

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



ΣΑΡΡΗ ANNA

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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων  
ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΑΚΑΛΩΦ  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

# Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	3
Θεωρητικό μέρος .....	4
<b>1.Αντιβιοτικά .....</b>	<b>5</b>
1.1 Κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών .....	5
<b>2.Κολιστινη .....</b>	<b>9</b>
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
<b>3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού.....</b>	<b>15</b>
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
<b>4. Τεχνολογία συμπαγούς πυρήνα(Core-shell) .....</b>	<b>28</b>
<b>5. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-Προσδιορισμός κολιστινης με την χρήση υγρής χρωματογραφίας &amp; ανιχνευτή φθορισμού.....</b>	<b>30</b>
Πειραματικό μέρος.....	34
Αντιδραστήρια-Όργανα-Συσκευές.....	35
<b>1.Παραγωγοποίηση της κολιστίνης με φθορίζοντα ιχνηθέτη.....</b>	<b>37</b>
1.1. Παραγωγοποίηση 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
1.2Παραγωγοποίηση σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και απομόνωση της παραγωγοποιημένης κολιστίνης .....	42
<b>2. Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC-FLD .....</b>	<b>43</b>
2.1. Ισοκρατική έκλυση .....	43
2.2. Βαθμιδωτή έκλυση .....	46
2.2.1 Κατασκευή καμπυλών αναφοράς.....	48

3. Επιλογή διαφορετικού παραγωγποιητή .....	51
4. Αλλαγή Χρωματογραφικής Στήλης(Πυρήνα-κελύφους/Core shell).....	53
5. Εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου.....	55
6. Συμπεράσματα-Παρατηρήσεις.....	57
Βιβλιογραφία.....	59

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό που συχνά αναφέρεται ως αντιβιοτικό έσχατης 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 Όρθοφθαλαδεΰδης (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 έκλυση με σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο:νερό:τετραϋδροφουράνιο.

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου 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 Γκατζή 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.

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά-επίσης γνωστά με τον όρο αντιμικροβιακά-είναι μια κατηγορία φαρμάκων για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριακών 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 όπου 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<sup>ου</sup> αιώνα ενώ ακολουθήσαν και τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη και βενζυλ-πενικιλίνη.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 προκαλούν. 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 δημόσια υγεία 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.<sup>1</sup>

### 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 ίδια κατηγορία ανήκουν φάρμακα των οποίων οι χημικές δομές είναι συγκρίσιμες καθώς και φάρμακα που ανήκουν στην ίδια τάξη, δηλαδή

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: αμινοπενικιλίνες, 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,

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.



*ΙΧ. Αμινογλυκοσίδες*

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

*Χ. Πολυπεπτίδια*

Τα πολυπεπτίδια δρουν κατά των gram-αρνητικών βακτηρίων διαταράσσοντας την κυτταρική τους μεμβράνη.<sup>3</sup>

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:

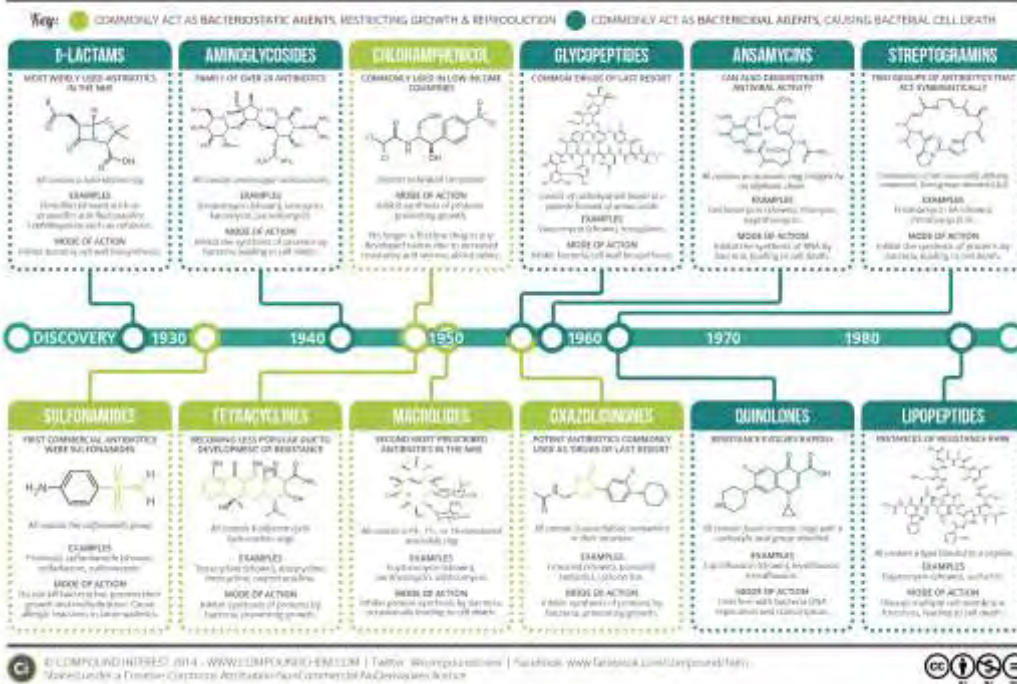
Τετρακυκλίνες

Μακρολίδες

Λινκομυκίνες

Σουλφοναμίδες<sup>4</sup>

# DIFFERENT CLASSES OF ANTIBIOTICS - AN OVERVIEW



Εικόνα 1.1 Βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών και χρονοδιάγραμμα της ανακάλυψής τους.<sup>26</sup>

## 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 πολυμυξινών.<sup>5</sup> Οι πολυμυξίνες είναι μια παλιά τάξη κυκλικών αντιβιοτικών πολυπεπτιδίων που απομονώθηκε το 1949 από το *Bacillus polymyxa*.<sup>6</sup> Πολυμυξίνη Β (PMB) και κολιστίνη (πολυμυξίνη Ε) είναι δευτερογενή μεταβολικά μη ριβοσωμικά πεπτιδικά που παράγονται από τα βακτήρια του εδάφους *P. Polymyxa*. Η διαφορά των δυο αυτών ουσιών έγκειται στην 6<sup>η</sup> θέση της πεπτιδικής αλληλουχίας όπου στην κολιστίνη υπάρχει την D-Leu αντί για D-Phe που υπάρχει στην PMB.<sup>7</sup>

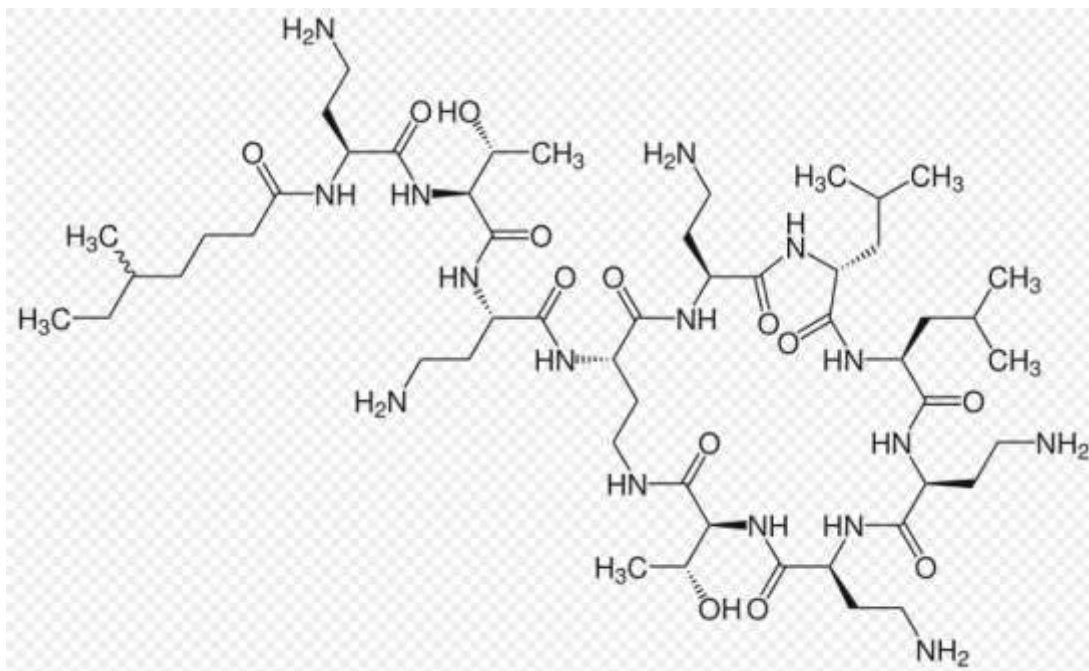
Η κολιστίνη έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των περισσότερων Gram (-) βακτηρίων όπως *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter sp* και έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιψευδομοναδικό αντιβιοτικό από την δεκαετία του 1960. Η κολιστίνη, είναι ένα αντιβιοτικό που είχε εγκαταληφθεί για πολλά χρόνια εξαιτίας της τοξικότητάς 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.<sup>7,8,16</sup>

Ωστόσο λόγω της αύξησης της βακτηριακής αντίστασης και της ανάγκης αντιμετώπισης σοβαρών λοιμώξεων από *P. Aeruginosa* και *A. Baumannii*, 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.<sup>2,5,15</sup>

## **2.2. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ & ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ**

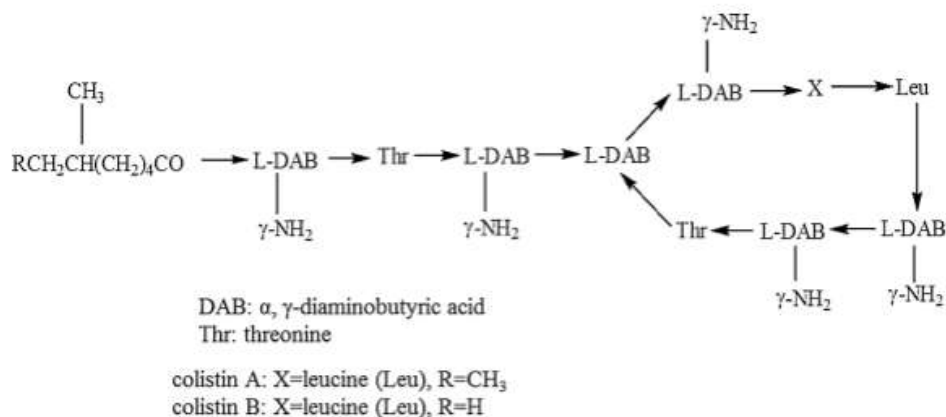
Η κολιστίνη (εικόνα 2.1) αποτελείται από σύνθετο μείγμα 30 ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια δομή. Από τις 30 ενώσεις έχουν αναγνωρισθεί μόνο 13. Συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο το οποίο φέρει μια πλευρική αλυσίδα, η οποία αποτελείται από 3 αμινοξέα και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

διαφορετικά αμινοξέα και στο διαφορετικό λιπαρό οξύ που αποτελούνται.<sup>9,10</sup>



Εικόνα2.1.:Κολιστίνη: 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-[(1R)-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-μεθυλοεπταναμιδίο.(PubMed)

Χαρακτηριστικό των πολυμικσινών είναι η ύπαρξη τμημάτων α,γ-διαμινοβουτυρικού οξέος και λιπόφιλου αμινοξέος D-λεύκινης.<sup>5</sup> Η κολιστίνη Α(πολυμικσίνη Ε1) και η κολιστίνη Β(πολυμικσίνη Ε2) είναι τα δυο κυρία 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.<sup>11</sup> Η κολιστίνη Α φέρει 6-μεθυλοοκτανοϊκό οξύ και η κολιστίνη Β 6-μεθυλοεπτονοϊκό οξύ.(εικόνα 2.2).<sup>12</sup> Οι μορφές της κολιστίνη που διατίθενται στην αγορά είναι η θειική κολιστίνη για per os και τοπική χορήγηση και η μεθανοσουλφονική κολιστίνη για παρεντερική και για από αναπνοής χορήγηση.<sup>13</sup>



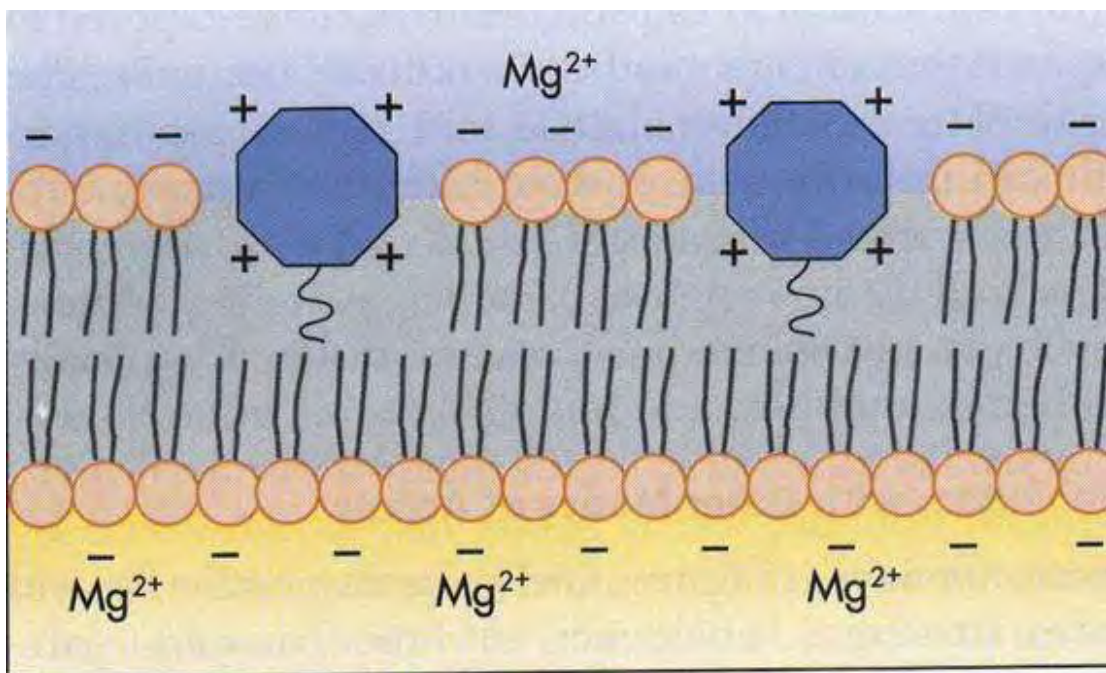
Εικόνα 2.2:Χημική δομή κολιστίνης A & κολιστίνης B<sup>7</sup>

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)<sup>8</sup>. Το λιπαρό οξύ της πλάγιας αλυσίδας είναι υπεύθυνο για τις λιπόφιλες ιδιότητες, ενώ οι πέντε ελεύθερες  $\gamma$ -αμινομάδες των μορίων του  $\alpha,\gamma$ -διαμινοβουτυρικού οξέος είναι υπεύθυνες για τις υδροφιλικές ιδιότητες.<sup>5</sup>

### 2.3. Μηχανισμός δράσης

Η κολιστίνη δρα ως κατιοντικό απορροπταντικό ή επιφανειοδραστική ουσία. Αυτό οφείλεται στις υδρόφιλες θετικά φορτισμένες  $\gamma$ -αμινομαδες του  $\alpha,\gamma$ -διαμινοβουτυρικού 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 A ή στο

εσώτατο μέρος του κορμού της πολυσακχαρικής αλυσίδας.<sup>5</sup> 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 λιποπολυσακχαριτών 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 βακτηρίου.<sup>14</sup>



Εικόνα 2.3: Αντιμικροβιακός τρόπος δράσης της κολιστίνης κατά των gram αρνητικών βακτηρίων-LPS: Λιποπολυσακχαριτής<sup>14</sup>

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

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 μικροβία.<sup>13</sup>Παράλληλα έχει αναφερθεί ότι τα δισθενή καίοντα μαγνησίου και ασβεστίου δρουν ανταγωνιστικά με την κολιστινη<sup>5</sup>

## **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%.<sup>17</sup>

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 οπου είχαν προσβληθεί από το βακτήριο *A. Baumannii*, 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

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

Τέλος μελέτες έχουν σχετίσει την κολιστίνη με την θεραπεία εγκαυμάτων, την θεραπεία κοίλων του εγκεφάλου λόγω της προσβολής από το βακτήριο *A. Baumannii* και την θεραπεία λοιμώξεων, από βακτήρια που παρουσιάζουν πολλαπλή αντίσταση, σε καρκινοπαθείς<sup>15</sup> Παρόλα τα οφέλη που μπορεί να αποφέρει η χορήγηση της κολιστινής λόγω της πιθανότητας εμφάνισης νευροτοξικότητας και νεφροτοξικότητας χρειάζεται η παρακολούθηση των επιπέδων της κολιστινής στον ορό του αίματος, ώστε να προσαρμοστεί η δόση της. Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών προτύπων (CLSI) η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της κολιστινής για τα gram-αρνητικά βακτήρια που προσβάλλει είναι μικρότερη του 2mg/L. Η προτεινομένη συγκέντρωση της κολιστινής στο αίμα κυμαίνεται από 1 έως 5mg/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 κολιστινής σε αυτούς τους πληθυσμούς ασθενών. Λόγω της νευροτοξικότητας και της νεφροτοξικότητας της κολιστινής είναι σημαντικό να προσδιοριστούν τα επίπεδο δόσεων στο αίμα. Υπάρχουν αρκετές αναλυτικές μέθοδοι που έχουν συσταθεί για την ανάλυση της κολιστινής. 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



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

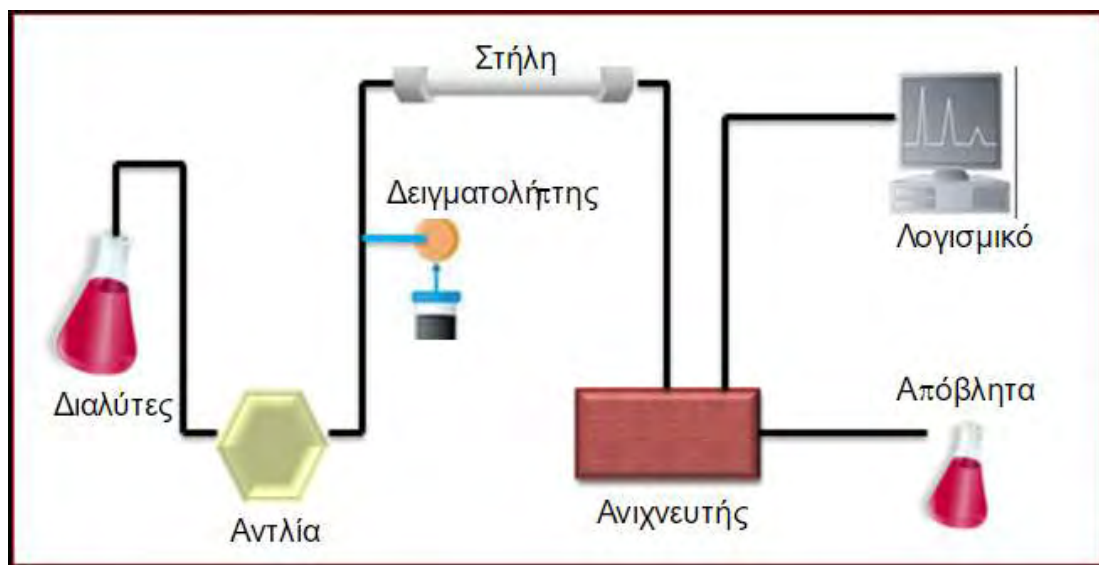
### **3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού**

#### **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 βάσει 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 δειγματοληπτή. Το δείγμα συμπαρασύρεται από τον διαλυτή και τα συστατικά του μετακινούνται μέσα στην στήλη με την μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Κάθε συστατικό δίνει ένα σήμα στον ανιχνευτή που εμφανίζεται ως κορυφή μέσω ενός λογισμικού. Επιπλέον υπάρχει και μια έξοδος αποβλήτων όπου εκεί καταλήγουν όλες οι

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 χρωματογραφικές 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.<sup>22</sup>

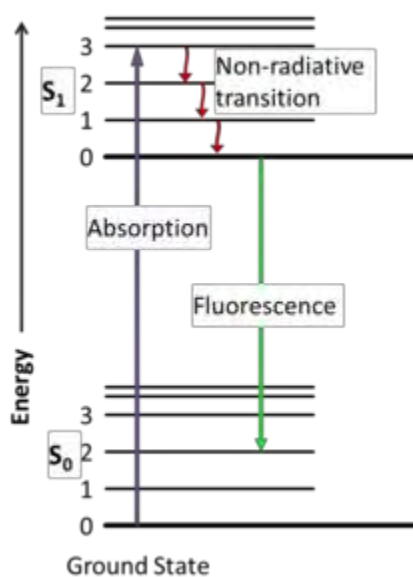


Εικόνα 3.1: Αναπαράσταση της γενικής διάταξης της υγρής χρωματογραφίας

### 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

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. Αυτή ακριβώς η ενέργεια είναι που κάνει τα μόρια να φθορίζουν.



Εικόνα 3.2: Ενεργειακές 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 διεγείρονται.<sup>23</sup>

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.

- Οι ηλεκτρονιοδότες(-NH<sub>2</sub>, -OH), αυξάνουν τον φθορισμό, ενώ οι ηλεκτρονιοφιλικές ομάδες μειώνουν ή 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 όπου δεν υπάρχει άλλη αύξηση.<sup>24</sup>

### 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.<sup>17</sup> Η ευαισθησία του ανιχνευτή φθορισμού είναι 10-1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ανιχνευτή UV, ενώ η εκλεκτικότητα του υπερέρχει 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.<sup>22</sup>

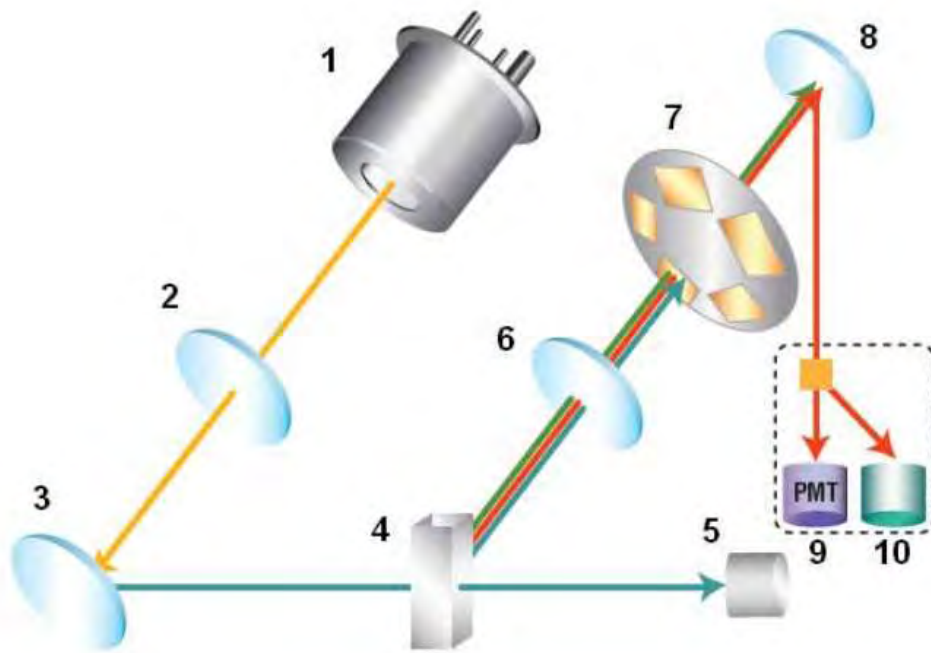
Περίπου το 15% των υπάρχουσών ενώσεων έχουν έναν φυσικό φθορισμό. Η παρουσία του συζευγμένου ρι-ηλεκτρονίου, ειδικά στις αρωματικές ενώσεις δίνει την πιο έντονη φθορίζουσα δραστηριότητα. Άλλες ουσίες οι οποίες φθορίζουν, αλλά λιγότερο, είναι αλειφατικές και αλεικυκλικές ενώσεις με ομάδες καρβονυλίου, 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.<sup>21</sup>

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



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

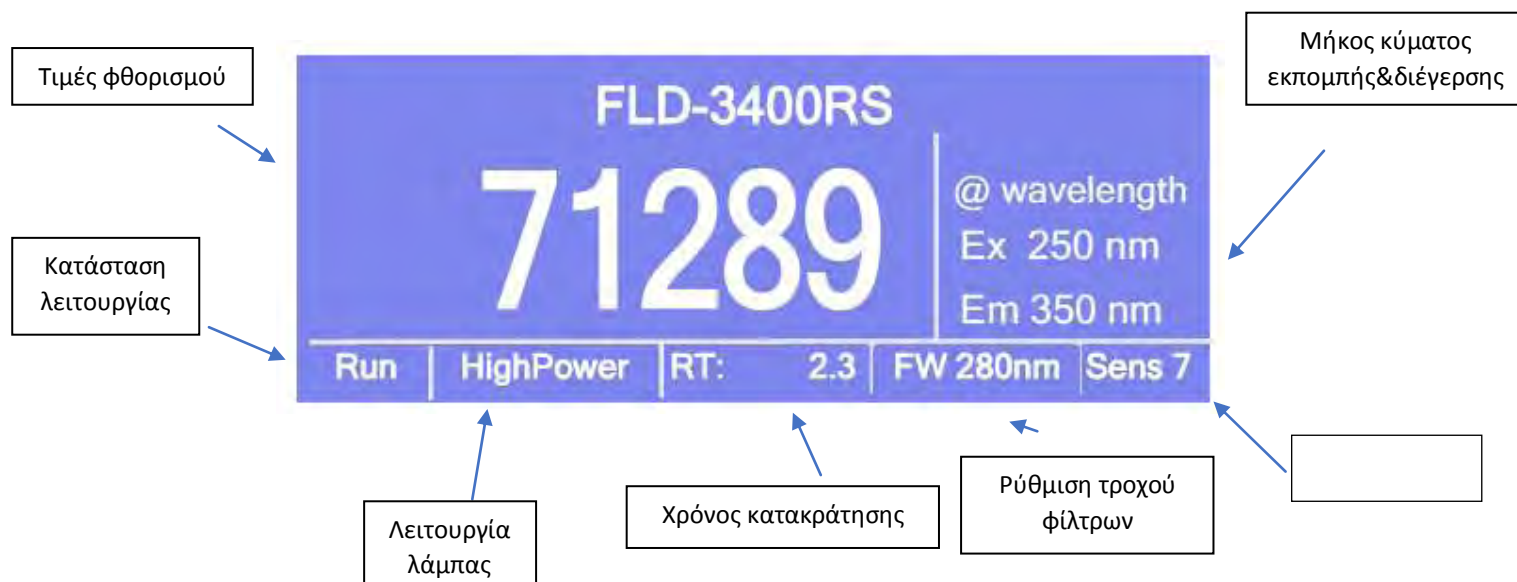
1. Λάμπα ξένου (Xenon lamp)
2. Οπτικό σύστημα λάμπας (Lamp optics)
3. Μονοχρωμάτορας διέγερσης (Excitation monochromator)
4. Κυψέλη ροής (Flow cell)
5. Ανιχνευτής αναφοράς (Reference detector)
6. Σύστημα οπτικής εκπομπής (Emission optics)
7. Τροχός φίλτρων (Filter wheel)
8. Μονοχρωμάτορας εκπομπής (Emission 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

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(φωτοπολλαπλασιαστή) και μετράται .

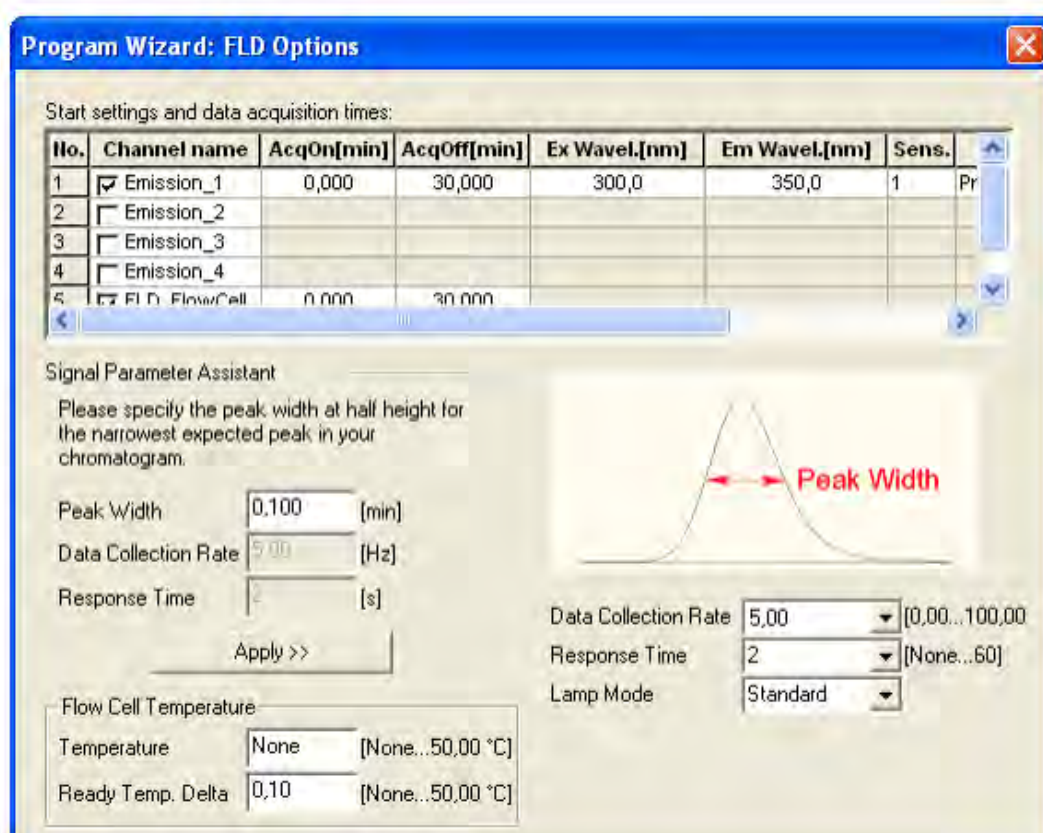
Κατά την έναρξη λειτουργίας του μηχανήματος γίνεται ένας αυτοέλεγχος για την εξισορρόπηση όλων των παραμέτρων και με το πέρας αυτού η αρχική οθόνη αλλάζει στην οθόνη κατάστασης η οποία μας ενημερώνει για:

- 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)

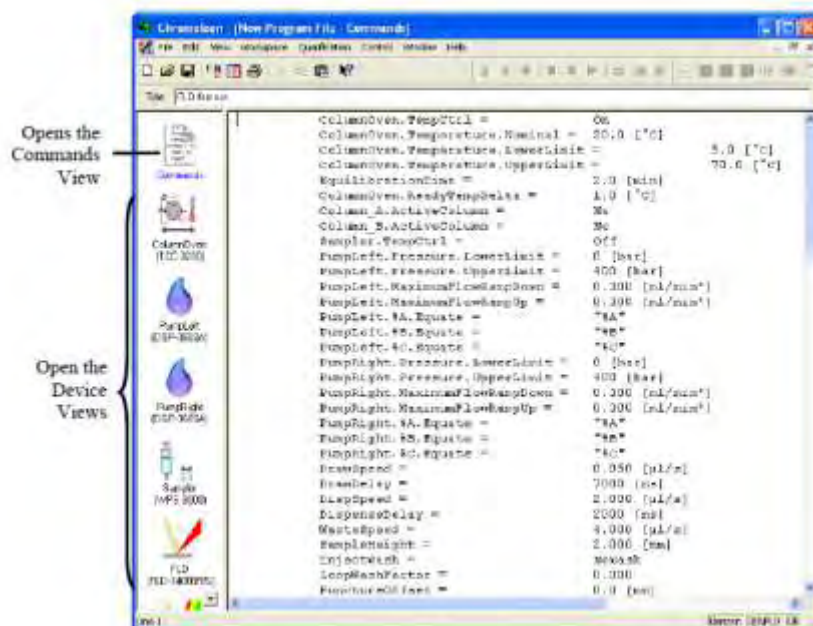
Οι παράμετροι του προγράμματος του φθορισμού που θα τρέξει κάθε φορά ρυθμίζεται μέσω του οδηγού FLD. Μέσω αυτού του οδηγού μπορούμε να επιλέξουμε ένα ή περισσότερα κανάλια εκπομπής. Αν επιλεγεί μόνο ένα κανάλι εισάγετε το αναμενόμενο ελάχιστο πλάτος κορυφής. Το πρόγραμμα χρονομετρεί υπολογίζει τον κατάλληλο ρυθμό συλλογής δεδομένων και τον χρόνο απόκρισης βάσει 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.





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 περιγράψουν 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.

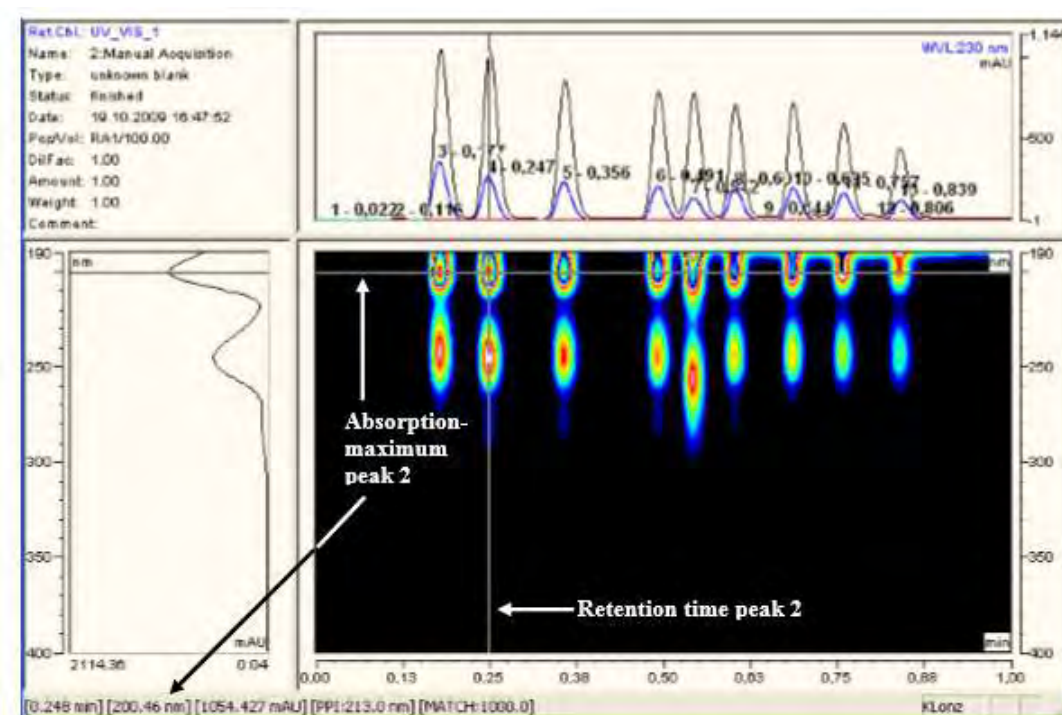
### **Μέθοδος 1<sup>η</sup>:***ρυθμιση με την χρήση ενός δείγματος στον ανιχνευτή φθορισμού*

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 2<sup>η</sup>:***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

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 δίδων.

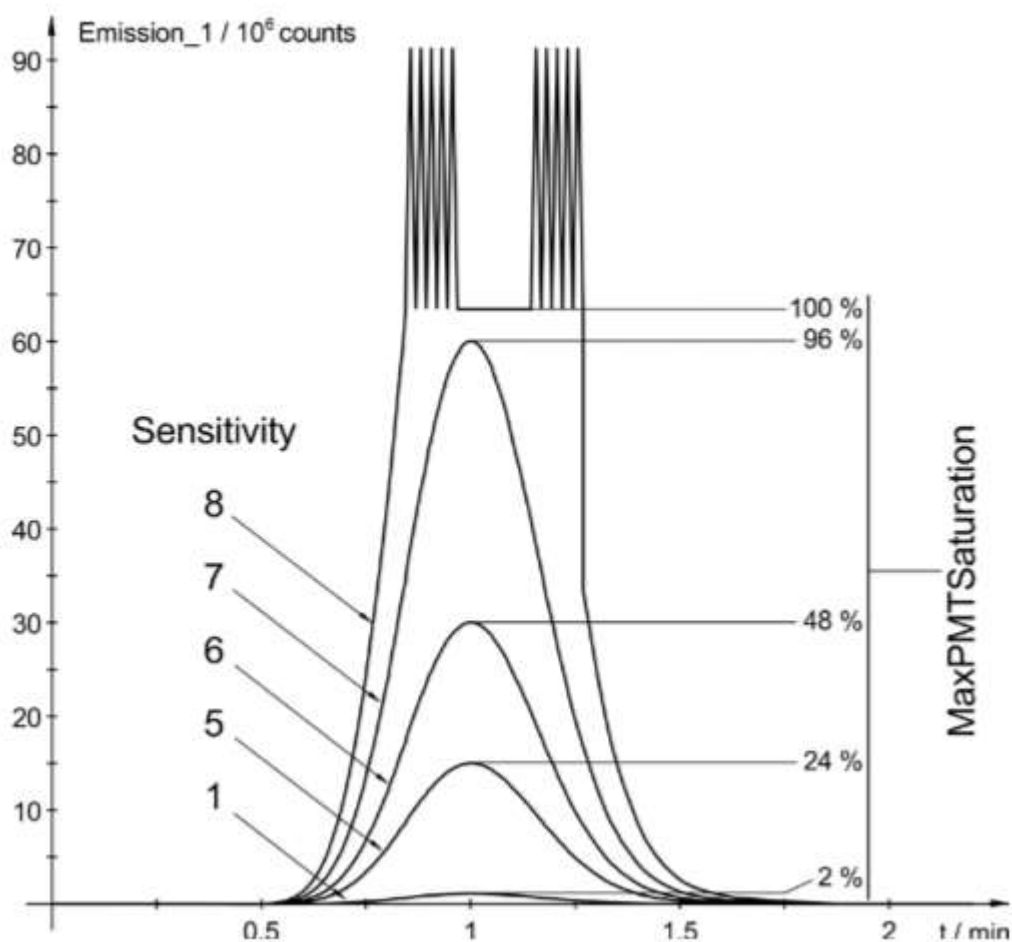
### 3.3. Ευαισθησία ανιχνευτή φθορισμού

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.

- 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.<sup>28</sup>



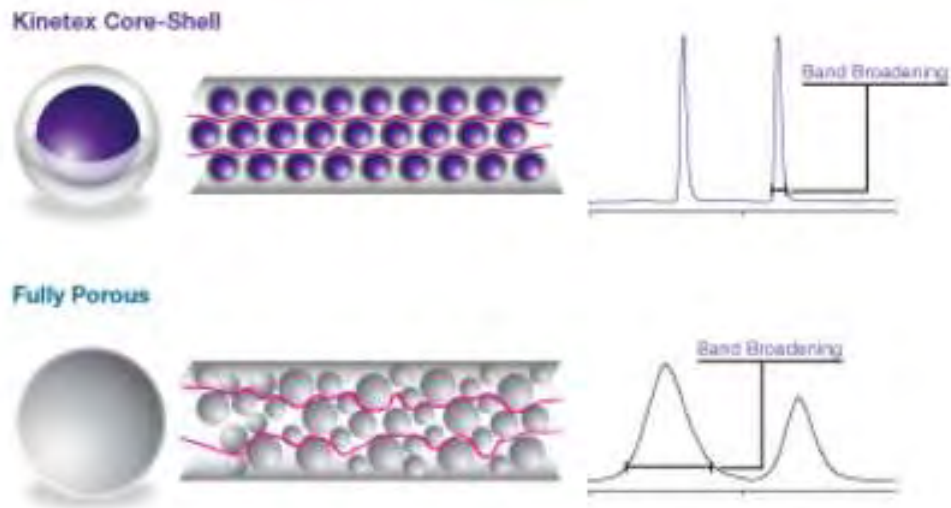
Εικόνα 3.9:Αποτελέσματα ρύθμισης της ευαισθησίας

#### 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 χρόνια για την πλήρωση των χρωματογραφικών στηλών χρησιμοποιούνται μικροσφαιρίδια συμπαγούς πυρήνα(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 πυρήνα σε σχέση με τα συμβατικά σωματίδια πλήρους πορώδους.<sup>25</sup>

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.<sup>27</sup>



Εικόνα 4.1: Αποτελέσματα χρωματογραφικού διαχωρισμού με χρήση 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.<sup>25</sup> 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

πορώδη σωματίδια και απορροφούν αποτελεσματικά αυτού του είδους την θερμότητα.<sup>25</sup>

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.<sup>27</sup>

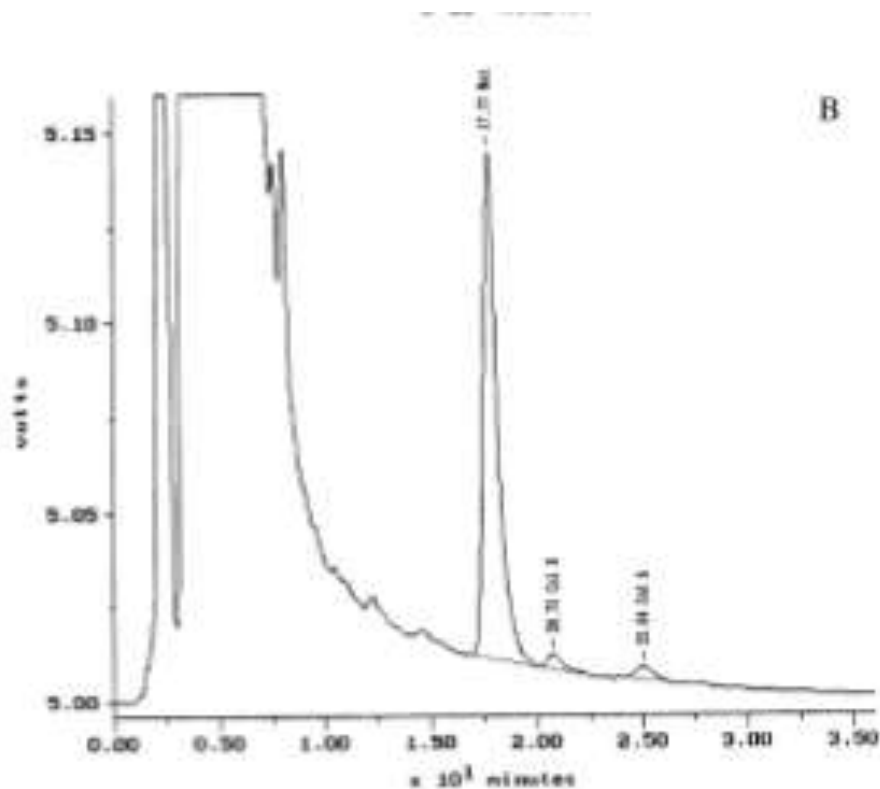
## **5. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-Προσδιορισμός κολιστινης με την χρήση υγρής χρωματογραφίας & ανιχνευτή φθορισμού.**

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

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 δημοσιεύτηκαν από την παραπάνω ερευνά είχαν την παρακάτω μορφή:



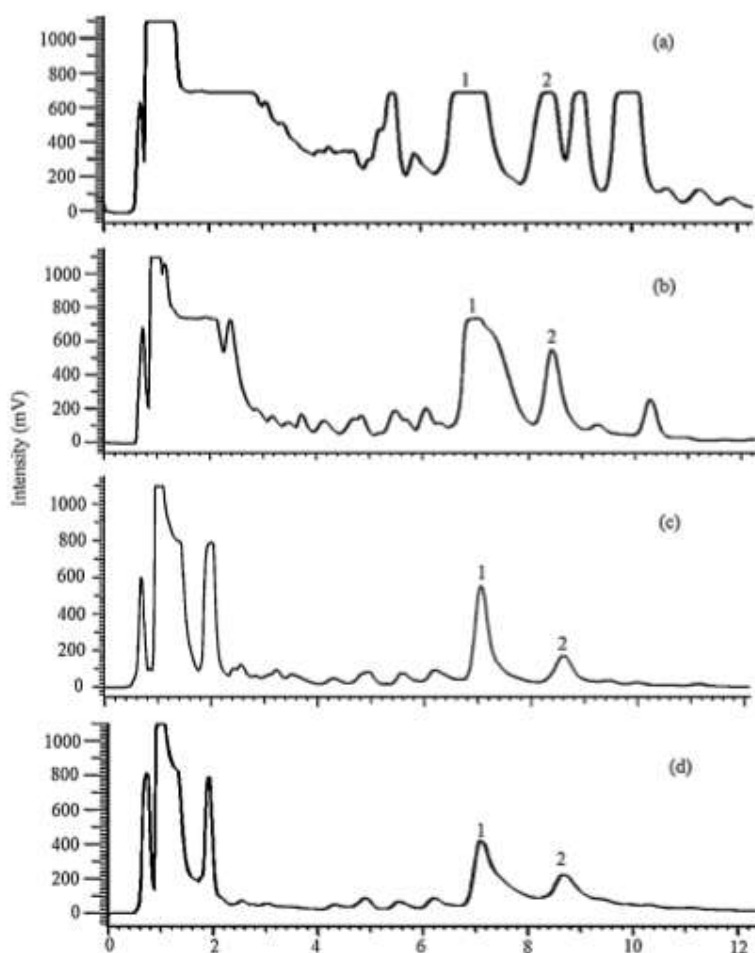
Εικόνα 5.1:τελικό χρωματογράφημα του επεξεργασμένου πλάσματος αίματος εμβολιασμένο με διάλυμα κολιστινης συγκέντρωσης 0.1mg/l, χρόνος συγκράτησης 20 & 22,5 λεπτα

Παρατηρούμε ότι οι κορυφές της κολιστινης A και B 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.<sup>12</sup> Παράλληλα η μέθοδος αυτή έχει βρει τεσσερις εφαρμογές σε μετέπειτα αντίστοιχες μελέτες, ενώ η ακρίβεια της μεθόδου αμφισβητείτε στην δεύτερη εργασία που ακολουθεί.



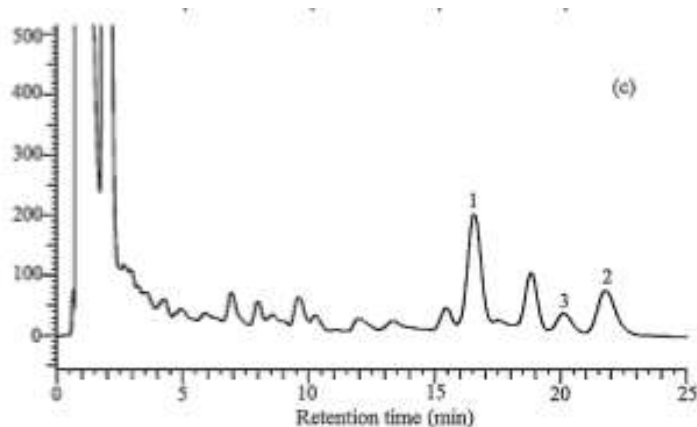
Στην δεύτερη εργασία, ο D.Cheryala και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μέθοδο ανίχνευσης της κολιστινης χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο πολυμιξίνη Β και διάταξη εκχύλισης στέρεας φάσης μέσα στην οποία πραγματοποιήθηκε και η παραγωγοποίηση της κολιστινης με φλουορενυλμεθυλοξυκαρβονυλ-χλωρίδιο(FMOC-Cl).Η 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 παραγωγοποίηση 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 χρωματογράφημα. a)70% b)80% c)95% και d)100%.η κορυφή 1 αποτυπώνει την κολιστίνη Β ενώ η κορυφή 2 την κολιστίνη Α.

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 μεγαλύτερες.<sup>10</sup>

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ❖ 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-φθαλαλδεΐδης/*ortho*-phthalaldehyde (OPA)(Rigas Lab)
- Μερκαπτο-αιθανολ/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 αναλογία 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 αναλογία διαλυτών 1:1.

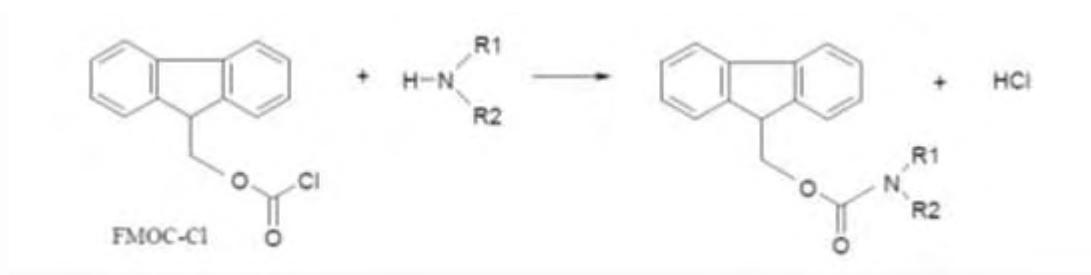
- Επιμέρους πρότυπα διαλύματα κολιστίνης συγκεντρώσεων 0.5μg/ml, 1μg/ml, 2μg/ml, 4μg/ml και 6μg/ml σε αναλόγια διαλυτών ακετονιτριλίου-νερό 1:1 και προσθήκη σε καθένα 25ml εσωτερικού πρότυπου.
- Διάλυμα FMOC-Cl 0.1M: Προσθήκη 0.2585g στέρεου παραγωγοποιητή σε 10ml ακετονιτριλίου.
- Διάλυμα βορικού οξέος 0.2M: Προσθήκη 0.120g στέρεου βορικού οξέος σε 10 ml νερού.
- Ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M: Προσθήκη 0.1g ανθρακικού νάτριου σε 10 ml νερού.
- Βορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=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 2.6μ 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)

## 1. Παραγωγοποίηση της κολιστίνης με φθορίζοντα ιχνηθέτη.

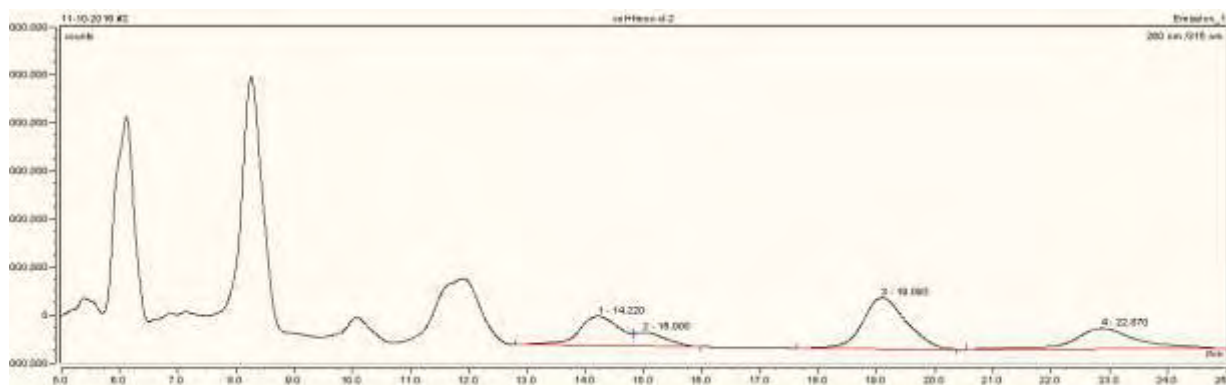
Η κολιστίνη δεν απορροφά έντονα στην περιοχή υπεριώδους -ορατού και για την ανίχνευση της στις αναμενόμενες θεραπευτικές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη η παραγωγοποιητή της. Για τον λόγο αυτό για την ανίχνευση της με την χρήση FLD χρησιμοποιήθηκε ένας ιχνηθέτη η αντίδραση του οποίου με την κολιστίνη θα έδινε φθορίζοντα παράγωγα που θα ανιχνεύονταν. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση παρατηρήθηκε ότι για την παραγωγοποίηση της κολιστινης προτείνεται η χρήση της όρθο-φθαλαλδεΐδης (*ortho*-phthalaldehyde (OPA)) Όμως σύμφωνα με την βιβλιογραφία 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 παραγωγοποίηση της κολιστίνης η όποια απορρίφθηκε λόγω υψηλού κόστους ήταν η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη. Έτσι επιλέχτηκε το 9-φλουορενυλ-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.



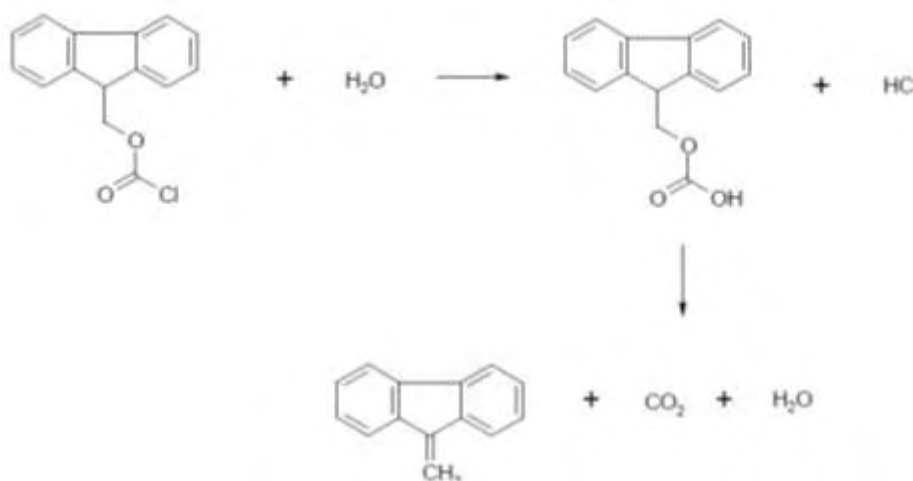
**Εικόνα 1.1:** Αντιδραση του FMOC-Cl με δευτεροταγή αμίνη

### 1.1. Παραγωγοποίηση 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 6 μg/ml σε μείγμα διαλυτών ACN : H<sub>2</sub>O σε αναλογία 50:50. Από το κάθε διάλυμα πάρθηκε ποσότητα 100 μl, η οποία αναμίχθηκε με 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M (pH = 10) και 50 μl FMOC-Cl συγκέντρωσης 100 mM. Το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά και προστέθηκαν 30 μl βορικού οξέος συγκέντρωσης 0.2 M. Μετά 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 χρωματογραφικές κορυφές εμφανίζονται όταν χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις του παραγωγοποιητή και για τον λόγο αυτό μειώσαμε την συγκέντρωση του παραγωγοποιητή από τα 100 mM στα 50 mM, δηλαδή στο μισό. Εν τούτοις το πρόβλημα με τον αυξημένο αριθμό των χρωματογραφικών κορυφών εξακολούθησε να υπάρχει.



Εικόνα 1.2.:Χρωματογράφημα 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 A και B. 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.



Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του χρόνου αντίδρασης, της θερμοκρασίας διεξαγωγής της αντίδρασης και την προσθήκη γλυκίνης στο χρωματογραφικό 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 κολιστινής με τον παραγωγοποιητή όσον αφορά την ολοκλήρωση της αντίδρασης για να μην έχουμε ημιτελή παραγωγοποιημένα προϊόντα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στο χρωματογράφημα ούτε εξαφάνιση κορυφών. Συμπέρασμα: παράταση του χρόνου αντίδρασης δεν μεταβάλλει το τελικό χρωματογραφικό αποτέλεσμα.

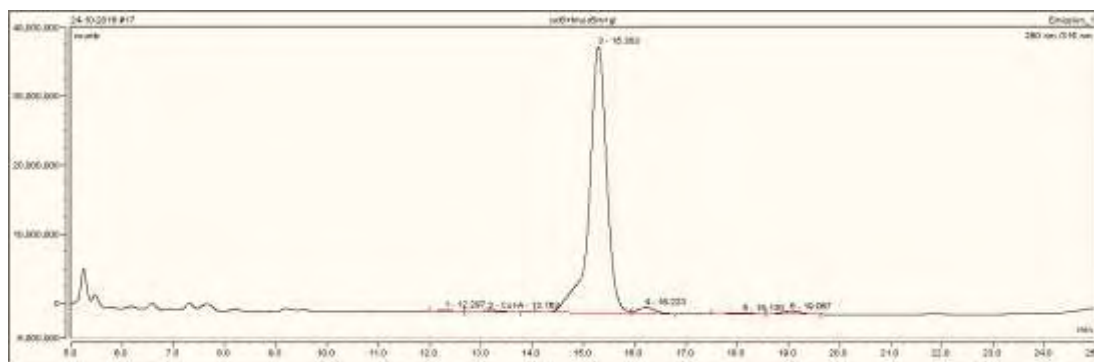
#### **b. Επίδραση θερμοκρασίας αντίδρασης**

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° C για χρονικό διάστημα 10, 35 και

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 παραγωγοποίηση. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε ούτε εδώ μεγάλη βελτίωση των αποτελεσμάτων.

### γ. Επίδραση της προσθήκης γλυκίνης στην αντίδραση.

Η περίσσεια του αντιδραστήριου 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.



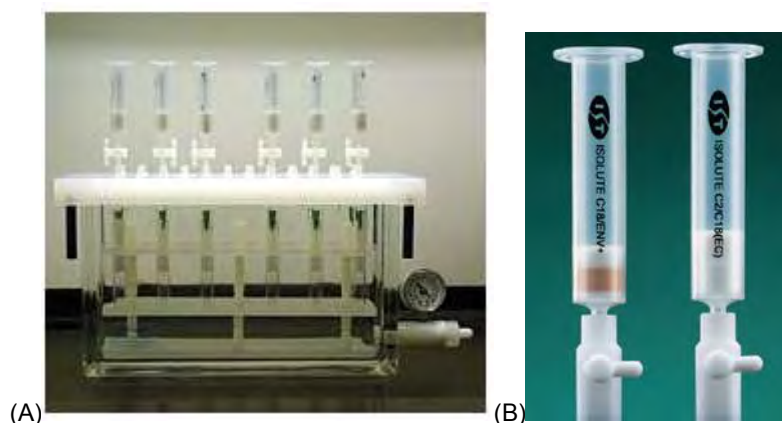
Εικόνα 1.4:Χρωματογραφήμα παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκέντρωσης 6μg/ml έπειτα από την προσθήκη γλυκίνης.

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

## **1.2. Παραγωγοποίηση σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και απομόνωση της παραγωγοποιημένης κολιστίνης.**

Για την απομόνωση της παραγωγοποιημένης 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 φουσίγγια 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 φουσίγγιο.
- c. Μετά την πλύση κάθε φουσιγγίου με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου, 50μl Fmoc-Cl συγκέντρωσης 50mM προστέθηκαν σε αυτό.
- d. Με το πέρας 10 λεπτών της αντίδρασης ακολουθήσε ξήρανση για άλλα 5λεπτα.
- e. Τα φουσίγγια 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.



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

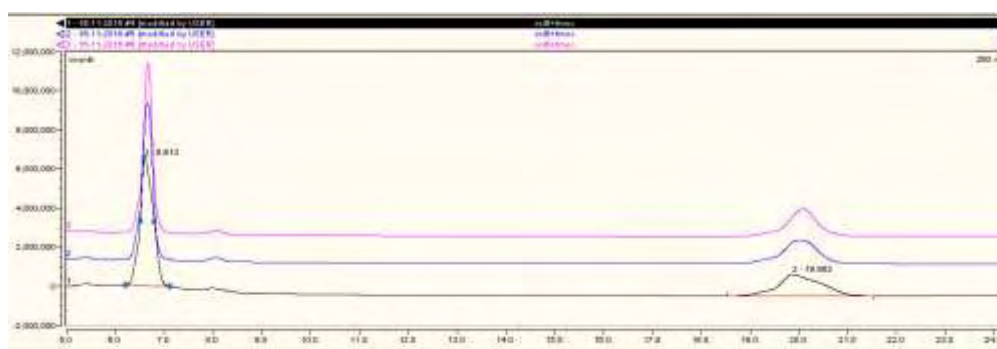
## 2. Χρωματογραφική ανάλυση με HPLC-FLD

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

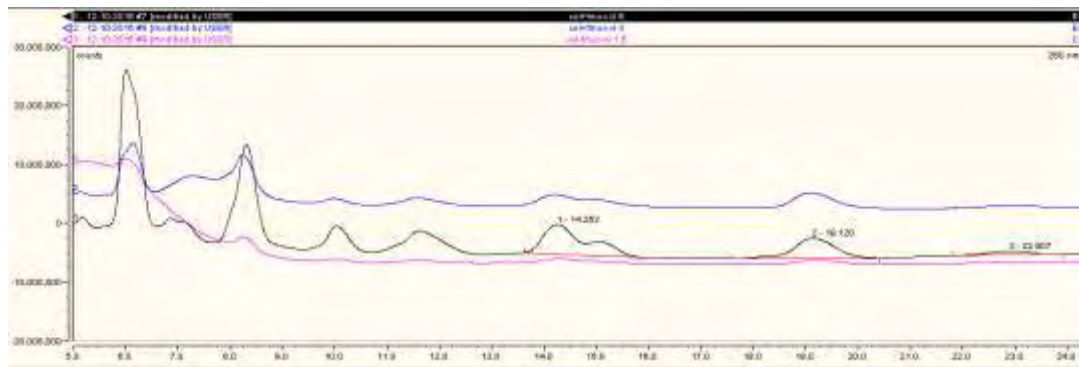
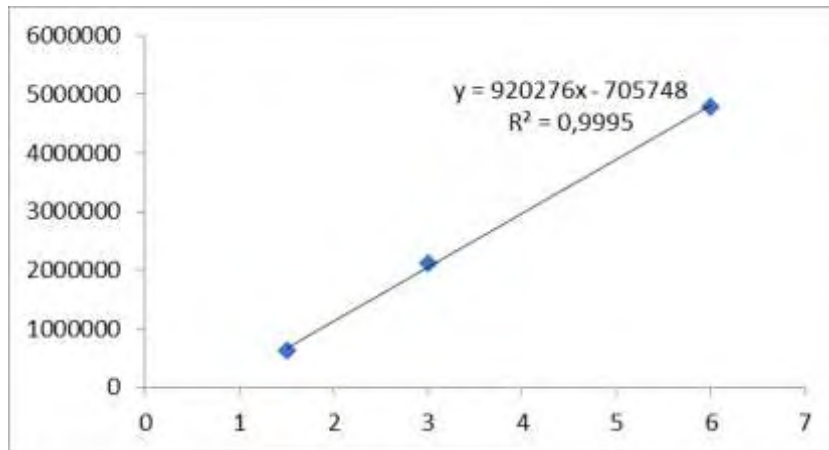
Σε επόμενη ανάλυση της παραγωγοποιημένης κολιστινης 6μg/ml ισοκρατικά, γίνεται ανάλυση του διαλύματος τρεις φορές ώστε να ελεγχθεί τόσο η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων όσο και μέρος της αντίδρασης της κολιστινης με τον παραγωγοποιητή(Εικόνα 2.1).Το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχίζεται στον παραγωγοποιητή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



Εικόνα 2.1:Χρωματογραφήμα 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 όπου 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

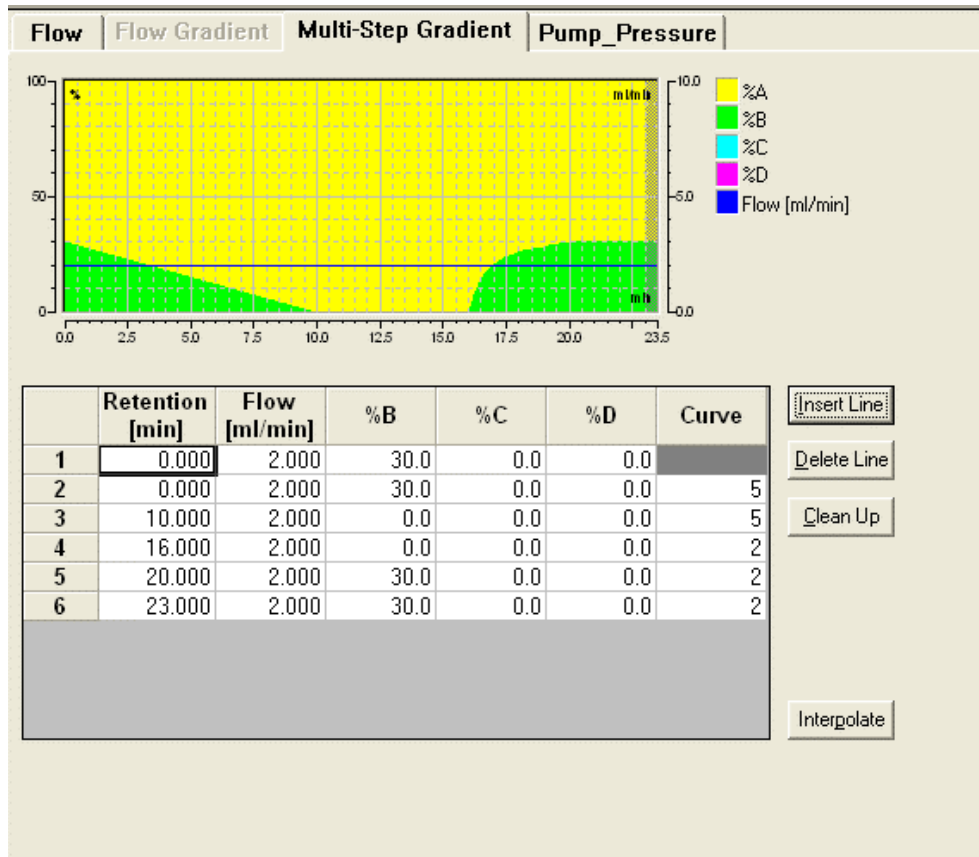


Εικόνα 2.2:Χρωματογράφημα προτύπων διαλυμάτων παραγωγισμένης κολιστίνης συγκεντρώσεων 6mg/ml(μαύρο), 3mg/ml(μπλε), 1,5mg/ml(ροζ)

Παρόλα αυτά λόγω του μεγάλου αριθμού των αμινομάδων στην κολιστίνη-τέσσερις πρωτοταγής και δεκατέσσερις δευτεροταγής αμινομάδες-η αντίδραση της κολιστίνης με τον παραγωγιστη δέν 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 κολιστίνης με τον παραγωγιστη.

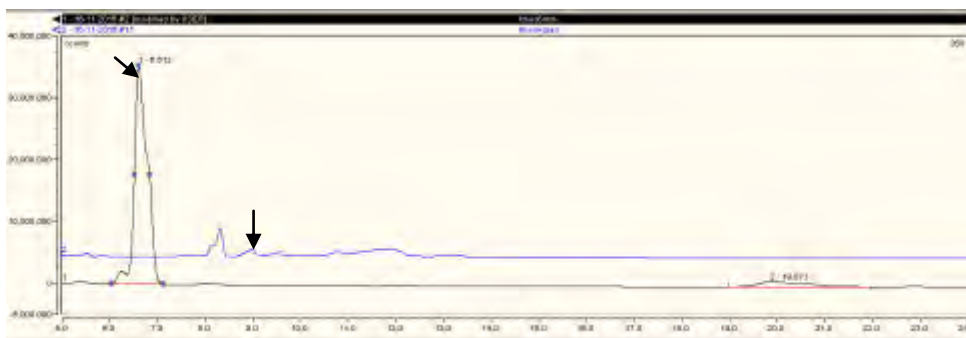
## 2.2. Βαθμιδωτή έκλυση

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



Εικόνα 2.3: Προγραμμα βαθμιδωτής εκλούσης

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

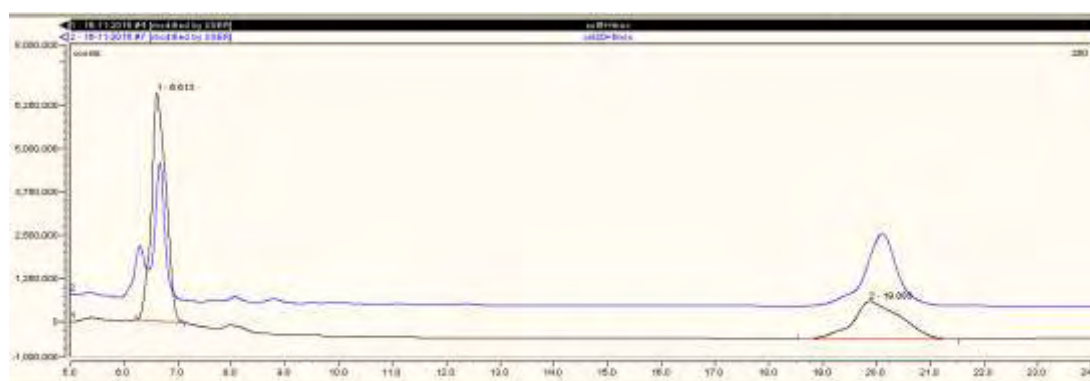


Εικόνα 2.4: Χρωματογράφημα διαλύματος παραγωγοποιητή συγκέντρωσης 50 mM με ισοκρατικό (μαύρο) και βαθμιδωτό (μπλε) τρόπο εκλούσης.

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 παραγωγοποιημένης 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 μόνος 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.



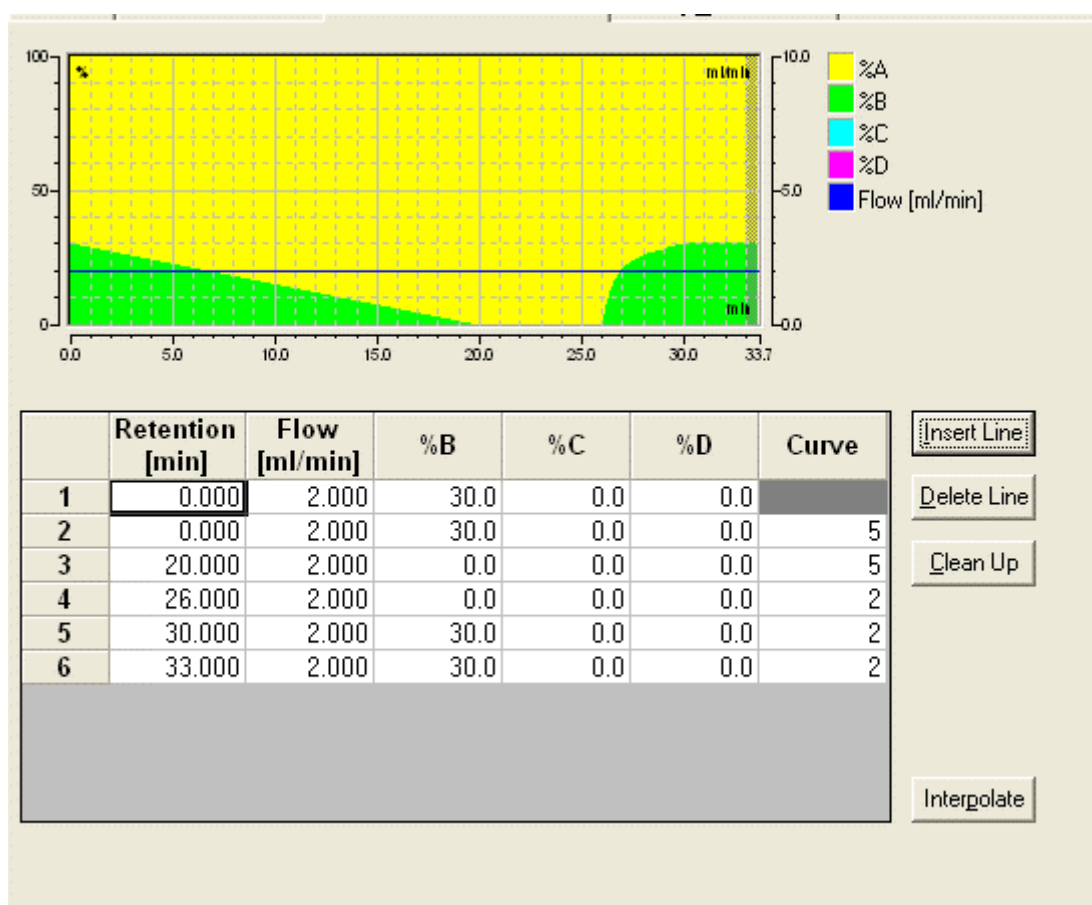
Εικόνα 2.5:Χρωματογράφημα διαλύματος παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκέντρωσης 6μg/ml(μαύρη γραμμή)& διαλύματος παραγωγοποιημένης κολιστινης συγκέντρωσης 20μg/ml(μπλε γραμμή)

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



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 ίδια αναλογία χρόνων 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 συμπιέζε τα συστατικά μας και περνούσαν ταυτόχρονα από την χρωματογραφική μας στήλη.



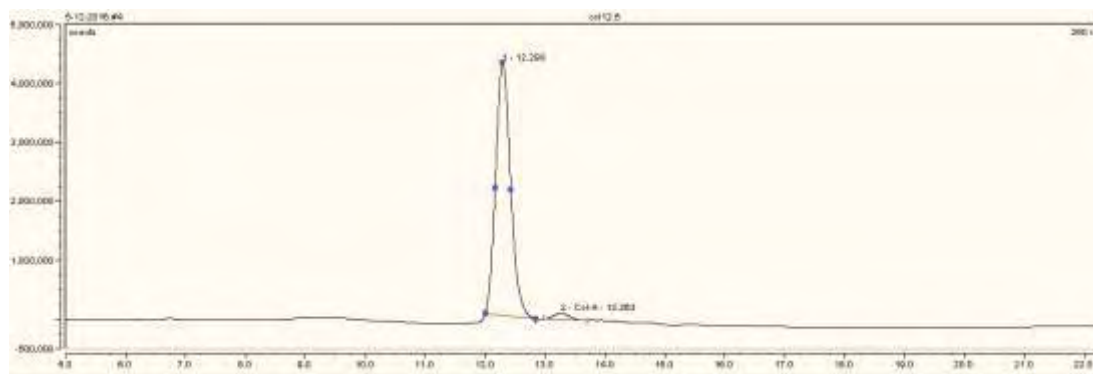
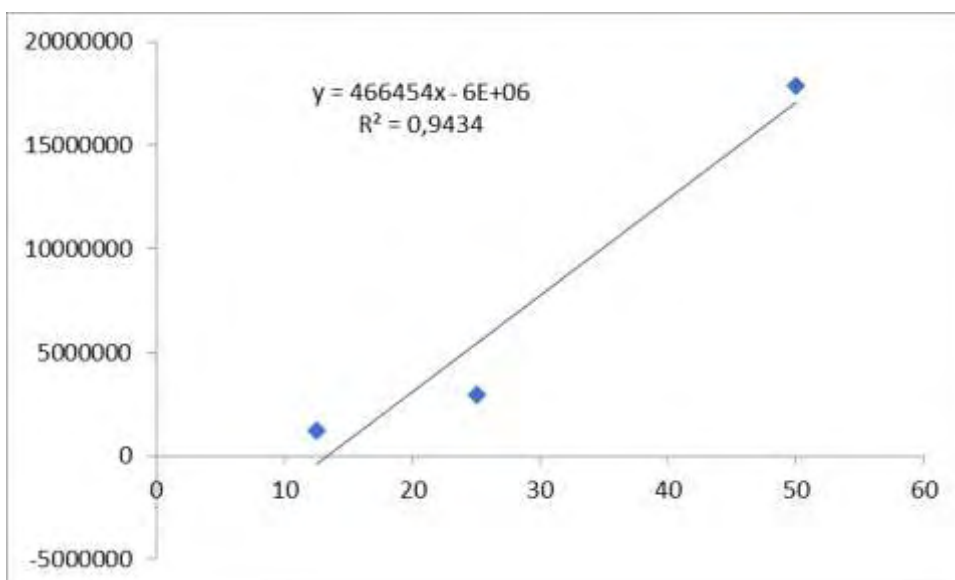
Εικόνα 2.4: Νέο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

### 2.2.1. Κατασκευή καμπυλών αναφοράς

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

εκχύλισης στέρας φάσης με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης .Στο πρώτο πείραμα αναλυθήκαν 3 δείγματα παραγωγοποιημένης 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:

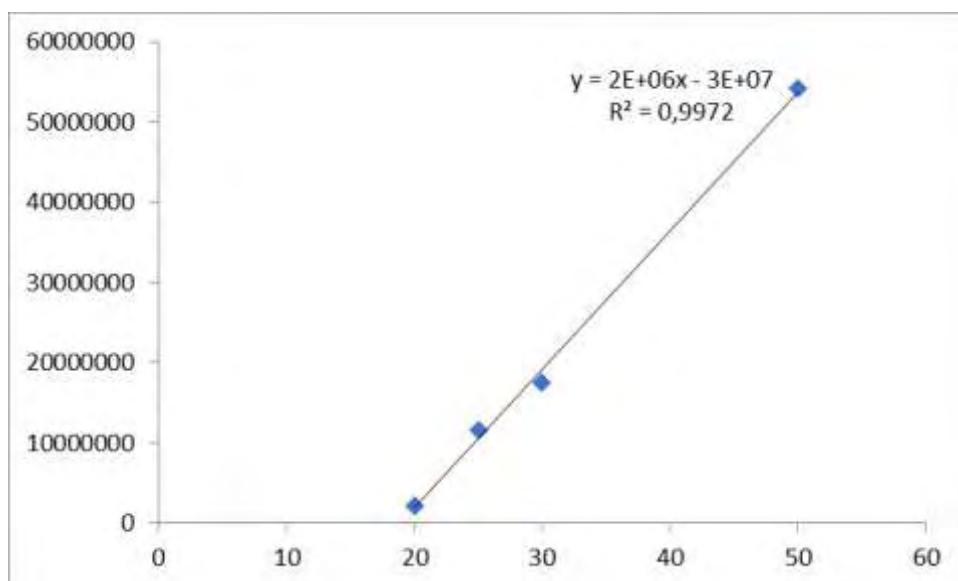
c(μg/ml)	t	Area
50	14,3	17902024
25	12,4	2941072
12,5	12,2	1234907



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

Έπειτα παρασκευάστηκαν ανεξάρτητα διαλύματα κολιστινης συγκεντρώσεων 50,30,25 και 20 µg/ml,τα οποία υπέστησαν την ίδια 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 των 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



### 3. Επιλογή διαφορετικού παραγωγοποιητή

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

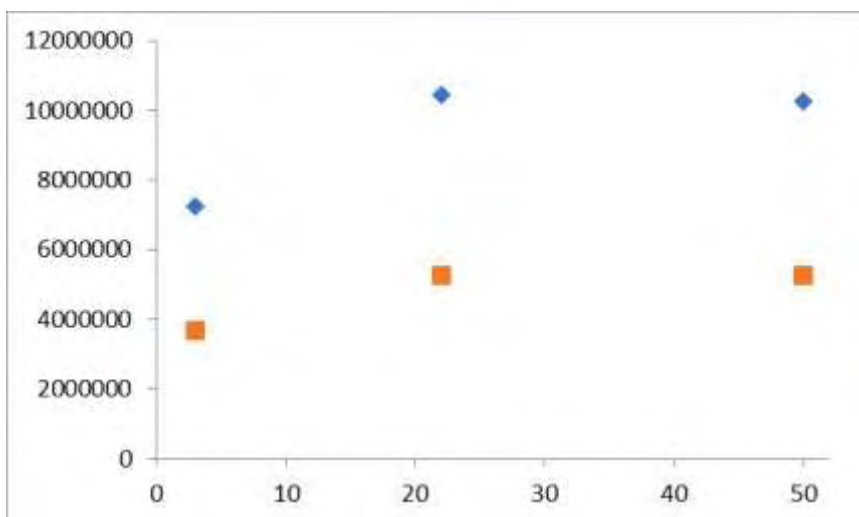
Η διαδικασία παρασκευής του OPA που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

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° 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:

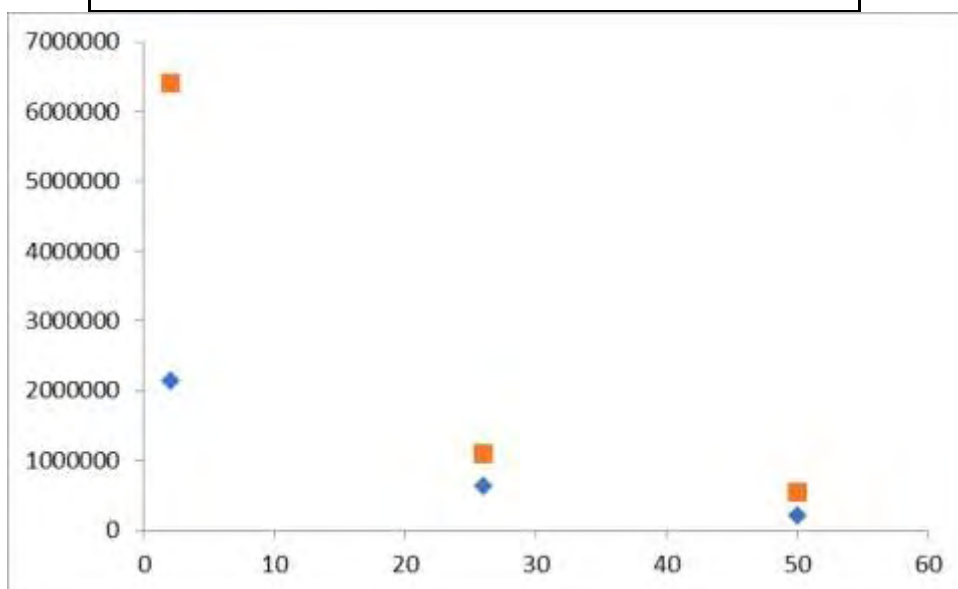
- ✓ Ευκολία παρασκευής του παραγωγοποιητή
- ✓ Σταθερότητα του παραγωγοποιητή με το πέρασ του χρόνου

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



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

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



Εικόνα 4.1: Συγκριση σταθερότητας OPA σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα

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 πρωτοταγής και με τις δευτεροταγής.

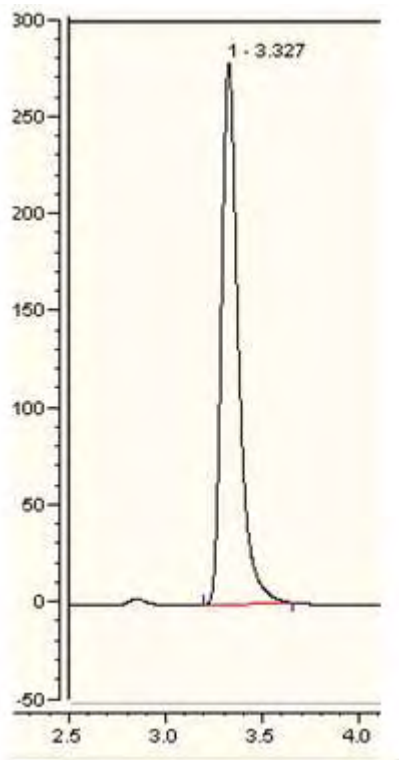
#### **4. Αλλαγή Χρωματογραφικής Στήλης(Πυρήνα-κελύφους/Core shell)**

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°, 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 προηγούμενης στήλης. 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

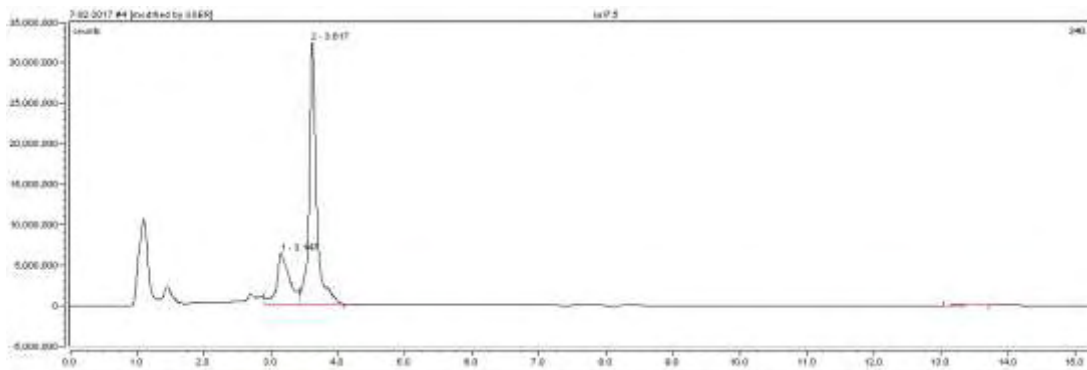
β) η κορυφή που προέκυψε από την στήλη πυρήνα-κελύφους δίνει πιο ψηλή κορυφή, ίδιου εμβαδού σε σύγκριση με την κορυφή της προηγούμενης στήλης, οπότε με βάση την θεωρία των θεωρητικών

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 ακολούθησε η χρωματογραφική ανάλυση. Ο τρόπος έκλουσης που ακολούθηθηκε 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 προηγούμενη 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, γεγονός που επαληθεύεται και από το θεωρητικό κομμάτι. (Εμβαδό κορυφών 1373127:4198715)



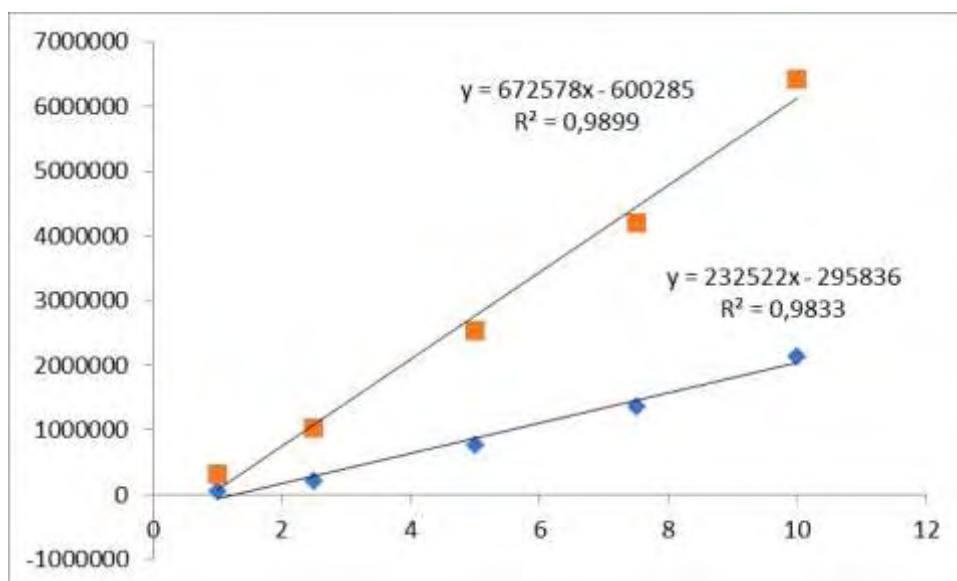
Εικόνα 4.2:Χρωματογράφημα κολιστινης συγκέντρωσης 7.5µg/ml παραγωγοποιημένης με OPA

## 5. Εκτίμηση της ακριβείας 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 B και της κολιστινης A 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.





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 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΗ από την κολιστίνη Α( $\mu\text{g/ml}$ )	ΑΝΑΚΤΗΣΗ %	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΗ από την κολιστίνη Β( $\mu\text{g/ml}$ )	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

## 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 παραγωγοποίηση 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 φάσης 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 κολιστίνης με το OPA πραγματοποιείται πλήρως σε μικρό χρόνο και δίνει καλύτερο διαχωρισμό της κολιστίνης 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  $104,4 \pm 17\%$  και της κολιστίνης B  $95 \pm 7\%$  (εύρος συγκεντρώσεων 2,5-10ng/mL).
  - Τα παράγωγα της OPA έχουν μικρότερη σταθερότητα και απαιτούν την ανάλυση τους εντός της ίδιας μέρας.

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

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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 συνήθειες 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 θεραπείας. 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

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](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 Hayes, Adham Ahmeda, Tony Edge, 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