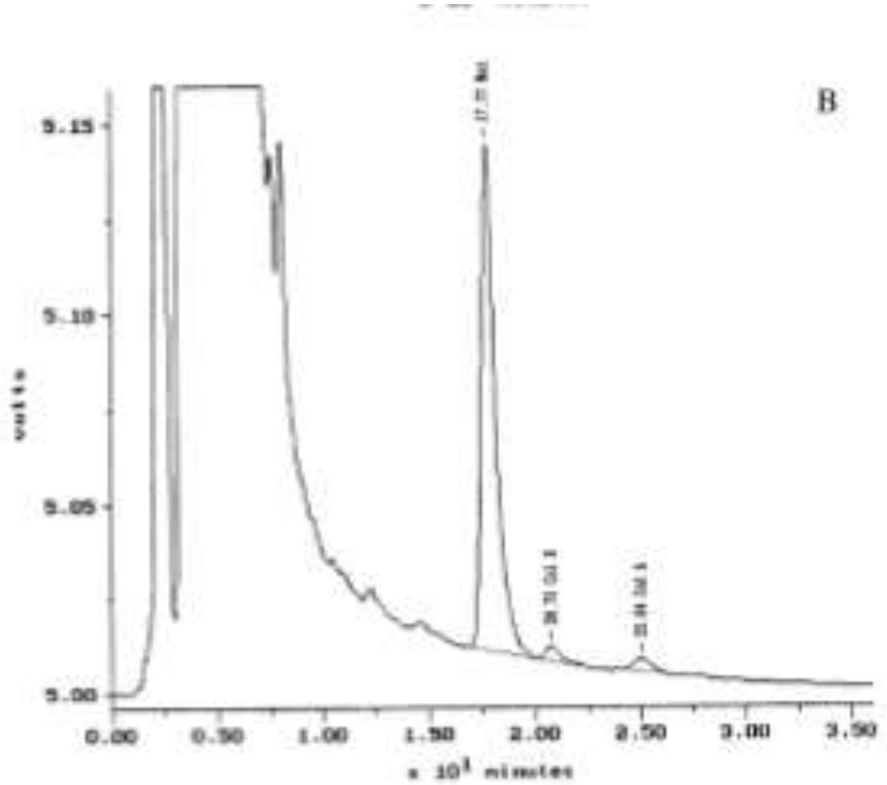
Οι παλαιότερες εργασίες που βρέθηκαν στην βάση δεδομένων Scopus και οι οποίες αναφέρονταν στον προσδιορισμό της κολιστινης με την χρήση υγρής χρωματογραφίας μαζί με ανιχνευτή φθορισμού ήταν μόνο δυο.

Στην πρώτη δημοσιευμένη το 2001 εργασία ο Jian Li και οι συνεργάτες του παρουσίασαν μια μέθοδο προσδιορισμού της κολιστινης χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο νετιλμικίνη και ως παραγωγοποιητή το φλουορενυλμεθυλοξυκαρβονυλ-χλωρίδιο(FMOC-Cl).Για την παραλαβή της παραγωγοποιημένης κολιστινης χρησιμοποιήθηκε σύστημα εκχύλισης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

στέρεας φάσης, ενώ η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η C18 5μm (250x4.6 mm).Το σύστημα των διαλυτών ήταν ακετονιτρίλιο:νερό:τετραϋδροφουράνιο (87:13:4) και η ροή ορίστηκε στο 1ml/min.

Τα χρωματογραφικά αποτελέσματα που δημοσιευτήκαν από την παραπάνω ερευνά είχαν την παρακάτω μορφή:



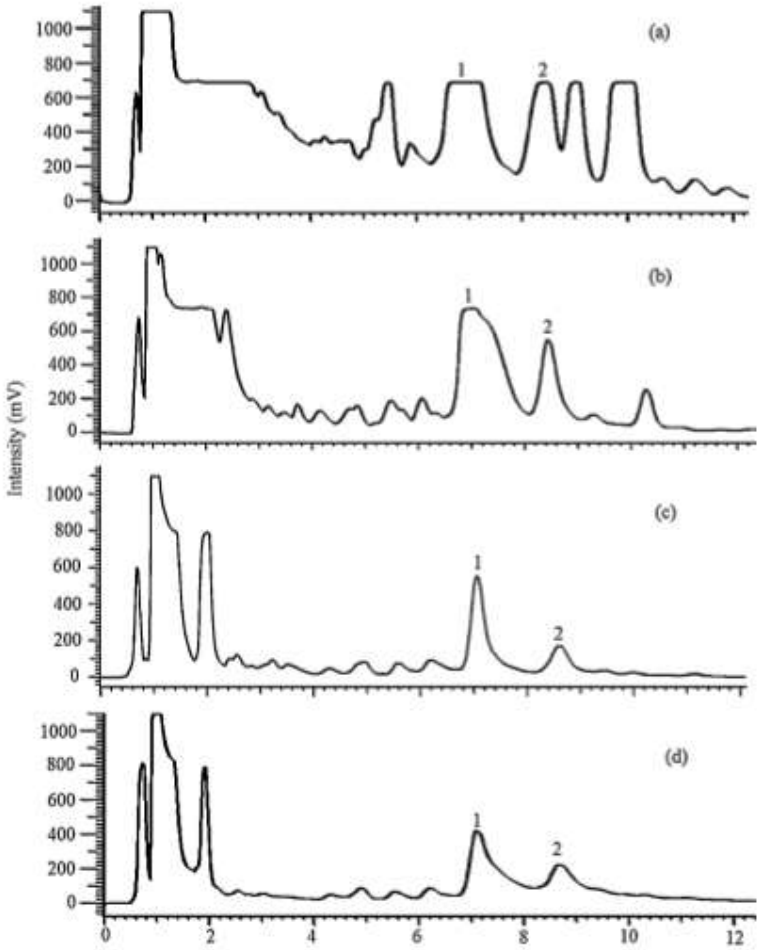
Εικόνα 5.1:τελικό χρωματογράφημα του επεξεργασμένου πλάσματος αίματος εμβολιασμένο με διάλυμα κολιστινης συγκέντρωσης 0.1mg/l, χρόνος συγκράτησης 20 & 22,5 λεπτα

Παρατηρούμε ότι οι κορυφές της κολιστινης Α και Β είναι πολύ μικρές καθώς επίσης και μια μορφή θορύβου στην αρχή του χρωμαγραφήματος που δημιουργεί αμφιβολία για την ορθότητα της μέτρησης. Η κλίμακα του χρόνου πολλαπλασιάζεται με το δέκα, συνεπώς οι κορυφές μας εμφανίζονται σε χρόνους 20 και 22.5 λεπτά, γεγονός που μαρτυρά ότι η μέθοδος είναι αρκετά χρονοβόρα.[12] Παράλληλα η μέθοδος αυτή έχει βρει τεσσερις εφαρμογές σε μετέπειτα αντίστοιχες μελέτες, ενώ η ακρίβεια της μεθόδου αμφισβητείτε στην δεύτερη εργασία που ακολουθεί.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Στην δεύτερη εργασία, ο D.Chepyala και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μέθοδο ανίχνευσης της κολιστινης χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο πολυμιξίνη Β και διάταξη εκχύλισης στέρεας φάσης μέσα στην οποία πραγματοποιήθηκε και η παραγωγοποίηση της κολιστινης με φλουορενυλμεθυλοξυκαρβονυλ-χλωρίδιο(FMOC-Cl).Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18 2.7μm (2.1x100mm),οι διαλυτές ήταν ακετονιτρίλιο:τετραϋδροφουράνιο:νερό (82:2:16) και η ροή 0.5ml/min.

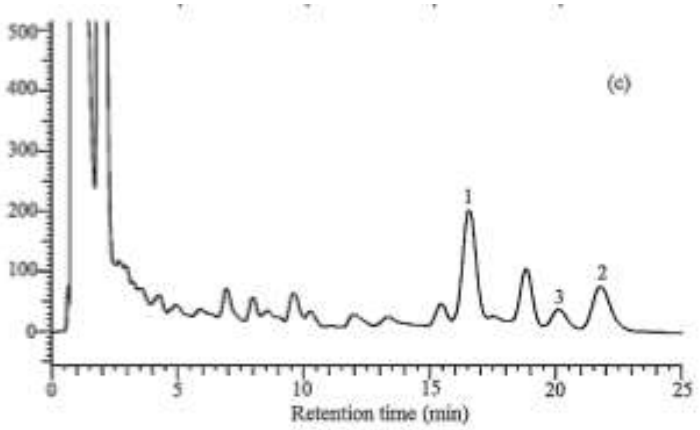
Η παραγωγοποιήση σε αυτή την μελέτη έδινε πολλά παράγωγα τα οποία δεν μπορούσαν να ερμηνευτούν πλήρως .Ενώ αυξάνοντας το πλύσιμο χάνονται πολλά από αυτά αλλά μειώνεται και το εμβαδόν των κορυφών της κολιστινης. Συνεπώς η συγκεκριμένη μέθοδος δεν παρουσιάζει καθόλου καλή ευαισθησία.



Εικόνα 5.2: Επίδραση της πλύσης στο χρωματογραφία.a)70% b)80% c)95% και d)100%.η κορυφή 1 αποτυπώνει την κολιστίνη Β ενώ η κορυφή 2 την κολιστίνη Α.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Τέλος το χρωματογραφικό αποτέλεσμα που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου σε πλάσμα αίματος αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 5.2: τελικό χρωματογράφημα του επεξεργασμένου πλάσματος αίματος εμβολιασμένο με διάλυμα κολιστινης συγκέντρωσης 0.2mg/l

Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται αρκετές κορυφές οι οποίες δεν αντιστοιχίζονται σε κάποιο μόριο, και εδώ στα πρώτα πέντε λεπτά της ανάλυσης εμφανίζονται πολύ υψηλές κορυφές, οι οποίες αλλοιώνουν το καλό χρωματογράφο αποτέλεσμα, ενώ υπάρχει μια μείωση της κλίμακας που αφορά την ένταση των κορυφών, με σκοπό να απεικονίζονται μεγαλυτερες.[10]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

❖ Αντιδραστήρια-Όργανα-Συσκευές

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ουσίες, διαλύματα, όργανα και συσκευές τα οποία αναφέρονται ονομαστικά παρακάτω:

Πρότυπες ουσίες:

- Κολιστίνη/Colistin sulfate(Biosure)
- Πολυμυξίνη Β/Polymyxin B(Biosure)

Αντιδραστήρια/Διαλύματα

- Ακετονιτρίλιο/Acetonitrile(Sigma-Aldrich)
- Τετραϋδροφουράνιο/Tetrahydrofuran(Sigma-Aldrich)
- Ανθρακικό νάτριο/Sodium Carbonate(Merck)
- Βορικό οξύ/Boric acid
- Φλουορενυλμεθυλοξυκαρβονυλ-χλωρίδιο/Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride(FMOC-Cl) (Biosure)
- Όρθο-φθαλαλδεϋδης/*ortho*-phthalaldehyde (OPA)(Rigas Lab)
- Μερκαπτο-αιθανολη/mercaptoethanol
- Τετραβορικό νάτριο/sodium tetraborate
- Μεθανόλη/Methanol (Sigma-Aldrich)
- Ακετόνη/Acetone (Sigma-Aldrich)

Διαλύματα που παρασκευαστήκαν

- *Διάλυμα τετραϋδροφουρανίου-νερού: Παρασκευάσαμε διάλυμα τετραϋδρο-φουρανιου νερού σε αναλόγια 1:3 για την χρήση του ως κινητής φάσης*
- *Διάλυμα εργασίας κολιστίνης συγκέντρωσης 1mg/ml:Ποσότητα 10mg στερεής κολιστίνης διαλυθήκαν σε ακετονιτρίλιο και νερό με αναλόγια διαλυτών 1:1.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

- *Επιμέρους πρότυπα διαλύματα κολιστίνης συγκεντρώσεων 0.5μg/ml, 1μg/ml, 2μg/ml, 4μg/ml και 6μg/ml σε αναλόγια διαλυτών ακετονιτρίλιο-νερό 1:1 και προσθήκη σε καθένα 25μl εσωτερικού πρότυπου.*
- *Διάλυμα FMOC-Cl 0.1M:Προσθήκη 0.2585g στέρεου παραγωγοποιητή σε 10ml ακετονιτριλίου.*
- *Διάλυμα βορικού οξέος 0.2M:Προσθηκη 0.120g στέρεου βορικού οξέος σε 10 ml νερού.*
- *Ανθρακικό ρυθμιστικό διαλυμα0.1M:Προσθηκη 0.1g ανθρακικού νάτριου σε 10 ml νερού.*
- *Βορικό ρυθμιστικό διάλυμα(p H=10.5): Προσθήκη 4.72ml σε φιάλη των 100 ml και πλήρωση με διάλυμα τετραβορικού νατρίου 0.05M.*

ΥΛΙΚΑ/ΣΥΣΚΕΥΕΣ

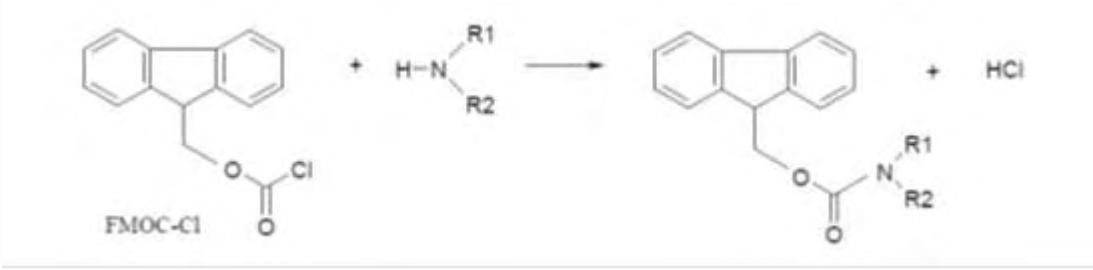
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας Ultimate 3000:Dionex USA με ανιχνευτές σειράς διοδίων PDA 3000 Detector& φθορισμού FLD-3*00(RS) Detector
- Χρωματογραφική στήλη C18 5μM 15cm x 4.6mm
- Χρωματογραφική στήλη C18 2.6u 10cm x 300mm
- Συσκευή διήθησης διαλυτών
- Συσκευή ανάδευσης(Vortex)
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμαντική πλακά
- Ένθετα κωνικά 250μl γυάλινα για φιάλες αυτομάτου δειγματολήπτη
- Φιαλίδια αυτομάτου δειγματολήπτη 1.8ml διαφανή 12*32mm με βιδωτό πώμα 9mm
- Φίλτρα σύριγγας μεγέθους πόρων 0.2μm
- Διάταξη εκχύλισης στέρεας φάσης.(SPE)
- Φυσίγγια εκχύλισης στέρεας φάσης C18 (1ml,100mg)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

1. Παραγωγοποιήση της κολιστίνης με φθορίζοντα ιχνηθέτη.

Η κολιστίνη δεν απορροφά έντονα στην περιοχή υπεριώδους -ορατού και για την ανίχνευση της στις αναμενόμενες θεραπευτικές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη η παραγωγοποιητή της. Για τον λόγο αυτό για την ανίχνευση της με την χρήση FLD χρησιμοποιήθηκε ένας ιχνηθέτη η αντίδραση του οποίου με την κολιστίνη θα έδινε φθορίζοντα παράγωγα που θα ανιχνεύονταν. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση παρατηρήθηκε ότι για την παραγωγοποιηση της κολιστινης προτείνεται η χρήση της όρθο-φθαλαλδεϋδης (*ortho*-phthalaldehyde (OPA)) Όμως σύμφωνα με την βιβλιογρφία τα παράγωγα της δεν είναι αρκετά σταθερά, χωρίς όμως να αναφέρεται συγκεκριμένος χρόνος ημιζωής τους. Για την σταθεροποίηση των παραγόντων OPA χρησιμοποιήθηκε προσθήκη 2-μερκαπτο-αιθανολης και 3-μερκαπτο-προπιονικο οξύ. Άλλη μια ουσία κατάλληλη για την παραγωγοποιήση της κολιστίνης η όποια απορρίφθηκε λόγω υψηλού κόστους ήταν η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη. Έτσι επιλέχτηκε το 9-φλυορενυλ-μεθυλ-οξυ-καρβονυλο χλωρίδιο(**9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride(FMOC-Cl)).Η συγκεκριμένη επιλογή βασίστηκε στην δυνατότητα του FMOC-Cl να αντιδρά με πρωτοταγής και δευτεροταγής αμίνες, που αποτελούν και τον μεγαλύτερο αριθμό αμινομάδων που συναντάται στο μόριο της κολιστίνης, καθώς και στο χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις προηγούμενες δυο ουσίες.**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

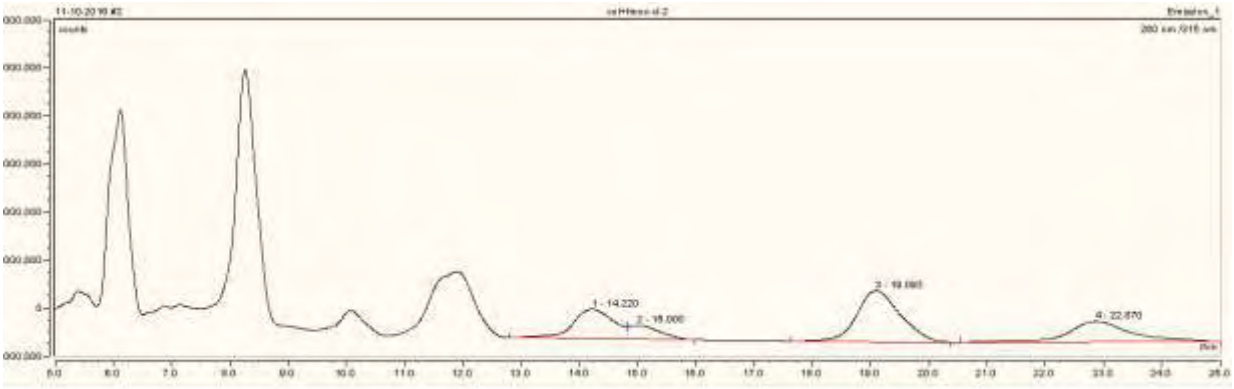


***Εικόνα 1.1:*Αντιδραση του FMOC-Cl με δευτεροταγή αμίνη**

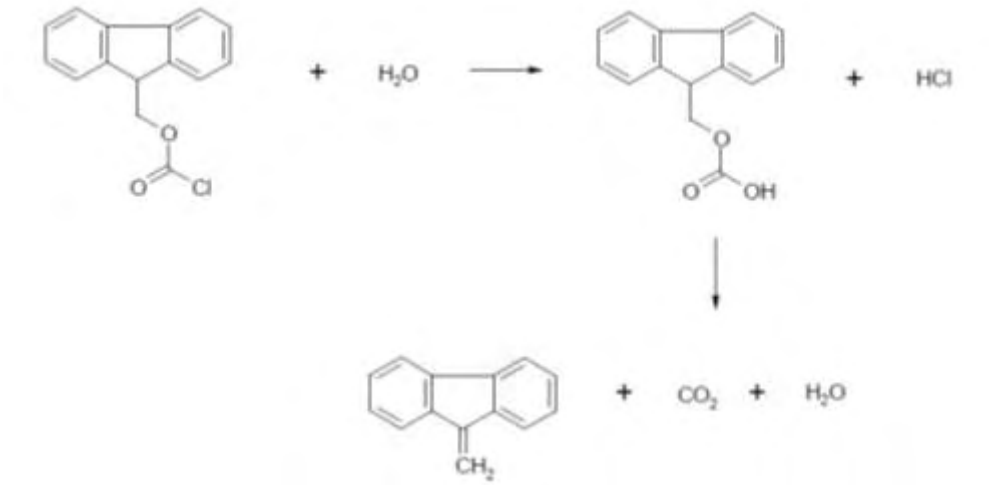
1.1. Παραγωγοποιήση της κολιστίνης στο διάλυμα χωρίς την απομόνωση του παραγωγοποιημένου προϊόντος.

Οι πρώτες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της κολιστίνης έγιναν με βάση την προ υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα κολιστίνης συγκεντρώσεων 0.5,1,2,4 και 6μg/ml σε μείγμα διαλυτών ACN : H_2O σε αναλογία 50:50. Από το κάθε διάλυμα πάρθηκε ποσότητα 100μl,η οποία αναμίχθηκε με 50μl ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1M (pH =10) και 50μl FMOC-Cl συγκέντρωσης 100mM.Το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά και προστέθηκαν 30μl βορικού οξέος συγκέντρωσης 0.2M.Μετα το φιλτράρισμα του διαλύματος ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων με HPLC-FLD.Στα χρωματογραφήματα που παραλήφθηκαν παρατηρήθηκε μη αναμενόμενα αυξημένος αριθμός χρωματογραφικών κορυφών.(Εικόνα 1.2.) Δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση των αναμενόμενων κορυφών της κολιστίνης A και B, του παραγωγοποιητή και των προϊόντων υδρόλυσης του (Εικόνα 1.3.).Συμβουλευόμενοι για ακόμη μια φορά την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ανεπιθύμητες χρωματογραφίκες κορυφές εμφανίζονται όταν χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις του παραγωγοποιητή και για τον λόγο αυτό μειώσαμε την συγκέντρωση του παραγωγοποιητή από τα 100mM στα 50mM, δηλαδή στο μισό. Εν τούτοις το πρόβλημα με τον αυξημένο αριθμό των χρωματογραφίκων κορυφών εξακολούθησε να υπάρχει.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 1.2.:Χρωματογραφημα παραγωγοποιημενης κολιστινης συγκέντρωσης 2μg/ml



*Εικόνα 1.3:*Υδρολυση FMOC-Cl&προϊόντα του

Ο αυξημένος αριθμός των χρωματογραφικών κορυφών μπορεί όμως να αποδοθεί στην ατελή παραγωγοποίηση της κολιστίνης Α και Β. Στο μόριο κολιστίνης υπάρχουν 4 πρωταταγής και 12 δευτεροταγής αμινομάδες. Η ατελής σε διαφορετικό βαθμό παραγωγοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από παράγωγα της κολιστίνης. Η πλήρης ολοκλήρωση μπορεί να εξαρτάται από συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης παραγωγοποίησης ,την διάρκεια της, την θερμοκρασία και την αναλογία αντιδραστηρίων. Η συγκέντρωση της κολιστινης είναι σημαντικά μικρότερη από την συγκέντρωση του παραγωγοποιητή καθώς χρησιμοποιείται περίσσεια του δευτέρου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του χρόνου αντίδρασης, της θερμοκρασίας διεξαγωγής της αντίδρασης και την προσθήκη γλυκίνης στο χρωματογράφικο αποτέλεσμα.

a. Επίδραση του χρόνου αντίδρασης

Για να ελεγχθεί η επίδραση του χρόνου της αντίδρασης της κολιστίνης με τον παραγωγοποιητή FMOC-Cl, πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή ανάλυση κατ' επανάληψη ενός δείγματος παραγωγοποιημένης κολιστίνης συγκέντρωσης 6μg/ml.Η μορφή του χρωματογραφήματος που προέκυψε σε κάθε μέτρηση δίνει όμοιες κορυφές, συμπεραίνοντας έτσι ότι η αντίδραση της κολιστίνης με τον παραγωγοποιητή δίνει σταθερά προϊόντα, τα οποία δεν μεταβάλλονται με τον χρόνο.

Σε συνέχεια του παραπάνω πειράματος πραγματοποιήθηκε και μέτρηση νέου δείγματος παραγωγοποιημένης κολιστίνης συγκέντρωσης 6μg/ml την επόμενη μέρα και σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο μερών. Η εικόνα των δυο ημέρων είναι παρόμοια όσον αφορά τις κορυφές που εμφανίζονται, παρόλα αυτά παρατηρήθηκε μια χρονική μετατόπιση αυτών την δεύτερη μέρα.

Μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου αντίδρασης της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή όσον αφορά την ολοκλήρωση της αντίδρασης για να μην έχουμε ημιτελη παραγωγοποιημένα προϊόντα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στο χρωματογράφημα ούτε εξαφάνιση κορυφών. Συμπέρασμα: παράταση του χρόνου αντίδρασης δεν μεταβάλλει το τελικό χρωματογραφικό αποτέλεσμα.

b. Επίδραση θερμοκρασίας αντίδρασης

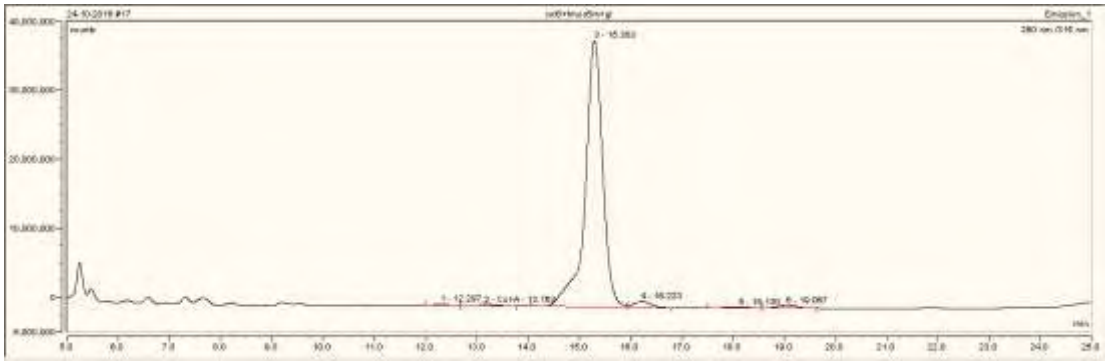
Για να εξετάσουμε κατά πόσο η θερμοκρασία επηρεάζει την απόδοση και την ολοκλήρωση της αντίδρασης της κολιστινής με τον παραγωγοποιητή παρασκευάστηκαν διαλύματα κολιστινής 0.5, 2.5, 5, μg/ml τα οποία παραγωγοποιήθηκαν σε θέρμανση 50^{o} C για χρονικό διάστημα 10, 35 και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

60 λεπτών αντίστοιχα. Πρωταρχικό συμπέρασμα αυτού του πειράματος αποτελεί η μείωση των κορυφών σε σχέση με τα προηγούμενα τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την βελτίωση του τρόπου που γίνεται η αντίδραση και πιθανώς πιο ολοκληρωμένη παραγωγοποίση. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε ούτε εδώ μεγάλη βελτίωση των αποτελεσμάτων.

c. Επίδραση της προσθήκης γλυκίνης στην αντίδραση.

Η περίσσεια του αντιδραστηρίου FMOC-Cl αντιδρά με το νερό και σχηματίζει το FMOC-OH το οποίο επίσης φθορίζει και μπορεί να προκαλέσει παρεμβολές στην χρωματογραφική ανάλυση. Οι πολλαπλές κορυφές που προκύπτουν από την αντίδραση της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή, μας οδήγησαν στην παραπάνω υπόθεση. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος είχε δοκιμαστεί από παλαιότερες έρευνες είτε η χρήση ασπαρτικού οξέος στο μείγμα της αντίδρασης είτε η χρήση μιας διαφορετικής αμίνης. Εν προκειμένω επιλέχθηκε η δεύτερη διαδικασία κυρίως λόγω απλότητας και έτσι πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλυμάτων συγκεντρώσεων 5,10,15μg/ml ακολουθώντας την διαδικασία παρασκευής που περιγράφηκε παραπάνω με την διαφορά ότι στο τελευταίο στάδιο προστέθηκε και ποσότητα 50μl διαλύματος γλυκίνης σε νερό, συγκέντρωσης 5mM και παρατηρήθηκε μείωση των κορυφών που εμφανίζονται. Παρόλα αυτά δεν επιτεύχθηκε κάλος διαχωρισμός των δυο εκδοχών της κολιστινης.



Εικόνα 1.4:Χρωματογραφημα παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκέντρωσης 6μg/ml έπειτα από την προσθήκη γλυκίνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Τα πειραματικά μας δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η απομόνωση των πλήρων παραγωγοποιημένων προϊόντων πρέπει να προηγηθεί της χρωματογραφικής ανάλυσης

1.2. Παραγωγοποιήση σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και απομόνωση της παραγωγοποιημένης κολιστίνης.

Για την απομόνωση της παραγωγοποιημενης κολιστίνης χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα στήλης εκχύλισης στερεάς φάσης. Η αντίδραση παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκε σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE – solid phase extraction) με επακόλουθη ξέπλυμα της στήλης για την απομάκρυνση των υποπροϊόντων. Συγκεκριμένα:

a. Τα φυσίγγια της συσκευής εκχύλισης στερεάς φάσης πλυθήκαν με 1ml μεθανόλης και 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1M (pH =10).
b. 0.5ml δειγμάτων φορτώθηκαν στο κάθε φυσίγγιο.
c. Μετά την πλύση κάθε φυσιγγίου με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατριου,50μl FMOC-Cl συγκέντρωσης 50mM προστέθηκαν σε αυτό.
d. Με το πέρας 10 λεπτών της αντίδρασης ακολουθήσε ξήρανση για άλλα 5λεπτα.
e. Τα φυσίγγια πλύθηκαν με 1ml μεθανόλης και ακολουθήσε η έκλουση των προϊόντων της αντίδρασης με 1.3ml ακετόνης.
f. Το προκύπτων διάλυμα πέρασε μέσα από ένα φίλτρο κυτταρίνης 0.2μm και αναλύθηκε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

(A) (B)

Εικόνα 1.3: Διάταξη manifold, (A) για την ταυτόχρονη πολλαπλή εκχύλιση στερεάς με στήλες SPE (B) Σύστημα στήλης εκχύλισης στερεάς φάσης

2. Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC-FLD

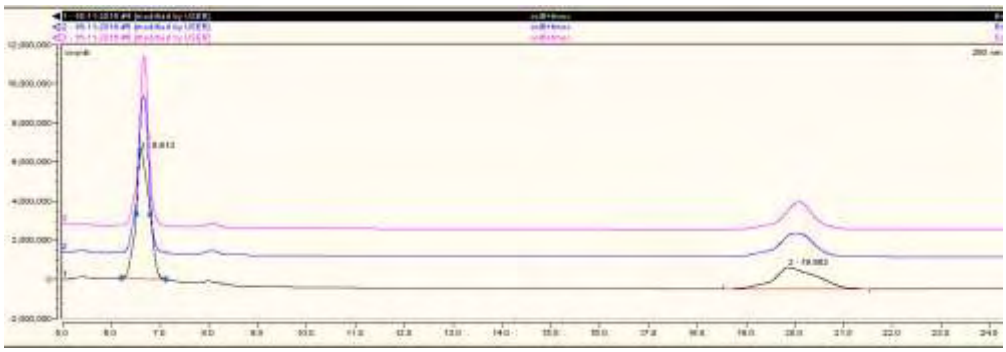
Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Ultimate 3000(Dionex PDA 3000 Detector & FLD-3*00(RS) Detector,εξοπλισμένη με χρωματογραφική στήλη C18 5μM 15cm x 4.6mm.Δοκιμάστηκε ισοκρατικός και βαθμιδωτός τρόπος έκλουσης των διαλυτών.

2.1. Ισοκρατική έκλουση

Αν και οι πρώτες αναλύσεις της κολιστίνης βασιζόμενες σε παλαιότερη βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή ισοκρατικού τρόπου έκλουσης με κινητή φάση 75:25(ακετονιτρίλιο:νερό &τετραϋδροφουράνιο), για το βέλτιστο αποτέλεσμα της ανάλυσης μας, δοκιμάστηκαν άλλες τρεις διαφορετικές αναλογίες ακετονιτριλίου:νερού , οι οποίες ήταν 80:20,70:30,60:40.Στις αναλύσεις αυτές πέραν της ουσίας της κολιστίνης και του παραγωγοποιητή, στα δείγματα μας έχει προστεθεί και ένα εσωτερικό πρότυπο(πολυμιξίνη Β) με σκοπό την καλύτερη ποσοτική ανάλυση του αποτελέσματος της κολιστίνης. Από το πείραμα αυτό παρατηρήθηκε ότι ο καλύτερος χρωματογραφικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με την χρήση των διαλυτών σε αναλογία 70:30

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Σε επόμενη ανάλυση της παραγωγοποιημένης κολιστινης 6μg/ml ισοκρατικά, γίνεται ανάλυση του διαλύματος τρεις φορές ώστε να ελεγχθεί τόσο η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων όσο και μέρος της αντίδρασης της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή(Εικόνα 2.1).Το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχίζεται στον παραγωγοποιητή μειώνεται στο 1/6 σε σχέση με το εμβαδόν που δίνει ο παραγωγοποιητής αν αναλυθεί μονός του.

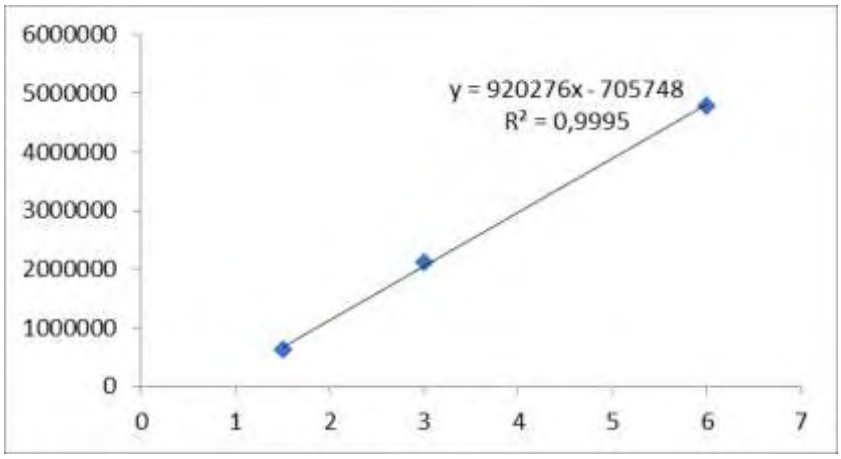


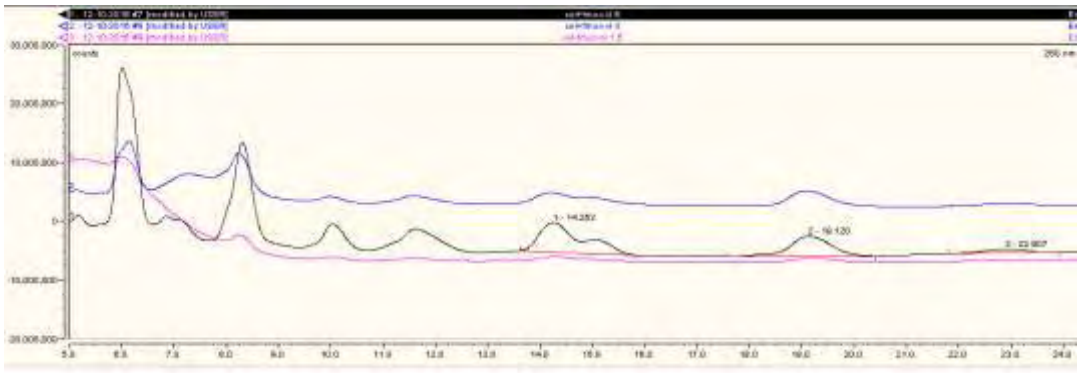
Εικόνα 2.1:Χρωματογραφημα προτύπων διαλυμάτων παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκέντρωσης 6μg/ml.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε μέτρηση διαλυμάτων κολιστινης συγκεντρώσεων 1.5, 3 και 6 μg/ml, τα οποία προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις του τελευταίου. Η μελέτη των αποτελεσμάτων έδειξε μια αναλογία συγκέντρωσης δείγματος - εμβαδού κορυφής οπού αποτυπώνεται γραφικά παρακάτω.

c(μg/ml)	t	Area	Height
6	14,253	4798097	4951332
3	14,23	2108517	1864053
1,5	14,287	639042	697041

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30





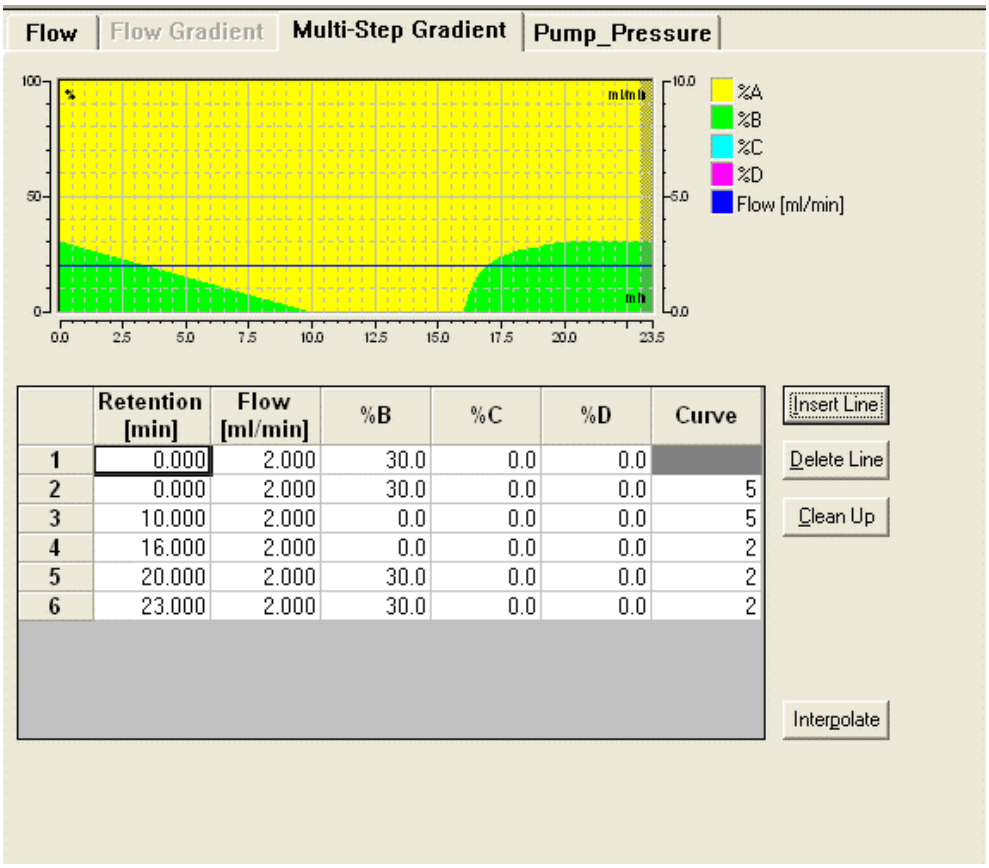
Εικόνα 2.2:Χρωματογραφημα προτύπων διαλυμάτων παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκεντρώσεων 6μg/ml(μαύρο), 3μg/ml(μπλε), 1,5μg/ml(ροζ)

Παρόλα αυτά λόγω του μεγάλου αριθμού των αμινομάδων στην κολιστίνης-τέσσερις πρωτοταγής και δεκατέσσερις δευτεροταγής αμινομάδες-η αντίδραση της κολιστίνης με τον παραγωγοποιητή δεν μας δίνει ένα σταθερό αποτέλεσμα και κατά συνέπεια εμφανίζονται και περαιτέρω κορυφές σε χρόνους μετά τα 14,2 λεπτά που ανιχνεύεται η κολιστίνη, οι οποίες αποδίδονται στην πιο ύστερη αντίδραση κάποιων αμινομάδων της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

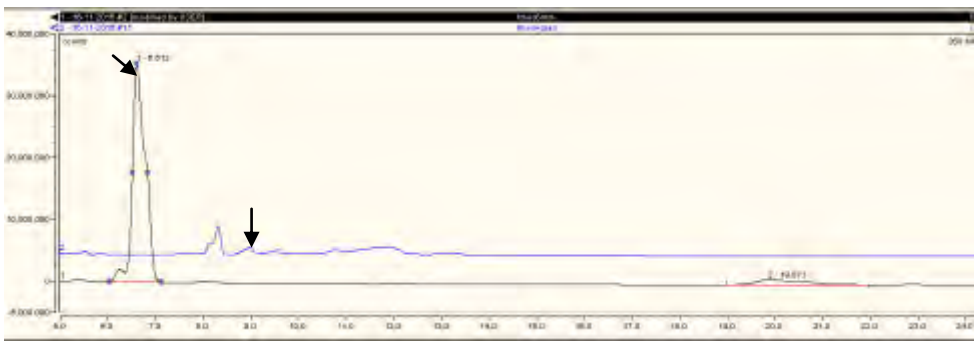
2.2. Βαθμιδωτή έκλουση

Λόγω των πολλών κορυφών που οφείλονταν στα παραπροϊόντα του παραγωγοποιητή επιλέχθηκε η δοκιμή ενός προγράμματος βαθμιδωτής εκλούσης.



Εικόνα 2.3:Προγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Μετά από ανάλυση του παραγωγοποιητή ισοκρατικά και βαθμιδωτά προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



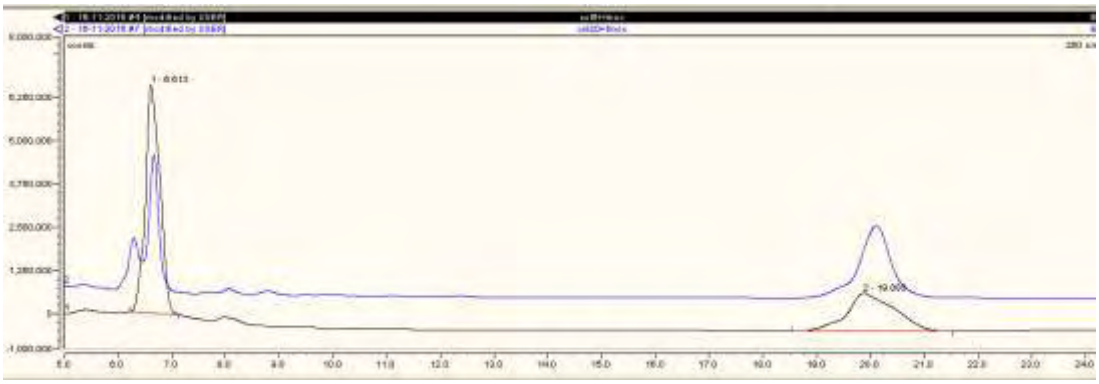
Εικόνα 2.4:Χρωματογραφημα διαλύματος παραγωγοποιητή συγκέντρωσης 50 mM με ισοκρατικό(μαύρο) και βαθμιδωτό(μπλε) τρόπο ελκούσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Στην ισοκρατική έκλουση παρατηρείται μια κορυφή στα 6,6 λεπτά η οποία αποδίδεται στον παραγωγοποιητή, ενώ στην βαθμιδωτή έκλουση η κορυφή αυτή εμφανίζεται λίγο αργότερα σε μικρότερο εμβαδόν στα 8,3 λεπτά.

Σε επόμενη ανάλυση έγιναν επαναλήψεις της μέτρησης της παραγωγοποιημενης κολιστινης(συγκέντρωσης 6μg/ml).Οι μετρήσεις έδωσαν επαναλήψιμα αποτελέσματα, οπότε η αντίδραση μας πραγματοποιείται με σταθερό τρόπο ενώ ταυτόχρονα το εμβαδόν της κορυφής του παραγωγοποιητή μειώνεται σε σχέση με το εμβαδόν που μας δόθηκε όταν αναλύθηκε μονός του, γεγονός που επίσης επαληθεύει την ορθή πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Επιπλέον η αντίδραση του παραγωγοποιητή με κάποιες από τις αμινομάδες της κολιστίνης επαληθεύεται και από την μέτρηση διαλύματος κολιστίνης 20μg/ml μαζί με παραγωγοποιητή, που μας εμφανίζει την τιμή του εμβαδού του παραγωγοποιητή περίπου στο μισό σε σχέση με την μέτρηση του δείγματος κολιστίνης συγκέντρωσης 6μg/ml.



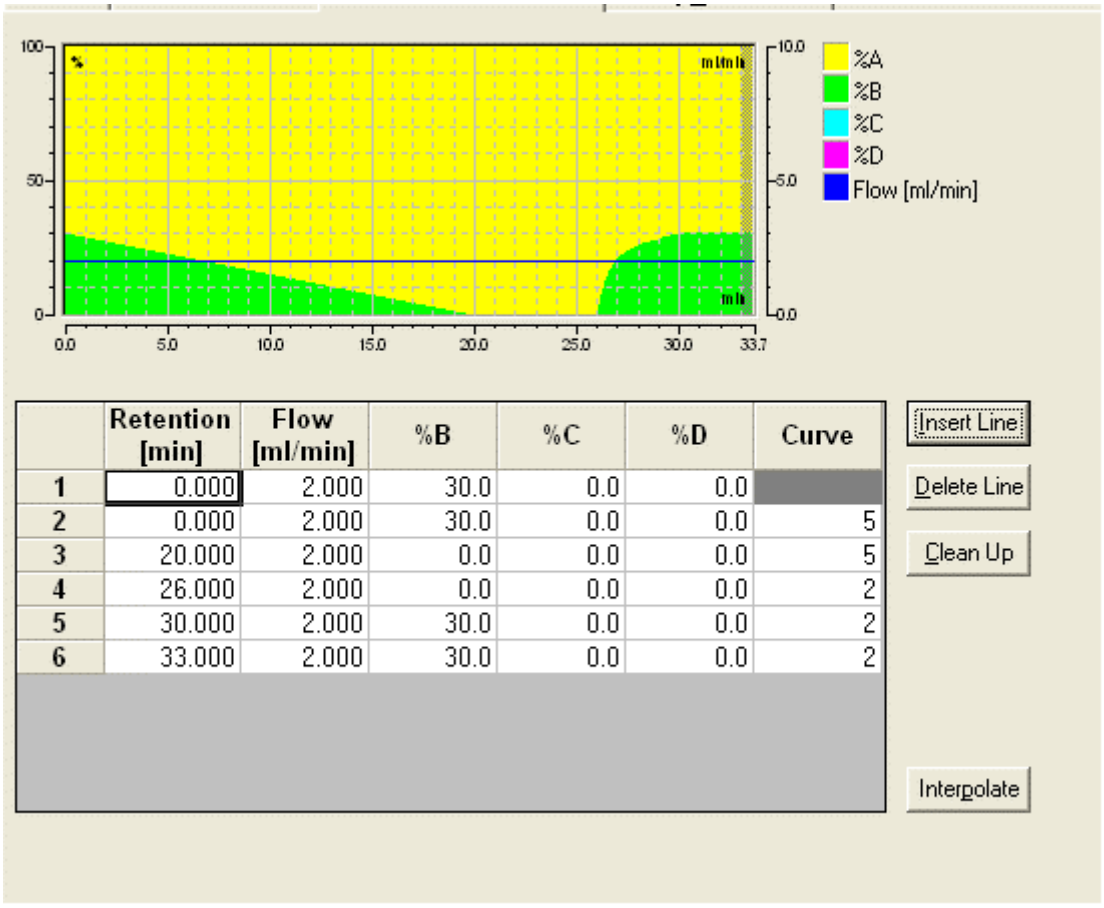
Εικόνα 2.5:Χρωματογραφημα διαλύματος παραγωγοποιημενης κολιστινης συγκέντρωσης 6μg/ml(μαύρη γραμμή)& διαλύματος παραγωγοποιημενης κολιστινης συγκέντρωσης 20μg/ml(μπλε γραμμή)

Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μετρήσεων του διαλύματος της κολιστίνης συγκέντρωσης 6μg/ml ισοκρατικά και βαθμιδωτά. Από το χρωματογράφημα αυτό γίνεται εμφανές ότι έχουμε είτε κάποια συγκράτηση στην στήλη είτε κάποια παραπροϊόντα της αντίδρασης τα οποία μας εμποδίζουν να δούμε κάποια κορυφή που αντιστοιχεί στην κολιστίνη στην ισοκρατική έκλουση. Τα παραπροϊόντα αυτά εξάλλου δημιουργούν και τις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

πολλαπλές κορυφές οι οποίες εμφανίζονται στην αρχή της βαθμωτής εκλούσης. Παρόλα αυτά η κορυφή που αποδίδεται στον παραγωγοποιητή εξακολουθεί να φαίνεται και στις δυο περιπτώσεις έχοντας και πάλι την ιδία αναλογία χρονών και εμβαδόν όπως είχαμε αρχικά παρατηρήσει.

Ένα άλλο πρόβλημα που εκδηλώθηκε ήταν η αδυναμία διαχωρισμού των δυο εκδόχων της κολιστινης και για τον λόγο αυτό, αποφασίστηκε η αλλαγή της χρονικής διάρκειας της ανάλυσης μας από τα 23 στα 33 λεπτά, καθώς έγινε η υπόθεση ότι ο πρώτος χρόνος συμπίεζε τα συστατικά μας και περνούσαν ταυτόχρονα από την χρωματογραφική μας στήλη.



	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0.000	2.000	30.0	0.0	0.0	
2	0.000	2.000	30.0	0.0	0.0	5
3	20.000	2.000	0.0	0.0	0.0	5
4	26.000	2.000	0.0	0.0	0.0	2
5	30.000	2.000	30.0	0.0	0.0	2
6	33.000	2.000	30.0	0.0	0.0	2

Εικόνα 2.4: Νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

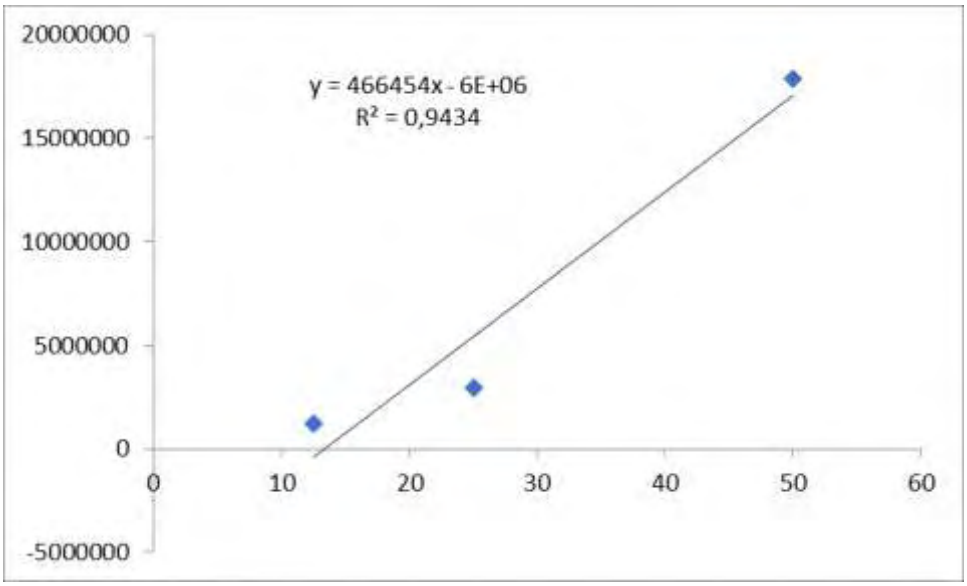
2.2.1.Κατασκευή καμπυλών αναφοράς

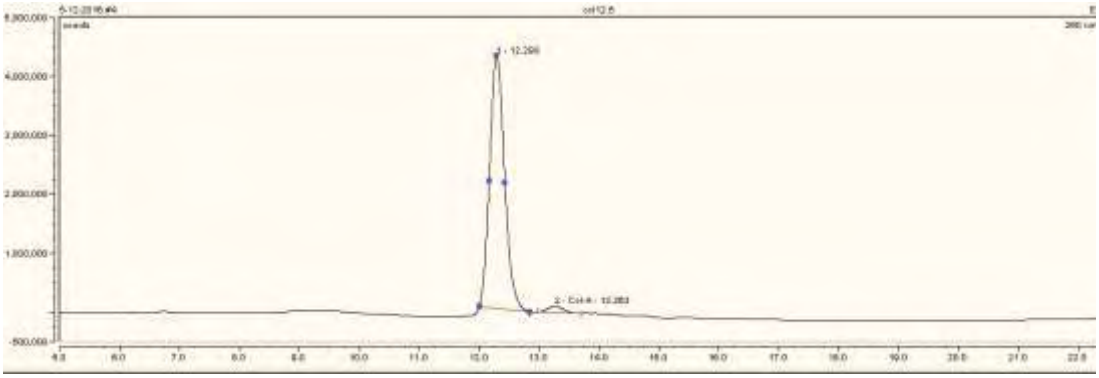
Για να αποδειχθεί η γραμμικότητα της μεθόδου μας πραγματοποιήσαμε δυο πειράματα απομονωμένης παραγωγοποιημένης κολιστινης μέσω της χρήσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

εκχύλισης στέρεας φάσης με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης .Στο πρώτο πείραμα αναλυθήκαν 3 δείγματα παραγωγοποιημενης κολιστινης τα οποία προήλθαν από διαδοχικές αραιώσεις. Οι συγκεντρώσεις που αναλυθήκαν ήταν 50,25,12.5μg/ml.Τα αριθμητικά αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης φαίνονται παρακάτω:

c(μg/ml)	t	Area
50	14,3	17902024
25	12,4	2941072
12,5	12,2	1234907



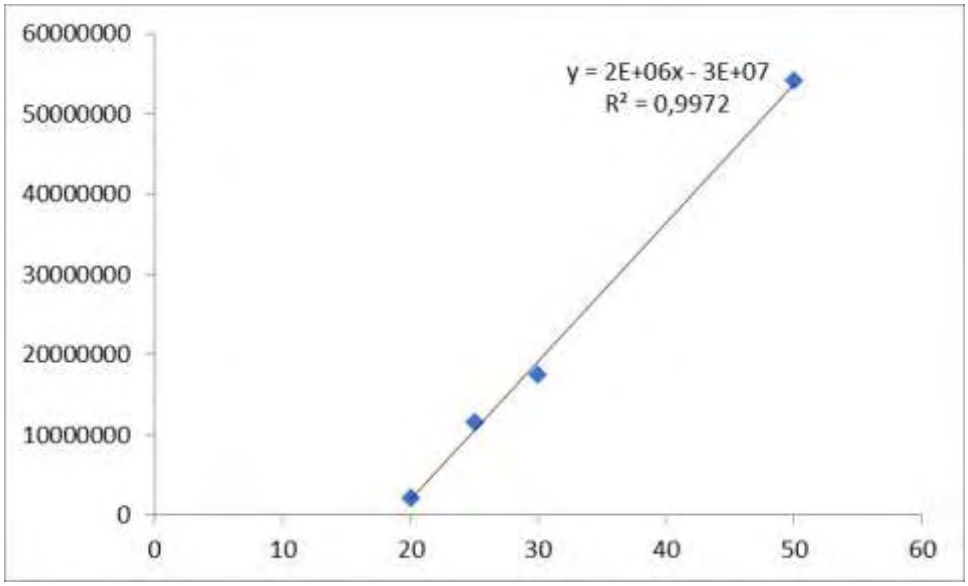


Εικόνα 2.5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα παραγωγοποιημένης κολιστίνης συγκέντρωσης 12.5μg/ml

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Έπειτα παρασκευάστηκαν ανεξάρτητα διαλύματα κολιστινης συγκεντρώσεων 50,30,25 και 20 μg/ml,τα οποία υπέστησαν την ιδιά προ κατεργασία με τα προηγούμενα. Να αναφέρουμε εδώ ότι η κολιστίνη μετά από μια χρωματογραφική ανάλυση και λόγω της σύστασης(μείγμα κολιστινης Α και Β),αναμένεται να δώσει δυο κορυφές. Παρόλα αυτά ο διαχωρισμός αυτών τον κορυφών δεν κατέστη ξεκάθαρος στο πείραμα μας και για τον λόγο αυτό λήφθηκαν υπόψιν ως μια κορυφή. Τα αριθμητικά αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

c(μg/ml)	t	Area
20	11,4	2199861
25	12,8	11590106
30	12,9	17438484
50	12,9	54125704



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

3. Επιλογή διαφορετικού παραγωγοποιητή

Εκτός από το 9-φλυορενυλ-μεθυλ-οξυ-καρβονυλο χλωρίδιο**(9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride(FMOC-Cl)) δοκιμάστηκε και η ιχνηθέτηση της κολιστινης με την χρήση της** όρθο-φθαλαλδεϋδης (*ortho*-phthalaldehyde (OPA)).Η ουσία αυτή είχε απορριφθεί παλαιοτέρα λόγω της πολυπλοκότερης προ κατεργασίας της και της αστάθειας της, παρόλα αυτά εμείς επιχειρήσαμε μια σύγκριση των δυο ουσιών που παραγωγοποιούν την κολιστίνη.

Η διαδικασία παρασκευής του OPA που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

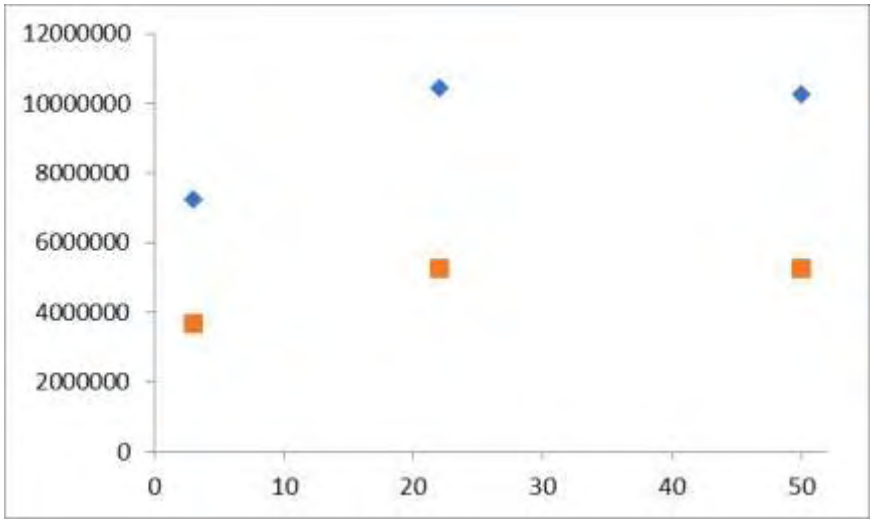
80mg OPA προστέθηκαν σε διάλυμα μεθανόλης όγκου 15ml και εν συνέχεια στο διάλυμα αυτό προστέθηκαν 15ml βορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH=10.5) και 0,1ml μερκαπτοαιθανολης.Το διάλυμα παρέμεινε για 12 ώρες στο σκοτάδι και στην συνέχεια φυλάχθηκε σε θερμοκρασία 4^{o} C.Για την παραγωγοποιητή της κολιστινης είχαμε μια αναλογία κολιστινης:OPA 10:1.Η αντίδραση λάμβανε χωρά 3 λεπτά και έπειτα το δείγμα ήταν έτοιμο για ανάλυση.

Συγκρίνοντας τους δυο αυτούς παραγωγοποιητές γίνεται εμφανής η υπεροχή του **FMOC-Cl έναντι του OPA στα εξής δυο στοιχεία:**

- ✓ Ευκολία παρασκευής του παραγωγοποιητή
- ✓ Σταθερότητα του παραγωγοποιητή με το πέρας του χρόνου

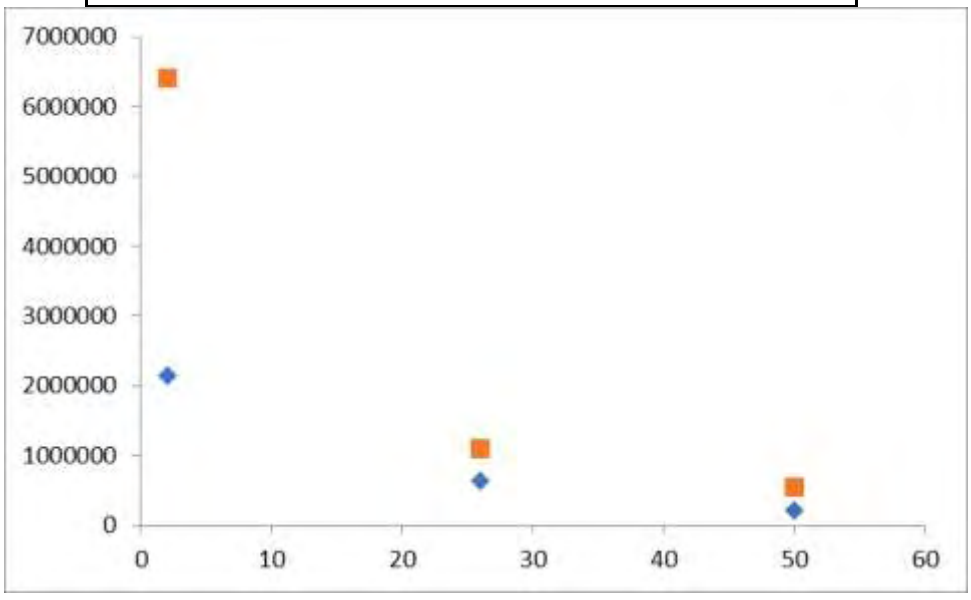
Χρόνος(hours)	εμβαδόν κολιστίνης B	εμβαδόν κολιστίνης A
3	7229614	3679611
22	10433257	5245307
50	10266319	5244480

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 4.1:Συγκριση σταθερότητας FMOC-Cl σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα

χρόνος(hours)	εμβαδόν κολιστίνης B	εμβαδόν κολιστίνης A
2	2139240	6409179
26	640556	1088597
50	211515	542045



Εικόνα 4.1:Συγκριση σταθερότητας OPA σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

Στον αντίποδα αυτών το OPA υπερέχει του FMOC-Cl στα εξής:

- ✓ Μικρότερος χρόνος ανάλυσης
- ✓ Καλύτερος διαχωρισμός των δυο κορυφών της κολιστινης
- ✓ Λιγότερες κορυφές στην χρωματογραφική ανάλυση

Και τα δυο πλεονεκτήματα του OPA έναντι του FMOC-Cl,οφείλονται στην δυνατότητα του OPA να αντιδρά μόνο με τις πρωτοταγής αμίνες ενώ το FMOC-Cl αντιδρα και με τις πρωταταγής και με τις δευτεροταγης.

4. Αλλαγή Χρωματογραφικής Στήλης(Πυρήνα-κελύφους/Core shell)

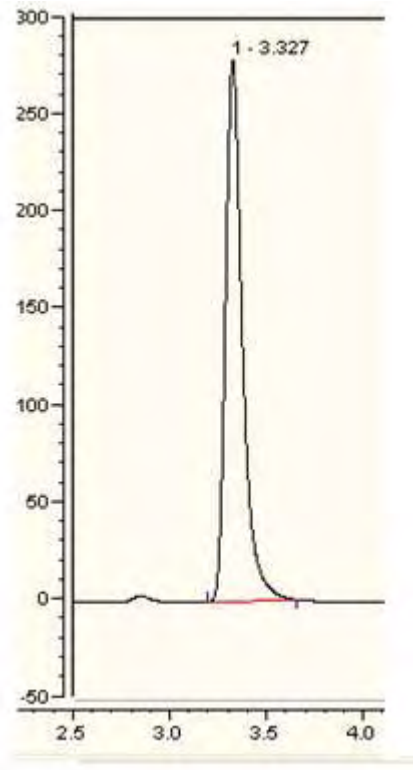
Σε μια προσπάθεια καλύτερου διαχωρισμού των δυο ενώσεων που συνθέτουν την κολιστίνη, στην χρωματογραφική ανάλυση, δοκιμάστηκε στήλη της νέας τεχνολογίας core shell.Η στήλη αυτή ήταν η Kinetex 2.6u C18 100 A^{o} , LC column 100 x 3.00mm (Phenomenex, USA).Αρχικά για να επαληθευτεί η σωστή λειτουργία της στήλης παρασκευάστηκε διάλυμα τολουολίου σε αναλογία διαλυτών 65:35 μεθανόλη:νερό ,εισήχθη στο όργανο για να αναλυθεί και η δοθείσα κορυφή συγκρίθηκε τόσο με το χρωματογράφημα το οποίο έχει δοθεί από την εταιρεία παραγωγής της στήλης, όσο και με το χρωματογράφημα που αφορούσε το ίδιο διάλυμα αλλά προέκυψε από χρωματογραφική ανάλυση της προηγουμένη στήλη. Έτσι καταλήξαμε στα συμπεράσματα ότι:

α) η στήλη μας λειτουργεί καλά, αφού υπήρξε ταύτιση της κορυφής του τολουολίου που εμφανίστηκε στο UV με αυτήν που υποδείκνυε η εταιρεία παραγωγής της στήλης και

β)η κορυφή που προέκυψε από την στήλη πυρήνα-κελύφους δίνει πιο ψηλή κορυφή, ίδιου εμβαδού σε σύγκριση με την κορυφή της προηγουμένης στήλης, οπότε με βάση την θεωρία των θεωρητικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

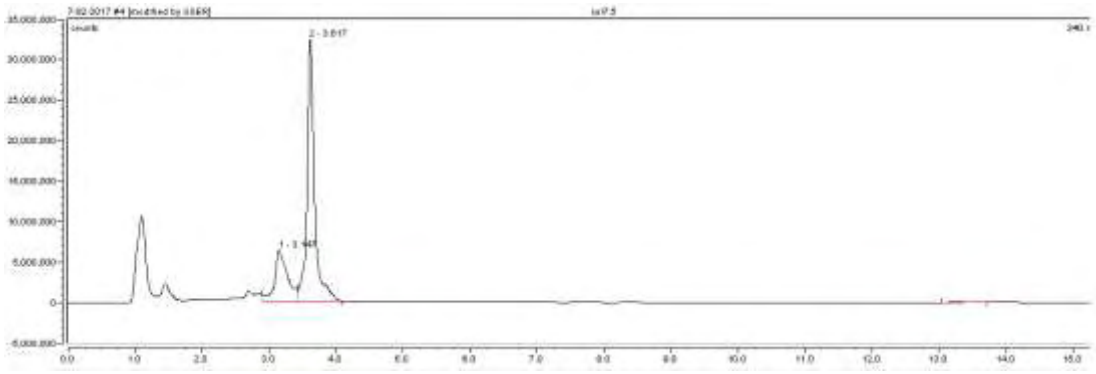
πλακών η απόδοση της στήλης πυρήνα-κελύφους είναι καλύτερη, καθώς ο αριθμός των θεωρητικών πλακών στα πείραμα μας υπολογίστηκε ότι ισούται με δεκαοχτώ.



Εικόνα 4.1: κορυφή του τολουολίου από την στήλη πυρήνα -κελύφους.

Στην συνέχεια παρασκευάστηκαν διαλύματα κολιστινης συγκεντρώσεων 1, 2.5, 5, 7.5, 10μg/ml τα οποία παραγωγοποιήθηκαν με την χρήση του OPA.Η αντίδραση της κολιστινης με το OPA διήρκησε 3 λεπτά και ακολουθήσε η χρωματογραφική ανάλυση. Ο τρόπος έκλουσης που ακολουθήθηκε ήταν ο ισοκρατικό ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν τα 16 λεπτά, καθώς η αλλαγή του παραγωγοποιητή αναμενόταν να εμφανίσει τις κορυφές της κολιστινης αρκετά νωρίτερα σε σχέση με την προηγουμένη μέθοδο. Η κορυφή της κολιστινης Β εμφανίζεται σε χρόνο 3.14 λεπτά ενώ η κορυφή της κολιστινης Α σε χρόνο 3.61 λεπτά. Η αναλογία των κορυφών είναι 1:3,γεγονος που επαληθεύεται και από το θεωρητικό κομμάτι.(Εμβαδό κορυφών 1373127:4198715)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



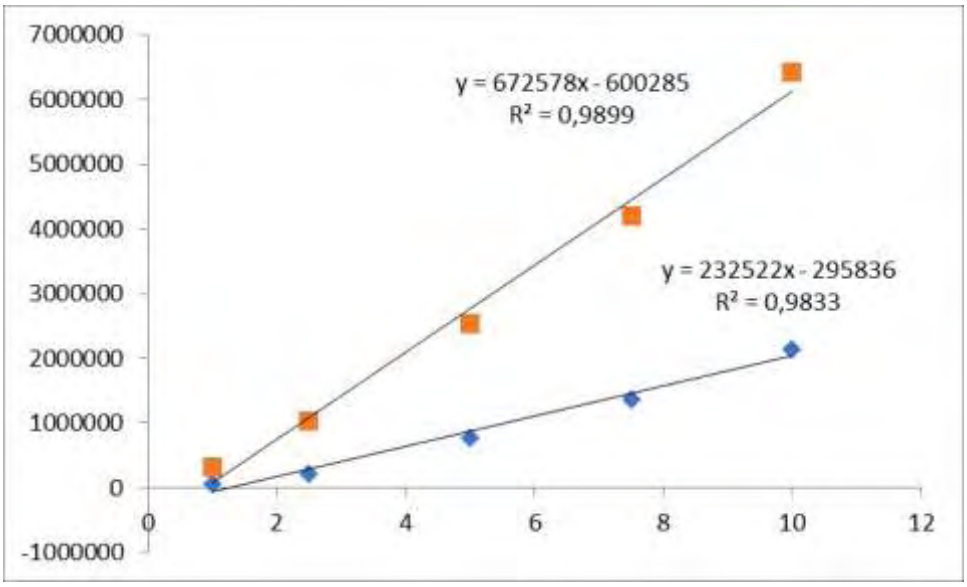
Εικόνα 4.2:Χρωματογραφημα κολιστινης συγκέντρωσης 7.5μg/ml παραγωγοποιημένης με OPA

5. Εκτιμηση της ακριβειας της μεθόδου.

Για να εξεταστεί η δυνατότητα ακρίβειας των αποτελεσμάτων μας, φτιάξαμε μια καμπύλη αναφοράς από δείγματα συγκεκριμένων συγκεντρώσεων τόσο για διαλύματα κολιστινης παραγωγοποιημένα με FMOC-Cl όσο και για διαλύματα παραγωγοποιημένα με OPA.Από καθεμία από τις δυο αυτές καμπύλες προέκυψαν δυο εξισώσεις οι οποίες αφορούσαν την συγκέντρωση της κολιστινης Β και της κολιστινης Α ανά πείραμα. Με την χρήση των εξισώσεων κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης κάθε διαλύματος που παρασκευάσαμε και η απόκλιση του από την αναμενομένη συγκέντρωση της κολιστινης.

- Για την δοκιμή της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή OPA παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 1 ,2.5 ,5 ,7.5, 10 μg/ml.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30



Εικόνα 5.2:Καμπυλη αναφοράς για την κολιστίνη Α(καφέ γραμμή) & την κολιστίνη Β(μπλε γραμμή)

Ενώ και σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα αναμενομένης και προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ (μg/ml)	**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΗ από την κολιστίνη Α(μg/ml)**	**ΑΝΑΚΤΗΣΗ %**	**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΗ από την κολιστίνη Β(μg/ml)**	**ΑΝΑΚΤΗΣΗ %**
1	1.34	134	1.56	156
2.5	2.42	96,8	2.22	88,8
5	4.67	92	4.56	91,2
7.5	7.13	95	7.17	95,6
10	10.42	104,2	10.47	104,7

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

6. Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις

Στηριζόμενοι σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξήχθησαν κάποια συμπεράσματα τα οποία συνοψίζονται παρακάτω:

- ✓ Ο ποσοτικός προσδιορισμός της κολιστίνη μετά από παραγωγοποίηση με FMOC-Cl δεν είναι εφικτός λόγω του ότι:
  - η παραγωγοποιήση είναι ημιτελής και οδηγεί σε πολλά προϊόντα και ως αποτέλεσμα παρατηρούνται πολλές χρωματογραφικές κορυφές
  - η παράταση χρόνου αντίδρασης ή η αύξηση της θερμοκρασίας της δεν οδηγεί στην σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων της παραγωγοποίησης
  - Η εφαρμογή εκχύλισης στερεάς φάσεις για την απομόνωση των πλήρως παραγωγοποιημένων προϊόντων και η εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης βελτιώνει την χρωματογραφική εικόνα όμως δεν οδηγεί στην καλή ποσοτικοποίηση της κολιστίνης
- ✓ Η χρήση εναλλακτικού παραγωγοποιητή OPA οδηγεί σε βέλτιστα ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα.
  - Η αντίδραση της κολιστινης με το OPA πραγματοποιείται πλήρως σε μικρό χρόνο και δίνει καλύτερο διαχωρισμό της κολιστινης A και B στην χρωματογραφική ανάλυση.
  - Η απόκριση του ανιχνευτή είναι γραμμική σε κλίμακα των κλινικά αναμενόμενων συγκεντρώσεων με R^2=0,99 για την κολιστίνη A και R^2=0,98 για την κολιστίνη B.
  - Μέση ακρίβεια προσδιορισμού κολιστίνης A είναι 104,4± 17% και της κολιστίνης B 95 ± 7% (εύρος συγκεντρώσεων 2,5-10ng/mL).
  - Τα παράγωγα της OPA έχουν μικρότερη σταθερότητα και απαιτούν την ανάλυση τους εντός της ίδιας μέρας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

- ✓ Η χρήση της στήλης τεχνολογίας πυρήνα-κελύφους (core-shell) Kinetex 2,6μm C18 (Phenomenex, USA) επιταχύνει την ανάλυση και βελτιώνει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php
2. https://www.drugs.com/article/antibiotics.html
3. A Dictionary of Biomedicine-John Lackie
4. Treatment of infections in elderly patients, Thomas T. Yoshikawa. Author links open the author workspace. MDOpens the author workspaceDean C. Norman. Author links open the author workspace. MD(σελ. 23-31)
5. Χαλεβελακης ΓΕ, Λεγακης ΝΙ, Περογαμβρος ΤΗ, Αντιβιοτικά και συνήθεις λοιμώξεις(σελ. 247)
6. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K. A new antibiotic “colistin” produced by spore-forming soil bacteria, J Antibiot (σελ. 457-8)
7. https://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialResistance/Pages/colistin.aspx
8. Φαρμακοκινητική μελέτη της κολιστινης σε βαθέως πάσχοντες ασθενείς στην μονάδα εντατικής θεραπειας. Μαρινα-Ζωη Φουστέρη(σελ. 10-13)
9. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria
10. Liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry for the characterization of polypeptide antibiotics of the colistin series in commercial samples.Divyabharathi Chepyalaa, I-Lin Tsaia, Hsin-Yun Sunb,Shu-Wen Lina, Ching-Hua Kuoa.
11. Comment on: Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis
12. A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography, Jian Li , Robert W. Milne , Roger L. Nation , John D. Turnidge , a,c d Kingsley Coulthard , David W. Johnson
13. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate
14. The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis
15. Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century
16. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma
17. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. Int. J. Antimicrob. Agents, 194–199

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30

18. Rodriguez CH, Hernan RC, Bombicino K et al. Selection of colistin-resistant Acinetobacter baumannii isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 65(2), 188–191.
19. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ et al. Treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin. Infect. Dis. 36(9), 1111–1118(
20. Park YK, Jung SI, Park KH et al. Independent emergence of colistin-resistant Acinetobacter spp. isolates from Korea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64(1), (43–51).
21. https://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_flur.html
22. Ενόργανη χημική ανάλυση, Ι.Ν Παπαδογιαννης, Β.Φ.Σαμανιδου(σελ. 264-268)
23. PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS, Sixth Edition, authors: Douglas A. Skoog, F. James Holler, and Stanley R. Crouch
24. https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHARM173
25. Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. Richard Hayesa, Adham Ahmeda, Tony Edgeb, Haifei Zhanga.
26. Pushing the performance limits of reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with 1.3 μm core–shell particles
27. «Ανάπτυξη μεθοδων για τον προσδιορισμό διάφορων κατηγοριών αντιβιοτικών στο γάλα με τεχνικές προ κατεργασίας και χρωματογραφική ανάλυσης με χρήση υλικών και στηλών συμβατικής και νέας τεχνολογίας» Καραγεωργού Ευτυχία.
28. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series-Operating Instructions

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
29/05/2024 19:31:12 EEST - 3.17.110.30