

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ. ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΟΡΦΑΝΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ Ε.Κ.Π.Α.

AOHNA 2011







ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ – ΠΕΝΕΔ 2003 Γ' ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ 2000-2006 ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΡΓΟ 03ΕΔ 959

(ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΤΑ 75% ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ – ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΚΑΙ ΚΑΤΑ 25% ΑΠΟ ΤΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΔΗΜΟΣΙΟ – ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ – ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ)

"Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα."

(Ν. 5343 / 1932, άρθρο 202)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ-ΒΥΖΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Επιβλέπουσα, Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

ΙΩΑΝΝΗΣ ΛΟΥΚΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣΜέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΦΩΣΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΜΙΚΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΙΡΗΝΗ ΠΑΝΤΕΡΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 2006-2010 στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Φαρμακευτικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του προγράμματος Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού - ΠΕΝΕΔ 2003, Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης 2000-2006, Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ανταγωνιστικότητα, έργο 03ΕΔ 959 (συγχρηματοδότηση κατά 75 % από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινοτικό Ταμείο και κατά 25 % από το Ελληνικό Δημόσιο - Υπουργείο Ανάπτυξης - Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας).

Η παρούσα μελέτη μπορεί να θεωρηθεί συνέχεια και ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, που παρουσιάστηκε το 2006.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν με τον τρόπο τους να ολοκληρωθεί αυτή η προσπάθεια:

Την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Αικατερίνη Αντωνιάδου-Βυζά, που με πρότεινε για το συγκεκριμένο έργο και μου έδωσε την ευκαιρία να συνεχίσω τις σπουδές μου. Την ευχαριστώ θερμά για την υπομονή της, την καθοδήγησή της, τις συμβουλές της και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Η συμβολή της ήταν πολύτιμη καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής και συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μιχαήλ Κουππάρη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Λουκά, για την καθοδήγηση, τις εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις, για το χρόνο που διέθεσαν και για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Καθηγητή Μιχαήλ Κουππάρη, για την παραχώρηση του εργαστηρίου του, όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή σκέδασης φωτός καθώς επίσης και για την επίβλεψη και τις χρήσιμες υποδείξεις κατά την εκτέλεση αυτών.

Τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τους Καθηγητές Γεώργιο Φώσκολο και Εμμανουήλ Μικρό, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ειρήνη Παντερή και τον Λέκτορα Ευάγγελο Γκίκα, για την ιδιαίτερη τιμή να αξιολογήσουν τη παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Αν. Καθηγήτρια Ε. Παντερή για την πολύτιμη βοήθειά κατά την εκτέλεση των πειραμάτων MS.

Τους συνεργάτες από τον συνεργαζόμενο φορέα Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτο, Κωνσταντίνα Γιαννακοπούλου, Ερευνήτρια Α΄, Ειρήνη Μαυρίδου, Ερευνήτρια Α΄ και Δρ. Μαρία Λαμπροπούλου για τη σύνθεση των νέων υποκατεστημένων με σάκχαρα κυκλοδεξτρινών.

Τον κ. Παναγιώτη Κυριαζόπουλο, Βιολόγο στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Νομαρχιακού Νοσοκομείου Πατησίων, για τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο που διέθεσε στην οργάνωση και εκμάθηση της διαδικασίας εκτέλεσης των μικροβιολογικών πειραμάτων, τη συνεχή του επίβλεψη και καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή αυτών, την απομόνωση ανθεκτικών στελεχών, καθώς επίσης για την παραχώρηση δομών του νοσοκομείου για την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών πειραμάτων.

Την Επίκουρη καθηγήτρια Λαδά-Χυτήρογλου από το Μικροβιολογικό τμήμα της Ιατρικής Αθηνών και τον Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη από το Μικροβιολογικό τμήμα της Ιατρικής Κρήτης για την απομόνωση ανθεκτικών στελεχών για τους μικροβιολογικούς ελέγχους.

Την υποψήφια Διδάκτορα Όλγα Γαλανοπούλου, καθώς οι παρατηρήσεις, η εμπειρία, το ερευνητικό ταπεραμέντο και η βοήθειά της αποδείχτηκαν πολύτιμα για την εκπόνηση αρκετών πειραμάτων και για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Το νεότερο μέλος του εργαστηρίου μας, Μαρία Οικονόμου για τη στήριξή της.

Την υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Κώνστα, για τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο που διέθεσε για την εκμάθηση και για τη διαρκή παρουσία της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή σκέδασης φωτός, αλλά κυρίως για τη φίλη που κέρδισα μέσα από αυτή τη συνεργασία.

Την Διδάκτορα Δήμητρα Μπενάκη, για τη βοήθειά της στη λήψη των φασμάτων NMR.

Την οικογένειά μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα, για την τεράστια ψυχολογική στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	. iii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	. iv
Α. Θεωρητικό μέρος	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΛΕΚΤΙΝΕΣ	. 1
Εισαγωγή στους στόχους της παρούσας διατριβής	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ	13
2.1. Κινολόνες 1 ^{ης} Γενιάς	16
2.2. Κινολόνες 2 ^{ης} Γενιάς	17
2.3. Κινολόνες 3 ^{ης} Γενιάς	19
2.4. Κινολόνες 4 ^{ης} Γενιάς	21
2.5. Κινολόνες σε εξέλιξη	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ 3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ 3.1.1. Μονοσακχαρίτες 3.1.2. Ολιγοσακχαρίτες 3.1.3. Πολυσακχαρίτες 3.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	25 25 25 34 36 38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ	49
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΜΑΓΝΗΤΙΙ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟ (NMR)	KO 59 1ην 60 1κή 61 63 65 66
Πειραματικό μέρος	69
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
Γενικά χαρακτηριστικά οξολινικού οξέος και κυπροφλοξακίνης	70
Α. Κινολόνες	70
Β. Κυκλοδεξτρίνες	70
Φυσικές κυκλοδεξτρίνες	70
1. β-κυκλοδεξτρίνες	70
Εμπορικώς διαθέσιμα συνθετικά παράγωγα των φυσικών κυκλοδεξτρινών	70
2. υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (ΗΡβCD)	71
3. μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (MalβCD)	71

	4.	Επτακις-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) 71	l
	5.	Οκτακις-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpsp) 72)
	6.	Επτακις-[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) 72	2
	7.	Οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαννοπυρανοζο-1'-υλο)-4-αζα-3-	
		οξοεξανο-1-υλο1-6-θειο}-ν-κυκλοδεξτρίνη (ManOHNH-apsp)	
	8	Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαγγοπυραγοζο-1΄-υλο]-4-αζα-3-	
	•••	α	5
	q	Oκτακιζβ-δεοδιμ-β-βειο-[β-(2-ακεταμιδο-2-δεοδιμ-α-D-γλμκοπιμοαγοζο-	,
	0.	$1'_{\mu\lambda}$	
		$\frac{1 - 0 \cdot 0}{1 - 4 - 0 \cdot 0} = \frac{1 - 0 \cdot 0}{1 - 0} $	
	40	$(NAcGiuOHind-ypsp) \dots (O aussaul F O Ass(u C D D C C C C C C C C$	
	10.	Επτακις δ-οεοζυ-ό-θειο-ίο-(2-ακεταμιοο-2-οεοζυ-ά-D-	
		γαλακτοπυρανοζο-1 -υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-	
		κυκλοδεξτρίνη (NAcGalOHNH-bpsp)	ì
	11.	Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-	
		οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (GalOHNH-bpsp)	
	12.	Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-γλυκοπυρανοζο	-
		1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη	
		NAcGluOHNH-bpsp 77	,
	13	Επτακις/6-δεοεμ-6-θειο-16-(α β-1 -φομκοπμοανοζο-1'-μλο)-4-αζα-3-	
	10.	$c_{1} = c_{1} = c_{1$	ł
		οζοεζανο- 1-ολοj-ο-οειοζ-ρ-κοκλοοεζηρινή (1 άσοι παι - σρορ)	' ג
Τ. ΟΡγ		λογια	, \
Χρωμα	10	יר איז	,
Αλλα α	συσ	τηματα)
Ι Ιηγη (ακτι	νοβολίας με λυχνία τόξου αερίου ξενού	ł
Κυψελ	361	5 81	
Λυοφιλ	λοπ	οιητής82	
Χρωμα	ατον	γραφική διάταξη HPLC-ELS83	3
Φασμα	ατον	γράφος NMR	ŀ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	Ι. Σ	ΥΜΠΛΟΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ 85	5
1.1.	ПА	ΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ	(
ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ	YO	=FOΣ MF THN YAPO=ΥΠΡΟΠΥΛΟ-β-ΚΥΚΛΟΛΕ=ΤΡΙΝΗ 85	;
0_0/	11	1 Μελέτη ανηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού του οξολιγικού	'n
			,
	οξέ	ος σε υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη	l
	1 1	2 Μελέτη της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου του οξολινικού	'n
	۰.۱ م۶ć	$\frac{1}{2}$, ,
	1 1	3 Melétin the grouve outpoint for kalling the bound of the second sec	,
	1.1	3. MEREIN THE OTOREDUE DIAG RATING OUNTED TO OUNTROUCH AND A DECEMBER OF A DECEMBER	J
	ΟζΟ	λινικού οζεος:υοροζυπροπυλο-β-κυκλοσεζτρινής με Φασματοσκοπιά	X
	NIV	IR	
	1.1	.4. Μελέτη επίδρασης του σχηματισμού του συμπλόκου του οξολινικού	J
	οξέ	ος και της υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης στη διαλυτότητα του	J
	οξα	λινικού οξέος	,
1.2.	ΠА	ΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ	5
ΚΥΠΡΟΦΛΟ	ΞAł	ΚΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	
	1.2	1. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη . 102	2
		1.2.1.1. Παρασκευή του συμπλόκου της κυπροφλοξακίνης με τη	ו
		μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτοίνη	Ļ
		1212 Επιβεβαίωση σχηματισμού και ναρακτηρισμός του	•

συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία NMR
Φασματοσκοπία NMR
1.2.2. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη β-κυκλοδεξτρίνη
1.2.2.1. Παρασκευή του συμπλόκου της κυπροφλοξακίνης με τη β-
Κυκλοοεζτρινη
1.2.2.2. Επιβεραίωση σχηματισμού και χαρακτηρισμός του στιμπλόκου της κυποοφλοξακίνης και της β-κυκλοδεξτοίνης με
Φασματοσκοπία NMR 117
1.2.2.3. Μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου
κυπροφλοξακίνης και β-κυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία
Μαζών (MS)
1.2.3. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη gpsp+NAcGluOHNH ₂ 120
1.2.4. Συμπλοκό κυπροφλόξακινης με τη bpsp+GalOHNH ₂
ΚΕΦΔΛΔΙΟ 2 ΔΝΔΠΤΥΞΗ ΚΔΙ ΔΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΛΟΥ ΔΝΔΛΥΣΗΣ ΓΙΔ ΤΟ
2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
2.1.1 Χρωματογραφικές συνθήκες
2.1.2 Μελέτη επίδρασης στήλης Χ _{τεκκ} α
2.1.3 Μελέτη επιδρασης στηλης XBridge
2.1.4 Μελετή επιορασής συνουασμού στηλών
αάση 135
2.1.6 Μελέτη επίδρασης στήλης Χ _{ΤΕRRA} (4,6 x 250 mm)
2.1.7 Μελέτη προσθήκης στην υδατική φάση βρωμιούχου
τετραβουτυλαμμωνίου ή επτανοσουλφονικού οξέος
2.1.8 Επιλογή της βέλτιστης μεθόδου
2 2 1 Oolo avívvelanc 150
2.2.2. Όριο ποσοτικοποίησης
2.2.3. Γραμμικότητα
2.2.4 Επαναληψιμότητα 154
2.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα
2.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα 157 2.2.6. Ακρίβεια 158 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ 163 3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ 163 3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ 163 3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ 163 3.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου 163 3.1.2. Απουσία τριαιθυλαμίνης 165 3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας 166 3.1.4. Μεταβολή του ρΗ της κινητής φάσης 167
2.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα 157 2.2.6. Ακρίβεια 158 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ 163 3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ 163 3.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου 164 3.1.2. Απουσία τριαιθυλαμίνης 165 3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας 166 3.1.4. Μεταβολή του pH της κινητής φάσης 167 3.1.5. Τροποποίηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης 167
2.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα 157 2.2.6. Ακρίβεια 158 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ 163 3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ 163 3.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου 163 3.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου 164 3.1.2. Απουσία τριαιθυλαμίνης 165 3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας 166 3.1.4. Μεταβολή του ρΗ της κινητής φάσης 167 3.1.6. Επίδραση οργανικού τροποποιητή 170 170

φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης σε διαλύματα ρυθμιστικών αλάτων pH 6,0

bpsp και gpsp: περι-υποκατεστημένη βCD και γCD, αντίστοιχα, με 4.2.6. Μελέτη επίδρασης της προσθήκης της περι-υποκατεστημένης κυκλοδεξτρίνης bpsp με υποκαταστάτες συνθετικής то σάκχαρο γαλακτοζαμίνη (bpsp+GalOHNH₂) στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης α) ως μίγμα δραστικού συστατικού και συνθετικής 4.2.7. Μελέτη επίδρασης της σύμπλεξης με διαφορετικές περιυποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους σάκχαρα, στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης

ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ KAI τηΣ ΜΑΛΤΟΖΥΛΟ-Β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ME 5.2.3. Έλεγχος γραμμικότητας στα διαλύματα της κυπροφλοξακίνης... 233 Έλεγχος γραμμικότητας στα διαλύματα της μαλτοζυλο-β-5.2.4. 5.2.5. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 5.2.6. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της κυπροφλοξακίνης στα ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΜΑΛΤΟΖΥΛΟ-β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ME 6.1. Χρωματογραφικές συνθήκες για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή σκέδασης φωτός 247 Εφαρμογή της μεθόδου HPLC-ELSD στην ανάλυση διαλυμάτων 6.2. κυπροφλοξακίνης, μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου τους 264 6.3. Προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης 6.4. Έλεγχος διαφόρων λιπόφιλων ενώσεων για την ανταγωνιστική σύνδεσή τους

6.5.3. Γραμμικότητα για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό 6.5.5. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης σε διαλύματα συμπλόκου της με τη κυπροφλοξακίνη, με πειράματα 6.5.6. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της κυπροφλοξακίνης σε διαλύματα συμπλόκου της με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, με 6.6. Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου HPLC-ELS στη χρωματογραφική διάταξη 6.7. Μελέτη επίδρασης της παρουσίας συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης στην απορρόφηση της υδροχλώρικής κυπροφλοξακίνης με φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΟΛΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ 7.1. Προκαταρκτικά πειράματα παρασκευής και ελέγχου μικροβιολογικών διαλυμάτων κυπροφλοξακίνης παρουσία διαφορετικών κυκλοδεξτρινών 289 7.2. Προσπάθειες παρασκευής στείρων διαλυμάτων για τους μικροβιολογικούς 7.2.1. Πείραμα αυξανόμενων συγκεντρώσεων σε β-κυκλοδεξτρίνη 293 7.2.2. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης από τα 7.2.3. Μελέτη επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:bpsp... 296 7.2.4. Μελέτη επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης των συμπλόκων της κυπροφλοξακίνης με 7.2.6. Διερεύνηση περιοχής pH του διαλύματος κυπροφλοξακίνης, στο 7.2.7. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης σε 7.2.8. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης σε διαλύματα συμπλόκων της κυπροφλοξακίνης με διαφορετικές 7.2.9. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης από 7.2.10. των μικροβιολογικών διαλυμάτων της Παρασκευή 7.3.1. Μέθοδοι παρασκευής στείρων διαλυμάτων 7.4. Έλεγχος δραστικότητας των φαρμάκων που μελετήθηκαν σε ελεύθερη

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CIP	υδροχλωρική κυπροφλοξακίνη
OXA	οξολινικό οξύ
CD	κυκλοδεξτρίνη
βCD	β-κυκλοδεξτρίνη
ΗPβCD	υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
MeβCD	μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
MalβCD	μαλτοζυλο-β- κυκλοδεξτρίνη
bpsp	επτακίς-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β- κυκλοδεξτρίνη
bpen	επτακις-[6-(αμινοαίθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β- κυκλοδεξτρίνη
gpsp	οκτακις-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-γ- κυκλοδεξτρίνη
Man	D (+)-μαννόζη
Gal	D (+)-γαλακτόζη
Fuc	L (-)-φουκόζη
Glu	D (+)-γλυκόζη
GalNAc	Ν-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη
GluNAc	Ν-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη
bpsp+ManOHNH ₂	επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαννοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-
	οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη
bpsp+GalOHNH ₂	επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-
	αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη
bpsp+NAcGalOHNH ₂	επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-
	γαλακτοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-
	κυκλοδεξτρίνη
bpsp+NAcGluOHNH ₂	επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-
	γλυκοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-
	κυκλοδεξτρίνη
bpsp+FucOHNH ₂	επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-L-φουκοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-
	3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη
gpsp+ManOHNH ₂	οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαννοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-
	οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-γ-κυκλοδεξτρίνη
gpsp+NAcGluOHNH ₂	οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-
	γλυκοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-γ-
	κυκλοδεξτρίνη
MeOH	μεθανόλη
ACN	ακετονιτρίλιο
THF	τετραϋδροφουράνιο
TMA	βρωμιούχο τετραμεθυλαμμώνιο
DMSOd ₆	διμεθυλοσουλφοξείδιο δευτεριωμένο
D_2O	οξείδιο του δευτερίου
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ICH	International Conference on Harmonization
MIC	Minimum Inhibitory Concentration



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΛΕΚΤΙΝΕΣ

Οι λεκτίνες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που απαντώνται σε όλα τα είδη των οργανισμών (ζώα, φυτά, ιοί, βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου) και παρουσιάζουν τη τάση να δεσμεύουν υδατάνθρακες. Η ιδιότητά τους να προσκολλώνται σε υδατάνθρακες, είναι αναστρέψιμη και χαρακτηρίζεται από ειδικότητα. Οι λεκτίνες αλληλεπιδρούν με τους υδατάνθρακες που έχουν συμπληρωματική σε αυτές δομή, όπως ένα αντίσωμα θα αναγνώριζε το αντιγόνο του. Αυτό επιτρέπει τη χρήση των υδατανθράκων ως «μόρια αναγνώρισης», για την ανίχνευση, απομόνωση και χαρακτηρισμό των λεκτινών ή των κυττάρων στην επιφάνεια των οποίων είναι συνδεδεμένες, με τη βοήθεια διαλυμάτων που θα περιέχουν τους επιθυμητούς υδατάνθρακες, που αναγνωρίζουν οι λεκτίνες [1,2].

Οι περισσότερες πρωτεΐνες στις επιφάνειες των κυττάρων και πολλά λιπίδια στις μεμβράνες αυτών είναι γλυκοζυλιωμένα και τα σάκχαρα αυτά αποτελούν θέσεις δέσμευσης για τις λεκτίνες. Η δέσμευση και αλληλεπίδραση έχει ως επακόλουθο τη συγκόλληση των κυττάρων. Αρχικά ως λεκτίνες περιγράφονταν οι ενώσεις, που απομονώνονταν από φυτά και είχαν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τις ομάδες αίματος, με βάση τα σάκχαρα, που εκφράζονταν από αυτές. Επίσης έχουν τη τάση να δεσμεύουν και να καταβυθίζουν υπό μορφή ιζήματος πολυσακχαρίτες ή γλυκοπρωτεΐνες σε διαλύματα. Η δράση τους αυτή μπορεί να αντιστραφεί με τη προσθήκη σακχάρων για τα οποία οι λεκτίνες παρουσιάζουν ειδικότητα και δεσμεύονται εκλεκτικά. Τα σάκχαρα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, στη μεταφορά ερεθισμάτων και στην ανοσολογική απάντηση, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια [3-5].

Μεταξύ τους διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη δομή και τη θέση δέσμευσης. Κάθε λεκτίνη παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια για ένα ή περισσότερα ή παράγωγα των ακόλουθων σακχάρων: μαννόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη, Νακετυλογλυκοζαμίνη, φουκόζη και Ν-ακετυλονευραμινικό οξύ (κοινώς σιαλικό οξύ). Αν και υπάρχει πληθώρα μονοσακχαριτών στη φύση, στην επιφάνεια των ευκαρυωτικών κυττάρων συναντάμε κυρίως τους ανωτέρω. Ειδικότητα για άλλα σάκχαρα σπάνια αναφέρεται, ενώ η σταθερά σύνδεσης λεκτίνης-σακχάρου είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση των ολιγοσακχαριτών σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες. Υπάρχουν διάφοροι τύποι λεκτινών που έχουν αναγνωριστεί. Σε μεγαλύτερη αφθονία απαντώνται οι τύπου C, οι οποίες διακρίνονται επιπλέον σε σελεκτίνες (E, L και P), κολλεκτίνες και λεκτίνες ενδοκύττωσης και σχετίζονται με τη δέσμευση πρωτεϊνών. Επίσης υπάρχουν οι λεκτίνες τύπου S ή γκαλεκτίνες, που είναι ειδικές για τη γαλακτόζη και άλλες που αναγνωρίζουν μόρια σιαλικού οξέος που βρίσκονται στην επιφάνεια ανοσοσφαιρινών.

Οι λεκτίνες συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως η αναγνώριση κυττάρων και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, η κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση σηματοδότηση ή προσκόλληση. Επίσης είναι δραστικές σε περίπτωση φλεγμονής και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου παράγοντα [6].

Οι βακτηριακές λεκτίνες ή αλλιώς συγκολλητίνες (adhesins) βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων των βακτηρίων. Έχουν συνήθως τη μορφή τριχιδίων ή κροσσών (fimbriae) και αποτελούνται από πολλές διαφορετικές υπομονάδες, μία εκ των οποίων παρουσιάζει δεσμευτική ικανότητα για συγκεκριμένο τύπο σακχάρου. Τα βακτήρια μπορούν να μεταλλάσσονται περιοδικά μεταξύ κροσσωτής και μη κροσσωτής κατάστασης (φάση παραλλαγής), με αποτέλεσμα σε ένα βακτηριακό πληθυσμό να συνυπάρχουν φαινότυποι και των δύο μορφών. Τα τριχίδια ή κροσσοί είναι πολύ σταθερές δομές και αλληλεπιδρούν με τα συμπληρωματικά σε αυτά σάκχαρα. Για παράδειγμα, οι βακτηριακές λεκτίνες που απομονώνονται από την επιφάνεια των βακτηρίων Esherichia coli αναγνωρίζουν τη γαλακτόζη και τη N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, από την επιφάνεια του Vibrio cholerae και του Rhizobium Iupinii τη φουκόζη, οι βακτηριακές λεκτίνες τύπου 1 που απομονώνονται από την επιφάνεια των βακτηρίων Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Esherichia coli, Serratia marcescens, Shigella flexneri και Klebsiella pneumoniae αναγνωρίζουν τη μαννόζη, οι βακτηριακές λεκτίνες τύπου P που απομονώνονται από την Esherichia coli και οι τύπου 2 από τον Actinomyces viscosus αναγνωρίζουν τη γαλαβιόζη, οι τύπου G που απομονώνονται από την Esherichia coli αναγνωρίζουν τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη, του Streptococcus sanguis, του Mycoplasma pneumoniae και του Helicobacter pylori αναγνωρίζουν σιαλικό οξύ κ.α. Τα βακτήρια, τα οποία απομονώνονται από διάφορες λοιμώξεις μπορεί να μην διαθέτουν τριχίδια ή κροσσούς αν και γενετικά διατηρούν την ικανότητα να τα συνθέσουν με τη βοήθεια πρωτεϊνών που κωδικοποιούν αυτή τη διαδικασία και ρυθμίζουν το μήκος των υπομονάδων και τη συναρμολόγηση αυτών σε τριχίδια ή κροσσούς. Ο κροσσωτός φαινότυπος εμφανίζει συνήθως μεγαλύτερη λοιμογόνο δράση. Λεκτίνες έχουν απομονωθεί και από τα πρωτόζωα Entamoeba

histolytica (ειδικές για γαλακτόζη και τη Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη), Plasmodium falciparum (ειδικές για το σιαλικό οξύ και τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη) και Giardia lamblia (ειδικές για τη μαννόζη) [7-18].



Σχήμα 1.1: Απεικόνιση της σύνδεσης των βακτηριακών λεκτινών με τα κύτταρα του ξενιστή μέσω του μηχανισμού αναγνώρισης συγκεκριμένων υδατανθράκων. Η παρουσία φαρμάκου που θα δεσμεύεται εκλεκτικά μπορεί να αναστείλει τη συγκεκριμένη δράση.

Η δεσμευτική ικανότητα των λεκτινών οφείλεται στην ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, σπανιότερα δε και σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η παρουσία μεταλλικών ιόντων επηρεάζει, ενώ η μεσολάβηση μορίων νερού μπορεί να είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των ανωτέρω δεσμών. Τα μόρια νερού συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και δημιουργούνται γέφυρες λεκτινών-μορίων νερού-σακχάρων που παίζουν ρόλο στο στάδιο της

αναγνώρισης. Οι βακτηριακές λεκτίνες προσκολλώνται με τους παραπάνω μηχανισμούς στα κύτταρα του ξενιστή. Η δέσμευση των παθογόνων στελεχών μέσω των βακτηριακών λεκτινών και η αποίκιση σε ιστούς του ξενιστή αποτελεί προϋπόθεση για την έναρξη μιας λοίμωξης. Η προσκόλληση προστατεύει τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τους μηχανισμούς κάθαρσης της φυσικής ροής των εκκρίσεων (βλέννα, σάλιο, ιδρώτας, ούρα), που θα τους παρέσυραν εκτός του οργανισμού και επιπλέον έτσι έχουν καλύτερη πρόσβαση σε πηγές διατροφής, ενώ διευκολύνει τη παράδοση των τοξικών παραγόντων που απελευθερώνουν στους ιστούς υποδοχής και τελικά τη διείσδυση των βακτηρίων στους ιστούς αυτούς. Κανονικά, τα επιθηλιακά κύτταρα στην επιφάνεια των βλεννογόνων απομακρύνουν καθημερινά εκατοντάδες μη προσκολλημένα μικροβιακά είδη. Επομένως η απλή επαφή παθογόνων στελεχών και ιστών δεν οδηγεί πάντα σε νόσο [1, 10, 19-20].

Οι λεκτίνες αντιπροσωπεύουν τη λοιμογόνο δύναμη των βακτηρίων. Η αναστολή της δράσης των βακτηριακών λεκτινών από σάκχαρα, με τα οποία δεσμεύονται επιλεκτικά, θεωρείται ήπια και ασφαλής ιατρική παρέμβαση και θα μπορούσε να εμποδίσει την εξάπλωση των μολυσματικών ασθενειών. Για παράδειγμα, η προσκόλληση των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα κύτταρα αναστέλλεται από τη παρουσία μαννόζης. Η πειραματική συγχορήγηση μαννόζης με λεκτίνη τύπου 1 από Ε. coli στην ουροδόχο κύστη ποντικιών μείωσε το ποσοστό μόλυνσης του ουροποιητικού τους συστήματος. Το μητρικό γάλα περιέχει σε υψηλές συγκεντρώσεις κάποιους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι αναστέλλουν τη προσκόλληση των εντεροπαθογόνων βακτηρίων Campylobacter jejuni. Τα βρέφη που θηλάζουν εμφανίζουν εντερικές διαταραχές με πολύ μικρή συχνότητα, π.χ. δεν υποφέρουν από διάρροιες. Άλλος ολιγοσακχαρίτης του μητρικού γάλατος, που φέρει υποδοχείς δέσμευσης του σιαλικού οξέος, προστατεύει τα βρέφη από τον ιό της γρίπης Α. Το μητρικό γάλα, χάρη στους ολιγοσακχαρίτες που περιέχει προστατεύει από λοιμώξεις του γαστρεντερικού, ουροποιητικού και αναπνευστικού συστήματος γενικότερα, κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής των βρεφών. Για να είναι αποτελεσματική η δράση των σακχάρων ως «αντιπροσκολλητικοί» παράγοντες θα πρέπει να χορηγούνται σε επαρκή συγκέντρωση και σε συνδυασμούς δεδομένου ότι μία μόλυνση μπορεί να οφείλεται σε περισσότερους μικροοργανισμούς και κάθε βακτήριο μπορεί να εκφράζεται από λεκτίνες διαφορετικού τύπου. Η παρουσία στο ίδιο παθογόνο βακτήριο, πολλαπλών λεκτινών που αλληλεπιδρούν με ποικιλία σακχάρων και η χαμηλή συγγένεια των βακτηριακών λεκτινών για τα ελεύθερα σάκχαρα, αποτελεί το μεγαλύτερο εμπόδιο στη χρήση των τελευταίων στη θεραπευτική. Η βακτηριακή λοιμογόνος δύναμη μπορεί να ενισχυθεί από τη παρουσία μικροβιακών ενζύμων, που τροποποιούν τις υδατανθρακικές αλυσίδες των σακχάρων του ξενιστή και αυξάνουν την πυκνότητα των υποδοχέων των λεκτινών τους. [1, 19, 21-25].

Φαίνεται ότι οι λεκτίνες πράγματι επηρεάζουν τη πορεία μιας λοίμωξης και την άμυνα ενός οργανισμού έναντι παθογόνων εισβολέων. Η αλληλεπίδραση λεκτινώνυδατανθράκων αμέσως μετά τη μικροβιακή μόλυνση και πριν την εγκατάσταση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή οδηγεί σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχουν αναφερθεί τρεις μηχανισμοί: α) οι βακτηριακές λεκτίνες συνδέονται απευθείας σε σάκχαρα που βρίσκονται στην επιφάνεια φαγοκυττάρων, β) σάκχαρα των βακτηρίων συνδέονται με λεκτίνες των φαγοκυττάρων και γ) εξωκυττάριες λεκτίνες λειτουργούν ως γέφυρες που συνδέουν σάκχαρα από την επιφάνεια των βακτηρίων και των φαγοκυττάρων. Ακολουθεί η λύση αυτών (φαγοκυττάρωση) πριν προλάβει να εξαπλωθεί η λοίμωξη. Επομένως οι βακτηριακές λεκτίνες, από τη μία αυξάνουν τη παθογένεια των βακτηρίων αφού προωθούν τη προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα και από την άλλη την ελαττώνουν ευαισθητοποιώντας τη φαγοκυττάρωση. Επίσης καθώς οι λεκτίνες μιμούνται τη δράση των ειδικών αντιγόνων ή αντισωμάτων σε μεμβρανικά συστατικά είναι χρήσιμες για μελέτες σχετικά με το μηχανισμό μιας ανοσολογικής αντίδρασης [27-28].

Στην επιφάνεια των μακροφάγων, κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος των ανώτερων θηλαστικών, υπάρχουν λεκτίνες που αναγνωρίζουν τη μαννόζη που απαντάται σε γλυκάνες στην επιφάνεια μολυσματικών βακτηρίων, δεσμεύονται εκλεκτικά και επιταχύνεται η καταστροφή τους. Βέβαια, δε διαθέτουν όλα τα βακτήρια λεκτίνες που μπορούν να συνδεθούν με μακροφάγα. Οι κολλεκτίνες συμμετέχουν σε μηχανισμούς ανοσίας. Οι σελεκτίνες είναι υπεύθυνες για τη προσκόλληση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και για τη μετάβαση των λευκών αιμοσφαιρίων σε φλεγμαίνουσες περιοχές, όπου θα δράσουν περιορίζοντας την εξάπλωση των βακτηρίων. Στα φυτά οι λεκτίνες μπορεί επίσης να συμμετέχουν σε μηχανισμούς άμυνας αναγνωρίζοντας και δεσμεύοντας φυτοπαθογόνες ενώσεις που απελευθερώνουν μύκητες και έντομα. Οι φυτικές λεκτίνες εκπροσωπούνται ικανοποιητικά και στη διατροφή του ανθρώπου, όπου μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδοχείς ενισχύοντας τη συγκόλληση των βακτηρίων [2, 14, 26, 28-29].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι λεκτίνες συμμετέχουν στην συγκόλληση των κυττάρων. Η ύπαρξή τους σε αυξημένα επίπεδα στις επιφάνειες των καρκινικών κυττάρων έχει συνδεθεί με το μηχανισμό μετάστασης. Έτσι, θεωρούνται υπεύθυνες για την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα-στόχους και την επαγωγή της μετάστασης. Επομένως οι λεκτίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση αλλαγών στην επιφάνεια διαφοροποιημένων καρκινικών (παθολογικών) κυττάρων και τη σύγκριση τους με φυσιολογικά. Επιπλέον αυξημένα επίπεδα γκαλεκτινών έχουν συνδεθεί με λεμφώματα ή κακοήθεις όγκους στο στομάχι, το κεφάλι, το θυρεοειδή και το λαιμό. Αντίθετα σε καρκίνο μαστού, μήτρας και ωοθηκών τα επίπεδα των γκαλλεκτινών διατηρούνται χαμηλά. Ακόμα, επειδή οι λεκτίνες αλληλεπιδρούν περισσότερο με καρκινικά παρά με φυσιολογικά κύτταρα, λόγω της διαφορετικής κατανομής και του μεγαλύτερου αριθμού υποδοχέων λεκτινών σε αυτά, χρησιμεύουν στο σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων, εκδηλώνοντας άμεση τοξικότητα για αυτά ή ως φορείς τοξικών παραγόντων. Καθώς θα δεσμευτούν και θα δράσουν επιλεκτικά σε καρκινικούς ιστούς μπορούν να περιοριστούν οι αυξημένες ανεπιθύμητες ενέργειες και η τοξικότητα αυτών σε φυσιολογικούς ιστούς [2-6, 30-31].

Επιπρόσθετα οι λεκτίνες μπορεί να εμπλέκονται στον προσδιορισμό της ομάδας αίματος, καθώς και στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών [5].

Η μελέτη των βακτηριακών λεκτινών και ο εντοπισμός των υποδοχέων τους, μπορεί να διευκολύνει τη κατανόηση της μοριακής βάσης μιας μόλυνσης και να οδηγήσει σε νέες προσεγγίσεις για την πρόληψή της. Η φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των λεκτινών των βακτηρίων και σακχάρων της επιφάνειας των κυττάρων του ξενιστή, μπορεί να διευκολύνει στο σχεδιασμό αποτελεσματικότερων θεραπευτικών παραγόντων που θα αναστείλουν τη προσκόλληση των βακτηριακών λεκτινών στα κύτταρα του ξενιστή αποτρέποντας την επακόλουθη μόλυνση. Επιπλέον, τα σάκχαρα αποτελούν φυσιολογικά συστατικά της επιφάνειας των κυττάρων και των υγρών του σώματος, ακόμη και του μητρικού γάλατος, επομένως η χρήση τους ως μέσο για την αναστολή της βακτηριακής πρόσφυσης είναι μη τοξική και ασφαλής. Τα κλασσικά αντιβιοτικά παρεμβαίνουν συνήθως σε κάποια κρίσιμη για το μικροοργανισμό μεταβολική οδό, με αποτέλεσμα τα μικρόβια να αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης και να τροποποιούν τις λειτουργίες τους προκειμένου να επιβιώσουν. Με τη χρήση σακχάρων που προσελκύουν επιλεκτικά τα μικρόβια, δύσκολα θα αναπτυχθούν ανθεκτικά στελέχη, επειδή αυτά απέτυχαν να δεσμευτούν σε υποδοχείς του ξενιστή [9, 12, 19, 24, 26].

Η χρήση των λεκτινών ως φορέων φαρμάκων ή ως μεσολαβητών για την στοχευμένη δράση των αντιβιοτικών σε παθογόνους μικροοργανισμούς πλεονεκτεί Η στοχευμένη δράση έναντι της παραδοσιακής θεραπείας. αυξάνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, καθώς το φάρμακο συσσωρεύεται εκλεκτικά σε ικανή συγκέντρωση στις περιοχές όπου εστιάζεται το πρόβλημα, ενώ προστατεύονται οι υγιείς ιστοί. Η επιλεκτική απελευθέρωση του φαρμάκου στον παθολογικό ιστό και η ελαττωμένη ποσότητα του χορηγούμενου φαρμάκου που συνεπάγεται, προστατεύουν από ανεπιθύμητες ενέργειες, που θα καθυστερούσαν τη θεραπεία ή θα απέτρεπαν τον ασθενή από τη θεραπεία με το συγκεκριμένο φάρμακο. Η ιδέα της χρήσης της αλληλεπίδρασης λεκτινών και σακχάρων για στοχευμένη δράση μπορεί να εφαρμοστεί για τη γαστρεντερική οδό, αλλά και άλλους βιολογικούς ιστούς, όπως ο ρινικός βλεννογόνος, ο οφθαλμός, οι πνεύμονες και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός [4].

Η στοχευμένη δράση μπορεί να προϋποθέτει τη προστασία των ενεργών ομάδων του φαρμάκου μέχρι να παραδοθεί στο σημείο δράσης. Το φάρμακο μπορεί να προστατευτεί με εγκλεισμό σε κατάλληλο φορέα, π.χ. κυκλοδεξτρινική κοιλότητα. Στη συνέχεια στο σύμπλοκο που προκύπτει δεσμεύεται το μόριο-στόχος, απελευθερώνεται το φάρμακο και εκδηλώνει τη δράση του.

Οι φυσικοί πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη στερεών φαρμακοτεχνικών μορφών (προ-φάρμακα) που θα απελευθερώσουν τη δραστική μορφή του φαρμάκου σε συγκεκριμένο ιστό. Η χρήση τους μέχρι σήμερα οφείλεται κυρίως στην ανάγκη προστασίας ορισμένων ευαίσθητων φαρμάκων, οπότε α) συνδέονται με αυτά, β) χρησιμεύουν ως υλικό επίστρωσης με το φάρμακο στο πυρήνα τους ή γ) ενσωματώνουν το φάρμακο σε κοιλότητες που διαθέτουν, οπότε λαμβάνεται ένα προ-φάρμακο. Πολλές πρωτεΐνες και πεπτιδικά φάρμακα, όπως η ινσουλίνη δε μπορούν να χορηγηθούν από του στόματος, αφού αποικοδομούνται από τα πεπτικά ένζυμα. Άλλα φάρμακα δεν επιβιώνουν από το όξινο pH του στομάχου. Για τη στοχευμένη δράση ενός φαρμάκου στο παχύ έντερο, θα πρέπει να προηγηθεί η προστασία αυτού από το εχθρικό περιβάλλον του στομάχου και του λεπτού εντέρου. Αυτή η προστασία στο τμήμα του άνω γαστρεντερικού σωλήνα επιτυγχάνεται με μόρια μεταφορείς, οπότε σχηματίζονται προ-φάρμακα. Το προ-φάρμακο είναι φαρμακολογικά ανενεργή μορφή που απαιτεί μια αυθόρμητη ή ενζυμική μετατροπή, προκειμένου να απελευθερώσει τη δραστική μορφή. Τα σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης βασίζονται επίσης στη δημιουργία των προ-φαρμάκων. Έτσι, ενισχύεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, ελαττώνεται η χορηγούμενη δόση και η συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Μερικοί πολυσακχαρίτες, που έχουν μελετηθεί και έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι η χιτοζάνη, οι πηκτίνες, η θειϊκή χονδροϊτίνη, οι δεξτράνες, οι κυκλοδεξτρίνες, το κόμμι γκουάρ, η αμυλόζη, η ινουλίνη και το κόμμι χαρουπιών. Οι πολυσακχαρίτες διατίθενται σε αφθονία, είναι οικονομικοί και διακρίνονται από ποικιλία δομών και ιδιοτήτων. Επιπλέον τροποποιούνται εύκολα χημικά είτε βιοχημικά, είναι ενώσεις σταθερές, μη τοξικές, υδρόφιλες, ασφαλείς, βιοαποικοδομήσιμες, επομένως κατάλληλες για χρήση όταν είναι επιθυμητή η στοχευμένη δράση φαρμάκων [32].



Σχήμα 1.2: Απεικόνιση της στοχευμένης δράσης των φαρμάκων σε συγκεκριμένα κύτταρα με τη μεσολάβηση εξωγενών ή ενδογενών λεκτινών ως φορέων αυτών.

Εισαγωγή στους στόχους της παρούσας διατριβής

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών και η εισαγωγή τους στην θεραπευτική αποτέλεσε την μεγαλύτερη ανακάλυψη της φαρμακοχημείας αλλά συγχρόνως καλλιέργησε την πεποίθηση ότι εξαλείφθηκε το πρόβλημα των μικροβιακών λοιμώξεων. Το πρόβλημα όμως ήταν και παραμένει πολυπλοκότερο, διότι τα βακτήρια ανέπτυξαν μηχανισμούς που επέτρεψαν την εξέλιξή τους και την αντίσταση έναντι των αντιβιοτικών. Σήμερα ένα βακτηριακό στέλεχος θεωρείται παθογόνο όταν α) έχει λοιμογόνο δράση και ενέχεται στην εμφάνιση επιδημιών.

Η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει σε τροποποίηση των γενετικών χαρακτηριστικών ορισμένων βακτηριακών πληθυσμών και στην ανάπτυξη νέων μορφών τους, ανθεκτικών στα ήδη διαθέσιμα δραστικά αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η αντιμετώπιση λοιμώξεων από αυτά. Οι αλλαγές αυτές διαφοροποιούν τις ιδιότητες όχι μόνο παθογόνων βακτηρίων, αλλά και την φυσιολογική χλωρίδα. Έναυσμα μιας βακτηριακής λοίμωξης, αποτελεί η μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου βακτηρίου και συγκεκριμένων κυττάρων του ξενιστή.

Ο αποικισμός των μικροβίων σε ιστούς του ξενιστή (δηλ. του προσβαλλόμενου οργανισμού) πραγματοποιείται με ειδικές μοριακές δομές του βακτηριακού κυττάρου οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια αυτού, τις λεκτίνες. Οι λεκτίνες αποτελούν δομικά στοιχεία πρωτεϊνικών δομών του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηριακού κυττάρου και έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σάκχαρα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, όπως η μαννόζη, η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η φουκόζη, η μαλτόζη, η Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη, η Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη ή σύμπλοκα σακχάρων κ.λ.π. Η μοριακή αυτή αλληλεπίδραση χαρακτηρίζεται από στερεοειδικότητα, η οποία προσφέρει την δυνατότητα σχεδιασμού και σύνθεσης υπερμοριακών ενώσεων με βιομιμητικές ιδιότητες (χημικά ανάλογα των βιογενών υποδοχέων) που θα παρεμποδίζουν την διαδικασία προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων στους ιστούς του ξενιστή.

Σε προηγούμενη έρευνα της ερευνητικής ομάδος του εργαστηρίου μας αποδείχτηκε ότι ο μοριακός εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες, που είναι εγκεκριμένα έκδοχα, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας σε περιορισμένο, αλλά στατιστικά σημαντικό βαθμό των αντιμικροβιακών έναντι πολυανθεκτικών κλινικών στελεχών. Η αύξηση της δραστικότητας ήταν εντονότερη έναντι των gram-αρνητικών μικροβίων και κυρίως των εντεροβακτηρίων, στοιχείο ιδιαιτέρως σημαντικό λόγω της δυσκολίας αντιμετώπισης του φαινομένου της αντίστασης των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Επίσης απέδειξε ότι καθοριστικοί παράγοντες στην ενίσχυση της δραστικότητας είναι το είδος και ο βαθμός χημικής υποκατάστασης των μορίων της χρησιμοποιούμενης κυκλοδεξτρίνης.

Στην παρούσα μελέτη στόχος είναι να επεκταθεί η ανωτέρω έρευνα, για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικροβιακά στελέχη, στην κατηγορία των κινολονών με τον εγκλεισμό αυτών στις ήδη υπάρχουσες φυσικές κυκλοδεξτρίνες ή σε παράγωγα αυτών διαθέσιμα στο εμπόριο, καθώς και ο εγκλεισμός σε νέες, μη εμπορικώς διαθέσιμες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες θα συντεθούν για το συγκεκριμένο σκοπό. Οι ειδικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες θα εμφανίζουν στερεοειδικότητα ως προς τις βακτηριακές προσκολλητίνες. Συγκεκριμένα, οι κυκλοδεξτρίνες θα φέρουν τα ανωτέρω σάκχαρα, που θα αναγνωρίζουν τα παθογόνα βακτήρια και συγχρόνως θα έχουν δεσμεύσει αντιβιοτικό στην κοιλότητά τους.

Οι κινολόνες, οι οποίες επιλέχτηκαν είναι το οξολινικό οξύ και η κυπροφλοξακίνη, χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι πρώτης και δεύτερης γενιάς αντίστοιχα. Н κατηγορία των φθοριοκινολονών. κυπροφλοξακίνη ανήκει στην Or μελέτες πραγματοποιήθηκαν αρχικά στις εμπορικώς διαθέσιμες κυκλοδεξτρίνες και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν στις συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, εφόσον η σύνθεση αυτών πραγματοποιήθηκε παράλληλα με τη συγκεκριμένη μελέτη, η συνθετική πορεία ήταν επίπονη και η διαθέσιμη ποσότητα αυτών ιδιαίτερα περιορισμένη.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι φυσικοί κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούνται από 6-8 μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης:









η επαναλαμβανόμενη μονάδα

β-κυκλοδεξτρίνη

σύμπλοκο εγκλεισμού

Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της β-κυκλοδεξτρίνης, των μονομερών από τα οποία αποτελείται και συμπλόκου αυτής.

Δομικά χαρακτηρίζονται από υδρόφιλες εξωτερικές επιφάνειες (πρωτοταγής και δευτεροταγής πλευρά) και λιπόφιλες εσωτερικές, (κοιλότητα), επομένως, μπορούν να εγκλωβίζουν στην κοιλότητά τους μη υδατοδιαλυτά οργανικά μόρια (όπως τα αντιβιοτικά) κυρίως από την δευτεροταγή πλευρά, και να τα μεταφέρουν στο διάλυμα, λειτουργούν δηλαδή ως μοριακοί ξενιστές. Οι κυκλοδεξτρίνες δεν υδρολύονται και δεν απορροφώνται από το στομάχι και το λεπτό έντερο [33].

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στο πεδίο του εγκλωβισμού φαρμάκων για παραγωγή σκευασμάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από:

(α) βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα του ενεργού συστατικού.

(β) βελτιωμένη σταθερότητα του δραστικού συστατικού εφόσον προστατεύεται από την κυκλοδεξτρίνη (από φωτοδιάσπαση, χημική αποικοδόμηση, οξείδωση, κλπ).

(γ) ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου από το εν διαλύσει σύμπλοκο.

(δ) βελτιωμένη σταθερότητα και χρόνο ζωής κατά την αποθήκευση του σκευάσματος.

(ε) μειωμένες ανεπιθύμητες παρενέργειες (ελάττωση της τοξικότητας, βελτίωση γεύσης ή οσμής κλπ).

Έχει αναφερθεί η ταυτόχρονη χορήγηση αντιβιοτικών και σακχάρων, με στόχο οι λεκτίνες του βακτηριακού κυττάρου των μικροβίων να δεσμεύσουν τα εξωγενή σάκχαρα και όχι εκείνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή. Η 'παραπλάνηση' αυτή των μικροβίων θα μπορούσε να αναστείλει τη δράση των μικροβίων και με τη βοήθεια των ταυτόχρονα χορηγηθέντων αντιβιοτικών να αντιμετωπιστεί πιθανή λοίμωξη.

Η σύνθεση των νέων κυκλοδεξτρινών πραγματοποιήθηκε με στόχο τη μοριακή αναγνώριση μεταξύ κυκλοδεξτρινών, αντιμικροβιακών παραγόντων, βακτηρίων και άλλων βιογενών δομών, επομένως θα μπορούσε να προκύψει μερική σταδιακή αντιμετώπιση του προβλήματος των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικροβιακά στελέχη, εφόσον αναμένεται να ενισχυθεί η δραστικότητα των εν λόγω αντιμικροβιακών φαρμάκων.

Πιο ειδικά, η χρήση τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών με κατάλληλες ομάδες με βιομιμητικές ιδιότητες (σάκχαρα), οι οποίες θα αναγνωρίζονται επιλεκτικά από τις λεκτίνες του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων και θα είναι φορείς αντιμικροβιακών φαρμάκων, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μια περισσότερο στοχευμένη δράση εναντίον των παθογόνων στελεχών. Πρώτο στάδιο για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι η αλληλεπίδραση κυκλοδεξτρινών-παθογόνων στελεχών και η δέσμευση των συνδεδεμένων στις κυκλοδεξτρίνες σακχάρων και των μικροβιακών λεκτινών, ενώ αποτρέπεται η προσκόλληση των μικροβίων στους ιστούς υποδοχείς και παρεμποδίζεται η επαφή αυτών με τα παθογόνα στελέχη. Ακολουθεί η απελευθέρωση του εγκλεισμένου επιλεγμένου δραστικού αντιμικροβιακού από τη κοιλότητα των ανωτέρω κυκλοδεξτρινών, το οποίο θα εκδηλώσει την αντιμικροβιακή του δράση απευθείας στο μικρόβιο.

Επομένως, στη συγκεκριμένη έρευνα δίνεται ιδιαίτερο βάρος στην μοριακή αναγνώριση, την στοχευμένη σύνδεση στον τόπο δράσης και την μοριακή μεταφορά. Ιδανικά, μετά το μοριακό εγκλεισμό των αντιμικροβιακών φαρμάκων στις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, θα επιτυγχάνεται η στόχευση των παθογόνων στελεχών και όχι όλου του πληθυσμού του βακτηριακού είδους, ώστε να μην διαταράσσεται η φυσιολογική χλωρίδα του ξενιστή.

Οι συνθετικές, μη εμπορικώς διαθέσιμες, συστηματικώς τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, θα περιέχουν επιλεγμένες ομάδες ώστε :

- Να αναγνωρίζονται από τις προσκολλητίνες των κυτταρικών τοιχωμάτων των ανθεκτικών μικροβίων, ώστε να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της αναγνώρισης και, κυρίως, στόχευση του αντιβιοτικού στο παθογόνο βακτήριο.
- Να αλληλεπιδρούν εκλεκτικά σε ρυθμιζόμενο βαθμό με τις κυτταρικές μεμβράνες μικροβίων βάσει χαρακτηριστικών ομάδων, οι οποίες θα εισαχθούν στην πρωτοταγή πλευρά των κυκλοδεξτρινών.
- Να διαθέτουν την δευτεροταγή τους πλευρά ελεύθερη, ώστε να είναι δυνατή η μοριακή εισχώρηση του αντιβιοτικού.
- Να επιτυγχάνεται προστασία των αντιβιοτικών, εξ' αιτίας του μοριακού εγκλεισμού του στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, έναντι ενζυμικών και άλλων υδρολυτικών διαδικασιών στο κύτταρο.

Θα γίνει εκτίμηση της αντιμικροβιακής δραστικότητας των διαλυμάτων των συμπλόκων εγκλεισμού με διάφορες κυκλοδεξτρίνες και με τις συνθετικά σάκχαρα τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που φέρουν υποκαταστάτες και παρασκευάστηκαν για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, εναντίον διαλυμάτων παθογόνων στελεχών, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα πρότυπα στελέχη και στελέχη που απομονώθηκαν από το ουροποιητικό σύστημα ασθενών και θα προσδιοριστεί η ελάχιστη τιμή της ΜΙC των τελικών διαλυμάτων, δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, που μπορεί και αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

Οι κινολόνες είναι αντιμικροβιακά φάρμακα, με χαρακτηριστικό δομικό τους γνώρισμα το δακτύλιο της ναφθυριδόνης.



X = N; naphthyridone X = CH ; quinolone ;

Η πρώτη κινολόνη ήταν το ναλιδιξικό οξύ και συντέθηκε το 1962. Στη συνέχεια, μετά από ποικίλες δομικές τροποποιήσεις προέκυψαν οι κινολόνες πρώτης έως και τέταρτης γενιάς, ενώ υπάρχουν και οι υπό εξέλιξη δομές. Οι κινολόνες πρώτης γενιάς δρουν ενάντια στους Gram- μικροοργανισμούς. Στόχος των νεώτερων δομών είναι η επέκταση του αντιμικροβιακού φάσματος, ώστε οι κινολόνες επόμενων γενιών να είναι δραστικές και ενάντια σε Gram+, αναερόβιους μικροοργανισμούς και τον πνευμονιόκοκκο καλύπτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα παθογόνων βακτηρίων. Η χρήση των κινολονών βρίσκει κλινικές εφαρμογές σε μολύνσεις στο ουροποιητικό, αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα, σε γυναικολογικές λοιμώξεις, σεξουαλικώς μεταδιδόμενα νοσήματα, καθώς επίσης σε δερματολογικές παθήσεις, αλλά και παθήσεις μαλακών ιστών [34-37].







Σχήμα 2.1: Μηχανισμός δράσης των κινολονών.

Η δράση των κινολονών βασίζεται στην παρεμπόδιση του αναδιπλασιασμού του βακτηριακού DNA. Επιπλέον προωθούν τη διάσπαση του βακτηριακού DNA, στα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ του DNA των βακτηρίων και των ενζύμων DNA-γυράση και τοποϊσομεράση IV. Στην περίπτωση των Gram- βακτηρίων η αναστολή οφείλεται στην παρεμπόδιση της δράσης της βακτηριακής DNA-γυράσης, ενώ στην περίπτωση των Gram+ η αναστολή οφείλεται σε παρεμπόδιση της δράσης της βακτηριακής τοποϊσομεράσης IV. Σε κάθε περίπτωση έχουμε θάνατο του βακτηριακού κυττάρου και αναστολή της εξάπλωσης της λοίμωξης [38-50].



Σχήμα 2.2: Μηχανισμός δράσης DNA-γυράσης και τοποϊσομεράσης IV

2.1. Κινολόνες 1^{ης} Γενιάς

Οι πρώτες κινολόνες ήταν δραστικές εναντίον Gram- μικροοργανισμών. Η χρήση τους σήμερα είναι πλέον περιορισμένη.



<u>Σχήμα 2.3:</u> Χημικός τύπος Nalidixic acid.



<u>Σχήμα 2.4:</u> Χημικός τύπος Cinoxacin.



<u>Σχήμα 2.5:</u> Χημικός τύπος Flumequine.



<u>Σχήμα 2.6:</u> Χημικός τύπος Oxolinic acid.





<u>Σχήμα 2.7:</u> Χημικός τύπος Piromidic acid.

<u>Σχήμα 2.8:</u> Χημικός τύπος Pipemidic acid.



<u>Σχήμα 2.9:</u> Χημικός τύπος Rosoxacin.

2.2. Κινολόνες 2^{ης} Γενιάς

Είναι δραστικές εναντίον Gram- μικροοργανισμών και παρουσιάζουν περιορισμένη δράση εναντίον Gram+ μικροοργανισμών. Οι κινολόνες αυτές είναι περισσότερο δραστικές εναντίον Gram- βακίλων. Η κυπροφλοξακίνη παραμένει δραστική και αντιβιοτικό επιλογής εναντίον της Pseudomonas aeruginosa.



<u>Σχήμα 2.10:</u> Χημικός τύπος Ciprofloxacin.



Σχήμα 2.11: Χημικός τύπος Enoxacin.



<u>Σχήμα 2.12:</u> Χημικός τύπος Fleroxacin.



Σχήμα 2.13: Χημικός τύπος Lomefloxacin.



<u>Σχήμα 2.14:</u> Χημικός τύπος Nadifloxacin.



Σχήμα 2.15: Χημικός τύπος Norfloxacin.





Σχήμα 2.16: Χημικός τύπος Ofloxacin.

Σχήμα 2.17: Χημικός τύπος Pefloxacin.



Σχήμα 2.18: Χημικός τύπος Rufloxacin.

2.3. Κινολόνες 3^{ης} Γενιάς

Πρόκειται για κινολόνες δραστικές τόσο ενάντια σε Gram- μικροοργανισμούς, όσο και ενάντια σε Gram+ μικροοργανισμούς. Ειδικότερα, η λεβοφλοξασίνη, η σπαρφλοξασίνη, η γκατιφλοξασίνη και η μοξιφλοξασίνη είναι δραστικές εναντίον του Streptococcus pneumoniae και των ανθεκτικών στην πενικιλλίνη μορφών. Επίσης, η λεβοφλοξασίνη, η γκατιφλοξασίνη και η μοξιφλοξασίνη έχουν εξαιρετική δράση εναντίον των Legionella, Chlamydia, Mycoplasma και Ureoplasma.



<u>Σχήμα 2.19:</u> Χημικός τύπος Balofloxacin.

<u>Σχήμα 2.20:</u> Χημικός τύπος Gatifloxacin.



<u>Σχήμα 2.21:</u> Χημικός τύπος Grepafloxacin. <u>Σχήμα 2.22:</u> Χημικός τύπος Levofloxacin.





Σχήμα 2.23: Χημικός τύπος Moxifloxacin.



Σχήμα 2.24: Χημικός τύπος Pazufloxacin.



<u>Σχήμα 2.25:</u> Χημικός τύπος Sparfloxacin.



Σχήμα 2.26: Χημικός τύπος Temafloxacin.



<u>Σχήμα 2.27:</u> Χημικός τύπος Tosufloxacin.

2.4. Κινολόνες 4^{ης} Γενιάς

Οι κινολόνες τελευταίας γενιάς παραμένουν δραστικές εναντίον Gram- και Gram+ μικροοργανισμών και επεκτείνουν τη δράση τους εναντίον αναερόβιων βακτηρίων.

Η τραβοφλοξασίνη είναι δραστική εναντίον του Streptococcus pneumoniae και των ανθεκτικών στην πενικιλίνη μορφών, αλλά και μολύνσεων από αναερόβιους μικροοργανισμούς. Η γκεμιφλοξασίνη έχει εξαιρετική δράση εναντίον των Legionella, Chlamydia, Mycoplasma και Ureoplasma.





<u>Σχήμα 2.28:</u> Χημικός τύπος Clinafloxacin.

<u>Σχήμα 2.29:</u> Χημικός τύπος Gemifloxacin.


<u>Σχήμα 2.30:</u> Χημικός τύπος Sitafloxacin.



<u>Σχήμα 2.31:</u> Χημικός τύπος Trovafloxacin.



Σχήμα 2.32: Χημικός τύπος Prulifloxacin.

2.5. Κινολόνες σε εξέλιξη:



Σχήμα 2.33: Χημικός τύπος Garenoxacin.



<u>Σχήμα 2.34:</u> Χημικός τύπος Delafloxacin.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Ο όρος «υδατάνθρακες» περιλαμβάνει μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων, οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν στους μονοσακχαρίτες, τους ολιγοσακχαρίτες και τους πολυσακχαρίτες. Ο φυσιολογικός ρόλος των υδατανθράκων είναι η παροχή ενέργειας στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ ο βιολογικός τους ρόλος είναι η μεταφορά ανοσολογικών μηνυμάτων. Μερικοί απαντώνται στη φύση, ενώ χαρακτηριστικό των περισσοτέρων είναι η γλυκύτητα, την οποία παρουσιάζουν. Κάθε ομάδα διακρίνεται σε διάφορες υποκατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν παράγωγα αναγωγικών ή οξειδωτικών αντιδράσεων, αντικατάσταση υδροξυ- ομάδων από υδρογόνο, αμινο-, θειολο- ομάδων και διάφορα άλλα ετεροάτομα. Επίσης ορισμένοι μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες είναι γνωστοί ως "σάκχαρα" και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων καθώς επίσης και σαν έκδοχα σε φαρμακευτικά σκευάσματα [51-56].

3.1.1. Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες αποτελούνται από μία ομάδα τριών ή περισσοτέρων ατόμων άνθρακα και διακρίνονται σε πολυ-υδροξυ-αλδεΰδες του τύπου Η-[CHOH]_n-CHO και πολυ-υδροξυ-κετόνες του τύπου Η-[CHOH]_n-CO-[CHOH]_m-H. Διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύμμετρα κέντρα άνθρακα και παρουσιάζουν μοριακή ασυμμετρία. Εμφανίζονται με τις εναντιομερείς μορφές, D και L ως προς κάθε ασύμμετρο κέντρο ή και ως ρακεμικά μίγματα. Διαθέτουν επίσης την ικανότητα στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός και χαρακτηρίζονται σαν (+) ή (-) ανάλογα με τη φορά στροφής.

(Δι-) Αλδόζες και (Δι-) κετόζες

Η διάκριση αυτή στηρίζεται στον αριθμό των αλδεϋδικών ή κετονικών ομάδων που περιλαμβάνονται. Έτσι, μονοσακχαρίτες με μία ή δύο αλδεϋδικές ομάδες είναι γνωστοί σαν αλδόζες και δι-αλδόζες αντίστοιχα. Ονομάζονται συνήθως σύμφωνα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα που περιέχουν και τη κατάληξη –οζη, π.χ. τρι-οζη. Η απλούστερη αλδόζη είναι η γλυκεραλδεϋδη, η οποία περιέχει ένα ασύμμετρο κέντρο άνθρακα και επομένως υφίσταται υπό δύο εναντιομερείς μορφές, D και L (σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Παραδείγματα μονοσακχαριτών, που ανήκουν στην κατηγορία αλδόζεςδιαλδόζες. i) L-γλυκεραλδεϋδη, ii) D- θρεόζη, iii) D-ξυλόζη, iv) L-γλυκόζη, v) D-μαννόζη, vi) D-γαλακτόζη, vii) L-ριβο-D-μαννο-νονόζη, viii) L-θρεο-τετροδιαλδόζη.

Μονοσακχαρίτες με μία ή δύο κετονικές ομάδες είναι γνωστοί σαν κετόζες και δικετόζες αντίστοιχα. Ονομάζονται με τρόπο ανάλογο με τις αλδόζες, αλλά παίρνουν τη κατάληξη –ουλόζη (σχήμα 3.2).

сн₂он с=о нсон	сн₂он с=о нсон нсон		СН₂ОН С=О НОСН НСОН НСОН		CH₂OH C = O HOCH HOCH HOCH HCOH HCOH HOCH		СН₂ОН С=0 НСОН НОСН С=0
_{i)} сн ₂ он	ii) CH ₂ OH	iii)	сн₂он	iv)	с́н₂он	V)	с́н₂он

Σχήμα 3.2: Παραδείγματα μονοσακχαριτών, που ανήκουν στην κατηγορία κετόζεςδικετόζες. i) D-γλυκερο-τετρουλόζη, ii) D-ερυθρο-πεντ-2-ουλόζη, iii) D-αραβινο-εξ-2ουλόζη, iv) L-γλυκερο-D-μαννο-οκτ-2-ουλόζη, v) L-θρεο-εξ-2,5-διουλόζη.

Κυκλικές μορφές

Οι περισσότεροι μονοσακχαρίτες υφίστανται στην κυκλική τους μορφή, με τρία ή περισσότερα άτομα άνθρακα. Στους μονοσακχαρίτες κυκλικής μορφής συμπεριλαμβάνονται οι ημιακετάλες με πενταμελή δακτύλιο, γνωστές και σαν φουρανόζες και με εξαμελή δακτύλιο, γνωστές και σαν πυρανόζες (σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3: Σχηματισμός της D-γλυκοπυρανόζης από την D-γλυκόζη.

Ο σχηματισμός του δακτυλίου οδηγεί στη δημιουργία ενός νέου χειρόμορφου κέντρου, το ανωμερικό κέντρο. Τα δύο ανωμερή διακρίνονται από το πρόθεμα α ή β που παίρνουν (σχήμα 3.4).





<u>Σχήμα 3.4:</u> i) α-D-γλυκοπυρανόζη, ii) β-D-γλυκοπυρανόζη.

<u>Κετοαλδόζες</u>

Οι μονοσακχαρίτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν ταυτόχρονα αλδεϋδική και κετονική ομάδα είναι γνωστοί ως κετοαλδόζες (σχήμα 3.5). Οι κετοαλδόζες αναφέρονται συχνά και σαν "διϋδρο" αλδόζες.



Σχήμα 3.5: i) D-αραβινο-εξοζ-3-ουλόζη ii) μεθυλο β-D-ξυλο-εξοπυρανοζιτο-4-ουλόζη (ή 4-διϋδρο-D-γλυκόζη) iii) μεθυλο α-L-εξοζο-2-ουλο-2,5-φουρανοζίτη.

<u>Δεοξυ- σάκχαρα</u>

Οι μονοσακχαρίτες, στους οποίους μία αλδεϋδο- ομάδα έχει αντικατασταθεί από άτομο υδρογόνου είναι γνωστοί σαν δεοξυ- σάκχαρα (σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: i) α-L-φουκοπυρανόζη ή 6-δεοξυ-α-L-γαλακτοπυρανόζη ii) Lραμνοπυρανόζη ή 6-δεοξυ-L-μαννοπυρανόζη iii) 2-δεοξυ-D-ριβοεξόζη iv) 3-δεοξυ-Dριβοεξόζη.

Αμινο- σάκχαρα

Οι μονοσακχαρίτες, στους οποίους μία αλδεϋδο- ομάδα έχει αντικατασταθεί από αμινο- ομάδα είναι γνωστοί σαν αμινο- σάκχαρα (σχήμα 3.7).



<u>Σχήμα 3.7:</u> i) 2-αμινο-2-δεοξυ-D-γλυκοπυρανόζη ή D-γλυκοζαμίνη ii) 2-δεοξυ-2μεθυλαμινο-L-γλυκοπυρανόζη.

Άλλες υποκαταστάσεις, οι οποίες απαντώνται στους μονοσακχαρίτες είναι υδροξυλομάδα ή υδρογόνο από φαινυλομάδα (σχήμα 3.8 i), οξυγόνο καρβονυλομάδας ή υδροξυλομάδας από θείο, τελλούριο, σελήνιο (σχήμα 3.8 ii, iii), υδρογόνο από αλογόνο (σχήμα 3.8 iv), υδροξυλομάδα από αζιδομάδα (σχήμα 3.8 iv), οξυγόνο καρβονυλομάδας από άζωτο (σχήμα 3.8 vi) κ.α.





Σχήμα 3.8: i) 2-C-φαινυλ-α-D-γλυκοπυρανόζη, ii) 5-θειο-β-D-γλυκοπυρανόζη, iii) μεθυλο 5-σεληνο-α-D-φρουκτοφουρανοζίτη, iv) 2-βρωμο-2-χλωρο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη v) νιτρική 2,3-διαζιδο-4-Ο-βενζοϋλ-6-βρωμο-2,3,6-τριδεοξυ-α-D-μαννοπυρανόζη, vi) 1- δεοξυ-1-(μεθυλιμινο)-D-ξυλιτόλη.

<u>Αλδιτόλες</u>

Οι πολυϋδρικές αλκοόλες, οι οποίες προκύπτουν από την αντικατάσταση μιας καρβονυλικής ομάδας σε ένα μονοσακχαρίτη από την ομάδα CHOH, αναφέρονται και σαν αλδιτόλες. Λαμβάνουν το όνομά τους από τις αντίστοιχες αλδόζες, από τις οποίες προκύπτουν τροποποιώντας την κατάληξη από "οζη"σε "ιτολη" (σχήμα 3.9).

	CH₂OH	сн₂он
CH2OH	нсон	HĊOH
носн	носн	нсон
нсон	нсон	носн
нсон	нсон	носн
i) с́н₂он ii)	с́н₂он III)	с́н₃

Σχήμα 3.9: i) D-αραβινιτόλη, ii) D-Γλυκιτόλη, iii) L-ραμνιτόλη.

Αλδονικά οξέα

Με τον όρο αλδονικά οξέα αναφερόμαστε σε μονοκαρβοξυλικά οξέα, τα οποία προκύπτουν από τις αλδόζες με αντικατάσταση της αλδεϋδο- ομάδας από καρβοξυλική ομάδα. Λαμβάνουν τη κατάληξη "ονικο οξύ" και διακρίνονται περαιτέρω σε αλδοτριονικά, αλδοτετρονικά, αλδοπεντονικά οξέα κ.τ.λ. (σχήμα 3.10 i). Παράγωγα των αλδονικών οξέων είναι τα άλατα (σχήμα 3.10 ii), που παίρνουν τη κατάληξη "ονάτη", οι εστέρες (σχήμα 3.10 iii), που παίρνουν την ίδια κατάληξη με τα άλατα, αλλά προηγείται το όνομα του αλκυλίου του εστέρα, τα αμίδια και τα νιτρίλια (σχήμα 3.10 iv), που παίρνουν τις καταλήξεις "οναμιδιο" και "ονονιτρίλιο", οι λακτόνες/λακτάμες (σχήμα 3.10 v, vi) που παίρνουν τη κατάληξη "ονολακτόνη/ονολακτάμη" και τα ακυλο-αλογόνα (σχήμα 3.10 vii), που παίρνουν τη κατάληξη "ονούλικο" και ακολουθεί το όνομα του αλογόνου.



Σχήμα 3.10: i) D-γλυκονικό οξύ, ii) D-γλυκονικός μεθυλεστέρας, iii) L-3,4-δι-Οισοπροπυλικός μεθυλεστέρας, iv) N,N-διμεθυλο-L-ξυλοναμίδιο v) D-γλυκονο-1,5λακτόνη, vi) 5-αμινο-5-δεοξυ-D-μαννονο-1,5-λακτάμη, vii) πεντα-Ο-ακετυλο-Dγλυκονοϋλοχλωρίνιο.

Κετοαλδονικά οξέα

Τα κετοαλδονικά οξέα προκύπτουν από τα αλδονικά έπειτα από αντικατάσταση μιας δευτεροταγούς ομάδας CHOH από καρβονυλική ομάδα. Ονομάζονται σύμφωνα με τη κατάληξη "ουλοζονικο οξύ" (σχήμα 3.11 i, ii). Τα παράγωγα των αλδονικών οξέων (σχήμα 3.11 iii, iv)υφίστανται και στην περίπτωση των κετοαλδονικών οξέων.



Σχήμα 3.11: i) D-ερυθρο-πεντ-2-ουλοζονικό οξύ ii) 3-δεοξυ-α-D-μαννο-οκτ-2ουλοπυρανοζονικό οξύ iii) 1-Ο-μεθυλο-α-D-αραβινοεξ-2-ουλοπυρανοζιτονικός αιθυλεστέρας iv) L-ξυλο-εξ-2-ουλοζονο-1,4-λακτόνη.

Ουρονικά οξέα

Τα ουρονικά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα, τα οποία προκύπτουν από τις αλδόζες εφόσον προηγηθεί αντικατάσταση της ομάδας CH₂OH από καρβοξυλική ομάδα (σχήμα 3.12). Ονομάζονται σύμφωνα με τη κατάληξη "ουρονικό οξύ", ενώ τα παράγωγα αυτών, όπως εστέρες, άλατα, λακτόνες, αμίδια, νιτρίλια και ακυλο-αλογόνα ονομάζονται με τρόπο αντίστοιχο των αλδονικών οξέων.



<u>Σχήμα 3.12:</u> i) D-γλυκουρονικό οξύ, ii) D-γλυκουρονο-3,6-λακτόνη, iii) μεθυλο β-Dγαλακτοπυρανοζιτουροναμίδιο.

<u>Αλδαρικά οξέα</u>

Είναι δικαρβοξυλικά οξέα, τα οποία παράγονται από τις αλδόζες, μετά από ταυτόχρονη αντικατάσταση τόσο της ομάδας CH₂OH όσο και της ομάδας CHO από καρβοξυλομάδες (σχήμα 3.13). Λαμβάνουν τη κατάληξη "αρικό οξύ", ενώ τα παράγωγα αυτών είναι και ονομάζονται αντίστοιχα με τα αλδονικά οξέα.



Σχήμα 3.13: i) D-γλυκαρικό οξύ, ii) D-γλυκαρ-6-αμικός μεθυλεστέρας, iii) L-μανναρο-1,4:6,3-διλακτόνη.

<u>Γλυκοζίτες</u>

Οι γλυκοζίτες είναι οι μονοσακχαρίτες, οι οποίοι προκύπτουν από το σχηματισμό γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ των υδροξυ- ομάδων ενός σακχάρου και μιας ακόμη ένωσης και έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ενός μορίου νερού. Είναι μονοσακχαρίτες κυκλικής μορφής (σχήμα 3.14 i) και εκτός της ομάδος OR, (όπου R=αλκύλιο), μπορεί να φέρουν ομάδες -SR (θειογλυκοζίτες) (σχήμα 3.14 ii), -SeR (σεληνογλυκοζίτες) (σχήμα 3.14 iv) ή -CR¹R²R³ (C-γλυκοζίτες).





Σχήμα 3.14: i) μεθυλο α-D-γλυκοπυρανοζίτης, ii) αιθυλο 1-θειο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη, iii) 2-καρβοξυαιθυλο 1-σεληνο-β-D-ξυλοπυρανοζίτη, iv) Ν-φαινυλο-α-Dφρουκτοπυρανοζυλαμίνη.

3.1.2. Ολιγοσακχαρίτες

Οι ολιγοσακχαρίτες είναι περισσότερο σύνθετες ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από δύο έως εννιά μονοσακχαρίτες ενωμένους μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Όπως αναμένεται η ονομασία τους προκύπτει από τον αριθμό των μονομερών, από τα οποία αποτελούνται και χαρακτηρίζονται σαν δι-, τρι-, σακχαρίτες κ.τ.λ., εφόσον περιέχουν δύο, τρεις κ.τ.λ. μονοσακχαρίτες αντίστοιχα (σχήμα 3.15). Επίσης με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσγλυκοζυλάση έχουν προκύψει τα παράγωγα ισομαλτο-, γλυκο-, φρουκτο- και γαλακτο- ολιγοσακχαρίτες, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικά.

CH₂OH HO нс HO HO CH₂OH i)



<u>Σχήμα 3.15:</u> i) α-D-γλυκοπυρανοζυτο α-D-γλυκοπυρανοζίτης (δισακχαρίτης), ii) α-Dγλυκοπυρανοζυλο-(1 \rightarrow 6)- α-D-γλυκοπυρανοζυλο-(1 \rightarrow 4)- D-γλυκοπυρανοζίτης (τρισακχαρίτης).

Κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες

Οι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται συνήθως από το ίδιο μονομερές, έναν επαναλαμβανόμενο μονοσακχαρίτη και ονομάζονται σύμφωνα με το πρόθεμα "κυκλο", ακολουθεί το είδος των δεσμών, ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονομερών και η κατάληξη "οζη".



Σχήμα 3.16: i) Η επαναλαμβανόμενη μονάδα α-D-γλυκοπυρανόζης, ii) κυκλομαλτοεξόζη ή α-κυκλοδεξτρίνη

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι κυκλοδεξτρίνες (σχήμα 3.16). Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μη αναγωγικοί α(1→4) συνδεδεμένοι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες. Πιο κοινές είναι οι α, β και γ κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες αποτελούνται από 6, 7 και 8 μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα. Παράγονται από το άμυλο με τη βοήθεια μιας ομάδας ενζύμων, των γλυκοζυλοτρανσφερασών, οι οποίες εμφανίζουν υδρολυτική δράση στο άμυλο και καταλύουν την σύζευξη των μορίων γλυκόζης, την ενδομοριακή κυκλοποίηση και τελικά το σχηματισμό δακτυλίων [57].

3.1.3. Πολυσακχαρίτες

Εφόσον ο αριθμός των μονοσακχαριτών, οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς ξεπερνά τους δέκα, οι ενώσεις που προκύπτουν ονομάζονται πολυσακχαρίτες. Διακρίνονται στους αμυλώδεις και τους μη αμυλώδεις πολυσακχαρίτες. Στους πολυσακχαρίτες συναντούμε επιπλέον φωσφοδιεστερικούς δεσμούς καθώς και μη γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πολυσακχαρίτες είναι γνωστοί και σαν γλυκάνες. Εφόσον ένας πολυσακχαρίτης αποτελείται από επαναλαμβανόμενες ομάδες ενός είδους μονοσακχαρίτη ονομάζεται ομοπολυσακχαρίτης ή ομογλυκάνη (σχήμα 3.17 ii). Αντίθετα, όταν ένας πολυσακχαρίτης αποτελείται από διαφορετικούς i. μονοσακχαρίτες, ενωμένους μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς, χαρακτηρίζεται σαν ετεροπολυσακχαρίτης ή ετερογλυκάνη (σχήμα 3.17 iii). Στους πολυσακχαρίτες ανήκουν επίσης οι γλυκοπρωτεΐνες, τα γλυκοπεπτίδια και οι πεπτιδογλυκάνες, πολυμερή που αποτελούνται από ομοιοπολικά συνδεδεμένους μεταξύ τους μονοσακχαρίτες. Τέλος οι πρωτεογλυκάνες, πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε πολυσακχαρίτες και οι πεπτιδογλυκάνες, πολυσακχαρίτες ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με πεπτιδικές αλυσίδες.



$$[4)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow 4)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow)_n$$

$$\uparrow$$

$$1$$

$$\beta-D-Manp-(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Manp6Ac$$

$$6 \quad 4$$

$$1/$$

$$(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Manp6Ac$$

$$6 \quad 4$$

$$1/$$

$$(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Manp6Ac$$

$$(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcP-(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcP-(1\rightarrow 4)-\beta-D-GlcP-(1$$

<u>Σχήμα 3.17:</u> i) $(2\rightarrow 1)$ -β-D-φρουκτοφουρανάνη (ομογλυκάνη), ii) $(1\rightarrow 4)$ -α-D-γαλακτουρανάνη (ομογλυκάνη), iii) ξανθάνη (ετερογλυκάνη).

3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Μια προκαταρκτική εξέταση για την παρουσία η την απουσία υδατανθράκων από ένα μίγμα, δηλαδή ένας αρχικός ποιοτικός έλεγχος, μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου, όπου παρουσία διαλύματος ιωδίου οι υδατάνθρακες λαμβάνουν ένα βαθύ μπλε χρώμα. Παρουσία διαλύματος υδροξειδίου του ασβεστίου οι υδατάνθρακες παίρνουν σκούρο πράσινο χρώμα, ενώ μετά τη προσθήκη και υδροχλωρικού οξέος μεταχρωματίζονται κόκκινοι. Επιπρόσθετα οι πολυϋδρικές δομές των υδατανθράκων μπορούν να μετατραπούν με αφαίρεση μορίων νερού σε ισχυρά οξέα φουρανικής δομής, τα οποία αντιδρούν με χρωμοφόρους φαινολικούς υποκαταστάτες, σχηματίζοντας διάφορα χρώματα και επιτρέποντας τον χρωματομετρικό τους προσδιορισμό. Την επιβεβαίωση της ύπαρξης υδατανθράκων ακολουθεί ο ποσοτικός έλεγχος αυτών [58].

Ο προσδιορισμός των υδατανθράκων πραγματοποιείται με φυσικές, χημικές, βιοχημικές και χρωματογραφικές μεθόδους [59].

Οι φυσικές μέθοδοι βασίζονται στην υψηλή διαλυτότητα, την οποία παρουσιάζουν ορισμένοι υδατάνθρακες, όπως η σακχαρόζη και περιλαμβάνουν τον υπολογισμό του ειδικού βάρους, του δείκτη διάθλασης σε διαλύματα σακχάρων και του μοριακού βάρους αυτών, καθώς και στο γεγονός ότι οι υδατάνθρακες είναι ουσίες οπτικώς ενεργές (πολαροσκοπικές μέθοδοι). Οι πολαροσκοπικές μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα των υδατανθράκων να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Είναι γρήγορες και εύκολες και προτιμώνται στις περιπτώσεις όπου εμφανίζεται ένα είδος σακχάρου ή όταν μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν οι συνυπάρχουσες ενώσεις, οι οποίες επίσης στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή στην ανάλυση των σακχάρων. Η σακχαρόζη, για παράδειγμα, μπορεί να προσδιοριστεί παρουσία λακτόζης μετά από επεξεργασία με διάλυμα κιτρικού ή υδροχλωρικού οξέος. Στην περίπτωση αυτή το όξινο διάλυμα αλληλεπιδρά μόνο με τη σακχαρόζη, της οποίας η στροφή αναστρέφεται (ιμβερτοποίηση) και ο προσδιορισμός της πραγματοποιείται με μέτρηση της στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός πριν και μετά την επαφή με το όξινο διάλυμα, δηλαδή πριν και μετά την αναστροφή αυτής. Αντίθετα, στην περίπτωση της γλυκόζης, θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθούν όλες οι οπτικώς ενεργές ουσίες (σάκχαρα), οι οποίες συνυπάρχουν, γιατί αλλιώς παρεμποδίζεται ο προσδιορισμός.

Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται στη παρουσία αλδεϋδικών και κετονικών ομάδων των υδατανθράκων (σακχάρων), γεγονός που τους προσδίδει ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες όταν έρθουν σε επαφή π.χ. με φελίγγειο υγρό. Ο προσδιορισμός των υδατανθράκων λόγω της αναγωγικής τους δράσης, επιτρέπει ταυτόχρονα τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Κάθε μονοσακχαρίτης, ανάλογα με το είδος των ομάδων που φέρει, εμφανίζει και διαφορετική αναγωγική ικανότητα. Στην περίπτωση δισακχαρίτων είναι πιθανό να προαπαιτούνται υδρολυτικές αντιδράσεις, προκειμένου να απελευθερωθούν οι αναγωγικές ομάδες.

Μίγματα δύο σακχάρων, μπορούν να προσδιοριστούν σύμφωνα με την ικανότητά τους να ανάγουν το αντιδραστήριο Fehling και διάλυμα ιόντων υδραργύρου (Sacchse) σε διαφορετική, αλλά σταθερή πάντα μεταξύ τους αναλογία. Ο προσδιορισμός περισσότερο σύνθετων μιγμάτων υδατανθράκων δυσχεραίνεται. Ο προσδιορισμός ενός πολύπλοκου μίγματος, το οποίο θα περιλαμβάνει σακχαρόζη, δεξτρόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, ισομαλτόζη και δεξτρίνη, για παράδειγμα, είναι ιδιαίτερα επίπονος, αλλά εφικτός με συγκεκριμένη πορεία αντιδράσεων. Τα αναγωγικά σάκχαρα επεξεργάζονται αρχικά με διάλυμα Fehling. Η σακχαρόζη προσδιορίζεται σε υδατικό διάλυμα μετά από την επίδραση ινβερτάσης, στους 50-55 °C, η οποία επάγει αντιστροφή. Η δεξτρόζη και η φρουκτόζη προσδιορίζονται στο υδατικό διάλυμα που απομένει μετά από ζύμωση με κατάλληλη μαγιά, η οποία αφήνει ανεπηρέαστη τη μαλτόζη. Το διάλυμα που προκύπτει από τις αντιδράσεις που προηγήθηκαν κατεργάζεται με υδροχλωρικό οξύ, οπότε πραγματοποιείται εκ νέου αναστροφή. Η μαλτόζη και η ισομαλτόζη προσδιορίζονται στο προηγούμενο διάλυμα ταυτόχρονα με τη δεξτρίνη. Η δεξτρίνη προσδιορίζεται ανεξάρτητα σε αλκοολικό διάλυμα, οπότε και καταβυθίζεται εκλεκτικά, επομένως από τη διαφορά των δύο τελευταίων διαδικασιών προσδιορίζονται η μαλτόζη και η ισομαλτόζη.

Οι βιοχημικές ή ενζυμικές μέθοδοι συμπληρώνουν ουσιαστικά τις χημικές, χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους ανάλυσης των υδατανθράκων. Βασίζονται στο γεγονός ότι ορισμένοι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες συμμετέχουν σε βιοχημικές αντιδράσεις και η αλληλεπίδρασή τους με τα κατάλληλα ενζυμικά συστήματα χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα. Επομένως με τη βοήθεια των αντίστοιχων ενζύμων σε καθαρή μορφή μπορούν να αναπτυχθούν ειδικές μέθοδοι προσδιορισμού των συμπληρωματικών τους σακχάρων. Αυτά θα μπορούν στη συνέχεια να προσδιοριστούν ακόμη και σε σύνθετα μίγματα εφόσον η αλληλεπίδραση του ενζύμου με τον υποδοχέα-υδατάνθρακα είναι ειδική. Ακόμη, η ανάλυση των πολυσακχαριτών μπορεί να διευκολυνθεί εφόσον αυτοί διασπαστούν αρχικά στους ολιγοσακχαρίτες, από τους οποίους αποτελούνται, διαδικασία που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των κατάλληλων ενζύμων. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης κλινικά πραγματοποιείται με συνδυασμό βιοχημικής (σχήμα 3.18) και χρωματομετρικής μεθόδου.

Glucose + ATP ——— Glucose-6-phosphate + ADP

Glucose-6-phosphate dehydrogenase Glucose-6-phosphate + NADP------ 6-phosphogluconate + NADPH

Σχήμα 3.18: Ενζυμική αντίδραση στην οποία στηρίζεται ο βιοχημικός προσδιορισμός της γλυκόζης.

Η ποσότητα του NADPH, που σχηματίζεται είναι ανάλογη με τη ποσότητα της γλυκόζης στο διάλυμα που αναλύεται. Ακολούθως το NADPH προσδιορίζεται χρωματογραφικά, καθώς απορροφά στο υπεριώδες μεταξύ 340 και 360 nm.

Επιπρόσθετα, οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται με τους υδατάνθρακες με αξιοσημείωτη ειδικότητα [60]. Οι λεκτίνες τύπου C αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με μονοσακχαρίτες, όπως το σιαλικό οξύ και τη γαλακτόζη ή τη μαννόζη ή άλλους μονοσακχαρίτες με παραπλήσιες δομές. Οι γκαλεκτίνες αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με δισακχαρίτες, όπως η λακτόζη ή άλλους δισακχαρίτες με παραπλήσιες δομές, ή άλλους δισακχαρίτες με παραπλήσιες αυτοξαμίνη [61]. Την ιδιότητα αυτή θα προσπαθήσουμε να εκμεταλλευτούμε, όπως αποκαλύπτεται στη συνέχεια από τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη του πειραματικού μέρους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι προηγούμενες μέθοδοι αντικαταστάθηκαν από χρωματογραφικές μεθόδους. Η ύπαρξη σύνθετων μιγμάτων υδατανθράκων και η ανάγκη για ποσοτικό προσδιορισμό των ενεχόμενων σακχάρων, έκανε απαραίτητη την ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού και οδήγησε τελικά στην ανάπτυξη χρωματογραφικών μεθόδων. Αρχικά αναπτύχθηκαν μέθοδοι χρωματογραφίας χάρτη και λεπτής στοιβάδας, οι οποίες ήταν κατάλληλες για ποιοτικό διαχωρισμό των υδατανθράκων, δεν κάλυπταν όμως και την ανάγκη για ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ειδικότερα οι χρωματογραφίες χάρτη και λεπτής στοιβάδας μπορεί να οδηγήσουν στο διαχωρισμό μιγμάτων μεθυλιωμένων σακχάρων και ταυτόχρονα να δώσουν πληροφορίες για το βαθμό και τις θέσεις μεθυλίωσης. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί εφόσον οι μεθυλιωμένες πεντόζες, εξόζες, δεοξυεξόζες και τα ουρονικά οξέα παρουσιάζουν διαφορετική ευκινησία και χρωματική απόκριση σε χρωματομετρικές αντιδράσεις με ειδικά εμφάνισης, αντιδραστήρια υδροχλωρική όπως η π-ανισιδίνη. Ακολούθως αναπτύχθηκαν μέθοδοι αέριου χρωματογραφίας, οι οποίες συνδυάζονται συχνά και με χρωματογραφία μάζας. Με τη βοήθεια της αερίου χρωματογραφίας και προτύπων διαλυμάτων αναφοράς οδηγούμαστε σε έναν ικανοποιητικό διαχωρισμό, αλλά η ανάλυση ολοκληρώνεται με τη βοήθεια της χρωματογραφία μάζας και τη παρακολούθηση ιόντων επιλεγμένων θραυσμάτων στο φάσμα μάζας. Οι υδατάνθρακες μετατρέπονται αρχικά στα περισσότερο πτητικά τριμεθυλοσιλυλο- παράγωγα είτε ανάγονται σε αλδιτόλες, οι οποίες προσδιορίζονται τελικά με την αέριο χρωματογραφία. Οι μέθοδοι αυτές δεν χαρακτηρίζονται από απόλυτη ειδικότητα εφόσον, για παράδειγμα, τόσο η φρουκτόζη όσο η γλυκόζη και η μαννόζη ανάγονται στην ίδια αλδιτόλη και προσδιορίζονται ταυτόχρονα. Δυσκολίες εμφανίζονται σε περίπτωση παρουσίας των ανθεκτικών στην υδρόλυση γλυκοζιτικών δεσμών, καθώς δυσχεραίνεται η μετατροπή των συγκεκριμένων υδατανθράκων στα πτητικά τους παράγωγα. Τέλος αναπτύχθηκαν μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, οι οποίες δεν απαιτούν καμία προκατεργασία και επιτρέπουν το διαχωρισμό μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και ολιγοσακχαριτών με μεγάλη ευαισθησία και μπορούν να αυτοματοποιηθούν πλήρως. Οι δυσκολίες που προκύπτουν οφείλονται κυρίως στην ύπαρξη ισομερών μορφών υδατανθράκων, οι οποίες συμπροσδιορίζονται. Ο διαχωρισμός των σακχάρων και των υδατανθράκων βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών, της στατικής φάσης και της κινητής φάσης. Στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι το τροποποιημένο ή μη τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (άλκυλο ή αμινο), οι πολυμερικές και οι ιοντοανταλλάκτες. Στην περίπτωση των πολικών στατικών φάσεων (π.χ. διοξείδιο του πυριτίου με συνδεδεμένες αμινομάδες) αναπτύσσονται υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις. Όταν η κινητή φάση περιέχει οργανικό διαλύτη (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη) σε μεγαλύτερο ποσοστό, είναι κατάλληλη για σάκχαρα και υδατάνθρακες μικρού μοριακού βάρους. Το νερό, έστω και σε μικρή αναλογία είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σακχάρων και των αμινομάδων που φέρει η στατική φάση και κατ' επέκταση για την αύξηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου και τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών. Για προσδιορισμό ολιγοσακχαριτών γενικότερα τον και υδατανθράκων μεγαλύτερου μοριακού βάρους η αναλογία του οργανικού διαλύτη θα πρέπει να ελαττωθεί. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των αναγωγικών σακχάρων και των αμινομάδων της στατικής φάσης, μπορεί να οδηγήσει στη γέννεση γλυκοζαμινών. Οι

επιπτώσεις αφορούν στην ποσοτική ανάλυση, εφόσον θα υφίσταται η απώλεια του αναλύτη που αντέδρασε και στον περιορισμένο χρόνο ζωής της στήλης εξαιτίας των απενεργοποιημένων αμινομάδων. Οι στατικές φάσεις που ανταλλάσσουν ιόντα παρουσιάζουν φυσική δύναμη και σταθερότητα σε μεγάλο εύρος pH, στην υδρόλυση, την οξείδωση και την αυξημένη θερμοκρασία, ενώ η εκλεκτικότητα της μεθόδου καθορίζεται και από το είδος του αντισταθμιστικού ιόντος (Ca²⁺, Al²⁺, Pb²⁺, La³⁺, βορικά ανιόντα). Η ανάλυση των υδατανθράκων οφείλεται στον αντιστρεπτό σχηματισμό συμπλόκων με τα συνδεδεμένα στην στατική φάση ιόντα. Στην περίπτωση χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, όπου έχουμε μη πολικές στατικές φάσεις (π.χ. σίλικα με συνδεδεμένες αλκυλομάδες) αναπτύσσονται ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί van der Waals μεταξύ των υδατανθράκων και των συνδεδεμένων στη κινητή φάση αλκυλίων. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (RI), υπεριώδους-ορατού (UV), σκέδασης φωτός (LSD), παλμικός ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (PED), αμπερομετρικός ανιχνευτής (PAD) και άλλοι. Επίσης με τη βοήθεια πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι δυνατή η αναγνώριση και ποσοτικοποίηση κοινών σακχάρων [62-63].

Όσον αφορά στα σάκχαρα γενικότερα, αλλά και στις κυκλοδεξτρίνες περιστασιακά έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση αυτών στη βιβλιογραφία, οι οποίες παρατίθενται στη συνέχεια. Οι κυκλοδεξτρίνες φέρουν μια υδρόφοβη κοιλότητα, στην οποία έχουν την ικανότητα να φιλοξενούν διάφορα μόρια, σχηματίζοντας σύμπλοκα με αυτά, τα οποία συγκρατούνται με ομοιοπολικούς ή μη δεσμούς. Ο σχηματισμός των συμπλόκων ακολουθεί μια δυναμική ισορροπία. Παράλληλα με την ιδιότητα σχηματισμού συμπλόκων, η αμελητέα τοξικότητα αυτών τις καθιστά πολύτιμες στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων και στη κοσμητολογία, όπου χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν τις ιδιότητες των μορίων που εσωκλείουν. Έτσι, αυξάνεται η διαλυτότητα δυσδιάλυτων μορίων, προστατεύονται ευπαθή μόρια (φωτοευαίσθητα, θερμοευαίσθητα, ευοξείδοτα κ.α.), περιορίζεται η εξάχνωση πτητικών ενώσεων ή η τοξική τους δράση, ρυθμίζεται η σταδιακή αποδέσμευση δραστικών συστατικών η απομόνωση ή η ασυμβατότητα ορισμένων μορίων, προκειμένου να συνυπάρξουν στο ίδιο σκεύασμα και βελτιώνεται η υφή και τα δειγματοληπτικά χαρακτηριστικά (κάλυψη δυσάρεστης οσμής ή γεύσης) [64].

Αρχικά, για την ανάλυση των υδατανθράκων εφαρμόστηκαν χρωματομετρικές μέθοδοι. Ο προσδιορισμός της γλυκοζαμίνης και της γαλακτοζαμίνης πραγματοποιείται

με ταυτόχρονη παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος βορικών αλάτων που ενισχύουν την ένταση των χρωμάτων [65]. Οι χρωματομετρικές μέθοδοι συνδυάζονται με φασματομετρία, όπου μετράται παράλληλα η απορρόφηση των σακχάρων του μίγματος [66]. Τα αλδονικά οξέα γλυκονικό και λακτοβιονικό αναλύονται με χρωματογραφία διχλωροφλουορεσκεΐνη ως αντιδραστήριο χάρτη, εμφάνισης και απευθείας προσδιορισμό φθορισμομετρικά [67]. Οι μονοσακχαρίτες αραβινόζη, σορβιτόλη και αδονιτόλη διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια αερίου-υγρής χρωματογραφίας και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας υδρογόνου, εφόσον πρώτα μετατράπηκαν στα αντίστοιχα αλδονιτρίλια ή αλδιτόλες αλλά και στα περισσότερο πτητικά τριμεθυλσιλανοπαράγωγα [68]. Όσον αφορά στον ποσοτικό προσδιορισμό, οι φθορισμομετρικές μέθοδοι παρουσία ο-φθαλαλδεΰδης στην περίπτωση των αμινοσακχάρων, αντικατέστησαν τις χρωματομετρικές [69]. Με το συνδυασμό αερίου χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρίας μάζας χαρακτηρίστηκαν πολύπλοκα μίγματα μονοσακχαριτών, που περιείχαν αλδόζες, κετόζες, πολυόλες, οξέα σακχάρων και αμινοσάκχαρα, εφόσον έχει προηγηθεί μεθυλίωση ή τριμεθυλοσιλυλίωση του δείγματος [70-71]. Ο συνδυασμός αερίου χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρίας μάζας παρουσία ανιχνευτή παγίδευσης ιόντων (ion trap detector ITD) επέτρεψε και την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση σακχάρων, φλαβονοειδών και οξέων σε μίγμα, επίσης με τη βοήθεια της τριμεθυλοσιλανοποίησης [72]. Μια ακόμη αντίδραση, η οποία χρησιμοποιείται για τη μετατροπή μονοσακχαριτών σε ενώσεις περισσότερο κατάλληλες για την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου, είναι η ακετυλίωση των κετοζών (σε πλήρως ακετυλιωμένες κετοξίμες), των αλδοζών (σε πλήρως ακετυλιωμένα αλδονονιτρίλια) [73] και των αμινοσακχάρων [74], προκειμένου να διευκολυνθεί η ανάλυση αυτών με αέριο χρωματογραφία και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας. Οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να προσδιοριστούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού αφού υδρολυθούν στους μονοσακχαρίτες, από τους οποίους αποτελούνται και επισημανθούν με 1-φαινυλο-3-μεθυλο-5πυραζολόνη [75]. Η ποσοτική ανάλυση μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών στα βιολογικά υγρά πραγματοποιείται επίσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και στήλη ανταλλαγής ανιόντων [76-80] ή κατιόντων [81] με ηλεκτροχημική ανίχνευση, παρουσία παλμικού αμπερομετρικού ανιχνευτή. Τόσο η αέριος όσο και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Έτσι, η αέριος χρωματογραφία προσφέρει συγκριτικά μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα επιτρέποντας το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού

σακχάρων στο ίδιο δείγμα, με μία χρωματογραφική στήλη, έναν ανιχνευτή και συνολικά χαμηλότερο κόστος. Ως μόνο περιοριστικό στάδιο μπορεί να αναφερθεί αυτό των αντιδράσεων μετατροπής των αναλυτών σε ενώσεις περισσότερο πτητικές. Αντίθετα η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα, αλλά οι αναλυτικές διαδικασίες είναι απλούστερες εφόσον δεν απαιτείται προκατεργασία του δείγματος (αντιδράσεις μετατροπής) και περισσότερο ευέλικτες εφόσον μπορούμε να επιλέξουμε από ποικιλία χρωματογραφικών στηλών αλλά και ανιχνευτών (UV, RI, LSD, PAD) [82-83]. Η ποσοτική ανάλυση μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών που παρουσιάζουν υψηλές τιμές δεικτών διάθλασης, μπορεί να υλοποιηθεί με τη βοήθεια φασματοσκοπίας surface plasmon resonance (SPR), με βάση τις παρατηρήσεις ότι διαφορετικοί δείκτες διάθλασης οδηγούν σε μετατόπιση του μήκους κύματος συντονισμού ή της γωνίας συντονισμού και της γραμμικής σχέσης μεταξύ του μήκους κύματος συντονισμού και της συγκέντρωσης του αναλύτη [84].

Όσον αφορά στις κυκλοδεξτρίνες και την ανάλυση αυτών, υπάρχουν επίσης αναφορές στη βιβλιογραφία, οι οποίες παρατίθενται στη συνέχεια με κάποια χρονολογική δομή, καταλήγοντας στις πιο πρόσφατες. Έτσι, αναφέρεται αρχικά η μικροανάλυση της β-κυκλοδεξτρίνης καθώς και παραγώγων αυτής σε βιολογικά υγρά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η β-κυκλοδεξτρίνη προσδιορίζεται με τη βοήθεια ανιχνευτή δείκτη διάθλασης, στατικές φάσεις σίλικα με συνδεδεμένες αλκυλο- ή αμινο- ομάδες και κινητή φάση μεθανόλη ή ακετονιτριλίο-νερό. Τα φαινυλο-ισοκυανικά παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης προσδιορίζονται με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού και σύστημα χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, εφόσον παρουσιάζουν πλέον σταθερή και ισχυρή απορρόφηση. Τα ακετυλιωμένα παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης προσδιορίζονται aμ тη βοήθεια ενός απαριθμητή σπινθηρισμών, εφόσον χρησιμοποιηθεί ραδιενεργό αντιδραστήριο οξικός ανυδρίτης για την ακετυλίωση των ελεύθερων υδροξυλίων και την παραγωγή επισημασμένης β-κυκλοδεξτρίνης. Σε κάθε περίπτωση η γ κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο, αλλά οι μέθοδοι αυτές έχουν μικρή ευαισθησία [85]. Οι υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες μπορούν επίσης να απομονωθούν από δείγματα, όπου συνυπάρχουν με άλλους υδατάνθρακες με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και ακολούθως να προσδιοριστούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης [86] σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας [87] ή και αέριο χρωματογραφία [88]. Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού, φθορισμομετρικό ή ηλεκτροχημικό ανιχνευτή για την

ανάλυση των κυκλοδεξτρινών σπάνια αναφέρονται εφόσον οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν αμελητέα απορρόφηση στα φάσμα του ορατού. Ο προσδιορισμός της β και γ-κυκλοδεξτρίνης σε βιολογικά υγρά έγινε εφικτός τελικά με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού και της χρωστικής φαινολοφθαλεΐνη. Η χρωστική παρουσιάζει απορρόφηση στο υπεριώδες και ταυτόχρονα μεγάλη σταθερά σύνδεσης με τις κυκλοδεξτρίνες, με τις οποίες σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Οι κυκλοδεξτρίνες προσδιορίζονται έμμεσα, από την ελάττωση του σήματος της φαινολοφθαλεΐνης, εφόσον δεν υπάρχουν προσμίξεις που ανταγωνίζονται με τη χρωστική για τη σύνδεσή τους με τις κυκλοδεξτρίνες [89]. Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός των παραγώγων μαλτοζυλο-, μαλτοτριοζυλο-, μαλτοτετραοζυλο- και γλυκοζυλο- των α, β και γ-κυκλοδεξτρινών επιτεύχθηκε επίσης με στήλη ανταλλαγής κατιόντων [90] ή στήλη αντιστρόφου φάσεως (polymer-based- reversed-phase column) [91-92] με ηλεκτροχημική ανίχνευση, παρουσία παλμικού αμπερομετρικού ανιχνευτή. Ο προσδιορισμός της υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης σε βιολογικά υγρά (πλάσμα ή ούρα) πραγματοποιήθηκε επίσης με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid- Phase Extraction, SPE) σε συνδυασμό με μια έμμεση χρωματομετρική αντίδραση, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τον τελικό προσδιορισμό με ανιχνευτές έναν παλμικό (pulse dampener) και έναν φασματοφωτομετρικό [93]. Η γκυκλοδεξτρίνη προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή διάθλασης [94]. Ένας συνδυασμός των προαναφερθέντων τεχνικών δείκτη χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό των κυκλοδεξτρινών σε ορό αίματος. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται αρχικά εκχύλιση στερεάς φάσεως για την απομάκρυνση προσμίξεων, οι οποίες ενδέχεται να παρεμποδίσουν την ανίχνευση και ακολουθεί η ανίχνευση, η οποία βασίζεται σε μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής και παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή. Η ρύθμιση του pH στηρίζεται στη χρήση μιας κατιοντοανταλλακτικής μεμβράνης (cation-exchange [95]. membrane reactor) Αναφέρεται επίσης σε πιο πρόσφατες βιβλιογραφίες ο διαχωρισμός και η ανάλυση διαφόρων κυκλοδεξτρινών (β, υδροξυπροπυλο-β και μεθυλιωμένα παράγωγα) με υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως και εξατμιστικό ανιχνευτή σκέδασης φωτός (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) [96-97]. Η μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη προσδιορίζεται επίσης με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Το μήκος κύματος διέγερσης ρυθμίζεται στα 290 nm, ενώ το μήκος κύματος εκπομπής στα 360 nm [98]. Με τρόπο ανάλογο προσδιορίζεται και η υδροξυπροπυλο-γ-κυκλοδεξτρίνη. Στην παρούσα περίπτωση η κυκλοδεξτρίνη

συμπλέκεται σε αρχικό στάδιο με έναν κατάλληλο παράγοντα φθορισμού (8ανιλινοναφθαλενο-1-σουλφονικό οξύ), για την ενίσχυση του σήματος αυτής στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ρυθμίζονται στα 270 nm και 512 nm, αντίστοιχα [99]. Η ανάλυση της α-κυκλοδεξτρίνης, παρουσία των πιθανών προσμίξεων αυτής επιτυγχάνεται με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης και παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή [100]. Τα σουλφοβουτυλοαιθερο- παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης αναλύονται είτε με ανιχνευτή ELSD σε συνδυασμό με στήλη ανταλλαγής ανιόντων [101], είτε με χρωματογραφικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS) και πηγή ψεκασμού ιόντων (ion-spray ionization) [102]. Η μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη με συνδυασμό φασματοσκοπίας μάζας (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS ή lonspray Mass Spectometry, ESI-MS) και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή ELSD [103-105]. Πιο ιδιαίτερη προσέγγιση αποτελεί ο χαρακτηρισμός των κυκλοδεξτρινών καθώς και των συμπλόκων που σχηματίζουν αυτές με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) [106], μέθοδο γρήγορη όσο και αξιόπιστη, που επιτρέπει τον προσδιορισμό της μάζας και τις οφειλόμενες στη θερμοκρασία αλλαγές στη δομική και λειτουργική συμπεριφορά των κυκλοδεξτρινών και/ή των προϊόντων διάσπασης αυτών. Για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού των κυκλοδεξτρινών η θερμική ανάλυση (DSC) συνδυάζεται και με άλλες τεχνικές, όπως η διάθλαση ακτίνων Χ και η φασματοσκοπία υπερύθρου [107]. Η ποσοτική ανάλυση των υδροξυπροπυλο-β- και υδροξυπροπυλο-γ-κυκλοδεξτρινών μπορεί κατά ένα τρόπο να πραγματοποιηθεί με υπολογισμό των όγκων και της ενθαλπίας κατάλληλου συστήματος, με το οποίο αλληλεπιδρούν οι κυκλοδεξτρίνες με δυνάμεις ιόντων-διπόλων [108]. Τέλος, αναφέρουμε μια τεχνική διαχωρισμού των κυκλοδεξτρινών και των παραγώγων τους, η οποία παρουσιάζει καινοτομία ως προς τις χρωματογραφικές στήλες, που χρησιμοποιούνται. Πιο συγκεκριμένα, OI χρωματογραφικές στήλες παρασκευάζονται με σύνδεση υποκατεστημένων αρωματικών ομάδων στις στατικές φάσεις διοξειδίου του πυριτίου. Οι αρωματικοί πυρήνες, οι οποίοι προτιμώνται είναι του φαινυλίου και του 2-ναφθυλίου (σχήμα 3.19).

PhC: N-phenyl-urea

NPhC: N-(4-nitrophenyl)-carbamide



Σχήμα 3.19: Δομές των νέων στατικών φάσεων.

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυκλοδεξτρινών και των υποκατεστημένων διοξειδίων του πυριτίου και σε σημαντικό βαθμό σε απομάκρυνση ηλεκτρονίων από άζωτο και ανταλλαγή υδρογόνου όταν υπάρχει αμίδιο ή ουρία στους υποκατεστημένους φαινολικούς πυρήνες (σχήμα 3.20).



Σχήμα 3.20: Μοριακός σχεδιασμός, όπου φαίνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ του δακτυλίου της β-κυκλοδεξτρίνης και της ομάδας της Ν-(4-νιτροφαινυλο)-ουρίας. Με --- παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ΟΗ της β-κυκλοδεξτρίνης και των CO- και NH- ομάδων της ουρίας.

Από τις χρωματογραφικές στήλες, οι οποίες ετοιμάστηκαν και δοκιμάστηκαν, τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για την ανάλυση των κυκλοδεξτρινών παρουσιάζουν εκείνες που φέρουν υποκαταστάτη ομάδα Ν-(4-νιτροφαινυλο)-ουρία. Ακολουθεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με χρήση ανιχνευτών δείκτη διάθλασης και ELSD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΙΧΝΕΥΤΈΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Οι ανιχνευτές σκέδασης φωτός βασίζονται στην ιδιότητα της ύλης να ανακλά μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας που λαμβάνει προς διάφορες κατευθύνσεις.

Υπάρχουν δύο είδη ανιχνευτών σκέδασης φωτός, ο εξατμιστικός (evaporative light scattering, ELS) και ο υγρός (liquid light scattering detector, LLS).

Οι ανιχνευτές LLS χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις όπου απαιτείται ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους ενώσεων, όπως στη σύνθεση ή σε ανάλυση βιοπολυμερών. Εκτός από το μοριακό βάρος των ενώσεων μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα και για το βαθμό μεγέθους, διακλάδωσης ή διάσπασης, πληροφορίες χρήσιμες στην αναλυτική και συνθετική χημεία, πρωτεϊνών ή βιομηχανικών πολυμερών.

Η αναλυόμενη ουσία βρίσκεται υπό μορφή διαλύματος, τα μόριά της προκαλούν τη σκέδαση του προσπίπτοντος φωτός και ο ανιχνευτής συλλέγει υπό κατάλληλη γωνία το σκεδαζόμενο φως και το μετατρέπει σε πληροφορία. Ο υπολογισμός της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, καθώς επίσης και του μοριακού βάρους των ουσιών που αναλύονται πραγματοποιείται με χρήση κατάλληλων εξισώσεων.

Οι ανιχνευτές ELS αποτελούνται από τρία συνεχή τμήματα, (α) το νεφελοποιητή, το χώρο όπου η ουσία μας (αναλύτης) έρχεται σε επαφή με κατάλληλο αέριο και ακολουθεί η εξαέρωσή τους (μετατροπή αυτού σε λεπτά σωματίδια μέσα στην αέριο ουσία) με τη βοήθεια του εξατμιστικού αερίου, (β) έναν αγωγό όπου παρασύρονται τα σωματίδια του αναλύτη με το αέριο και παράλληλα θερμαίνονται και (γ) το θάλαμο στον οποίο πραγματοποιείται η σκέδαση του φωτός και κατ' επέκταση η ανίχνευση. Οι ανιχνευτές ELS μετρούν το ποσό του φωτός, το οποίο σκεδάζεται καθώς τα σωματίδια του αναλύτη περνούν διαμέσου της φωτεινής ακτινοβολίας. Το μέγεθος των σωματίδίων που εξακολουθούν να υπάρχουν στο δείγμα και δεν έχουν εξαερωθεί ή αποσυντεθεί κατά το στάδιο της ατμοποίησης ποικίλει και είναι αυτά που προκαλούν τη σκέδαση του φωτός. Η ένταση της μέτρησης του σκεδαζόμενου φωτός συνδέεται με τη διάμετρο των σωματιδίων του αναλύτη, το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός και τη γωνία με την οποία είναι τοποθετημένος ο ανιχνευτής. Το αέριο που χρησιμοποιείται για την ατμοποίηση δε πρέπει να περιέχει σωματίδια που παρεμποδίζουν την ανίχνευση της επιθυμητής ένωσης, δίνοντας επιπλέον κορυφές, πχ άζωτο.



Σχήμα 4.1: Διάγραμμα αρχών λειτουργίας ενός τυπικού ανιχνευτή ELS

Ο τύπος ανιχνευτή του σχήματος 4.1 χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, και παρουσιάζεται εκτενέστερα στη συνέχεια.

Αρχή λειτουργίας εξατμιστικού ανιχνευτή σκέδασης ακτινοβολίας ELS:

Ο ανιχνευτής ELS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό όλων των ειδών των ουσιών με την προϋπόθεση ότι έχουν χαμηλότερη πτητικότητα από την κινητή φάση. Ανιχνεύει μη πτητικές ουσίες, όμως ακόμη και ημι-πτητικές ουσίες

μπορούν πλέον να ανιχνευτούν με τους ELSD νέας γενιάς, οι οποίοι επιτυγχάνουν χαμηλότερες θερμοκρασίες στο θάλαμο εξάτμισης. Για την πλειοψηφία των προσδιορισμών των μη-πτητικών ουσιών, τα όρια ανίχνευσης φτάνουν συχνά στην τάξη των νανογραμμαρίων, ng.

Κάθε ανιχνευτής ELS, περιλαμβάνει τρία στάδια από τα οποία περνά η αναλυόμενη ουσία:

<u>Στάδιο 1°:</u> Διαδικασία εκνέφωσης (nebulization) της κινητής φάσης μετά την έξοδό της από τη χρωματογραφική στήλη:

Σε αυτό το πρώτο στάδιο, η υγρή κινητή φάση, καθώς εξέρχεται από τη στήλη, μετατρέπεται σε μικρά σταγονίδια από τα οποία ο διαλύτης είναι πολύ πιο εύκολο στη συνέχεια να εξατμιστεί. Η εκνέφωση του εκλούσματος γίνεται με τη βοήθεια ροής αδρανούς αερίου, συνήθως αζώτου, N₂.

Το στάδιο της εκνέφωσης είναι εξαιρετικά σημαντικό διότι από αυτό εξαρτώνται τα επίπεδα ευαισθησίας και επαναληψιμότητας των μετρήσεων. Ειδικότερα, το μέγεθος των σχηματιζόμενων σωματιδίων, καθορίζει το μηχανισμό σκέδασης που θα επικρατήσει και άρα την ένταση του σήματος. Για μεγάλα σωματίδια ο μηχανισμός ανίχνευσης είναι αυτός της ανάκλασης/διάθλασης που δίνει –λόγω του φαινομένου της συμβολής- ενισχυμένο σήμα. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των σταγονιδίων, τόσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία που θα απαιτηθεί για την εξάτμιση.

Το μέγεθος των σωματιδίων που παράγονται σε αυτήν τη φάση εξαρτάται από:

α) την ταχύτητα ροής του αδρανούς αερίου. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η ταχύτητα, τόσο μικρότερα σε μέγεθος και περισσότερα σε αριθμό είναι τα σταγονίδια του εκνεφώματος.

β) από τις φυσικές ιδιότητες, αλλά και τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η υψηλή συγκέντρωση ευθύνεται για τη μεγάλη διάμετρο των σωματιδίων.

Στάδιο 2°: Εξάτμιση της κινητής φάσης:

Τα σταγονίδια του εκνεφώματος οδηγούνται παρασυρόμενα από τη ροή του αδρανούς αερίου, σε ένα γυάλινο, κεκλιμένο, θερμαινόμενο σωλήνα. Εκεί, με την επίδραση της θερμοκρασίας, ο διαλύτης εξατμίζεται, η διάμετρος των σταγονιδίων μειώνεται και τελικά παραμένουν σωματίδια απόλυτα καθαρής ουσίας. Η επιλογή της θερμοκρασίας είναι καθοριστική για τον προσδιορισμό της ουσίας. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη δεδομένα, όπως είναι η πτητικότητα της ουσίας και η πιθανότητα θερμικής διάσπασής της, καθώς και η πτητικότητα του διαλύτη έτσι ώστε εξατμιζόμενος να μην αφήνει υπολείμματα. Στην ιδανική περίπτωση, ο διαλύτης εξατμίζεται τελείως, αφήνοντας στερεά σωματίδια ουσίας, καθώς είναι γνωστό ότι το φως σκεδάζεται αποτελεσματικότερα από στερεά παρά από υγρά σωματίδια συγκεκριμένης διαμέτρου. Ως γενικός κανόνας ισχύει ότι η θερμοκρασία πρέπει να είναι η χαμηλότερη δυνατή, με ευνοϊκό το σχηματισμό κρυστάλλων από πολλά μόρια του αναλύτη, και την ενίσχυση του σήματος του ανιχνευτή.

Στάδιο 3°: Ανίχνευση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται από τα μη πτητικά μόρια της ουσίας:

Στο τελευταίο αυτό στάδιο, τα σωματίδια εξέρχονται από το θάλαμο εξάτμισης και εισέρχονται σε μία οπτική κυψελίδα, όπου διέρχεται δέσμη φωτός. Η δέσμη αυτή παράγεται, είτε από μία μονοχρωματική πηγή, π.χ. εκπομπής laser, είτε από μία πολυχρωματική πηγή στην περιοχή του ορατού, π.χ. λυχνία αλογόνου. Η ποσότητα του φωτός που σκεδάζεται, μετράται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή ή μια φωτοδίοδο, μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα και καταγράφεται.

Η παράσιτη ακτινοβολία δεσμεύεται με τη βοήθεια οπτικών παγίδων. Ένα δεύτερο ρεύμα αδρανούς αερίου, που διαβιβάζεται ταυτόχρονα και ανεξάρτητα του φέροντος, εμποδίζει τα σωματίδια να κινούνται άναρχα μέσα στην κυψελίδα και τα συγκεντρώνει στο κέντρο της, εκεί δηλαδή όπου εστιάζεται η δέσμη της ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών ELS που διαφέρουν στο σύστημα εκνέφωσής τους και στον τρόπο που κατεργάζονται αυτό το εκνέφωμα (σχήμα και λειτουργία του θαλάμου εξάτμισης).

1) Ανιχνευτής τύπου Α:

Σε αυτόν τον τύπο ανιχνευτή, το εκνέφωμα οδηγείται κατευθείαν στο θάλαμο εξάτμισης, χωρίς να αλλάξει η διεύθυνση της ροής του. Η μεταφορά αυτή είναι σχεδόν ποσοτική, ενώ το φέρον αέριο είναι είτε προθερμασμένο, είτε αέριο υψηλής θερμικής αγωγιμότητας. Ο θάλαμος εξάτμισης είναι ένας σωλήνας μικρού μήκους στον οποίο όμως εισέρχονται σταγονίδια μικρών και μεγάλων μεγεθών. Απαιτείται η χρήση πολύ υψηλών θερμοκρασιών (συχνά > 60 °C) προκειμένου να εξατμιστεί όλη η ποσότητα του διαλύτη της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να υπάρχουν απώλειες στα περισσότερο πτητικά ή ημι-πτητικά συστατικά του υπό εξέταση δείγματος. Το διάγραμμα αυτού του τύπου του ELSD φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 4.2: Διάγραμμα ανιχνευτή ELS τύπου Α

Ο ανιχνευτής τύπου Α απαιτεί τη χρήση κινητών φάσεων υψηλής πτητικότητας, κάτι που δυσκολεύει ή αποκλείει τη χρήση ύδατος, ενώ ακόμη αποκλείει τη χρήση υψηλών ταχυτήτων ροής.

Στα πλεονεκτήματά του πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της ποσοτικής μεταφοράς του εκνεφώματος στον εξατμιστή, ευνοείται η ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων της προσδιοριζόμενης ουσίας.

2) Ανιχνευτής τύπου Β:

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής τύπου Β. Στους ανιχνευτές τύπου Β το μεταφερόμενο εκνέφωμα, πριν την είσοδο του στο θάλαμο εξάτμισης οδηγείται σε ένα γυάλινο, κεκλιμένο σωλήνα που καλείται «κυψελίδα εκνέφωσης». Εκεί τα μεγάλου μεγέθους σταγονίδια, που είναι δύσκολο να εξατμιστούν, συμπυκνώνονται στα τοιχώματα του σωλήνα και καταλήγουν στα απόβλητα. Έτσι, το εκνέφωμα αποκτάει ομοιόμορφη διασπορά και στο θάλαμο εξάτμισης φτάνουν τελικά μόνο τα μικρότερα σταγονίδια. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι δεν απαιτούνται πολύ υψηλές θερμοκρασίες εξάτμισης και έτσι είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν προσδιορισμοί ακόμη και αρκετά πτητικών ουσιών ή ουσιών που είναι θερμοευαίσθητες με πιθανότητα διάσπασης. Η κινητή φάση μπορεί να περιέχει νερό ακόμη και σε ποσοστό 100% χωρίς πρόβλημα στην εξάτμισή της.



Σχήμα 4.3: Διάγραμμα ανιχνευτή ELS τύπου B

Ο θάλαμος εξάτμισης είναι μεγάλος σε μήκος κι έχει τη μορφή σπειράματος επιτρέποντας την ανάπτυξη μεγάλων ροών της κινητής φάσης (Σχήμα 4.3). Ενδεικτικό παράδειγμα είναι ότι καθαρό νερό με ροή 3 mL/min μπορεί να εξατμιστεί επαρκώς στους 40-50 °C.

Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ανιχνευτής τύπου Β επιτρέπει τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στην κυψελίδα εκνέφωσης ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία στο θάλαμο εξάτμισης. Η ρύθμιση αυτή βοηθά στο να αποφευχθούν οι μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας μεταξύ εκνέφωσης και εξάτμισης που μπορούν να επηρεάσουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Οι πηγές ακτινοβολίας, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη περίπτωση των ανιχνευτών ELS, είναι πολυχρωματικές (polychromatic sources), light emitting diodes (LED), λάμπες τόξου αερίου ξένου (Xenon arc lamps) και μονοχρωματική ακτινοβολία (laser diodes).

Πλεονέκτημα των ανιχνευτών ELS είναι ότι η λειτουργία τους είναι ανεξάρτητη από το χρησιμοποιούμενο διαλύτη, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα επιλογής από μεγάλη πληθώρα διαλυτών υπό την προϋπόθεση ότι αυτοί θα είναι πτητικοί, είναι κατάλληλοι για το προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων, δεν απαιτείται να φέρουν οι αναλύτες χρωμοφόρες ομάδες για την ανίχνευση, δεν προαπαιτείται παραγωγοποίηση των αναλυτών και είναι οικονομικότεροι.

Επίσης πλεονέκτημα είναι και το μικρό σήμα υποβάθρου που έχει ο ELSD εφόσον ο εξατμισμένος διαλύτης δε σκεδάζει καμία ποσότητα ακτινοβολίας και η μέτρηση δίνει την απόλυτη τιμή κι όχι τη διαφορά της σκέδασης μεταξύ αναλύτη και κινητής φάσης. Έτσι, δεν υπάρχει σήμα που να αποδίδεται στο διαλύτη, ικανό να καλύψει τις κορυφές των ιχνοποσοτήτων του δείγματος κι όλες οι κορυφές οφείλονται αποκλειστικά σε συστατικά του αναλυόμενου δείγματος.

Σε περίπτωση βέβαια που οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι μειωμένης καθαρότητας και περιέχουν προσμίξεις, είναι πιθανό να εμφανιστεί υψηλό σήμα υποβάθρου. Ομοίως, απαλλαγμένο από προσμίξεις πρέπει να είναι και το φέρον αέριο εκνέφωσης, συνήθως άζωτο τύπου N₂.

Επιπρόσθετα, ο χρόνος απόκρισης του συστήματος του ανιχνευτή είναι πολύ μικρός κι έτσι η επίδρασή του στη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών είναι αμελητέα. Η αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων του ανιχνευτή είναι πολύ ικανοποιητική όταν οι συνθήκες της ανάλυσης (ταχύτητα ροής, πίεση φέροντος αερίου, θερμοκρασία, ποιότητα εκλουστικού μίγματος και ποσότητα ενυόμενου δείγματος) παραμείνουν σταθερές.

Οι καμπύλες απόκρισης που σχεδιάζονται με βάση το εμβαδόν κορυφής συναρτήσει της συγκέντρωσης, λαμβάνονται με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος που εισάγεται στον ανιχνευτή και καταγραφή του σήματος. Η μεταβολή στη συγκέντρωση του δείγματος, μεταβάλλει το μέγεθος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων και όχι το συνολικό αριθμό των σταγονιδίων. Η μεταβολή στο μέγεθος των σωματιδίων συνεπάγεται, αύξηση στην απόκριση του ανιχνευτή.

Τα μειονεκτήματα των ανιχνευτών ELS είναι η χαμηλή ευαισθησία, η απουσία δομικών πληροφοριών που να αφορούν στις αναλυόμενες ουσίες και η πολυπλοκότητα της ανάλυσης ως αποτέλεσμα της μη γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή. Η αναλυόμενη ουσία θα πρέπει να είναι μη πτητική ή λιγότερο πτητική από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη εξάτμισης. Η χρήση προστατευτικών φίλτρων είναι απαραίτητη και αναγκαία, για την απομάκρυνση σωματιδίων σκόνης, την αποφυγή εμφάνισης θορύβου, την αύξηση της ευαισθησίας του συστήματος και τη λήψη αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων [109-113].

Σχέσεις ποσοτικοποίησης της απόκρισης του ανιχνευτή ELS:

Η απόκριση του ανιχνευτή εξαρτάται από το μηχανισμό σκέδασης και αυτός με τη σειρά του εξαρτάται από τη διασπορά και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος. Ο κυρίαρχος μηχανισμός κάθε φορά είναι συγκεκριμένος, αλλά συνυπάρχει με τους υπόλοιπους, μικρότερης έντασης μηχανισμούς, με αποτέλεσμα το φαινόμενο της σκέδασης τελικά να γίνεται αρκετά πολύπλοκο.

Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός δε μεταβάλλεται γραμμικά σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, αλλά η απόκριση του ανιχνευτή (εμβαδόν κορυφής του ανιχνευτή y_{ELSD}) συνδέεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη με την ακόλουθη εκθετική συνάρτηση:

$y_{ELSD}=a \cdot C^b \leftrightarrow log y_{ELSD} = b \cdot logC + loga$

όπου τα a, b είναι συντελεστές που καθορίζονται από τις συνθήκες, όπως το μέγεθος των σταγονιδίων, τη συγκέντρωση και τη φύση του αναλύτη, τη ταχύτητα ροής του

αερίου και της κινητής φάσης, τη θερμοκρασία εξάτμισης κ.α. Το α καλείται παράγοντας απόκρισης (response factor) και το b είναι η κλίση (slope) της γραμμικής μορφής της εξίσωσης.

Όσον αφορά στις ουσίες, οι οποίες πρόκειται να ανιχνευτούν, θα πρέπει να είναι λιγότερο πτητικές από τη κινητή φάση.

Εφαρμογή των ανιχνευτών σκέδασης φωτός είναι ο έλεγχος του διαχωρισμού ουσιών, όπως λιπίδια, λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια, που κανονικά θα απαιτούσαν βαθμιδωτή έκλουση για την επίτευξη ικανοποιητικού αποτελέσματος με συμβατικούς ανιχνευτές.

Οι ανιχνευτές ELS χρησιμοποιούνται γενικότερα στην περίπτωση ενώσεων, οι οποίες δεν περιέχουν χρωμοφόρα ούτε ομάδες ικανές για ανίχνευση στο υπεριώδεςορατό και βρίσκουν εφαρμογή στην ανάλυση αντιβιοτικών, σακχάρων, φωσφολιπιδίων, στεροειδών, αιθέριων ελαίων, μετάλλων, οργανικών ενώσεων, απορρυπαντικών κ.α [114-121].

Άλλες εφαρμογές αφορούν στο διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (χειρόμορφη χρωματογραφία), στον προσδιορισμό κυκλοδεξτρινών [122-127] και αλληλεπιδράσεων υδατανθράκων και λεκτινών [128] με τη βοήθεια του ELSD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια από τις σπουδαιότερες και ευρέως διαδεδομένες αναλυτικές μεθόδους σε ερευνητικό επίπεδο. Αποτελεί μέθοδο επιλογής για τη διερεύνηση της δομής και της στερεοχημείας των οργανικών μορίων, νέων συνθετικών ή ημισυνθετικών ενώσεων και φυσικών προϊόντων και επιπλέον πολυμερών, πρωτεινών, νουκλεϊκών οξέων, σακχάρων κ.α.

Η φασματοσκοπία NMR θεωρείται θεμελιώδης μέθοδος μέτρησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό ενός δείγματος. Διεξάγονται απευθείας συμπεράσματα και προσδιορίζονται με ακρίβεια ουσίες, οι οποίες συνυπάρχουν σε ένα δείγμα, χωρίς να καθίσταται απαραίτητη η ύπαρξη εσωτερικού προτύπου αναφοράς.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός δείγματος είναι επίσης εφικτός με φασματοσκοπία NMR, αλλά προϋποθέτει τη χρήση εσωτερικού προτύπου αναφοράς, δηλαδή κατάλληλης ουσίας, η οποία θα προστίθεται στα δείγματα σε σταθερή κάθε φορά συγκέντρωση και θα δίνει κορυφή συντονισμού σε διαφορετική συχνότητα από αυτή των ουσιών που μας ενδιαφέρουν. Από τη σύγκριση των σημάτων των ουσιών που μελετώνται με της ουσίας αναφοράς, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις και εξάγονται συμπεράσματα για την σύσταση ενός δείγματος. Η συγκέντρωση μιας ουσίας θα προσδιορίζεται από την αναλογία των εντάσεων των σημάτων της υπό μελέτη ουσίας και γνωστής συγκέντρωσης εσωτερικού προτύπου αναφοράς. Δίνει τη δυνατότητα ποσοτικών προσδιορισμών των σχετικών συγκεντρώσεων μοριακών ουσιών και των δομών τους ακόμα και σε μίγματα.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλονται σε διεγέρσεις πυρήνων, με την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, όταν αυτοί βρίσκονται σε μαγνητικό πεδίο. Κατά την επίδραση ακτινοβολίας κατάλληλης συχνότητας είναι δυνατή η μεταφορά ενέργειας με αποτέλεσμα τη μετάπτωση των πυρήνων από μία ενεργειακή κατάσταση σε άλλη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.

Η ένταση του σήματος στο φάσμα NMR (κορυφή) είναι ανάλογη προς τον αριθμό των πυρήνων που συντονίζονται. Από την ένταση του καταγραφόμενου σήματος είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων, για την αναλογία των πυρήνων που το
προκάλεσαν, στην ουσία που μελετάται. Αυτό επιτυγχάνεται με ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού. Η επιφάνεια που περικλείει κάθε κορυφή (εμβαδόν) είναι ανάλογη του αριθμού των πυρήνων που συντονίζονται στη συχνότητα αυτή. Οι αναλογίες των ληφθέντων ολοκληρώσεων (εμβαδά) μπορούν να μετατραπούν σε αντιστοιχία συγκεντρώσεων, εφόσον προστεθεί στο δείγμα ουσία αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό το NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός δείγματος [129-136].

5.1. Απαιτούμενα χαρακτηριστικά της μεθόδου προκειμένου να εφαρμοστεί στην ποσοτική ανάλυση

Η ποιότητα των φασμάτων μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία των μεθόδων ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού με τη φασματοσκοπία NMR. Η αναλογία του σήματος προς τον θόρυβο S/N, για συγκεκριμένο αναλύτη στον οποίο οφείλεται το σήμα αυτό, είναι επιθυμητό να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εφόσον η παράμετρος αυτή επηρεάζει την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

- Τα φάσματα θα πρέπει να λαμβάνονται με σταθερές συνθήκες. Παράμετροι όπως η θερμοκρασία λήψης ενός φάσματος και ο αριθμός των σαρώσεων (scans) θα πρέπει να είναι ο ίδιος σε κάθε φάσμα και όχι μικρότερος των 144 scans, προκειμένου να μπορούν να αξιολογηθούν τα φάσματα αυτά ποσοτικά. Μικρός αριθμός σαρώσεων σε σχέση με τον απαιτούμενο (λήψη φάσματος σε σύντομο χρόνο), μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένης έντασης σήμα, ενώ μεγαλύτερος (μεγάλη διάρκεια λήψης του φάσματος) μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο θόρυβο. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η ελάττωση του λόγου S/N, με επιπτώσεις στην ακρίβεια και την επαναληψιμότητα της μεθόδου.
- Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ένα φάσμα NMR στην ποσοτική ανάλυση, θα πρέπει οι εντάσεις των σημάτων που οφείλονται σε κάθε αναλύτη να εμφανίζονται σαφώς διαχωρισμένες μεταξύ τους, προκειμένου η απόδοση αυτών να είναι αξιόπιστη.
- Επιπλέον πειράματα NMR, μιας ή δύο διαστάσεων μπορεί να επιβεβαιώσουν ότι οι κύριες κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνονται και στις οποίες στηρίζεται η αναλυτική μέθοδος δεν αλληλεπιδρούν με άλλες κορυφές του αναλύτη ή προσμίξεων.

Η εφαρμογή του NMR σε μεθόδους ποσοτικών προσδιορισμών οδηγεί σε μεθόδους εύκολες, γρήγορες και εκλεκτικές.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως και στη φαρμακευτική ανάλυση, για την ταυτοποίηση φαρμάκων και των προσμίξεών τους ή προϊόντων διάσπασης. Η εφαρμογή της στην ποσοτική ανάλυση δίνει μεθόδους με τις οποίες δύναται να:

- 1. χαρακτηριστεί η καθαρότητα ενός δείγματος.
- προσδιοριστεί η παρουσία προσμίξεων και το ποσοστό τους, να αποσαφηνιστεί η δομή τους και η προέλευσή τους (εάν δηλαδή η παρουσία τους αποδίδεται σε διάσπαση της μητρικής ουσίας).
- εκτιμηθεί το περιεχόμενο υπολειμματικών διαλυτών που οφείλεται σε κάποιο συνθετικό στάδιο.
- καθοριστεί η ύπαρξη ισομερών μορφών: εναντιομερή, διαστερεοϊσομερή ή χειρόμορφα μέσα και η μεταξύ τους αναλογία.
- 5. υπολογιστεί η μοριακή συγκέντρωση βασικών φαρμάκων ή πρωτονιωμένων οργανικών οξέων σε διαλύματα αλάτων.
- 6. πραγματοποιηθεί αναγνώριση φαρμάκων ακόμη και σε σύνθετα σκευάσματα.
- 7. διερευνηθούν τα αίτια της αποσύνθεσης ενός φαρμάκου.

Εφόσον η πλειοψηφία των προσμίξεων σχετίζεται με τη συνθετική οδό μιας ουσίας, η οποία είναι συνήθως γνωστή, οι πιθανές προσμίξεις είναι αναμενόμενες και μπορούν να προσδιοριστούν με τη βοήθεια κάποιας χρωματογραφικής μεθόδου. Στην περίπτωση νέων ή διαφορετικών συνθετικών μεθόδων κατά τη διαδικασία παραγωγής μιας φαρμακοτεχνικής μορφής, μπορεί να εμφανιστούν άγνωστες προσμίξεις, οι οποίες δεν είναι δυνατό να προσδιοριστούν με τις υπάρχουσες στη Φαρμακοποιία μεθόδους, εφόσον έχουν αναπτυχθεί για καθορισμένη διαδικασία παραγωγής. Σε αυτές τις περιπτώσεις το NMR μπορεί να θεωρηθεί μέθοδος επιλογής, για την ανίχνευση, τη ταυτοποίηση και συχνά τη ποσοτικοποίηση των πρωτοεμφανιζόμενων προσμίξεων [137-141].

5.2. Πλεονεκτήματα της εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR στην ποσοτική ανάλυση

 Παρουσιάζει καλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα από τις κλασσικές χρωματογραφικές μεθόδους.

- 2. Δεν απαιτείται ιδιαίτερη προκατεργασία των δειγμάτων, όπως απομόνωση της κύριας ουσίας-αναλύτη από πιθανές προσμίξεις ή προϊόντα διάσπασης. Ακόμη και δείγματα από βιολογικά υγρά, κύτταρα ή εκχυλίσματα ιστών μπορούν να μετρηθούν απευθείας και να ληφθούν τα φάσματα αυτών χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια πολύπλοκη διαδικασία για την προετοιμασία τους. Στις χρωματογραφικές μεθόδους, ένας ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού προϋποθέτει χρωμοφόρο ομάδα, ενώ ένας φθορισμομετρικός ανιχνευτής, κατάλληλη ουσία ή μετατροπή αυτής ώστε να φθορίζει.
- Υπάρχει πληθώρα χημικών ουσιών, χαμηλού κόστους, κατάλληλων για χρήση ως εσωτερικών προτύπων αναφοράς.
- Κατά την ανάλυση λαμβάνονται πρόσθετες δομικές πληροφορίες, οι οποίες αφορούν σε προσμίξεις και στην εμφάνιση πιθανών ισομερών.
- 5. Είναι λιγότερο δαπανηρή μέθοδος όσον αφορά στο χρόνο (εύκολη και γρήγορη προετοιμασία δειγμάτων, ο αναλύτης ζυγίζεται και στη συνέχεια διαλύεται στον επιλεγμένο δευτεριωμένο διαλύτη, οπότε λαμβάνεται άμεσα το φάσμα χωρίς άλλη κατεργασία, δεν προαπαιτείται χρόνος εξισορρόπησης του συστήματος, όπως στις χρωματογραφικές μεθόδους) και στο κόστος (απαιτείται συγκριτικά μικρότερη ποσότητα αναλυτών και διαλυτών, επομένως αντισταθμίζεται και το αυξημένο ίσως κόστος των δευτεριωμένων διαλυτών). Κατά συνέπεια περιορίζεται το συνολικό κόστος και η επιβάρυνση του περιβάλλοντος.
- 6. Η ευκολία και απλότητα στην εφαρμογή της μεθόδου επιτρέπει την αναπαραγωγή των συνθηκών με καλή επαναληψιμότητα.
- Από ένα φάσμα, δηλαδή μία μέτρηση μπορούν να αντληθούν τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες ταυτόχρονα.
- 8. Είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δομής του αναλύτη.
- 9. Είναι εφικτή η λήψη πληροφοριών για άγνωστες προσμίξεις σε ένα δείγμα.
- Επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων του ενός αναλυτών, οι οποίοι συνυπάρχουν σε ένα μίγμα.
- 11. Επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση διαφόρων μεταβολιτών σε ένα δείγμα.
- 12.Η κατασκευή καμπύλης αναφοράς δεν είναι υποχρεωτική εφόσον η ένταση ενός σήματος σχετίζεται με την περιοχή που καλύπτει η συγκεκριμένη κορυφή και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο αριθμό πυρήνων, ενώ οι υπολογισμοί βασίζονται σε αναλογίες με την ένταση σημάτων ουσιών αναφοράς.

13. Είναι μέθοδος μη καταστρεπτική για το δείγμα.

Κατά συνέπεια, το ποσοτικό NMR χρησιμοποιείται στην ανάλυση φαρμάκων, εμβολίων, βιολογικών υγρών (μεταβολικοί παράγοντες για διαγνωστικούς σκοπούς, θεραπευτικά επίπεδα φαρμάκων στο αίμα), φυσικών προϊόντων, τροφίμων και ποτών, τη συνθετική χημεία, τη γεωργία, τη χημεία υλικών όπου η καθαρότητα και ο ακριβής προσδιορισμός ενός μίγματος έχουν καθοριστική σημασία. Με τη βοήθεια του ποσοτικού NMR μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα κάθε συστατικού σε ένα μίγμα είτε ή καθαρότητα ενός δείγματος αναφοράς [142-143].

5.3. Μειονεκτήματα της εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR στην ποσοτική ανάλυση

- Ως μειονέκτημα μπορεί να αναφερθεί το κόστος αγοράς και συντήρησης του οργάνου.
- 2. Σημαντικός περιορισμός στη χρήση και εφαρμογή του NMR στη ποσοτική ανάλυση είναι και η μεσολάβηση του ανθρώπινου παράγοντα στην επεξεργασία των φασμάτων. Έτσι, λειτουργίες όπως η διόρθωση φάσης ή η ολοκλήρωση των κορυφών απαιτούν μηχανοκίνητους χειρισμούς. Η επιλογή της κορυφής που θα αξιολογηθεί, ο τρόπος που θα ολοκληρωθεί, τα σημεία που θα καθορίζουν την αρχή και το τέλος μιας ολοκλήρωσης βασίζονται σε υποκειμενικούς παράγοντες και εξαρτώνται από την εμπειρία του αναλυτή. Υπάρχει πάντα η δυνατότητα κάποιοι χειρισμοί να εκτελεστούν αυτόματα από το πρόγραμμα, αλλά η επέμβαση ενός έμπειρου χειριστή είναι προτιμότερη. Οι ολοκληρώσεις τόσο της κορυφής της ουσίας αναφοράς όσο και της κορυφής του αναλύτη που έχει επιλεγεί θα πρέπει να βασίζονται σε ίδια κριτήρια και να γίνονται με ανάλογο τρόπο. Εφόσον υπάρχει οξεία κορυφή του αναλύτη με καλό διαχωρισμό και καθαρή, συνήθως επιλέγεται για τους υπολογισμούς.
- Η πολυπλοκότητα ενός φάσματος, το πλήθος κορυφών του αναλύτη και τυχόν προσμίξεων που γειτνιάζουν ή αλληλοεπικαλύπτονται δυσχεραίνουν τους χειρισμούς.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απόκριση του οργάνου ή αλλιώς η ένταση του σήματος της κορυφής μιας ουσίας (περιοχή ολοκληρώματος) Ι_x σε ένα φάσμα NMR, είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των πυρήνων Ν_x, οδηγώντας σε ευθύγραμμη μεταξύ τους σχέση:

 $I_x = K_s N_x$

όπου Ks: φασματοσκοπική σταθερά.

Συνήθως το σήμα μιας ουσίας σε ένα φάσμα NMR αποτελείται από διαδοχικές γραμμές συντονισμού.

Ο προσδιορισμός της σχετικής αναλογίας I_x/I_y είναι και ο ευκολότερος τρόπος για τη λήψη ποιοτικών αποτελεσμάτων. Για ένα παλμό ¹Η στο NMR και εφόσον όλες οι παράμετροι λήψης ενός φάσματος διατηρηθούν σταθερές, το K_s παραμένει σταθερό για όλες τις γραμμές συντονισμού. Επομένως θα ισχύει:

$$\frac{I_x}{I_y} = \frac{N_x}{N_y}$$

Η μοριακή αναλογία n_x/n_y για δύο ενώσεις X και Y μπορεί να υπολογιστεί στη συνέχεια από τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{I_x \cdot N_y}{I_y \cdot N_x} = \frac{n_x}{n_y}$$

Κατά συνέπεια το κλάσμα της ποσότητας μιας ουσίας X σε ένα μίγμα, το οποίο αποτελείται από m συστατικά, μπορεί να αποδοθεί από τη σχέση:

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{\frac{I_x}{N_x}}{\sum_{i=1}^m (I_i N_i)} = 100\%$$

Η σχέση δεν επηρεάζεται από το σήμα του διαλύτη, στον οποίο έχει διαλυθεί το δείγμα στο στάδιο της προκατεργασίας.

Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας μιας ουσίας απαιτείται ένα εσωτερικό πρότυπο αναφοράς γνωστής καθαρότητας. Η καθαρότητα σε αυτή τη περίπτωση μπορεί να προσδιοριστεί από την ακόλουθη σχέση:

$$P_{x} = \frac{I_{x}}{I_{std}} \cdot \frac{N_{std}}{N_{x}} \cdot \frac{M_{x}}{M_{std}} \cdot \frac{m_{std}}{m_{x}} \cdot P_{std}$$

όπου M_x και M_{std} οι μοριακές μάζες του αναλύτη και της ουσίας αναφοράς αντίστοιχα, m_x η μάζα του αναλύτη, m_{std} και P_{std} η μάζα και η καθαρότητα αντίστοιχα της ουσίας αναφοράς, N_{std} και I_{std} ο αριθμός των πυρήνων και η ένταση του σήματος (ολοκλήρωση) αντίστοιχα της ουσίας αναφοράς, N_x και I_x ο αριθμός των πυρήνων και η ένταση του σήματος ένταση του σήματος (ολοκλήρωση) αντίστοιχα του αναλύτου αναλύτη του αναλύτη.

5.4. Επιλογή κατάλληλης ουσίας αναφοράς

Η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια κατάλληλης μεθόδου και μιας ουσίας αναφοράς, η οποία θα έχει διαφοροποιημένη μοριακή δομή από εκείνη του αναλύτη, ώστε να δίνουν κορυφές συντονισμού σε διαφορετικά ppm και οι οποίες δε θα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Εφόσον μια ουσία αναφοράς με γνωστή συγκέντρωση προστεθεί στο δείγμα, η μοριακή αναλογία ανάμεσα στην ουσία αναφοράς και στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί από την ολοκλήρωση των κορυφών που αποδίδονται στην ένταση του σήματος του αναλύτη και της ουσίας αναφοράς. Στη συνέχεια η ακριβής ποσότητα του αναλύτη που μας ενδιαφέρει προσδιορίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\%(w/w)\alpha \nu\alpha\lambda \dot{v}\tau\eta = \frac{I_x}{I_{std}} \cdot \frac{N_{std}}{N_x} \cdot \frac{M_x}{M_{std}} \cdot \frac{m_{std}}{m_{\mu i \gamma \mu \alpha}}$$

όπου M_x και M_{std} οι μοριακές μάζες του αναλύτη και της ουσίας αναφοράς αντίστοιχα, m_{μίγμα} η μάζα του μίγματος, m_{std} η μάζα της ουσίας αναφοράς, N_{std} και I_{std} ο αριθμός των πυρήνων και η ένταση του σήματος (ολοκλήρωση) αντίστοιχα της ουσίας αναφοράς, N_x και I_x ο αριθμός των πυρήνων και η ένταση του σήματος (ολοκλήρωση) αντίστοιχα του αναλύτη.

Η επεξεργασία ενός φάσματος και ειδικότερα η ολοκλήρωση της κορυφής της ουσίας αναφοράς και της κορυφής που έχει επιλεγεί για τον αναλύτη, θα πρέπει να γίνονται με όμοιο τρόπο και να τηρούνται κάποια κριτήρια, τα οποία αφορούν π.χ. στα σημεία καθορισμού αρχής και τέλους των ολοκληρώσεων προκειμένου να υπάρχει ακρίβεια στη μέθοδο. Η τυπική απόκλιση των ολοκληρώσεων από το μέσο όρο, της έντασης του σήματος της κορυφής που επιλέγεται δίνει την ακρίβεια της μεθόδου, καθώς επίσης και πληροφορίες για την παρουσία προσμίξεων. Η προετοιμασία ενός δείγματος με ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά στις ζυγίσεις του αναλύτη και της ουσίας αναφοράς εξασφαλίζει υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα στη μέθοδο. Η ακρίβεια στον τρόπο ολοκλήρωσης σχετίζεται και με το λόγο S/N. Είναι πιθανό να απαιτηθεί διόρθωση στη φάση ή τη γραμμή βάσης ενός φάσματος. Σημαντική προϋπόθεση αποτελεί οι κορυφές, οι επιφάνειες των οποίων ολοκληρώνονται να είναι σαφώς διαχωρισμένες μεταξύ τους, αλλά και με την κορυφή της ουσίας, η οποία έχει επιλεγεί ως εσωτερικό πρότυπο αναφοράς. Όταν υπάρχει κορυφή απλή, απομονωμένη, καθαρή και συμμετρική θα πρέπει να επιλέγεται για τους υπολογισμούς. Αυτό δεν είναι ιδιαίτερα εύκολο σε περιπτώσεις πολύπλοκων φασμάτων, όπου οι κορυφές γειτνιάζουν με άλλες κορυφές του ιδίου μορίου ή προσμίξεων.

Σε περιπτώσεις όπου το φάσμα, που έχει ληφθεί δεν είναι αρκετά ικανοποιητικής μορφής, υπάρχουν τεχνικές για βελτίωση αυτού. Αυτές βασίζονται στο ότι οι χημικές μετατοπίσεις, είναι χαρακτηριστικές σε συγκεκριμένο περιβάλλον και εξαρτώνται από τη μοριακή δομή της εκάστοτε ουσίας (αναλύτη). Παράμετροι που επηρεάζουν το περιβάλλον του αναλύτη, μπορεί να επηρεάσουν τη μορφή του λαμβανόμενου φάσματος. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

- Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη μπορεί να βελτιώσει τη ποιότητα ενός φάσματος και προκαλώντας διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις να επηρεάσει το σχήμα και το διαχωρισμό των κορυφών. Ο διαλύτης, ο οποίος επιλέγεται εξαρτάται πάντοτε και από τη διαλυτότητα του αναλύτη, ενώ μίγματα διαλυτών μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.
- Η συγκέντρωση του διαλύματος. Είναι δυνατό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις να επηρεάζεται η χημική μετατόπιση των κορυφών ορισμένων πρωτονίων. Αυτό οφείλεται συνήθως σε φαινόμενα διμερισμού ή πολυμερισμού.
- 3. Το pH του διαλύματος του δείγματος. Αυτό ισχύει εφόσον ο αναλύτης περιέχει ομάδες που ιονίζονται. Προσμίξεις που φέρουν φορτία μπορούν επίσης να μεταβάλλουν το pH ενός διαλύματος.
- 4. Η προσθήκη βοηθητικών αντιδραστηρίων, όπως κυκλοδεξτρινών. Τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και της κυκλοδεξτρίνης (δεσμοί υδρογόνου, δεσμοί Van der Waals, πολικές επιδράσεις, εγκλεισμός στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης), μπορεί να ευθύνονται για σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων τους.
- Η θερμοκρασία. Αύξηση της θερμοκρασίας επάγει συνήθως καλύτερο διαχωρισμό.
- Η συγκέντρωση ιόντων μπορεί επίσης να επηρεάσει το διαχωρισμό των κορυφών.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να βελτιώσουν τη ποιότητα των φασμάτων και της ποσοτικής ανάλυσης με φασματοσκοπία NMR [139, 144-145].

5.5. Απαιτούμενα χαρακτηριστικά ουσιών αναφοράς

Η ουσία αναφοράς για να είναι κατάλληλη θα πρέπει:

- 1. Να είναι υψηλής ή γνωστής καθαρότητας.
- 2. Να έχει χαμηλό κόστος και να είναι εμπορικώς διαθέσιμη.
- 3. Να είναι διαλυτή σε πολλούς διαφορετικούς και στον επιλεγμένο διαλύτη.
- Να είναι σταθερή για μεγάλο χρονικό διάστημα ή για όσο διαρκεί η ανάλυση στις συνθήκες του πειράματος.
- 5. Να είναι χημικά αδρανής, ώστε να μην αλληλεπιδρά με τον αναλύτη.
- Να είναι μη πτητική, προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν αντιδράσεις διάσπασης του αναλύτη κατά την εξάτμιση και μη υγροσκοπική.
- 7. Να έχει την ικανότητα να παρουσιάζει απλό φάσμα και μοναδική κορυφή σε αυτό, η οποία θα εμφανίζεται σε περιοχή του φάσματος όπου δεν υπάρχουν άλλες κορυφές, να είναι δηλαδή σαφώς διαχωρισμένη από τον αναλύτη.
- 8. Να είναι εύκολη στη χρήση (π.χ. ζύγιση).
- Ουσίες με μικρά μοριακά βάρη είναι ιδανικές, εφόσον απαιτούνται μικρότερες ποσότητες αυτών, ή με παραπλήσια μοριακά βάρη με εκείνα των αναλυτών.

Η επιλογή μιας ουσίας αναφοράς εξαρτάται και από άλλους παράγοντες. Έτσι, αν απαιτείται ανάκτηση του δείγματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί μια πτητική ουσία αναφοράς. Εφόσον η ακρίβεια στη μέθοδο χρήζει ιδιαίτερης σημασίας, η ουσία αναφοράς θα πρέπει να είναι στερεής μορφής, καθώς η ποσότητα αυτής θα μπορεί να ζυγιστεί επακριβώς. Σε κάθε περίπτωση το σήμα της επιλεγμένης ουσίας αναφοράς δεν θα πρέπει να αναμιγνύεται με εκείνο των αναλυτών που μας ενδιαφέρουν.

Ενδιαφέρουσα εναλλακτική είναι η χρήση ηλεκτρονικού σήματος αναφοράς, με την προϋπόθεση ότι είναι διαθέσιμο κατάλληλο πρόγραμμα, το οποίο παρέχει αυτή τη δυνατότητα. Σε αυτή την περίπτωση, πλεονέκτημα αποτελεί η απουσία επιμόλυνσης του δείγματος με ξένη ουσία (αναφοράς) κατά την προκατεργασία αυτού.

Μερικές από τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

- 1. Μαλεϊκό οξύ: Στερεή ουσία, η οποία ζυγίζεται εύκολα, υδατοδιαλυτή.
- 2. 2,5-Διμεθυλοφουράνιο: Πτητική ουσία, η οποία απομακρύνεται εύκολα.
- Τριμεθυλσιλυλπροπιονικό οξύ: Στερεή ουσία, η οποία ζυγίζεται εύκολα, υδατοδιαλυτή, ασταθής σε διάλυμα.
- Τετραμεθυλοσιλάνιο: Πτητική ουσία, η οποία απομακρύνεται εύκολα, διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες.
- Εξαμεθυλοδισιλοξάνιο: Πτητική ουσία, η οποία απομακρύνεται εύκολα, διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας είναι οι κινολόνες και οι κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

	Ο δολυμικό οδύ [151 154]	Kumoore) o Servive [155, 157]			
Κινολόνη		κυπροφλοςακινη [155-157]			
Χημικός τύπος	O C ₂ H ₅ OH				
Χημική	5-αιθυλο-5,8-διϋδρο-8-οξο-[1,3]-	1-κυκλοπροπυλο-6-φθορο -1,4-διϋδρο-			
	διοξολο-[4,5]-κινολινο-7-	4-οξο-7-(1-πιπεραζινιλο)- κινολινο-3-			
ονομασία	καρβοξυλικό οξύ	καρβοξυλικό οξύ			
Μοριακός		C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃			
τύπος	U ₁₃ Π ₁₁ ΝU ₅				
Σχετική	261 23	331,32			
μοριακή μάζα	201,20				
Διαλυτότητα					
στο νερό	4,1	62,5			
(pH=7, mg/l)					
рK _a	6,9	6,15 каı 8,63			
Φωτολυτική αποικοδόμηση	παρουσία ΤἰΟ₂ (δύο προϊόντα) [158-159], κινητική [160-163],	παρατήρηση προϊόντων (έξι) και μεταβολιτών (τεσσάρων) με HPLC, MS [164], CE [165], HPLC (δύο προϊόντα) [166] LC-MS/MS (πέντε προϊόντα) [167], κινητική [162, 168], μηχανισμός φωτόλυσης και φωτοκατάλυσης παρουσία TiO ₂ , LC-MS/MS (169)			
	CIP:βCD, μοντέλο QSAR [170], CIF	P:HPγCD, φασματοφωτομετρία, UV [171],			
Κυκλοδε	CIΡ:(ΗΡβCD ή ΜeβCD):άγαρ, F⁻	TIR [172], CIP:polyHPβCD, FTIR [173],			
ξτρίνες	CIP:MeβCD, NMR [174], CIP:HPβ	CD, NMR [175], CIP:βCD, NMR, IR, DSC			
	[176], CIP:βCD, επίδραση σε φθορισμό [177]				

Γενικά χαρακτηριστικά οξ	ολινικού οξέος και	κυπροφλοξακίνης
--------------------------	--------------------	-----------------

Α. Κινολόνες

Οι κινολόνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι α) το οξολινικό οξύ (ΟΧΑ) και β) η κυπροφλοξακίνη (CIP), πρώτης και δεύτερης γενιάς, αντίστοιχα.

Β. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι φυσικές: β-κυκλοδεξτρίνη (βCD), συνθετικά παράγωγα των φυσικών κυκλοδεξτρινών, διαθέσιμα στο εμπόριο: υδροξυπροπυλοβκυκλοδεξτρίνη (HPβCD), μαλτοζυλοβκυκλοδεξτρίνη (MalβCD) και νέες συνθετικά τροποποιημένες: bpsp, gpsp, bpen, ManOHNH-gpsp, ManOHNH-bpsp, NAcGluOHNH-gpsp, NAcGalOHNH-bpsp, GalOHNH-bpsp, NAcGluOHNH-bpsp και FucOHNH-bpsp.

Φυσικές κυκλοδεξτρίνες

1. β-κυκλοδεξτρίνη (βCD)

Σχετική μοριακή μάζα: 1135

Χημικός τύπος:



Εμπορικώς διαθέσιμα συνθετικά παράγωγα των φυσικών κυκλοδεξτρινών 2. υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (ΗΡβCD) Σχετική μοριακή μάζα: 1500

Χημικός τύπος:





3. μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (MalβCD)

Σχετική μοριακή μάζα: 1629,45

<u>Χημικός τύπος:</u>



Η σύνδεση κυκλοδεξτρινών και σακχάρων, προϋποθέτει τη σύνθεση τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών και μονοσακχαριτών (σάκχαρα), οι οποίες θα φέρουν κατάλληλους υποκαταστάτες, που θα επιτρέψουν τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Τα σάκχαρα είναι πολυϋδροξυ αλδεΰδες ή κετόνες, με λειτουργικές ομάδες –ΟΗ ή –CHO και η χημική τους συμπεριφορά ταυτίζεται με των υδροξυλίων ή των καρβονυλίων αντίστοιχα. Τα υδατανθρακικά συμπλέγματα που θα προκύψουν από αυτή τη σύζευξη, θα διαθέτουν την ικανότητα εγκλεισμού μορίων φαρμάκων στην κοιλότητά τους καθώς και τη δυνατότητα αναγνώρισης από κατάλληλους βιολογικούς υποδοχείς (λεκτίνες).

Οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες 4-6, που ακολουθούν, είναι οι βιβλιογραφικά γνωστές bpsp, gpsp και bpen, οι οποίες φέρουν αμινο ή καρβοξυ ομάδες. Αυτές συντέθηκαν ως πρόδρομες ενώσεις με δυνατότητα σύνδεσης ενός, επτά ή οκτώ μονοσακχαριτών [178-179].

Συνθετικές κυκλοδεξτρίνες 4. Επτακις –[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp) Σχετική μοριακή μάζα: 1906 <u>Χημικός τύπος:</u>



5. Οκτακις –[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpsp)

Σχετική μοριακή μάζα: 2177

<u>Χημικός τύπος:</u>



6. Επτακις –[6-(αμινοαιθυλαμινο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpen) Σχετική μοριακή μάζα: 1683,5

Χημικός τύπος:



Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, οι βακτηριακές λεκτίνες αναγνωρίζουν κυρίως επτά συγκεκριμένα σάκχαρα: μαννόζη, μαλτόζη, γαλακτόζη, Ν-

ακετυλογαλακτοζαμίνη, Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη, φουκόζη και Ν-ακετυλονευραμινικό οξύ (κοινώς σιαλικό οξύ). Για τη σύζευξη με τις κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκαν: η D-(+)-Μαννόζη (Man), η D-(+)-Γαλακτόζη (Gal), η L-(-)-Φουκόζη (Fuc), η Ν-ακετυλο-Dγλυκοζαμίνη (GlcNAc) και Ν-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (GalNAc) που παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Τα σάκχαρα αυτά τροποποιούνται, ώστε να φέρουν αλειφατικές αλυσίδες με καταληκτικές αμινο ή καρβοξυ ομάδες, οι οποίες θα σχηματίσουν γέφυρες σύζευξης με τις κυκλοδεξτρίνες. Η αναγνώριση των βακτηριακών λεκτινών ενισχύεται όταν τα σάκχαρα διαθέτουν επιπλέον αμιδομάδες και όταν τα σάκχαρα προσεγγίζουν τις λεκτίνες υπό τη μορφή υδατανθρακικών συμπλεγμάτων. Οι κυκλοδεξτρίνες που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά θα αλληλεπιδράσουν με σάκχαρα που φέρουν αμινομάδες, ενώ εκείνες που φέρουν αμινομάδες στην πρωτοταγή τους πλευρά, κατά ανάλογο τρόπο, θα αλληλεπιδράσουν με σάκχαρα που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες.

Για τις συνθέσεις χρησιμοποιήθηκαν η bpsp και η gpsp, οι οποίες συζεύχθηκαν με τα ανωτέρω σάκχαρα αναγνώρισης. Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές φέρουν καρβοξυλικές ομάδες, ενώ τα σάκχαρα φέρουν μικρές αλειφατικές αλυσίδες με τελική αμινομάδα, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί. Προέκυψαν επτά διαφορετικά προϊόντα 7-13, τα οποία αναφέρονται στο σχήμα και πιο αναλυτικά στη συνέχεια.



Οι συνθετικές κυκλοδεξτρίνες 7-13 διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού και ανεξάρτητα από τους ογκώδεις υποκαταστάτες, η κοιλότητά τους παραμένει λειτουργική.

7. Οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαννοπυρανοζ-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξαν-1-υλο]-6θειο}-γ-κυκλοδεξτρίνη (ManOHNH-gpsp)

Σχετική μοριακή μάζα: 3188,34

<u>Χημικός τύπος:</u>



8. Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-α-D-μαννοπυρανοζ-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξαν-1-υλο]-6θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (ManOHNH-bpsp)

Σχετική μοριακή μάζα: 3643,82

<u>Χημικός τύπος:</u>



9. Οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-γλυκοπυρανοζ-1΄-υλο)-4αζα-3-οξοεξαν-1-υλο]-6-θειο}-γ-κυκλοδεξτρίνη (NAcGluOHNH-gpsp) Σχετική μοριακή μάζα: 3972,23

<u>Χημικός τύπος:</u>



10. Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-D-γαλακτοπυρανοζ-1΄-υλο) -4-αζα-3-οξοεξαν-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (NAcGalOHNH-bpsp) Σχετική μοριακή μάζα: 3473,21

<u>Χημικός τύπος:</u>



11. Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζ-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξαν-1υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (GalOHNH-bpsp)

Σχετική μοριακή μάζα: 3188,34

<u>Χημικός τύπος:</u>



12. Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ- α-D-γλυκοπυρανοζ-1΄-υλο)-4αζα-3-οξοεξαν-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (NAcGluOHNH-bpsp) Σχετική μοριακή μάζα: 3475,70

<u>Χημικός τύπος:</u>



13. Επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-L-φουκοπυρανοζ-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξαν-1υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (FucOHNH-bpsp)

Σχετική μοριακή μάζα: 3076,35

<u>Χημικός τύπος:</u>



Επιπρόσθετα, η επισήμανση των προϊόντων 8 και 11-13 με φλουορεσκεΐνη και η αλληλεπίδραση αυτών με ζώντα βακτήρια, έδειξε ότι πράγματι προσκολλώνται σε αυτά, αφού αυξάνουν το φθορισμό των βακτηρίων. Τα βακτήρια που μελετήθηκαν, είναι το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Ralstonia solanacearum* και το *Aeromonas caviae* που προσβάλλει το ζωϊκό βασίλειο (πτηνά, ψάρια κ.α.). Μάλιστα, η αλληλεπίδραση ισχυροποιείται όσο αυξάνεται ο αριθμός των σακχάρων που διαθέτουν τα υδατανθρακικά συμπλέγματα στην πρωτοταγή τους πλευρά. Η ποσοτική εκτίμηση της σύνδεσης των συνθετικών κυκλοδεξτρινών με τις λεκτίνες αυτές, έγινε με τη βοήθεια της οπτικής συμβολομετρίας [180].

Στην παρούσα εργασία οι συνθετικές κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή συμπλόκων με τις κινολόνες ΟΧΑ και CIP (κεφάλαιο 1), τη μελέτη της συμπεριφοράς των συμπλόκων στη φωτοσταθερότητα των φαρμάκων αυτών (κεφάλαιο 4) και την εύρεση των τιμών MIC, δηλαδή της χαμηλότερης συγκέντρωσης των αντιμικροβιακών παραγόντων υπό μορφή συμπλόκου, που μπορεί και αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, σε ανθεκτικά νοσοκομειακά μικροβιακά στελέχη (κεφάλαιο 7).

Γ. Οργανολογία

Χρωματογραφική διάταξη HPLC-UV

Για την εκτέλεση των χρωματογραφικών προσδιορισμών χρησιμοποιήθηκε διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), η οποία αποτελείται από:

1) Περιέκτες κινητής φάσεως:

Η κινητή φάση τοποθετείται σε σκουρόχρωμο υάλινο περιέκτη.

2) Αντλία:



Μοντέλο 1515 Waters, η οποία εξασφαλίζει τη σταθερή συνεχή ροή της κινητής φάσης, διαμέσου της στήλης. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ρυθμίζεται μέσω ηλεκτρονικού προγράμματος στην επιθυμητή τιμή, συνήθως μεταξύ των τιμών 0,10 και 1,00 ml/min. Η αντλία διαθέτει επίσης φούρνο σταθερών θερμοκρασιών, μέσα στον οποίο είναι τοποθετημένη η στήλη. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται μέσω ηλεκτρονικού προγράμματος στην επιθυμητή τιμή, συνήθως από 25 ως 50 °C.

3) Αυτόματος δειγματολήπτης:



Μοντέλο Waters TM 717 plus Autosampler. Διαθέτει 96 θέσεις υάλινων φιαλιδίων, στα οποία τοποθετούνται τα προς ανάλυση δείγματα. Ο όγκος του δείγματος που εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα καθορίζεται μέσω ηλεκτρονικού προγράμματος, συνήθως στα 20 μl.

4) Χρωματογραφική στήλη:

Στην χρωματογραφική στήλη πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Η χρωματογραφική στήλη συνδέεται μεταξύ του αυτόματου δειγματολήπτη και του ανιχνευτή. Η στήλη και ο αυτόματος δειγματολήπτης συνδέονται με την αντλία με μεταλλικές σωληνώσεις σταθερής διαμέτρου, ώστε να αποφεύγονται τυχόν ανωμαλίες στη ροή της κινητής φάσης. Οι χρωματογραφικές στήλες εκπλένονται στο τέλος κάθε εργαστηριακής ημέρας για τουλάχιστον μία ώρα σε χαμηλή ροή, συνήθως 0,10 ml/min με διάλυμα οργανικού διαλύτη μεθανόλη και νερού καθαρότητας HPLC σε αναλογία 50:50, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα των ενιόμενων ουσιών και των ανοργάνων αλάτων της κινητής φάσης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα.

5) Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής πολλαπλών φωτοδιόδων:



Moντέλο Waters 996 Photodiode Array Detector. Παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης στο επιθυμητό μήκος κύματος και ταυτόχρονα τη λήψη του φάσματος στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού.

6) Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των χρωματογραφικών δεδομένων:

Empower εγκατεστημένο σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω του συστήματος αυτού ρυθμίζονται όλες οι χρωματογραφικές παράμετροι (π.χ. ταχύτητα ροής, θερμοκρασία, όγκος ενιόμενου δείγματος, χρονική διάρκεια καταγραφής του λαμβανόμενου φάσματος).

Άλλα συστήματα:

1) Σύστημα απαέρωσης:

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για την ανάμιξη και απαέρωση των διαλυτών, οι οποίοι συνιστούν την κινητή φάση. πραγματοποιείται διήθηση της κινητής φάσεως υπό κενό. Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται έχουν μέγεθος πόρων 0,45 μm. Η συσκευή συνδέεται με αντλία κενού και η απαερωμένη κινητή φάση συλλέγεται σε ειδικό δοχείο. 2) Σύστημα παραγωγής απεσταγμένου νερού Milli Q Plus:

Χρησιμοποιείται για την παραγωγή νερού καθαρότητας HPLC, αγωγιμότητας 18 MΩ, το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του υδατικού μέρους της κινητής φάσεως. 3) Πεχάμετρο:

Χρησιμοποείται για την μέτρηση του pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των οξινισμένων διαλυμάτων, τα οποία αποτελούν το υδατικό μέρος της κινητής φάσεως.

Πηγή ακτινοβολίας με λυχνία τόξου αερίου ξένου:



Μοντέλο Suntest CPS της εταιρείας Atlas Material Testing Technology LLC (Chicago, Illinois, USA). Η πηγή εκπέμπει ακτινοβολία μεταβαλλόμενης ισχύος από 250 ως 760 W/m² με φασματική κατανομή παρόμοια με αυτή του ηλιακού φωτός, η οποία είναι κατάλληλη για προσομοίωση της έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία, ακολουθεί τις προδιαγραφές (ICH Guidelines) [68] και επίσης κατάλληλη για επιταχυνόμενες μελέτες σταθερότητας. Η ένταση της ακτινοβολίας, η οποία παρέχεται, εξασφαλίζει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τις οδηγίες ICH απαιτείται ακτινομετρικός έλεγχος της πηγής ακτινοβολίας. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλου ακτινομετρικού συστήματος, το οποίο αποτελείται από υδατικό διάλυμα διϋδρικής υδροχλωρικής κινίνης 2 % (w/v) και καταγράφεται η μεταβολή απορρόφησης του αντιδραστηρίου στο υπεριώδες. Το όργανο διαθέτει δυνατότητα ρύθμισης της ισχύος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε μία ορισμένη ένταση. Στην παρούσα μελέτη επιλέγεται η μέγιστη ισχύς στα 760 w/m².

Κυψελίδες:

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες από χαλαζία πάχους 1 cm με βιδωτό πώμα των 3,5 ml. Οι κυψελίδες, εντός των οποίων εισάγεται το διάλυμα του φαρμάκου, του οποίου θα πραγματοποιηθεί έλεγχος σταθερότητας εκτίθενται στην ακτινοβολία της πηγής υπό συνεχή ανάδευση με σύστημα μαγνητικού αναδευτήρα, σε σταθερή απόσταση 20 cm από την πηγή της ακτινοβολίας.

Για την παρακολούθηση της ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης λαμβάνονται δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα, στα οποία η συγκέντρωση των δραστικών συστατικών προσδιορίζεται χρωματογραφικά.

Λυοφιλοποιητής:



Μοντέλο TELSTAR Cryodos –50 με αντλία κενού. Ο λυοφιλοποιητής Cryodos είναι ένα συμπαγές επιτραπέζιο όργανο, που αναπτύχθηκε για τη βασική έρευνα στον τομέα της βιοτεχνολογίας και των επιστημονικών ιδρυμάτων. Είναι εύκολο στη χρήση, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις στη συντήρησή του. Η βασική μονάδα αποτελείται από μία μεταλλική καμπίνα, με μία πόρτα στο πίσω μέρος, που δίνει πρόσβαση στο εσωτερικό τμήμα. Η αντλία κενού αποτελεί χωριστό όργανο, που συνδέεται με το λυοφιλοποιητή και μπορεί να απομονωθεί με τη βοήθεια μιας βαλβίδας. Το σύστημα ψύξης του λυοφιλοποιητή λειτουργεί στους -50 °C. Στην κορυφή εφαρμόζεται κύλινδρος από ανοξείδωτο ατσάλι, εντός του οποίου τοποθετούνται τα δείγματα. Το εξωτερικό κάλυμμα του κυλίνδρου είναι κατασκευασμένο από διαφανές ακρυλικό υλικό, επιτρέποντας την επιθεώρηση της διαδικασίας λυοφιλοποίησης των δειγμάτων. Τα δείγματα που τοποθετούνται για λυοφιλοποίηση θα πρέπει προηγουμένως να καταψύχονται, ενώ η διάρκεια της διαδικασίας εξαρτάται από τη ποσότητα και την στερεά σύνθεση του δείγματος, δηλαδή από το μέγεθος των σωματιδίων στο δείγμα. Μόλις ο λυοφιλοποιητής προσεγγίσει την επιθυμητή θερμοκρασία, σύμφωνα με τις ενδείξεις στην οθόνη του, τοποθετούνται τα κατεψυγμένα δείγματα στο εσωτερικό του κυλίνδρου και ανοίγει η βαλβίδα της αντλίας που βρίσκεται ήδη σε λειτουργία, για την εφαρμογή κενού στο σύστημα και την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Χρωματογραφική διάταξη HPLC-ELS

Το σύστημα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή σκέδασης φωτός αποτελείται από τα ακόλουθα επιμέρους τμήματα:

1) Αντλία υψηλής απόδοσης παροχής διαλυτών SHIMADZU LC-IOAD VP (Duisburg, Germany):

Η αντλία Shimadzu διαθέτει δύο πιστόνια συνδεδεμένα παράλληλα που κινούνται παλινδρομικά, αντλώντας κάθε φορά από τα δοχεία που περιέχουν τη κινητή φάση, όγκο ίσο με 10 μl. Έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί είτε ως αντλία σταθερής ροής, είτε ως αντλία σταθερής πίεσης, με μέγιστη δυνατή αναπτυσσόμενη πίεση τα 39,2 Mpa. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μπορεί να κυμαίνεται από συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης με χρήση ως και τεσσάρων διαλυτών σε αναλογίες από 0,0 ως και 100,0 %. Η αποδεκτή περιοχή pH για ομαλή λειτουργία της αντλίας είναι μεγάλου εύρους (1-13), παρέχοντας πολλές δυνατότητες για πλήθος αναλυτικών εφαρμογών.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος (χειροκίνητη βαλβίδα δύο θέσεων Rheodyne 7725i)
της S.E.D.E.R.E. μοντέλο SEDEX 75:

Η βαλβίδα της Rheodyne είναι δύο θέσεων. Στη πρώτη θέση «load» η κινητή φάση δεν διέρχεται από τον βρόγχο. Με μια μικροσύριγγα εισάγεται το δείγμα στον βρόγχο, του οποίου η μέγιστη χωρητικότητα είναι 20μl. Εφόσον ο βρόγχος πληρωθεί με το διάλυμα του δείγματος, η επιπλέον ποσότητα οδηγείται αυτόματα στα απόβλητα. Στη συνέχεια η βαλβίδα γυρίζει στη δεύτερη θέση «inject» και το δείγμα παρασύρεται από τη ροή της κινητής φάσης κατευθυνόμενο προς τη διαχωριστική χρωματογραφική στήλη.

3) Χρωματογραφική στήλη:

Η αναλυτική στήλη, η οποία επιλέχτηκε για την χρωματογραφική ανάλυση και το διαχωρισμό είναι στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 4.6×150mm με διάμετρο σωματιδίων 3.5μm.

4) Μεταλλικός σωλήνας σύνδεσης, διαμέτρου 1/16 inch, για την εκτέλεση των πειραμάτων με τη τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection Analysis, FIA).

5) Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) της S.E.D.E.R.E. μοντέλο SEDEX 75:

Ο σχεδιασμός του συγκεκριμένου ανιχνευτή, του επιτρέπει να συζευχθεί με διάταξη HPLC, αλλά και με άλλες διατάξεις (Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού-SFC, Χρωματογραφία Πηκτής-Gel Permeation Chromatography) με μικρές διαφοροποιήσεις. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία, επιτρέπει το διαχωρισμό

των σταγονιδίων μετά την εκνέφωση και πριν το στάδιο της εξάτμισης έτσι, ώστε το εκνέφωμα να είναι πιο ομοιόμορφο και η απαιτούμενη θερμοκρασία εξάτμισης χαμηλότερη. Αναφέρεται χαρακτηριστικά από τον κατασκευαστή, ότι ο SEDEX μοντέλο 75 μπορεί να εξατμίσει ικανοποιητικά κινητή φάση από 100 % ύδωρ ακόμη και στους 40 °C.

Η πηγή ακτινοβολίας του ανιχνευτή είναι μια λυχνία βολφραμίου/αλογόνου και ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 120° σε σχέση με τη διεύθυνση της ακτινοβολίας.

Εκτός από την παροχή ρεύματος και το σύστημα καταγραφής των αποτελεσμάτων, ο ανιχνευτής είναι συνδεδεμένος και με μια φιάλη αερίου Ν₂, που παρέχει το αέριο για τη δημιουργία του εκνεφώματος και διαθέτει μανόμετρα για συνεχή έλεγχο της πίεσης, αλλά και φίλτρο για τον καθαρισμό του αζώτου από τυχόν σωματίδια που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό.

Ο ανιχνευτής ELS μοντέλο SEDEX 75, έχει δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας και του συντελεστή ευαισθησίας (gain) στην κλίμακα 1-12. Ο σχεδιασμός του επιτρέπει την καταγραφή οξειών κορυφών ακόμη και με ταχύτητες ροής που φτάνουν τα 4 ml/min. Η πίεση του φέροντος αερίου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4,5 bar, διότι υπάρχει κίνδυνος βλάβης του ανιχνευτή.

6) Φιάλη αερίου αζώτου N₂.

7) Σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων συνδεδεμένο με Η/Υ και πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων Shimadzu Class-VP 4:

Είναι Η/Υ συνδεδεμένος με τον ανιχνευτή, ο οποίος καταγράφει τις χρωματογραφικές κορυφές των εκλουόμενων συστατικών κατά τη διάρκεια λήψης του χρωματογραφήματος.

Η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται με λογισμικό πρόγραμμα Shimadzu Class-VP 4.

Φασματογράφος NMR

Για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος NMR της εταιρείας Bruker DRX-Avance 400 MHz και 600 MHz. Ο φασματογράφος διαθέτει ενσωματωμένο σύστημα ψύξης ή θέρμανσης του δείγματος για την ρύθμιση της θερμοκρασίας. Ο αριθμός των σαρώσεων ρυθμίζεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

1.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΉ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΠΥΛΟ-β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ.

Αρχικά παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε το σύμπλοκο του οξολινικού οξέος (ΟΧΑ) με την υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (ΗΡβCD).

Το σύμπλοκο ΟΧΑ:ΗΡβCD παρασκευάστηκε σε υδατικό διάλυμα. Προσδιορίστηκε ο απαιτούμενος χρόνος για την αποκατάσταση της ισορροπίας σχηματισμού του συμπλόκου με Φασματοσκοπία Υπεριώδους (UV). Οι μεταβολές απορρόφησης που παρατηρούνται στο υπεριώδες μας επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δημιουργία συμπλόκου. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε με τη βοήθεια της Φασματοσκοπίας UV η σταθερά σύνδεσης του φαρμάκου με την κυκλοδεξτρίνη, χρησιμοποιώντας τη γνωστή από τη βιβλιογραφία εξίσωση Scott, στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το ΟΧΑ, 268 nm και καταγράφηκαν οι φασματικές μεταβολές του φαρμάκου σε διαφορετικά διαλύματα, αυξανόμενων συγκεντρώσεων ΗΡβCD.

Η μελέτη και ο προσδιορισμός της στοιχειομετρίας του παραπάνω συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία NMR, ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών κατά Job.

Η μελέτη της δομής του συμπλόκου έγινε με Φασματοσκοπία ¹Η NMR δύο διαστάσεων (ROESY) σε διάλυμα συμπλόκου ΟΧΑ και ΗΡβCD. Από τη μελέτη του φάσματος διαπιστώθηκαν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και επιβεβαιώθηκε η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ τους, ενώ σχεδιάστηκε η πιθανή δομή του δημιουργούμενου συμπλόκου.

Στον πίνακα 1.1 που ακολουθεί γίνεται απόδοση κορυφών για το ΟΧΑ σε διάλυμα 1,90×10⁻² Μ. Ως H(-CH₃) και H(-CH₂-) αναφερόμαστε στις κορυφές συντονισμού των πρωτονίων του αιθυλίου στη θέση 5.



Σχήμα 1.1: Χημικός τύπος ΟΧΑ.

Πίνακας 1.1: Απόδοση κορυφών σε φάσμα ¹Η NMR διαλύματος ΟΧΑ 1,90×10⁻² M σε D₂O.

Πρωτόνιο	Διάλυμα 1,90x10 ⁻² Μ (δ ppm)
H-2	5,9213 (s, 2H)
H-4	6,9235 (s, 1H)
H-6	8,1043 (s, 1H)
H-9	7,3234 (s, 1H)
H(-CH ₃)	1,2462 (t, 3H, J≈7 Hz)
H(-CH ₂ -)	4,0794 (q, 2H, J≈13 Hz, J≈7 Hz)

1.1.1. Μελέτη σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού του οξολινικού οξέος σε υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη

Η παρακολούθηση του χρόνου, που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας σχηματισμού του συμπλόκου του ΟΧΑ και της HPβCD, πραγματοποιείται με Φασματοσκοπία UV.

Η μελέτη πραγματοποιείται α) σε διαλύματα ΟΧΑ στο νερό και β) σε διαλύματα ΟΧΑ σε κινητή φάση.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων:</u>

Παρασκευάζονται δύο διαλύματα ΟΧΑ, των οποίων η συγκέντρωση αντιστοιχεί στο 80 % της διαλυτότητάς του (4,1 mg/l). Μεταφέρονται από 3,30 mg ΟΧΑ σε δύο ογκομετρικές φιάλες των 100 ml. Στην πρώτη περίπτωση το ΟΧΑ διαλύεται σε νερό (Διάλυμα ΣΑ, 1,26x10⁻⁴ M) και στην δεύτερη περίπτωση σε κινητή φάση (Διάλυμα ΣΒ, 1,26x10⁻⁴ M) προς αποφυγή της πιθανής καθίζησης της ουσίας κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε είναι ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v), 0,005% βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο, όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.1.7.

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το ΟΧΑ *λ*=268 nm. Για κάθε διάλυμα από τα ΣΑ, ΣΒ προσδιορίζονται οι μέγιστες απορροφήσεις στο *λ_{max}*. Ως τυφλό χρησιμοποιείται για το διάλυμα ΣΑ, νερό καθαρότητας HPLC και για το διάλυμα ΣΒ κινητή φάση, με τα οποία ρυθμίζεται η μηδενική απορρόφηση.

Στη συνέχεια ποσότητα 18,91 mg HPβCD μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με διάλυμα ΣΑ, ώστε στο τελικό διάλυμα ΣΑ΄ να υπάρχει κυκλοδεξτρίνη σε ισομοριακή ποσότητα με το ΟΧΑ. Ομοίως παρασκευάζεται διάλυμα ΣΒ'.

Μετρώνται για κάθε διάλυμα ΣΑ΄, ΣΒ΄ οι μέγιστες απορροφήσεις στο λ_{max}, οι οποίες αντιστοιχούν σε χρόνο t=0.

Ακολούθως τα διαλύματα ΣΑ΄, ΣΒ΄ ανακινούνται σε υδατόλουτρο σταθερών θερμοκρασιών στους 30 °C και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της μέγιστης απορρόφησης σε τακτά χρονικά διαστήματα. Καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος τα δείγματα προστατεύονται από τη φωτεινή ακτινοβολία.

Πίνακας 1.2: Τιμές των απορροφήσεων στο λ_{max}=268 nm για κάθε διάλυμα στους αντίστοιχους χρόνους.

Χρόνος (hours)	ΣΑ	ΣΑ΄	ΣΒ	ΣΒ΄
0	0,130	0,130	0,480	0,480
10		0,010		0,270
20		0,040		0,073
30		0,190		0,320
44		0,270		0,480
68		0,260		0,480
92		0,270		0,480
116		0,270		0,480
140		0,270		0,480

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Από την σύγκριση της απορρόφησης των φασμάτων στο υπεριώδες, των διαλυμάτων του ΟΧΑ στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησής του, πριν και μετά την ανάδευση διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν φασματικές μεταβολές. Όταν η μέγιστη απορρόφηση στο υπεριώδες δε μεταβάλλεται περαιτέρω, θεωρείται ότι η ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου εγκλεισμού έχει αποκατασταθεί. Μεταβολές στο λ_{max} δεν διαπιστώθηκαν.

Στα σχήματα που ακολουθούν, καταγράφονται οι τιμές απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο ανακίνησης.



Σχήμα 1.2: Γραφική απεικόνιση των απορροφήσεων (στα 268 nm) που λαμβάνονται για το διάλυμα ΣΑ΄ (σύμπλοκο σε νερό) σε συνάρτηση με το χρόνο ανακίνησης.



Σχήμα 1.3: Γραφική απεικόνιση των απορροφήσεων (στα 268 nm) που λαμβάνονται για το διάλυμα ΣΒ΄ (σύμπλοκο σε κινητή φάση) σε συνάρτηση με το χρόνο ανακίνησης.

Διαπιστώνεται ότι σε χρονικό διάστημα 44 ωρών έχει ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου του ΟΧΑ με την ΗΡβCD και η ισορροπία έχει αποκατασταθεί.

1.1.2. Μελέτη της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου του οξολινικού οξέος με την υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη

Με τη βοήθεια της Φασματοσκοπίας Υπεριώδους υπολογίστηκε η σταθερά σύνδεσης του φαρμάκου με την κυκλοδεξτρίνη, χρησιμοποιώντας τη γνωστή από τη βιβλιογραφία εξίσωση Scott [182-183]. Οι μετρήσεις έγιναν στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το ΟΧΑ (268 nm) και καταγράφηκαν οι φασματικές μεταβολές του φαρμάκου που προκύπτουν από το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του ΟΧΑ και της ΗΡβCD.

Οι μεταβολές απορρόφησης στο UV, οι οποίες αποδίδονται στη συμπλοκοποίηση, μας επιτρέπουν και τον υπολογισμό της σταθεράς σύνδεσης του υπερμορίου.

Για τη συγκεκριμένη μελέτη παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα ΟΧΑ 3,94×10⁻⁵ M, στα οποία προστίθενται διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις ΗΡβCD και λαμβάνονται οι αντίστοιχες απορροφήσεις στο υπεριώδες. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων σε ΗΡβCD ποικίλουν από 1,89×10⁻⁵ ως 1,51×10⁻² M. Η παρουσία της ΗΡβCD, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης των διαλυμάτων του ΟΧΑ στα φάσματα UV.



Σχήμα 1.4: Τμήμα φάσματος υπεριώδους-ορατού για το ΟΧΑ, σε εύρος 200-300 nm, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ΗΡβCD.

Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ του ΟΧΑ και της ΗΡβCD και η ισορροπία αποκατάστασης αυτού μπορεί να αποδοθεί σχηματικά: $OXA+ HP\beta CD \leftrightarrow OXA: HP\beta CD$

Η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου Kass ορίζεται:

 $K_{ass} = \frac{[OXA : HP\beta CD]}{[OXA] \cdot [HP\beta CD]}$

όπου [OXA], [HPβCD] και [OXA:HPβCD] αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις του OXA, της HPβCD και του μεταξύ τους συμπλόκου αντίστοιχα.

Η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου K_{ass}, υπολογίζεται με τη βοήθεια της εξίσωσης Scott's, απαραίτητη προϋπόθεση της οποίας είναι η δημιουργία 1:1 συμπλόκου. Η στοιχειομετρία του συμπλόκου όπως διαπιστώνεται και στη συνέχεια είναι 1:1, οπότε ισχύει η εξίσωση:

 $[HP\beta CD] / \Delta A = [HP\beta CD] / ([OXA] \times \Delta \varepsilon) + 1 / ([OXA] \times \Delta \varepsilon \times K_{ass})$ (1)

Το ΔΑ αντιπροσωπεύει κάθε φορά τη μεταβολή στην απορρόφηση του ΟΧΑ, που οφείλεται στην προσθήκη HPβCD σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (ΔΑ= Α_{HPβCD}-Α_{OXA}) και το Δε αντιπροσωπεύει τη διαφορά στη μοριακή απορροφητικότητα μεταξύ ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου ΟΧΑ.



Σχήμα 1.5: Γραφική απεικόνιση του λόγου της συγκέντρωσης της ΗΡβCD προς τη μεταβολή στην απορρόφηση του ΟΧΑ σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ΗΡβCD στα υδατικά διαλύματα του ΟΧΑ.

Εφόσον η γραφική παράσταση του όρου [ΗΡβCD] /ΔΑ σε συνάρτηση με τον όρο [ΗΡβCD] παρουσιάζει ευθύγραμμη σχέση, τότε η εξίσωση που την εκφράζει είναι:

 $[HP\beta CD]/\Delta A = slope [HP\beta CD] + intercept$

όπου ο όρος slope αναφέρεται στη κλίση της ευθείας και ο όρος intercept στην τομή της ευθείας της γραμμικής συσχέτισης των δεδομένων:

Από τη γραμμικότητα των δεδομένων (σχήμα 1.5) επιβεβαιώνεται η 1:1 στοιχειομετρία του συμπλόκου και η σταθερά σύνδεσης ή σχηματισμού του συμπλόκου μπορεί να υπολογιστεί από την ακόλουθη εξίσωση:

 $K_{ass} = (slope / intercept) \times 1000$ (2)

Η κλίση της ευθείας βρέθηκε ίση με 3,4479±0,1047 και η τομή ίση με 0,0013±0,0006. Επομένως, εφαρμόζοντας την εξίσωση 2, υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης του δημιουργούμενου συμπλόκου: K_{ass}=2,65×10⁶ M⁻¹.

1.1.3. Μελέτη της στοιχειομετρίας και της δομής του συμπλόκου οξολινικού οξέος:υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία NMR

Η μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου του ΟΧΑ και της ΗΡβCD πραγματοποιείται με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας NMR ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών κατά Job [184]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, καταγράφονται οι μεταβολές στη χημική μετατόπιση επιλεγμένων πρωτονίων του εγκλεισμένου μορίου ή του μεγαλομορίου, σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα και από το διάγραμμα που προκύπτει, προσδιορίζεται η στοιχειομετρία του δημιουργούμενου συμπλόκου. Για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος NMR 400 MHz.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων:</u>

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένοι διαλύτες D₂O και NaOD (20μl NaOD 10 % μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 2 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με D₂O). Όλες οι αραιώσεις έγιναν με μικροπιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου.

<u>Για το διάλυμα Α:</u> Ζυγίζονται 10,0 mg ΟΧΑ και μετατρέπονται σε μετά νατρίου άλας με 2 ml NaOD. Προκύπτει διάλυμα ΟΧΑ 1,9x10⁻² M.

<u>Για το διάλυμα G:</u> Zυγίζονται 57 mg HPβCD και διαλύονται σε 2 ml D₂O. Προκύπτει διάλυμα HPβCD 1,9x10⁻² M.

Από τα διαλύματα αυτά, παρασκευάζονται τα διαλύματα Β έως F αναμιγνύοντας τους όγκους που αναφέρονται στον πίνακα 1.3. Για την λήψη των φασμάτων 0,5 ml από κάθε διάλυμα μεταφέρονται σε σωληνάκια NMR.

Ακολουθεί η γνωστή διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου, η οποία έχει περιγραφεί νωρίτερα στο κεφάλαιο 1.1.1.

Πίνακας 1.3: Παρασκευή διαλυμάτων ΗΡβCD (A) και ΟΧΑ (G) για τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών.

Διάλυμα	Α	В	С	D	E	F	G
Α (μΙ)	500	400	300	250	200	100	0
G (μl)	0	100	200	250	300	400	500

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Λαμβάνονται τα φάσματα ¹Η-ΝΜR των διαλυμάτων διαφορετικών αναλογιών φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης Α ως και G και καταγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του φαρμάκου. Διαπιστώνεται ότι μεταβολή της χημικής μετατόπισης (Δδ ppm) υπάρχει τόσο στις κορυφές των πρωτονίων που αποδίδονται στο ΟΧΑ όσο και στις κορυφές των πρωτονίων που αποδίδονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, γεγονός που επιβεβαιώνει το σχηματισμό συμπλόκου εγκλεισμού.

Επιλέγεται στα φάσματα των διαλυμάτων Β έως F το πρωτόνιο του οποίου η κορυφή συντονισμού εμφανίζει τη μεγαλύτερη μεταβολή χημικής μετατόπισης, σε σύγκριση με το φάσμα διαλύματος καθαρού ΟΧΑ (Διάλυμα Α). Στη συνέχεια καταγράφονται οι μεταβολές αυτές σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα του ΟΧΑ. Τέλος, από το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών διαπιστώνεται η στοιχειομετρία του συμπλόκου.

Από τα πρωτόνια που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι δυνατόν να αξιολογηθεί εάν το μόριο του ΟΧΑ εισέρχεται στη κυλοδεξτρίνη, καθώς επίσης και εάν εισέρχεται από το ευρύ ή το στενότερο στόμιό της (με δεδομένο ότι η χημική μετατόπιση οφείλεται στον εγκλεισμό μορίου ΟΧΑ στην κοιλότητα της ΗΡβCD).

Πίνακας 1.4: Χημικές μετατοπίσεις της κορυφής του πρωτονίου Η-9 του ΟΧΑ στα διαλύματα Α έως F.

Διάλυμα	Α	В	С	D	E	F
H-9	7 3268	7 3725	7 4317	7 4642	7 4843	7 5474
δ (ppm)	.,0200	.,	.,	.,	.,	.,

Στον πίνακα 1.4, αναγράφονται αναλυτικά οι χημικές μετατοπίσεις της κορυφής του πρωτονίου Η-9 του ΟΧΑ για κάθε διάλυμα Β έως F που περιέχει κυκλοδεξτρίνη και για το διάλυμα καθαρού ΟΧΑ (Διάλυμα Α), καθώς το Η-9 είναι το πρωτόνιο του ΟΧΑ, που η κορυφή του εμφανίζει μεγαλύτερη μεταβολή χημικής μετατόπισης στα φάσματα πρωτονίου ¹Η NMR.

Από τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων του Η-9 του ΟΧΑ στα φάσματα πρωτονίου ¹Η NMR κατασκευάζεται το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών:





Από το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών (σχήμα 1.6) διαπιστώνεται ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου του ΟΧΑ και της HPβCD είναι 1:1, καθώς η μέγιστη μεταβολή παρατηρείται στο γραμμομοριακό κλάσμα 0,5.

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκριτικά τα φάσματα ¹Η-ΝΜR πρωτονίου των διαλυμάτων ΟΧΑ (Α), ΗΡβCD (G) και των μεταξύ τους μιγμάτων Β έως και F, που λαμβάνονται για τη κατασκευή του διαγράμματος των συνεχών μεταβολών.

Οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων του ΟΧΑ που εμφανίζουν μεγάλη μεταβολή χημικής μετατόπισης, εκτός του Η-9, είναι επιπλέον εκείνες που αποδίδονται στα Η-4. Μπορεί κατά συνέπεια να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι το ΟΧΑ (σχήμα 1. 1) εισέρχεται στην κυκλοδεξτρίνη από την πλευρά της μεθυλενοδιόξυ ομάδας.

Οι κορυφές των πρωτονίων της κυκλοδεξτρίνης που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μεταβολή χημικής μετατόπισης είναι εκείνες που αποδίδονται στα Η-5 της εσωτερικής

κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης και στα Η-6, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ΟΧΑ εισέρχεται στην κυκλοδεξτρίνη από το στενό στόμιό της, όπου βρίσκονται τα Η-5 και Η-6.



Σχήμα 1.7: Συγκριτικά φάσματα ¹Η-NMR πρωτονίου για το ΟΧΑ (Α), την ΗΡβCD (G) και των διαλυμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη αυτών (πίνακας 1.3).

Με την παρατήρηση των φασμάτων ¹Η NMR μιας διάστασης αποκαλύπτονται και κάποιες φασματικές ιδιαιτερότητες, οι οποίες αναφέρονται στο H-9 του ΟΧΑ και αφορούν τόσο στο σχήμα της κορυφής που αποδίδονται στο συγκεκριμένο πρωτόνιο όσο και στη συχνότητα συντονισμού του. Εκτιμάται πως, το πρωτόνιο H-9 επηρεάζεται ταυτόχρονα από τη συμπλοκοποίηση και την είσοδο του φαρμάκου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, αλλά και από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου που ακολούθως σχηματίζονται στη γειτονική του καρβονυλική ομάδα.



Σχήμα 1.8: Κορυφή πρωτονίου που αποδίδεται στο Η-9 του ΟΧΑ και εμφανίζεται ως μονή κορυφή στα 7,32 ppm.



Σχήμα 1.9: Κορυφή πρωτονίου που αποδίδεται στο Η-9 του ΟΧΑ και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή παρουσία ΗΡβCD από τα 7,46 ως τα 7,51 ppm.
Στο ελεύθερο ΟΧΑ το H-9 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 7,32 ppm (σχήμα 1.8). Αντίθετα, παρουσία της HPβCD το H-9 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή από τα 7,46 ως τα 7,51 ppm (σχήμα 1.9). Η μετατόπιση της κορυφής του H-9 σε χαμηλότερες τιμές πεδίου μπορεί να αποδοθεί στην μεταβολή του ηλεκτρονικού περιβάλλοντος του μορίου ως αποτέλεσμα του εγκλεισμού.

Ο συντονισμός του πρωτονίου Η-9 σε δύο διαφορετικές τιμές πεδίου μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η εναλλαγή του ΟΧΑ μεταξύ ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής είναι σχετικά αργή ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή και των δύο.

Η περεταίρω διερεύνηση της δομής του συμπλόκου έγινε με φασματοσκοπία ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY στο διάλυμα D του πίνακα 1.3, το οποίο περιέχει OXA και HPβCD σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Η μελέτη του φάσματος θα οδηγήσει σε συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του OXA και της HPβCD. Αναζητούνται πιθανές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων του φαρμάκου και των πρωτονίων που εντοπίζονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, οι οποίες θα στοιχειοθετούσαν τη δομή που προηγουμένως αναφέρθηκε. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις πράγματι παρατηρούνται, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.10 και επιβεβαιώνουν τις αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν.



<u>Σχήμα 1.10:</u> Τμήμα φάσματος δύο διαστάσεων ¹Η ROESY ΟΧΑ και ΗΡβCD σε D_2O .

Από τη μελέτη του φάσματος διαπιστώνεται αλληλεπίδραση των πρωτονίων Η-9 του μορίου του ΟΧΑ με τα πρωτόνια Η-6, Η-5 και Η-3 του μορίου της ΗΡβCD. Οι αλληλεπιδράσεις με τα πρωτόνια Η-3 και Η-5 της ΗΡβCD είναι ιδιαίτερα σημαντικές, αφού εντοπίζονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και κατά συνέπεια υποδηλώνουν την είσοδο του φαρμάκου σε αυτή και το σχηματισμό συμπλόκου εγκλεισμού.

Επιπρόσθετα παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων Η-4 και Η-6 του ΟΧΑ με τα ανωμερικά πρωτόνια Η-1 της ΗΡβCD. Η εγγύτητα των δύο μορίων επαληθεύει και πιστοποιεί την μεταξύ τους σύμπλεξη, αφού αυτή μόνο ερμηνεύει τη μεταξύ τους στενή επαφή.

Στο σχήμα 1.11 που ακολουθεί φαίνεται και η προτεινόμενη δομή του συμπλόκου.



Σχήμα 1.11: Πιθανή δομή του συμπλόκου του ΟΧΑ με την ΗΡβCD.

1.1.4. Μελέτη επίδρασης του σχηματισμού του συμπλόκου του οξολινικού οξέος και της υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης στη διαλυτότητα του οξολινικού οξέος

Μελετήθηκε στη συνέχεια η επίδραση του σχηματισμού των συμπλόκων στη διαλυτότητα του δραστικού συστατικού καθώς το ΟΧΑ είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτο στο νερό, γεγονός που δυσχεραίνει την παρασκευή σκευασμάτων. Για τη μελέτη της επίδρασης της συμπλοκοποίησης στη διαλυτότητα του ΟΧΑ εφαρμόστηκε η μέθοδος διαλυτότητας φάσεων, η οποία περιγράφεται από τους Higuchi & Connors [185].

Επίσης ελέγχεται η διαλυτότητα του ΟΧΑ σε κινητή φάση, διότι πρέπει να μελετηθεί κατά πόσο είναι δυνατή η καθίζηση του δραστικού συστατικού, κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας, στη συγκέντρωση που βρίσκεται στα δείγματα που ενίενται στο χρωματογραφικό σύστημα.

Προετοιμασία δειγμάτων

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς:

Ζυγίζονται 30,0 mg OXA και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Προστίθενται 120 μl διαλύματος NaOH 10%, για την μετατροπή του OXA σε μετά νατρίου άλας και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1,15x10⁻³ M (Διάλυμα ΔΦΑ, pH=9,6).

Ζυγίζονται 50,0 mg ΟΧΑ και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml. Προστίθενται 60 μl διαλύματος NaOH 10%, για την μετατροπή του ΟΧΑ σε μετά νατρίου άλας και αραιώνονται μέχρι χαραγής με H₂O καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 3,83x10⁻³ M (Διάλυμα ΔΦΒ, pH=9,6).

Από τα διαλύματα ΔΦΑ και ΔΦΒ προκύπτουν τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς ως εξής:

Από το διάλυμα ΔΦΑ με αραίωση 1 ml στα 50 ml προκύπτει το διάλυμα συγκέντρωσης ΔΦC₃=2,3x10⁻⁵ M.

Από το διάλυμα $\Delta \Phi C_3$ με αραιώσεις 1 ml στα 10 ml και 5 ml στα 10 ml προκύπτουν τα διαλύματα συγκεντρώσεων $\Delta \Phi C_1 = 0.23 \times 10^{-5}$ M και $\Delta \Phi C_2 = 1.15 \times 10^{-5}$ M της καμπύλης αναφοράς αντίστοιχα.

Από το διάλυμα ΔΦΒ με αραίωση 1 ml στα 50 ml προκύπτει το διάλυμα συγκέντρωσης ΔΦC₇=7,66x10⁻⁵ M.

Από το διάλυμα $\Delta \Phi C_7$ με αραιώσεις 5 ml στα 10 ml, 4 ml στα 10 ml και 3 ml στα 5 ml προκύπτουν τα διαλύματα συγκεντρώσεων $\Delta \Phi C_5$ =3,80x10⁻⁵ M, $\Delta \Phi C_4$ =3,06x10⁻⁵ M και $\Delta \Phi C_6$ =4,60x10⁻⁵ M της καμπύλης αναφοράς αντίστοιχα.

Πίνακας 1.5: Συγκεντρώσεις διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς.

OXA	ΔΦC1	ΔΦC ₂	ΔΦC ₃	ΔΦC₄	ΔΦС₅	ΔΦС ₆	ΔΦC ₇
C (x10⁻⁵) M	0,23	1,15	2,30	3,06	3,80	4,60	7,66



Σχήμα 1.12: Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε από τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς.

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:

Επιφάνεια κορυφής = 785723 x ($C_{oxolinic \ acid}$) - 82224, όπου R²=0,9998

Παρασκευή διαλυμάτων πειράματος διαλυτότητας:

Ζυγίζονται 6 φορές από περίπου 0,007 gr OXA (πίνακας 1.6) και μεταφέρονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια των 130 ml.

Πίνακας 1.6: Μίγματα ΟΧΑ (σε περίσσεια) και ΗΡβCD σε νερό ή κινητή φάση. Συγκέντρωση ΟΧΑ που προδιορίζεται στους 30 °C.

		OXA (gr)	[CD] (%) w/v	[OXA] x10 ⁻⁵ M
	ΔΦΟΑ ₁	0,0071	0	1,9123
Νερό	ΔΦΟΑ ₂	0,0070	0,01	2,4476
Νερό	ΔΦΟΑ ₃	0,0069	0,10	6,5487
	ΔΦΟΑ ₄	0,0069	0	11,9252
Κινητή φάση	ΔΦΟΑ ₅	0,0070	0,01	12,7392
	ΔΦΟΑ ₆	0,0070	0,10	22,1068

Τα δείγματα ΔΦΟΑ₁₋₆ προκύπτουν ως εξής:

Στο δείγμα ΔΦΟΑ₁ προστίθενται 10 ml H₂O καθαρότητας HPLC.

Στο δείγμα ΔΦΟΑ2 προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος 0,01% w/v HPβCD.

Στο δείγμα ΔΦΟΑ₃ προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος 0,1% w/v HPβCD.

Στο δείγμα ΔΦΟΑ₄ προστίθενται 10 ml κινητής φάσης.

Στο δείγμα ΔΦΟΑ₅ προστίθενται 10 ml κινητής φάσης που περιέχει 0,01% w/v HPβCD. Στο δείγμα ΔΦΟΑ₆ προστίθενται 10 ml κινητής φάσης που περιέχει 0,1% w/v HPβCD.

Τα φιαλίδια αφού αριθμηθούν σφραγίζονται καλά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, όπου ανακινούνται για 2 ημέρες, προστατευμένα από τη φωτεινή ακτινοβολία, σε σταθερή θερμοκρασία 30 °C. Τη τρίτη ημέρα διακόπτεται η ανακίνηση και τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 2 ώρες. Ακολούθως λαμβάνονται 400 μl από κάθε δείγμα με μικροπιπέτα και διηθούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα με τη βοήθεια υάλινης σύριγγας στην οποία έχουν προσαρμοστεί φίλτρα Acrodisc 4 mm με 0,45 μm Nylon Membrane. Από το διηθημένο δείγμα λαμβάνονται 200 μl με μικροπιπέτα και υποβάλλονται σε κατάλληλη με 500 μl H₂O καθαρότητας HPLC ή κινητή φάση. Τόσο τα σκεύη όσο και το νερό ή η κινητή φάση που χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων θα πρέπει να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία με τα δείγματα (δηλαδή στους 30 °C). Τα δείγματα που λαμβάνονται κατ' αυτόν τον τρόπο αναλύονται χρωματογραφικά με τη μέθοδο ΟΧΑ₃₄, που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.1.

Συμπεράσματα

Η διαλυτότητα του ΟΧΑ στους 30 °C βελτιώνεται σημαντικά με τη συμπλοκοποίηση. Η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης κυκλοδεξτρίνης στα αρχικά δείγματα οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της διαλυτότητας του ΟΧΑ, ανεξάρτητα από το αν η αρχική αραίωση πραγματοποιήθηκε σε H₂O καθαρότητας HPLC ή σε κινητή φάση.





Έτσι, με την προσθήκη 0,1% w/v HPβCD τριπλασιάζεται η συγκέντρωση του ΟΧΑ στο διάλυμα σε νερό, όπως φαίνεται από το σχήμα 1.13.



Σχήμα 1.14: Γραφική παράσταση των συγκεντρώσεων του ΟΧΑ στα διαλύματα κινητής φάσης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ΗΡβCD στους 30 °C.

Αντίστοιχη αλλά μικρότερη αύξηση διαλυτότητας παρατηρείται στο διάλυμα σε κινητή φάση, όπου η συγκέντρωση του ΟΧΑ διπλασιάζεται με την προσθήκη 0,1% w/v ΗΡβCD (σχήμα 1.14).

1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα σύμπλοκα της κυπροφλοξακίνης (CIP) με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (MalβCD), τη β-κυκλοδεξτρίνη (βCD), τη gpsp+NAcGluOHNH₂ και τη bpsp+GalOHNH₂. Η μελέτη των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία NMR είτε με Φασματοσκοπία MS.

1.2.1. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη

Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία ¹Η NMR. Παρασκευάστηκε το σύμπλοκο της CIP με τη MalβCD σε D₂O.



Σχήμα 1.15: Χημικός τύπος CIP

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται απόδοση κορυφών για τη CIP.

Πίνακας 1.7: Απόδοση κορυφών σε φάσματα ¹Η NMR διαλύματος 1,5x10⁻³ M CIP σε D₂O.

Πρωτόνιο	δ (ppm)
H-2	8,4101 (s, 1H)
H-5	7,3007 (d, 1H, J≈12,9 Hz)
H-8	7,2455 (d, 1H, J≈7,3 Hz)
H-9	3,5087-3,3298 (m, 1H)
H-10,11 cis	1,0057 (m, 2H)
H-10,11 trans	1,2384 (m, 2H)



<u>Σχήμα 1.16:</u> Χημικός τύπος MalβCD.

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται απόδοση κορυφών για τη MalβCD [186-187].

Πίνακας 1.8: Απόδοση κορυφών σε φάσματα	¹ Η NMR διαλύματος 1	,5x10 ⁻³ M MalβCD
σε D ₂ O.		

Πρωτόνιο	δ (ppm)
H-1	5,1916 (d, J≈3,8)
H-2	3,4895-3,3426 (m)
H-3, B	3,8374-3,7760 (m)
H-3, A	3,8374-3,8135 (m)
H-3, C	3,7896-3,7760 (m)
H-4 C+A	3,4895-3,3426 (m)
H-4, B	3,2237 (t, J≈8,4 Hz)
H-5 A+B	3,6887-3,6437 (m)
H-5, C	3,8796-3,8447 (m)
H-6 A+B	3,6887-3,6437 (m)
H-6 C	3,7516-3,7197(m)

όπου Α: μόριο της γλυκόζης που συνδέεται απευθείας με τη κυκλοδεξτρίνη, Β: μόριο της γλυκόζης που συνδέεται με τη γλυκόζη Α και C: μόρια της γλυκόζης που συνθέτουν το δακτύλιο της κυκλοδεξτρίνης.

1.2.1.1. Παρασκευή του συμπλόκου της κυπροφλοξακίνης με τη μαλτοζυλο-βκυκλοδεξτρίνη

Το σύμπλοκο παρασκευάζεται με διαφορετικές μεθόδους, οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια. Στο τέλος, μετά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων, επιλέγεται από αυτές η μέθοδος, η οποία είναι ταχύτερη, είναι εφικτή η εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία και ταλαιπωρεί λιγότερο το δείγμα μας, προς αποφυγή της καταστροφής του.

Παρασκευάζεται μίγμα CIP και MalβCD 1:1 σε συγκέντρωση 3,62x10⁻² M ως εξής: 7,0 mg (1,81x10⁻⁵ mol) CIP (MB 385,82) και 29,5 mg (1,81x10⁻⁵ mol) MalβCD (MB 1629,45), μεταφέρονται σε σωληνάκι NMR και αραιώνονται με 500 μl D₂O. Η συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο τελικό μίγμα που προκύπτει θα είναι 3,62x10⁻² M. <u>Μέθοδος α:</u> Το μίγμα αυτό τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες προς ανακίνηση σε υδατόλουτρο σταθερών θερμοκρασιών στους 30° C. Το μίγμα ελέγχεται φασματοσκοπικά μετά την απλή ανάμιξη, όπου δεν προκύπτουν μετατοπίσεις και αποδεικνύεται ότι με την απλή ανάμιξη δεν παρατηρείται συμπλοκοποίηση. Ελέγχεται μετά από τρεις ώρες, τρία εικοσιτετράωρα, έξι και εννέα εικοσιτετράωρα ανακίνησης, οπότε διαπιστώνεται ότι μετά από τα τρία εικοσιτετράωρα ανακίνησης στους 30° C, οι όποιες μετατοπίσεις σταθεροποιούνται και δεν παρατηρούνται νέες. Επομένως θεωρούμε ότι η ισορροπία έχει αποκατασταθεί και η σύμπλεξη έχει ολοκληρωθεί.

<u>Μέθοδος β</u>: Ακολούθως παρασκευάζονται εκ νέου διαλύματα CIP, MalβCD και του μεταξύ τους συμπλόκου 1:1 σε συγκέντρωση 3,62x10⁻² Μ. Τα διαλύματα αυτά τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες και ανακινούνται στους 60° C για ένα, δύο και τρία εικοσιτετράωρα, οπότε λαμβάνεται και πάλι το σύμπλοκο στα τρία εικοσιτετράωρα.

<u>Μέθοδος γ</u>: Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης χρησιμοποιείται στην παρασκευή συμπλόκων, διότι με τη βαθειά κατάψυξη και την εφαρμογή κενού ευνοείται η σύμπλεξη. Η παρασκευή των συμπλόκων πραγματοποιείται με τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης, σε μια προσπάθεια βελτίωσης του αποτελέσματος. Έτσι, 500 μl από υδατικό διάλυμα (3,62x10⁻² M) μεταφέρεται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες των 4 ml και ανακινούνται στους 30° C για τρία εικοσιτετράωρα, για την παρασκευή του συμπλόκου. Παράλληλα υδατικά διαλύματα ελεύθερης CIP και ελεύθερης MalβCD (3,62x10⁻² M) υπόκεινται στην ίδια διαδικασία λυοφιλοποίησης για να έχουμε συγκριτικά δεδομένα. Στη συνέχεια τα τρία διαλύματα καταψύχονται στους -30° C. Τα κατεψυγμένα δείγματα λυοφιλοποιόνται

στους -50° C. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αναδιαλύονται σε 500μl D₂O το καθένα. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος έδειξε ότι το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με αυτό που επιτυγχάνεται με την μέθοδο α.

<u>Μέθοδος δ</u>: Η παρασκευή των συμπλόκων πραγματοποιείται με απευθείας λυοφιλοποίηση των δειγμάτων. Τα διαλύματα καταψύχονται στους -30° C και τα κατεψυγμένα δείγματα λυοφιλοποιούνται στους -50° C, χωρίς προηγούμενη κατεργασία. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος έδειξε ότι το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με αυτό που επιτυγχάνεται με την μέθοδο α.

Τα διαλύματα που προορίζονται για λυοφιλοποίηση παρασκευάζονται σε νερό καθαρότητας HPLC και στη συνέχεια η σκόνη που παραλαμβάνεται διαλύεται σε D₂O. Τα υπόλοιπα παρασκευάζονται σε D₂O.

Συγκρίνονται τα φάσματα ¹Η NMR των παραπάνω δειγμάτων με φάσματα ελεύθερης CIP και ελεύθερης MalβCD. Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται δείχνουν τη σύμπλεξη. Οι μεταβολές αυτές παρατηρούνται σε όλα τα δείγματα που έχουν ελεγχθεί.

Στη συνέχεια, για την παρασκευή των συμπλόκων επιλέγεται η ηπιότερη μέθοδος, που ταλαιπωρεί λιγότερο το δείγμα και είναι η μέθοδος δ. Η αμέσως επόμενη είναι η μέθοδος α.

Φάσματα πριν και μετά τη διαδικασία σύμπλεξης όπως επίσης και οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται σε κορυφές συντονισμού, αναφέρονται αναλυτικά στην ενότητα 1.2.1.3 (πίνακας 1.10).

1.2.1.2. Επιβεβαίωση σχηματισμού και χαρακτηρισμός του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία NMR

Στη συνέχεια, από τα δείγματα που προέκυψαν με τη μέθοδο α, λαμβάνεται φάσμα δύο διαστάσεων ROESY των πρωτονίων του διαλύματος. Η μελέτη του φάσματος θα οδηγήσει σε συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της CIP και της MalβCD.

Διερευνάται η ύπαρξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτονίων του φαρμάκου και των πρωτονίων που εντοπίζονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Η διαπίστωση αυτών θα πιστοποιούσε τη δημιουργία συμπλόκου. Όπως φαίνεται και στο τμήμα φάσματος που παρουσιάζεται στο σχήμα 1.11 πράγματι διαπιστώνονται αλληλεπιδράσεις και επιβεβαιώνεται η δημιουργία συμπλόκου. Διαπιστώνεται κορυφή διασταύρωσης, μεταξύ των πρωτονίων H-10 και H-11 (1,11 και 1,37 ppm) της κυκλοπροπυλο ομάδας του μορίου της CIP με τα πρωτόνια H-2 (3,65-3,53 ppm) του μορίου της MalβCD. Επίσης παρατηρούνται αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-2, H-3 (3,91-3,85 ppm) και H-4 (3,49-3,41 ppm) του μορίου της MalβCD με τα πρωτόνια H-2 (8,45 ppm), H-5 (7,36 ppm) και H-8 (7,24 ppm), του κινολινικού δακτυλίου του μορίου της CIP, οι οποίες υποδεικνύουν την εγγύτητα των δύο μορίων και εφόσον οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται και με τα εσωτερικά πρωτόνια της κυκλοδεξτρίνης H-3, επιβεβαιώνουν τον εγκλεισμό του μορίου.

Εμφανείς είναι και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων Η-2, Η-5 και Η-8 με τα πρωτόνια Η-11 και Η-12 του μορίου της CIP, οι οποίες αποδίδονται στη δημιουργία διμερών μεταξύ των μορίων της CIP.





Σχήμα 1.11: Φάσμα ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY CIP και MalβCD (3,62x10⁻² M) σε D₂O και τμήματα του φάσματος με τις εστιασμένες περιοχές, όπου παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις.

1.2.1.3. Μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία NMR

Η μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου CIP και MalβCD πραγματοποιείται με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας NMR ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών κατά Job σε διαλύτη μίγμα D₂O/DMSOd₆ σε αναλογία 1,5:1.

Παρασκευή διαλυμάτων:

Διάλυμα C: Ζυγίζονται 100,9 mg CIP και διαλύονται σε 10 ml D₂O. Προκύπτει διάλυμα CIP 2,6x10⁻² M.

<u>Διάλυμα M:</u> Ζυγίζονται 211,9 mg MalβCD και διαλύονται σε 5 ml D₂O. Προκύπτει διάλυμα MalβCD 2,6x10⁻² M.

Από τα διαλύματα αυτά, παρασκευάζονται τα διαλύματα CM1 έως CM10 αναμιγνύοντας τους όγκους που αναφέρονται στον πίνακα 1.9. Για την λήψη των φασμάτων τα διαλύματα CM μεταφέρονται σε σωληνάκια NMR.

Πίνακας 1.9: Περιγραφή παρασκευής των διαλυμάτων CM από αναμίξεις των διαλυμάτων C (CIP) και M (MalβCD).

Δ/μα	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7	CM8	CM9	CM10
C (µl)	600	500	450	400	350	300	250	200	100	0
Μ (μl)	0	100	150	200	250	300	350	400	500	600

Τα φάσματα ¹Η NMR των διαλυμάτων διαφορετικών αναλογιών φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης μελετώνται και καταγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του φαρμάκου, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον πίνακα 1.10.

Πίνακας 1.10: Μεταβολές χημικής μετατόπισης (Δδ) των κορυφών των πρωτονίων της CIP μεταξύ των διαλυμάτων CM1 και CM6 (πίνακας 1.9).

Διάλυμα	H-2	H-5	H-8	H-9	H-10,11 cis	H-10,11 trans
Δδ (CM6- CM1)	0 1038	0 0919	0.0826	0 0293	0 0133	-0 0089
ppm	0,1000	0,0010	0,0020	0,0200	0,0100	0,0000

Διαπιστώνεται ότι μεταβολή της χημικής μετατόπισης Δδ (ppm) υπάρχει τόσο στις κορυφές των πρωτονίων που αποδίδονται στη CIP όσο και στις κορυφές των πρωτονίων που αποδίδονται στην MalβCD.

Είναι γνωστό ότι η CIP σχηματίζει διμερή σε υδατικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεγάλες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα φάσματα των μιγμάτων να παρατηρείται αντιστάθμιση των μεταβολών οι οποίες αναμένονται από τον εγκλεισμό της CIP στο μεγαλομόριο. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές αποτελούν το αλγεβρικό άθροισμα των μεταβολών, που συνεπάγονται από τον εγκλεισμό και από τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για την στοιχειομετρία του συμπλόκου.



Σχήμα 1.12: Φάσμα ¹Η NMR MalβCD και του συμπλόκου της με CIP (διάλυμα CM6, 1,81x10⁻² M), με εστίαση στην περιοχή όπου παρατηρείται διαφοροποίηση στο φάσμα της MalβCD στο σύμπλοκο.

Επιλέγεται στα φάσματα των διαλυμάτων CM, η κορυφή του αποδίδεται στο πρωτόνιο H-2 της CIP και υπολογίζεται η μεταβολή χημικής μετατόπισής του σε κάθε διάλυμα σε συνάρτηση με το διάλυμα CM1 που δεν περιέχει κυκλοδεξτρίνη.

Η χημική μετατόπιση των πρωτονίων της CIP οφείλεται σε δύο διαφορετικά φαινόμενα. Το πρώτο είναι ο εγκλεισμός του φαρμάκου στη κυκλοδεξτρίνη και η δημιουργία συμπλόκου και το δεύτερο είναι ο σχηματισμός μοριακών διμερών ανάλογα με τη συγκέντρωση της CIP.

Προς επιβεβαίωση όλων όσων αναφέρθηκαν, παρασκευάζεται μία δεύτερη σειρά διαλυμάτων C1 έως C9, που περιέχουν μόνο CIP (πίνακας 1.11), σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές των διαλυμάτων CM (πίνακας 1.9).

Πίνακας 1.11: Περιγραφή παρασκευής των διαλυμάτων C1 έως C9 της καμπύλης αναφοράς για τη CIP, από αναμίξεις του διαλύματος C (CIP) και διαλύματος D₂O.

Διάλυμα	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
C (µl)	200	250	300	320	350	380	400	420	440
D ₂ Ο (μl)	400	350	300	280	250	220	200	180	160

Αναμένεται ότι με τον τρόπο αυτό θα προσδιοριστεί η μεταβολή χημικής μετατόπισης των πρωτονίων στα διαλύματα C1 έως C10, η οποία θα οφείλεται αποκλειστικά στα φαινόμενα αυτοοργάνωσης της CIP.

Στη συνέχεια, με βάση τη μετατόπιση της κορυφής του H-2 σε κάθε διάλυμα σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση κατασκευάζεται η αντίστοιχη ευθεία.

Η μεταβολή της μετατόπισης της κορυφής του H-2 που οφείλεται στη μεταβολή της συγκέντρωσης για κάθε διάλυμα CM1 έως CM10 υπολογίζεται από τη συνάρτηση της ευθείας που προκύπτει και στη συνέχεια αφαιρείται από τη συνολική μεταβολή της χημικής μετατόπισης που παρατηρείται στο προηγούμενο πείραμα μετά τη σύμπλεξη. Η διαφορά στη χημική μετατόπιση που προκύπτει, θα οφείλεται μόνο στο φαινόμενο του εγκλεισμού και με βάση τις τιμές αυτές κατασκευάζεται το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών.

Λαμβάνονται τα φάσματα ¹Η NMR των διαλυμάτων (πίνακας 1.9) αμέσως μετά την παρασκευή αυτών (σχήμα 1.13), μετά από τρεις ώρες ανακίνησης (σχήμα 1.14) και μετά από τρεις ημέρες ανακίνησης (σχήμα 1.15) σε σταθερή θερμοκρασία στους 30 °C και κατασκευάζονται σε κάθε περίπτωση το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών. Από τα διαγράμματα αυτά αναμένεται να διαπιστωθεί η στοιχειομετρία του συμπλόκου.

Από το παρακάτω διάγραμμα (σχήμα 1.13) που προκύπτει στην πρώτη περίπτωση δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη στοιχειομετρία του συμπλόκου μεταξύ της CIP και της MalβCD. Αυτό θεωρείται αναμενόμενο εφόσον τα διαλύματα δεν έχουν υποστεί τη διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου. Φαίνεται πως η απλή ανάμιξη των δύο μορίων δεν οδηγεί απευθείας σε εγκλεισμό της CIP στη MalβCD.



Σχήμα 1.13: Διάγραμμα συνεχών μεταβολών με φασματοσκοπία ¹Η NMR. Δδ του Η-2 της CIP σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα της CIP αμέσως μετά τη παρασκευή των διαλυμάτων CIP:MalβCD CM₁₋₁₀.

Ακολουθεί η διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου με ανακίνηση για τρεις ώρες. Από το αντίστοιχο διάγραμμα που προκύπτει, συμπεραίνεται ότι ο χρόνος ανακίνησης δεν είναι επαρκής για τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης, κατά συνέπεια το διάγραμμα του σχήματος 1.14 δεν οδηγεί σε αξιόπιστα συμπεράσματα για τη στοιχειομετρία του δημιουργούμενου συμπλόκου.



Σχήμα 1.14: Διάγραμμα συνεχών μεταβολών με φασματοσκοπία ¹Η NMR. Δδ του Η-2 της CIP σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα της CIP μετά από τρεις ώρες ανακίνησης σε σταθερή θερμοκρασία των διαλυμάτων CIP:MalβCD CM₁₋₁₀.

Ακολουθεί η τρίτη διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου, δηλαδή με ανακίνηση επί τρεις ημέρες και στη συνέχεια γίνεται η φασματοσκοπική καταγραφή των δεδομένων που παρατηρούνται (σχήμα 1.15).



Σχήμα 1.15: Διάγραμμα συνεχών μεταβολών με φασματοσκοπία ¹Η NMR. Δδ του Η-2 της CIP σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα της CIP μετά από τρεις μέρες ανακίνησης σε σταθερή θερμοκρασία των διαλυμάτων CIP:MalβCD CM₁₋₁₀.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα των συνεχών μεταβολών δεν υπάρχει εμφανές μέγιστο, επομένως η στοιχειομετρία του συμπλόκου MalβCD και CIP δεν δύναται να προβλεφθεί από τη μέθοδο που ακολουθήθηκε.

Μελέτη στοιχειομετρίας σε μίγματα DMSOd₆/D₂O

Η παρουσία του διαλύτη DMSOd₆ δύναται να οδηγήσει σε διάνοιξη των διμερών. Κατά συνέπεια το πρόβλημα που περιγράφεται στα προηγούμενα πειράματα αντιμετωπίστηκε με την προσθήκη DMSOd₆ στο υδατικό διάλυμα σε κατάλληλη συγκέντρωση, η οποία υπολογίστηκε πειραματικά.

Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου CIP και MalβCD με τη βοήθεια Φασματοσκοπίας NMR ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών σε μίγματα DMSOd₆/D₂O, εφόσον οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις θα οφείλονται πλέον στη μία παράμετρο, δηλαδή τον εγκλεισμό στην κυκλοδεξτρίνη και αναμένεται να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα.

Σε προκαταρκτικά πειράματα διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη DMSOd₆ στα διαλύματα D₂O, θα είχε κάποιο αποτέλεσμα αντισταθμιστικό, σε ότι αφορά στο γεγονός της μετατόπισης των κορυφών που προκύπτει από φαινόμενα αυτοοργάνωσης. Οι κορυφές επανέρχονται στα σημεία που βρίσκονται στα αραιά διαλύματα.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων:</u>

<u>Πυκνό διάλυμα CIP Σ</u>: Ζυγίζονται 135,1 mg CIP και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα CIP 7,0×10⁻² M.

<u>Πυκνό διάλυμα MalβCD M:</u> Ζυγίζονται 569,5 mg MalβCD και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα MalβCD 7,0×10⁻² M.

Από το πυκνό διάλυμα CIP παρασκευάζονται τα διαλύματα Σ1, Σ2 και Σ3, τα οποία έχουν σταθερή συγκέντρωση CIP, αλλά περιέχουν διαφορετική ποσότητα DMSOd₆. Το διάλυμα Σ1 δεν περιέχει καθόλου DMSOd₆. Στη συγκέντρωση που επιλέγεται, τα μόρια της CIP δύνανται να σχηματίσουν διμερή.



<u>Σχήμα 1.16:</u> Τμήμα φασμάτων ¹H NMR των διαλυμάτων Σ1 (4,1×10⁻² M, απουσία DMSOd₆), Σ2 (4,1×10⁻² M, 15,55 % DMSOd₆), Σ3 (4,1×10⁻² M, 23,64 % DMSOd₆) και Σ4 (5,1×10⁻³ M, απουσία DMSOd₆) σε μίγμα D₂O/ DMSOd₆.

Ταυτόχρονα παρασκευάζεται και ένα αραιότερο διάλυμα CIP Σ4 (5,1×10⁻³ M), σε συγκέντρωση αρκετά χαμηλή. Η παρασκευή των διαλυμάτων περιγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 1.12. Από τη σύγκριση των φασμάτων Σ1 και Σ4 που δεν περιέχουν DMSOd₆ (σχήμα 1.16) διακρίνεται ότι στο πυκνότερο διάλυμα Σ1, οι κορυφές που αποδίδονται στα H-5, H-8 και H-2 του κινολινικού δακτυλίου της CIP μετατοπίζονται σε υψηλότερες τιμές πεδίου από ότι στο αραιότερο διάλυμα Σ4, γεγονός που αποδίδεται στη θωράκιση των πρωτονίων από φαινόμενα αυτοοργάνωσης του μορίου της CIP. Με κάθε προσθήκη ποσότητας DMSOd₆ στα διαλύματα Σ2 και Σ3 που περιέχουν ίδια

συγκέντρωση CIP με το διάλυμα Σ1, αποκαλύπτεται ότι οι παραπάνω κορυφές διανύουν αντίστροφη πορεία, από αυτή του διαλύματος Σ1.

Πίνακας 1.12: Περιγραφή παρασκευής των διαλυμάτων CIP σε D₂O, παρουσία και απουσία DMSOd₆. Διάλυμα Σ=CIP (7,0×10⁻² M).

Διάλυμα	Σ (μΙ)	DMSOd ₆ (µl)	D ₂ Ο (μl)	Συγκέντρωση CIP (M)	% DMSOd ₆
Σ1	320	0	230	4,1×10 ⁻²	0
Σ2	320	80	150	4,1×10 ⁻²	15,55
Σ3	320	130	100	4,1×10 ⁻²	23,64
Σ4	40	0	510	5,1×10 ⁻³	0

Από τα φάσματα ¹Η NMR των διαλυμάτων Σ1 έως Σ3 κατασκευάζεται η γραφική παράσταση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του Η-8 σε συνάρτηση με τον περιεχόμενο όγκο DMSOd₆ στα διαλύματα.



Σχήμα 1.17: Χημική μετατόπιση δ του Η-8 της CIP σε συνάρτηση με τον όγκο DMSOd₆ (σε μΙ) σε διάλυμα D₂O συνολικού όγκου 550 μΙ.

Η γραφική απεικόνιση της χημικής μετατόπισης δ του Η-8 της CIP σε συνάρτηση με τη προστιθέμενη ποσότητα DMSOd₆ δίνει ευθεία γραμμή και χαρακτηρίζεται από την εξίσωση:

```
δ (H-8) = 0,0017 × (V<sub>DMSOd6</sub>) + 7,0234, όπου R<sup>2</sup>=0,9995
```

Από την χημική μετατόπιση δ του Η-8 της CIP στο φάσμα ¹Η NMR του διαλύματος Σ4 και υπολογίζεται με τη βοήθεια της ανωτέρω εξίσωσης ο όγκος του

DMSOd₆ που πρέπει να προστεθεί στα διαλύματα προκειμένου να μην υπάρχει μετατόπιση που να μπορεί να αποδοθεί στη δημιουργία μοριακών διμερών.

Ο όγκος DMSOd₆ που απαιτείται για τη διάσταση των μοριακών διμερών υπολογίζεται σε 210 μl στα 550 μl δείγματος, δηλαδή 38,18 %. Η αναλογία του μίγματος των διαλυτών D₂O/DMSOd₆ που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα του πειράματος συνεχών μεταβολών θα είναι 1,5/1 ή 39,62 %, δηλαδή το DMSOd₆ προστέθηκε σε μικρή περίσσεια.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται νέα σειρά διαλυμάτων, όπως περιγράφεται στον πίνακα 1.13.

Πίνακας 1.13: Περιγραφή παρασκευής των διαλυμάτων CIP και MalβCD, σε μίγμα D₂O/ DMSOd₆ σε αναλογία 1,5:1. Διάλυμα Σ=CIP (7,0×10⁻² M).

Διάλυμα	ΣM1	ΣM 2	ΣM 3	ΣM 4	ΣΜ 5	ΣΜ 6	ΣM7
Σ (μΙ)	0	40	80	120	160	240	320
Μ (μl)	320	280	240	200	160	80	0
DMSOd ₆ (µI)	210	210	210	210	210	210	210

Λαμβάνονται τα φάσματα ¹Η NMR των διαλυμάτων ΣΜ1 έως και ΣΜ7 και κατασκευάζεται το διάγραμμα των συνεχών μεταβολών (σχήμα 1.18).



Σχήμα 1.18: Διάγραμμα συνεχών μεταβολών με φασματοσκοπία ¹Η NMR σε μίγμα D₂O/DMSOd₆ σε αναλογία 1,5:1. Δδ του H-2 της CIP σε συνάρτηση με το γραμμομοριακό κλάσμα της CIP.



<u>Σχήμα 1.19:</u> Τμήμα φασμάτων ¹Η NMR των διαλυμάτων CIP και MalβCD ΣM1-7 σε μίγμα D₂O/ DMSOd₆ σε αναλογία 1,5:1.

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου είναι 1:1, όπως φαίνεται και από το σχήμα 1.18, καθώς η μεγαλύτερη μετατόπιση αντιστοιχεί στο διάλυμα ΣΜ5, όπου η αναλογία φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης είναι 1:1.

1.2.2 Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη β-κυκλοδεξτρίνη

Αρχικά παρασκευάστηκε το σύμπλοκο της CIP με την βCD και ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του. Πραγματοποιήθηκε μελέτη ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY σε διάλυμα CIP και βCD σε μοριακή αναλογία 1:1 και διαπιστώθηκαν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ τους.

Η δημιουργία συμπλόκου επιβεβαιώθηκε σε διάλυμα CIP και βCD σε μοριακή αναλογία 1:1 με Φασματοσκοπία Μάζας (MS).

1.2.2.1. Παρασκευή του συμπλόκου της κυπροφλοξακίνης με τη β-κυκλοδεξτρίνη

Παρασκευάζεται διάλυμα CIP και βCD με μοριακή αναλογία 1:1. Ζυγίζονται 3,5 mg (9,07x10⁻⁶ mol) CIP (MB 385,82) και 10,2 mg (8,99x10⁻⁶ mol) βCD (MB 1135),

μεταφέρονται σε σωληνάκι NMR και αραιώνονται με 500 μl D₂O. Η συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο τελικό μίγμα που προκύπτει θα είναι 1,8x10⁻² M.

Το σύμπλοκο της CIP με τη βCD δημιουργείται είτε ακολουθώντας τη μέθοδο της ανακίνησης σε υδατόλουτρο σταθερών θερμοκρασιών είτε ακολουθώντας τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, όπως αποδεικνύεται με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και μάζας αντίστοιχα.

<u>Μέθοδος α</u>: Αρχικά το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες, ακολουθεί ανακίνηση για τρεις ημέρες σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας στους 30 °C, ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες και να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου της CIP με τη βCD.

<u>Μέθοδος β</u>: Για τη λήψη του συμπλόκου με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο. Στη συνέχεια τοποθετείται για ανακίνηση σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας στους 30 °C. Την τέταρτη μέρα το δείγμα καταψύχεται και ακολούθως λυοφιλοποιείται στους -50 °C υπό κενό. Το λυοφιλοποιημένο δείγμα, το οποίο λαμβάνεται επαναδιαλύεται, οπότε λαμβάνεται το διάλυμα του συμπλόκου. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος έδειξε ότι το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με αυτό που επιτυγχάνεται με την μέθοδο α.

<u>Μέθοδος γ</u>: Η παρασκευή των συμπλόκων πραγματοποιείται με απευθείας λυοφιλοποίηση των δειγμάτων. Τα διαλύματα καταψύχονται στους -30° C και τα κατεψυγμένα δείγματα λυοφιλοποιούνται στους -50° C, χωρίς προηγούμενη κατεργασία. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος έδειξε ότι το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με αυτό που επιτυγχάνεται με την μέθοδο α.

Στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν και οι τρεις τρόποι για τη παρασκευή των συμπλόκων της CIP με διάφορες κυκλοδεξτρίνες.

1.2.2.2. Επιβεβαίωση σχηματισμού και χαρακτηρισμός του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και β-κυκλοδεξτρίνης με φασματοσκοπία NMR

Λαμβάνεται αρχικά το φάσμα ¹Η NMR του παραπάνω διαλύματος. Στη συνέχεια λαμβάνεται φάσμα ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY των πρωτονίων του διαλύματος.

Στόχος είναι η αναζήτηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτονίων του φαρμάκου και των πρωτονίων που εντοπίζονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης [188] και θα συνεπάγονταν της δημιουργίας του συμπλόκου. Τέτοιες

αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.20 και επιβεβαιώνουν τη δημιουργία συμπλόκου.



<u>Σχήμα 1.20:</u> Τμήμα φάσματος ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY CIP και βCD (1,8x10⁻² M) σε D₂O.

Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνεται αλληλεπίδραση των πρωτονίων H-8 του μορίου της CIP (σχήμα 1.15) με τα πρωτόνια H-5, H-6 και H-3 του μορίου της βCD. Τα πρωτόνια H-3 και H-5 εντοπίζονται στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-2 και H-4 του μορίου της βCD με τα πρωτόνια H-5 και H-8 του μορίου της CIP, αποκαλύπτουν τη γειτνίαση των δύο μορίων. Οι αλληλεπιδράσεις όμως με το H-3 της βCD επιβεβαιώνουν τη συμπλοκοποίηση.

1.2.2.3. Μελέτη της στοιχειομετρίας του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και βκυκλοδεξτρίνης με Φασματοσκοπία Μαζών (MS)

<u>Διάλυμα CIP ΣΦΜ:</u> Ζυγίζονται 15,0 mg (3,89x10⁻⁵ mol) CIP (MB=385,82), καθαρότητας 99,19 % και περιεχόμενης υγρασίας 4,16 %. Τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1,28 mg/ml κυπροφλοξακίνη βάση (MB=331,35). <u>Διάλυμα CIP ΣΦΜ1</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος ΣΦΜ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο. Το διάλυμα CIP υπόκειται στη διαδικασία λυοφιλοποίησης (μέθοδος β), προκειμένου να διαπιστωθεί αν υφίσταται μεταβολές που οφείλονται στη συγκεκριμένη μέθοδο παρασκευής του συμπλόκου. Το λυοφιλοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP, το οποίο αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) κυπροφλοξακίνης βάσης.

Διάλυμα βCD ΣΦΜ₃: Ζυγίζονται 4,4 mg (3,88x10⁻⁶ mol) βCD, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 3,88x10⁻⁴ M. Το διάλυμα βCD υφίσταται επίσης την διαδικασία λυοφιλοποίησης (μέθοδος β).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 ή ΣΦΜ₂: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος ΣΦΜ (3,89x10⁻⁶ mol) και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 4,4 mg, 3,88x10⁻⁶ mol). Ακολουθεί η διαδικασία συμπλοκοποίησης (μέθοδος β). Το λυοφιλοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συμπλόκου 3,86x10⁻⁴ M.

Τα διαλύματα ΣΦΜ₁₋₃ αναλύονται με φασματοσκοπία μαζών στους 160 °C. Για κάθε διάλυμα καταγράφεται το φάσμα μάζας σε κατάλληλη περιοχή m/z. Στο διάλυμα ΣΦΜ₁ η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το μοριακό ιόν της CIP (331,35). Στο διάλυμα ΣΦΜ₂ η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το μοριακό ιόν της CIP, της βCD (1135), αλλά και του μεταξύ αυτών σχηματιζόμενου πιθανά συμπλόκου (1135+331,35=1466,35). Στο διάλυμα ΣΦΜ₃ η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το μοριακό ιόν της κυκλοδεξτρίνης.









Από τα λαμβανόμενα φάσματα, όπως φαίνεται στα σχήματα 1.21 και 1.22 παρατηρήθηκαν τα μητρικά θραύσματα με τιμές: m/z 332,1, το οποίο και αντιστοιχεί στην CIP, m/z 1153,6, το οποίο αντιστοιχεί στην βCD και m/z 1467,5, το οποίο αντιστοιχεί στο μεταξύ τους σύμπλοκο.

1.2.3. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη gpsp+NAcGluOHNH₂

Ακολούθως παρασκευάστηκε το σύμπλοκο της CIP με τη gpsp+NAcGluOHNH₂. Η μελέτη του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία NMR. <u>Παρασκευή διαλυμάτων:</u> <u>Διάλυμα CIP:</u> Ζυγίζονται 3,0 mg (7,77x10⁻⁶ mol) CIP (MB 385,82) και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 1 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα 7,77x10⁻³ M.

<u>Διάλυμα gpsp+NAcGluOHNH₂</u>: Ζυγίζονται 30,9 mg (7,78x10⁻⁶ mol) gpsp+NAcGluOHNH₂ (MB 3972,23) και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 1 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα 7,78x10⁻³ M.

Διάλυμα συμπλόκου: Προκύπτει με ανάμιξη διαλύματος CIP και διαλύματος gpsp+NAcGluOHNH₂ 1:1. Ακολουθεί διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1 (μέθοδος α).

Συγκρίνονται τα φάσματα ¹Η NMR της ελεύθερης CIP, της συνθετικής κυκλοδεξτρίνης gpsp+NAcGluOHNH₂ και του διαλύματος του 1:1 μίγματός τους σε D₂O πριν και μετά τη διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου (με τη μέθοδο α).



Σχήμα 1.23: Φάσμα ¹Η NMR διαλύματος gpsp+NAcGluOHNH₂ κυκλοδεξτρίνης και η απόδοση κορυφών.

Η μελέτη των φασμάτων αυτών θα οδηγήσει σε συμπεράσματα σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της CIP και της gpsp+NAcGluOHNH₂ και τον πιθανό εγκλεισμό της πρώτης στη δεύτερη.



Σχήμα 1.24: Συγκριτικά φάσματα ¹Η NMR διαλύματος CIP, διαλύματος gpsp+NAcGluOHNH₂ κυκλοδεξτρίνης και του 1:1 διαλύματος αυτών αμέσως μετά την ανάμιξή καθώς και του ίδιου διαλύματος μετά τη διαδικασία συμπλοκοποίησης.

Στα φάσματα του σχήματος 1.24 παρατηρούνται τροποποιήσεις στο σχήμα των κορυφών συντονισμού μόλις προστεθεί η CIP, οι οποίες είναι περισσότερο εμφανείς στο σχήμα που ακολουθεί (σχήμα 1.25).

Μεταξύ των κορυφών H-2 (8,62 ppm) και H-5,8 (7,53 ppm) της CIP εμφανίζεται νέα κορυφή, στα 8,19 ppm, η οποία αποδίδεται στο σύμπλοκο που σχηματίζεται μετά την ανακίνηση, η οποία και απουσιάζει από το διάλυμα που προκύπτει αμέσως μετά από την ανάμιξη των δύο διαλυμάτων.



Σχήμα 1.25: Συγκριτικά τμήμα φάσματατος ¹Η NMR διαλύματος CIP, διαλύματος gpsp+NAcGluOHNH₂ κυκλοδεξτρίνης και του 1:1 διαλύματος αυτών αμέσως μετά την ανάμιξή καθώς και του ίδιου διαλύματος μετά τη διαδικασία συμπλοκοποίησης με εστίαση στις περιοχές, όπου παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις.

Αποτελέσματα

Παρατηρούνται μεταβολές στο σχήμα των κορυφών συντονισμού, που εμφανίζονται στα φάσματα μιας διάστασης, ως αποτέλεσμα της συνύπαρξης των δύο μορίων στο ίδιο διάλυμα, γεγονός που αποδίδεται στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση και αποτελεί ένδειξη δημιουργίας συμπλόκου.

1.2.4. Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης με τη bpsp+GalOHNH₂

Ακολούθως παρασκευάστηκε το σύμπλοκο της CIP με τη bpsp+GalOHNH₂. Η μελέτη του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία NMR.

Παρασκευή διαλυμάτων:

Διάλυμα CIP: Ζυγίζονται 3,5 mg (9,07x10⁻⁶ mol) CIP (MB 385,82) και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 1 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα 9,07x10⁻³ M.

<u>Διάλυμα bpsp+GalOHNH₂</u>: Zυγίζονται 18,5 mg (9,05x10⁻⁶ mol) bpsp+GalOHNH₂ (MB 2045,20) και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 1 ml με D₂O. Προκύπτει διάλυμα 9,05x10⁻³ M.

Διάλυμα συμπλόκου: Προκύπτει με ανάμιξη διαλύματος CIP και διαλύματος bpsp+GalOHNH₂ 1:1. Ακολουθεί διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1 (μέθοδος α).

Συγκρίνονται τα φάσματα ¹Η NMR της ελεύθερης CIP, της συνθετικής κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂ και διαλύματος του 1:1 μίγματός τους σε D₂O πριν και μετά τη διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου (με τη μέθοδο α).



bpsp+GalOHNH₂ κυκλοδεξτρίνης και του 1:1 διαλύματος αυτών αμέσως μετά την ανάμιξή καθώς και του ίδιου διαλύματος μετά τη διαδικασία συμπλοκοποίησης.

Στο διάλυμα που έχει υποστεί διαδικασία συμπλοκοποίησης, οι κορυφές συντονισμού στο φάσμα ¹H-NMR, οι οποίες αποδίδονται στα H-2, H-5 H-8 και H-10,11 της CIP εμφανίζονται περισσότερο ευρείες και με σημαντικές μετατοπίσεις. Μεταξύ των κορυφών H-5 και H-2 της CIP εμφανίζεται νέα κορυφή, στα 7,98 ppm, η οποία αποδίδεται στην αποκατάσταση ισορροπίας σχηματισμού συμπλόκου μετά την ανακίνηση, η οποία και απουσιάζει από το διάλυμα που προκύπτει αμέσως μετά από την ανάμιξη των δύο διαλυμάτων (σχήμα 1.27).



Σχήμα 1.27: Συγκριτικά τμήματα φασμάτων ¹Η-ΝΜR διαλύματος CIP, διαλύματος κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂ και του 1:1 διαλύματος αυτών αμέσως μετά την ανάμιξή καθώς και του ίδιου διαλύματος μετά τη διαδικασία συμπλοκοποίησης.

Αποτελέσματα

Οι τροποποιήσεις στις κορυφές συντονισμού, που παρατηρούνται στα φάσματα ¹Η NMR ως αποτέλεσμα της συνύπαρξης των δύο μορίων, είναι εμφανείς και οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποδεικνύουν τη μεταξύ τους γειτνίαση και συμπλοκοποίηση.

Οι νέες συνθετικά παρασκευασμένες κυκλοδεξτρίνες είναι μόρια ευπαθή. Οι προσπάθειες για λήψη φασμάτων δύο διαστάσεων ROESY των συμπλόκων με τις νέες κυκλοδεξτρίνες δεν απέδωσαν, διότι διαπιστώθηκε μερική καταστροφή των κυκλοδεξτρινών αυτών εξαιτίας υδρολυτικών αντιδράσεων, που οδηγούσαν σε φάσματα των οποίων η ανάγνωση ήταν αδύνατη.

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ανάλυσης των υπερμορίων συγκαταλέγονται και μέθοδοι ελέγχου μεταβολής της ταχύτητας των αντιδράσεων. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης μελέτης, η μεταβολή που παρατηρείται στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP όταν αυτή βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκου με όλες τις συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες αποδεικνύει το σχηματισμό των συμπλόκων και περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αρχικά ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, ειδικής για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο σταθερότητας του ΟΧΑ και των συμπλόκων του με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες παρουσία των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησής του. Η μέθοδος διαχωρίζει τα προϊόντα διάσπασης μεταξύ τους και επιτρέπει την παρακολούθησή τους κατά τον έλεγχο σταθερότητας.

Χρησιμοποιήθηκε αρχικά μέθοδος αντίστοιχη με εκείνη που είχε αναπτυχθεί παλαιότερα στο εργαστήριό μας για την χρωματογραφική ανάλυση του ΟΧΑ, παρουσία των προϊόντων διάσπασης αυτού και στη συνέχεια έγινε προσπάθεια η μέθοδος αυτή να προσαρμοστεί στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου προγράμματος και να βελτιωθεί προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την χρωματογραφική ανάλυση του ΟΧΑ τόσο παρουσία προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης όσο και παρουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών, α) φυσικών και β) συνθετικών αναλόγων των κυκλοδεξτρινών του εμπορίου. Οι νέες αυτές κυκλοδεξτρίνες έχουν παρασκευαστεί για τους σκοπούς του προγράμματος.

Ανάπτυξη μεθόδου:

Στην παρούσα μελέτη οι χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζονται παρακάτω:

2.1.1. Χρωματογραφικές συνθήκες

Μέθοδος ΟΧΑ₀

Σε πρώτη φάση ελέγχονται οι συνθήκες της μεθόδου που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας στο παρελθόν: <u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Σε κάθε περίπτωση ελέγχεται η χρωματογραφική συμπεριφορά δειγμάτων ΟΧΑ αρχικής συγκέντρωσης 1,5x10⁻⁵ Μ, τα οποία έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου ξένου και έχουν αποικοδομηθεί κατά ποσοστό τουλάχιστον 20%.



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 2.1: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₀. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 7,320 min.

Παρατηρήσεις

Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε δείγματα συμπλόκων ΟΧΑ και κυκλοδεξτρίνης (όπως περιγράφονται στο κεφ. 1.1), αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά.

Μέθοδος ΟΧΑ₁

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (50:50 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 60:40 σε 50:50 δε βελτίωσε το διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₂

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (40:60 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 50:50 σε 40:60 δε βελτίωσε το διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ3

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (30:70 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 40: 60 σε 30:70 δε βελτίωσε το διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ4

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Οι μέθοδοι ΟΧΑ₁ έως ΟΧΑ₄ δείχνουν την προσπάθεια βελτίωσης του διαχωρισμού του ΟΧΑ και των προϊόντων αποικοδόμησής τους είτε ελαττώνοντας το ποσοστό του οργανικού διαλύτη μεθανόλη είτε ελαττώνοντας την ταχύτητα ροής του διαλύτη. Σε κάθε περίπτωση στόχος είναι η καθυστέρηση έκλουσης όλων των συνυπαρχόντων ουσιών και ο καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ τους, που όμως δεν μπόρεσε να επιτευχτεί με τη βοήθεια της στήλης Atlantis. Επιπλέον, στις τιμές pH που χρησιμοποιούνται, η συγκεκριμένη στήλη έχει περιορισμένο χρόνο ζωής.

2.1.2. Μελέτη επίδρασης στήλης Χ_{TERRA} (4,6x150 mm)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της στήλης Χ_{ΤΕRRA} στο διαχωρισμό του ΟΧΑ και των προϊόντων φωτολυτικής διάσπασης αυτού. Επιλέχτηκαν οι βέλτιστες συνθήκες με τη στήλη Atlantis (μέθοδος ΟΧΑ₀) και εφαρμόστηκαν (μέθοδος ΟΧΑ₅).

Μέθοδος ΟΧΑ₅

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η αναλογία μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος της μεθόδου ΟΧΑ₀ δεν έδωσε ικανοποιητικό διαχωρισμό ούτε με τη νέα στήλη.

Μέθοδος ΟΧΑ₆

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

Θερμοκρασία στήλης 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Παρατηρήσεις

Σε επόμενο βήμα (μέθοδος ΟΧΑ₆) ελαττώθηκε η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης με σκοπό την καθυστέρηση έκλουσης των προϊόντων διάσπασης, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά.

2.1.3. Μελέτη επίδρασης στήλης XBridge

Μέθοδος ΟΧΑ₇

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₈

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Παρατηρήσεις

Εφαρμόζονται αρχικά οι ίδιες συνθήκες, οι οποίες εφαρμόστηκαν και με τις δύο προηγούμενες στήλες (μέθοδος ΟΧΑ₇). Ο διαχωρισμός δεν είναι ικανοποιητικός ακόμη και με αλλαγή της ροής (μέθοδος ΟΧΑ₈).

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τροποποιήσεις σε δύο παραμέτρους, στην αναλογία των οργανικών διαλυτών και ακολούθως στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και εκτιμώνται τα αποτελέσματα.

Μέθοδος ΟΧΑ₉

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (50:50 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min <u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 60:40 (μέθοδος ΟΧΑ₇) σε 50:50 δε βελτίωσε το διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₀

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (50:50 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₁₁

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (40:60 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Παρατηρήσεις

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 50:50 (μέθοδος ΟΧΑ₁₀) σε 40:60 δε βελτίωσε το διαχωρισμό. Ως επόμενο βήμα, μελετάται η προσθήκη ακετονιτριλίου στις συνθήκες της μεθόδου ΟΧΑ₁₀, καθώς έχει δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα μέχρι τώρα.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₂

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (50:50 v/v), 1% ακετονιτρίλιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min
Παρατηρήσεις

Η προσθήκη ακετονιτριλίου στη σύσταση των οργανικών διαλυτών φαίνεται να βελτιώνει το διαχωρισμό, ως εκ τούτου, στην πορεία της εργασίας θα αντικατασταθεί η μεθανόλη εξ ολοκλήρου από ακετονιτρίλιο και θα μελετηθεί η επίδραση στον διαχωρισμό του ΟΧΑ και των προϊόντων διάσπασης αυτού.

Αρχικά διατηρείται η μεθανόλη στη θέση του οργανικού διαλύτη και μελετάται η επίδραση της μεταβολής του pH στον διαχωρισμό. Οι χρωματογραφικές συνθήκες, οι οποίες μελετήθηκαν παρατίθενται στην συνέχεια.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₃

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

Κινητή φάση: μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή του pH από 3,5 (μέθοδος ΟΧΑ₈) σε 4,0 (μέθοδος ΟΧΑ₁₃) δεν έδωσε ικανοποιητικό διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₄

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,0 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή του pH από 3,5 (μέθοδος ΟΧΑ₈) σε 3,0 (μέθοδος ΟΧΑ₁₄) βελτίωσε το διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₅

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm. <u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C. <u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,0 (50:50 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min <u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Συμπέρασμα

Η μεταβολή της αναλογίας μεθανόλης / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 60:40 (μέθοδος ΟΧΑ₁₄) σε 50:50 (μέθοδος ΟΧΑ₁₅) δε βελτίωσε περαιτέρω το διαχωρισμό.

2.1.4. Μελέτη επίδρασης συνδυασμού στηλών

Στόχος της χρήσης δύο στηλών σε σειρά είναι ο πλήρης διαχωρισμός του ΟΧΑ και των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με την υπάρχουσα κινητή φάση, προτού γίνει η δραστικότερη μεταβολή της αντικατάστασης του οργανικού διαλύτη μεθανόλη. Το ΟΧΑ αναμένεται να διαχωριστεί σε πρώτο στάδιο από τα προϊόντα φωτολυτικής διάσπασής του, περνώντας από τη στήλη XBridge, ενώ σε δεύτερο στάδιο, περνώντας από τη στήλη ZORBAX^R, ελέγχεται εάν θα επιτευχθεί και ο διαχωρισμός των προϊόντων διάσπασης μεταξύ τους.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₆

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm συνδεδεμένη σε σειρά με ZORBAX^R SB-PHENYL.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> μεθανόλη / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,0 (60:40 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Το αποτέλεσμα του συνδυασμού των δύο αυτών στηλών στο διαχωρισμό δεν ήταν το επιθυμητό, αφού το χρωματογράφημα έδειξε αλληλοεπικάλυψη των προϊόντων διάσπασης με το ΟΧΑ. Φαίνεται πως οι φαινυλομάδες της δεύτερης στήλης καθυστερούν τόσο την έκλουση των προϊόντων διάσπασης, με αποτέλεσμα αυτά να συνεκλούονται με το ΟΧΑ. Η XBridge διατηρείται ως στήλη επιλογής.

Ακολούθως αντικαθίσταται εξ ολοκλήρου η μεθανόλη από ακετονιτρίλιο.

2.1.5. Μελέτη επίδρασης της σύστασης του υδατικού μέρους στην κινητή φάση

Ελέγχεται η συμπεριφορά του ΟΧΑ και των προϊόντων διάσπασής του με κινητή φάση που περιέχει ακετονιτρίλιο παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ή υδατικού διαλύματος οξικού οξέος. Η αναλογία των οργανικών διαλυτών διατηρείται σταθερή.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₇

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=2,5 (40:60 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₁₈

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=2,5 (40:60 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Παρατηρήσεις

Πραγματοποιείται μεταβολή στην αναλογία των οργανικών διαλυτών και ελέγχεται η επίδραση που έχει στον διαχωρισμό του ΟΧΑ και των προϊόντων διάσπασής του.

Μέθοδος ΟΧΑ₁₉

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,0 (15:85 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min <u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Από τις δύο κινητές φάσεις που δοκιμάστηκαν, τη μέθοδο ΟΧΑ₁₇ που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και τη μέθοδο ΟΧΑ₁₈ που περιέχει υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, ο διαχωρισμός εμφανίζεται βελτιωμένος στην περίπτωση χρήσης υδατικού διαλύματος οξικού οξέος. Η μεταβολή της αναλογίας του υδατικού διαλύματος οξικού οξέος στην κινητή φάση και του pH (μέθοδος ΟΧΑ₁₉) οδήγησε σε βελτίωση του διαχωρισμού.

Είναι πιθανό κάποια από τα προϊόντα φωτόλυσης να είναι ιονισμένα και να αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικές δυνάμεις με τα φωσφορικά ιόντα, οπότε να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων, να παρασύρονται και να εκλούονται άλλα ως καθαρές κορυφές και άλλα στον ίδιο χρόνο με άλλη ένωση (αλληλοεπικάλυψη κορυφών). Ως μια άλλη ερμηνεία, τα φωσφορικά ιόντα μπορεί να δεσμεύονται στις ενεργές ομάδες σιλανόλης της στήλης, να ανταγωνίζονται με προϊόντα ή να τα εμποδίζουν να δεσμευτούν στις ίδιες θέσεις, τροποποιώντας την ιονική τους αλληλεπίδραση με την στήλη και τελικά την χρωματογραφική τους συμπεριφορά.

Στην περίπτωση του υδατικού διαλύματος οξικού οξέος δεν υπάρχουν ιόντα, που θα συμπεριφερθούν όπως τα φωσφορικά και σ' αυτό ίσως οφείλεται η βελτίωση του διαχωρισμού και η εμφάνιση περισσότερων κορυφών προϊόντων φωτόλυσης.

Στη συνέχεια δοκιμάζονται διαφορετικές αναλογίες οργανικών διαλυτών, καθώς και η επίδραση της μεταβολής του pH ή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.

Μέθοδος ΟΧΑ₂₀

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (30:70 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₂₁

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=2,5 (30:70 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₂₂

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₂₃

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,10 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Ο διαχωρισμός του ΟΧΑ είναι ικανοποιητικός, αλλά τα προϊόντα της φωτολυτικής του αποικοδόμησης δε διαχωρίζονται πλήρως. Η μεταβολή του pH (μέθοδος OXA₂₁), η ελάττωση της αναλογίας του ακετονιτριλίου (μέθοδοι OXA₂₂ και OXA₂₃) και της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης (μέθοδος OXA₂₃) δεν οδηγούν στον επιθυμητό διαχωρισμό των προϊόντων διάσπασης μεταξύ τους.

2.1.6. Μελέτη επίδρασης στήλης Χ_{TERRA} (4,6 x 250 mm)

Με δεδομένο τη βελτίωση στο διαχωρισμό, που οφείλεται στη χρήση ακετονιτριλίου και υδατικού διαλύματος οξικού οξέος, ελέγχεται η επίδραση μιας στήλης μεγαλύτερου μήκους στις βέλτιστες μέχρι τώρα συνθήκες (μέθοδος OXA₂₂). Είναι πιθανό η καθυστέρηση στην έκλουση των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης του OXA, εξαιτίας της μεγαλύτερης διαδρομής μέχρι την έξοδο της στήλης και των

πολλαπλών αλληλεπιδράσεων με τις σιλανόφιλες ομάδες αυτής να οδηγήσει στον επιθυμητό διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₂₄

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3.5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 2.2: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₂₄. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 20,847 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η στήλη Χ_{TERRA} (4,6 x 250 mm) δε βελτιώνει τελικά το διαχωρισμό των προϊόντων διάσπασης μεταξύ τους και παράλληλα αυξάνει σημαντικά το χρόνο ανάλυσης.

Η χρήση της στήλης XBridge κρίνεται περισσότερο κατάλληλη και συνεχίζονται οι προσπάθειες για τη βελτίωση του διαχωρισμού (μέθοδος ΟΧΑ₂₂) με αυτή. Μεταβάλλονται η αναλογία των οργανικών διαλυτών, η θερμοκρασία της στήλης και το pH.

Αρχικά μεταβάλλεται η αναλογία ακετονιτρλίου / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος από 25:75 (μέθοδος ΟΧΑ₂₂) σε 20:80 (μέθοδος ΟΧΑ₂₅).

Μέθοδος ΟΧΑ₂₅

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (20:80 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Παρατηρήσεις

Μεταβάλλεται η θερμοκρασία της στήλης από 30 °C (μέθοδος OXA₂₅) σε 25 °C (μέθοδος OXA₂₆).

Μέθοδος ΟΧΑ₂₆

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 25 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (20:80 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:





Συμπέρασμα

Η ελάττωση της θερμοκρασίας δε βελτιώνει τον διαχωρισμό.

Μέθοδος ΟΧΑ₂₇

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,5 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₂₈

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 2.5: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₂₈. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 5,519 min.

Μέθοδος ΟΧΑ₂₉

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C. <u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=4,0 (10:90 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Παρατηρήσεις

Η σημαντική ελάττωση της ποσότητας του οργανικού διαλύτη οδηγεί ταυτόχρονα σε αντίστοιχη αύξηση του χρόνου ανάλυσης, η οποία και καθυστερεί σημαντικά (περίπου 60 min). Επιπρόσθετα η συμμετρία της κορυφής του ΟΧΑ δεν είναι ικανοποιητική.

Στη συνέχεια δοκιμάζεται η επίδραση που έχει στο διαχωρισμό η προσθήκη μεθανόλης στη κινητή φάση ακετονιτρλίου / υδατικού διαλύματος οξικού οξέος.

Μέθοδος ΟΧΑ₃₀

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 / μεθανόλη (50:45:5 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm



Σχήμα 2.6: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₃₀. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 4,970 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Ο συνδυασμός οργανικών διαλυτών μεθανόλης και ακετονιτριλίου βελτιώνει το χρόνο ανάλυσης, αλλά έχει αρνητική επίδραση στο διαχωρισμό των προϊόντων αποικοδόμησης.

Μέθοδος ΟΧΑ31

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα οξικού οξέος pH=3,5 / μεθανόλη (15:80:5 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 2.7: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₃₁. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 14,334 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Αύξηση στην αναλογία της μεθανόλης με επακόλουθη ελάττωση στην αναλογία του ακετονιτριλίου αυξάνει σημαντικά το χρόνο ανάλυσης και οδηγεί σε συνέκλουση των προϊόντων διάσπασης.

Μέθοδος ΟΧΑ₃₂

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Αντικατάσταση του υδατικού διαλύματος οξικού (μέθοδος ΟΧΑ₂₈) από διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (μέθοδος ΟΧΑ₃₂) οδηγεί σε βελτιωμένο διαχωρισμό μεταξύ των προϊόντων φωτολυτικής διάσπασης του ΟΧΑ, χωρίς σημαντική αύξηση στον χρόνο ανάλυσης.

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 2.8: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₃₂. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 5,446 min.

Μέθοδος ΟΧΑ₃₃

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 2.9: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₃₃. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 9,112 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Ελάττωση της αναλογίας του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση αυξάνει το χρόνο ανάλυσης, με μικρή ταυτόχρονα βελτίωση στο διαχωρισμό μεταξύ των προϊόντων διάσπασης, ενώ εμφανίζεται ένα προϊόν επιπλέον.

2.1.7. Μελέτη προσθήκης στην υδατική φάση βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου ή επτανοσουλφονικού οξέος

Καθώς τα αποτελέσματα δεν είναι ενθαρρυντικά, επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων με την χρήση αντιδραστηρίων αντισταθμιστικών ιόντων. Αν υπάρχουν ιονισμένα προϊόντα φωτολυτικής αποικοδόμησης, είναι πιθανό η παρουσία ενός από τα αντιδραστήρια αυτά να δημιουργήσει ζεύγη ιόντων με τα ιονισμένα προϊόντα. Εφόσον υφίστανται διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με κάθε προϊόν είναι δυνατό να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός με ένα κατιοντικό αντιδραστήριο, όπως το βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο, καθώς τα προϊόντα φωτοεπαγόμενων αντιδράσεων είναι ανιοντικά στην πλειονότητά τους.

Η προσπάθεια συνεχίζεται με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του επιλεγμένου άλατος βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου στην κινητή φάση.

Μέθοδος ΟΧΑ₃₄

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v), 0,005 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₃₅

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v),

0,01 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 2.10: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₃₄. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 8,668 min.

Μέθοδος ΟΧΑ₃₆

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v),

0,015 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₃₇

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v),

0,02 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₃₈

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v), 0,05 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min <u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η προσθήκη βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου στο υδατικό μέρος της κινητής φάσης βελτιώνει το διαχωρισμό μεταξύ των προϊόντων φωτολυτικής διάσπασης του ΟΧΑ, ενώ παράλληλα ο χρόνος ανάλυσης είναι ικανοποιητικός. Σύμφωνα με τη μία θεωρία της χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων, είναι δυνατό το αντισταθμιστικό ιόν (βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο) να σχηματίζει ζεύγη ιόντων με τα υπό διαχωρισμό ιονισμένα μόρια, με αποτέλεσμα το λιπόφιλο τμήμα να υπερισχύει με συνέπεια την κατακράτησή τους στο υλικό της στήλης. Η επίδραση είναι διαφορετική στο καθένα από τα προϊόντα αποικοδόμησης (θετικά ή αρνητικά ιονισμένα και μη ιονισμένα), καθυστερείται η έκλουσή των ανιοντικών και εξέρχονται της χρωματογραφικής στήλης σε αρκετά διαφοροποιημένους χρόνους. Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία της χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων, το βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο επικάθεται με το λιπόφιλο τμήμα του στη στήλη και τα ιονισμένα μόρια του βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίο τη μετατρέπουν ώστε να έχει ταυτόχρονα λιπόφιλες και ιονικές αλληλεπιδράσεις.

Τελικά διαχωρίζονται επτά προϊόντα διάσπασης (μέθοδος OXA₃₄). Αύξηση στη συγκέντρωση του βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου από 0,005 % (μέθοδος OXA₃₄) ως και 0,05 % (μέθοδος OXA₃₈), δεν οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση του διαχωρισμού, επομένως επιλέγεται η μικρότερη συγκέντρωση και οι συνθήκες της μεθόδου 34 ως βέλτιστες.

Οι προσπάθειες για περαιτέρω βελτίωση της μεθόδου συνεχίζονται με την προσθήκη οργανικού τροποποιητή μεθανόλης (μέθοδος ΟΧΑ₃₉) ή τετραϋδροφουρανίου (μέθοδος ΟΧΑ₄₀).

Μέθοδος ΟΧΑ₃₉

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 / μεθανόλη (15:80:5 v/v), 0,02 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Μέθοδος ΟΧΑ₄₀

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3,0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

<u>Κινητή φάση:</u> ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 / τετραϋδροφουράνιο (15:80:5 v/v), 0,02 % βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η προσθήκη τετραϋδροφουρανίου ή μεθανόλης ως δεύτερου οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση δε βελτιώνει το διαχωρισμό και εγκαταλείπεται.

Μέθοδος ΟΧΑ₄₁

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3.0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3,5μm.

Θερμοκρασία στήλης: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v),

0,015 % επτανοσουλφονικό οξύ

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 2.11: Χρωματογράφημα της μεθόδου ΟΧΑ₄₁. Το ΟΧΑ εκλούεται στα 8,547 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η χρήση του ανιοντικού αντισταθμιστικού αντιδραστηρίου επτανοσουλφονικού οξέος αντί βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου δε βελτιώνει το διαχωρισμό.

2.1.8. Επιλογή της βέλτιστης μεθόδου

Οι συνθήκες της μεθόδου 34 επιλέγονται ως βέλτιστες και ακολουθεί επικύρωση αυτών. Η μέθοδος θα αξιολογηθεί όσον αφορά στη γραμμικότητα, στην ακρίβεια, στην επαναληψιμότητα και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τις οδηγίες ICH. Ταυτόχρονα θα αξιολογηθούν διαλύματα που περιέχουν τις χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

2.2.1. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N), εφόσον η αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει θόρυβο γραμμής βάσης.

Το όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση με εμφανιζόμενη κορυφή, η οποία μπορεί αξιόπιστα να αποδοθεί στο ΟΧΑ και όχι στο θόρυβο της γραμμής βάσης. Εάν είναι γνωστός ή μετρήσιμος ο θόρυβος της γραμμής βάσης, τότε ως όριο ανίχνευσης θεωρείται η ποσότητα του ΟΧΑ με σήμα 3,33 φορές τον θόρυβο αυτό.

Ο προσδιορισμός του λόγου σήμα προς θόρυβο πραγματοποιείται με σύγκριση των σημάτων που μετρώνται από δείγματα με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις του ΟΧΑ, με το σήμα που λαμβάνεται από τυφλό δείγμα.

Το τυφλό δείγμα έχει την ίδια σύσταση με τα δείγματα του ΟΧΑ, αλλά δεν περιέχει OXA, συγκεκριμένη περίπτωση ακετονιτρίλιο/υδατικό διάλυμα στη τριφθοροξικού οξέος αναλογία 20:80. % pH=3,5 σε 0.005 βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο. Ο θόρυβος της γραμμής βάσης υπολογίζεται εισάγοντας στο χρωματογράφο το τυφλό δείγμα και παρακολουθώντας το σήμα του ανιχνευτή για 30 min από το χρόνο έκλουσης του ΟΧΑ. Από το χρωματογράφημα που λαμβάνεται υπολογίζεται η απόκριση του τυφλού στα 7,5x10⁻⁵ AU.

Η απόκριση του τυφλού συγκρίνεται με την απόκριση που υπολογίζεται από τα δείγματα του ΟΧΑ. Για να μπορεί να αποδοθεί μία κορυφή, η οποία εμφανίζεται στο χρόνο έκλουσης του ΟΧΑ σε αυτό, θα πρέπει το σήμα της να είναι 3,33 φορές μεγαλύτερο του σήματος του θορύβου.

Το όριο ανίχνευσης του ΟΧΑ προσδιορίζεται στα 0,59x10⁻⁷ Μ.

2.2.2. Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίζεται επίσης με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N), εφόσον η αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει θόρυβο γραμμής βάσης.

Ο λόγος S/N θα πρέπει να είναι για το όριο ποσοτικοποίησης 10:1.

Για κάθε δείγμα που εισάγεται στον χρωματογράφο υπολογίζεται ο λόγος της απόκρισης αυτού προς την απόκριση του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίζεται στα 1,83x10⁻⁷ Μ.

2.2.3. Γραμμικότητα

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας δέκα διαλύματα ΟΧΑ με εύρος από το όριο ποσοτικοποίησης, 1,83x10⁻⁷ Μ έως 3,79x10⁻⁴ Μ.

Ζυγίζονται 19,8 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 7,58x10⁻⁴ M (Α). Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος Α: 50 ml στα 100 ml (Γ10, 3,79x10⁻⁴ M) και 5 ml στα 100 ml (3,79x10⁻⁵ M). Σε αυτό το διάλυμα πραγματοποιείται αραίωση 7 ml στα 25 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,06x10⁻⁵ M (Γ5). Στο διάλυμα Γ10 πραγματοποιείται αραίωση 10 ml στα 25 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,52x10⁻⁴ M (Γ9).

Ζυγίζονται 16,1 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 6,16x10⁻⁴ M (B). Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος B: 4 ml στα 100 ml (B1, 2,46x10⁻⁵ M), 4 ml στα 10 ml (B2, 2,46x10⁻⁴ M) και 3 ml στα 100 ml (B3, 1,85x10⁻⁵ M). Στο διάλυμα B1 πραγματοποιούνται οι αραιώσεις: 4 ml στα 10 ml και ακολούθως 2 ml στα 100 ml (Γ2, 1,97x10⁻⁷ M), 5 ml στα 50 ml (Γ3, 2,47x10⁻⁶ M), 6 ml στα 20 ml (Γ4, 7,40x10⁻⁶ M). Στο διάλυμα B2 πραγματοποιούνται οι αραιώσεις: 4 ml στα 10 ml (Γ6, 3,45x10⁻⁵ M). Στο διάλυμα B3 πραγματοποιείται αραίωση: 1 ml στα 100 ml (Γ1, 1,85x10⁻⁷ M). Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Από το κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις εισαγωγές των 20 μl.

Διάλυμα	Г1	Г2	Г3	Г4	Г5
Συγκέντρωση (x10 ⁻⁶ M)	0,18	0,20	2,47	7,40	10,61
	16849	14534	213577	638656	881666
Επιφάνεια	16795	15189	216877	639808	883307
	16464	13778	214512	639052	880364
Μέση Τιμή	16702,67	14500,33	881779	214988,7	881779
% Σχετική Τυπική Απόκλιση	1,25	4,87	0,19	0,27	0,17
Апоклюц					
Διάλυμα	Г6	Γ7	Г8	Г9	Г10
Συγκέντρωση (x10 ⁻⁶ M)	34,5	69,0	98,6	151,6	379,0
	2813383	5654463	8024126	12453345	30995437
Επιφάνεια	2792246	5671184	8018024	12552213	31289024
	2791116	5658209	8013876	12541326	31545676
Μέση Τιμή	2798915	5661285	8018675	12515628	31276712
% Σχετική Τυπική Απόκλιση	0,45	0,15	0,06	0,43	0,88

Πίνακας 2.1: Τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς.



Σχήμα 2.12: Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας.

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι:

Eπιφάνεια = $(82336, 10\pm791, 20) \times C_{\text{oxolinic acid}} + (22735, 63\pm106884, 81)$

Σημειώνεται πως η συγκέντρωση στην εξίσωση εκφράζεται ως μΜ (10⁻⁶ M).

Στατιστική επεξεργασία:
Συντελεστής συσχέτισης R² = 0,9993
Σταθερή απόκλιση κλίσης α: s_α = 791,20
Σταθερή απόκλιση τομής β: s_β = 106884,81
Για P=95 % και N-2=8 βαθμούς ελευθερίας, t = 2,306
Όρια εμπιστοσύνης για κλίση: α ± t x s_α →80511,59 < α < 84160,60</p>
Όρια εμπιστοσύνης για τομή: β ± t x s_β →-223760,74 < β < 269211,99</p>



Σχήμα 2.13: Διάγραμμα υπολοίπων της γραμμικότητας.

Άθροισμα υπολοίπων: Σ = 3,186x10⁻¹⁴

2.2.4. Επαναληψιμότητα

Παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα με τελικές συγκεντρώσεις στο 100% της περιοχής εργασίας, δηλαδή περίπου στα 3,86x10⁻⁵ Μ. Τα διαλύματα αυτά αναλύονται χρωματογραφικά και υπολογίζεται η περιεχόμενη σε αυτά ποσότητα ΟΧΑ. Το πείραμα επαναλαμβάνεται και 2^η εργαστηριακή ημέρα, με καινούργια σειρά οκτώ διαλυμάτων.

Τα αποτελέσματα της κάθε ημέρας, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

<u>1^η εργαστηριακή ημέρα</u>

Ζυγίζονται 49,9 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 50 ml με νερό καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος 5 ml στα 100 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,91x10⁻⁴ M (Διάλυμα K1).

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας περιγράφεται στον πίνακα 2.2.

Τα διαλύματα του πίνακα 2.2 εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση του ΟΧΑ.

	Δμα Κ1 (ml)	Δμα Μ (ml)	Αραίωση (ml)	Τελική Συγκέντρωση (x10 ⁻⁵ M)
Διάλυμα 1	5	1	25	3,82
Διάλυμα 2	5	1	25	3,82
Διάλυμα 3	5	1	25	3,82
Διάλυμα 4	5	1	25	3,82
Διάλυμα 5	5	1	25	3,82
Διάλυμα 6	5	1	25	3,82
Διάλυμα 7	5	1	25	3,82
Διάλυμα 8	5	1	25	3,82

Πίνακας 2.2: Θεωρητική σύσταση των διαλυμάτων για τον έλεγχο επαναληψιμότητας.

Το Διάλυμα Μ είναι πλήρως φωτολυμένο διάλυμα ΟΧΑ.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.

	C _{θεωρ} (x10 ⁻⁵ M)	C _{πειρ} (x10 ⁻⁵ M)	X _i [C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i – X _{mean}	$(\mathbf{x}_{i} - \mathbf{x}_{mean})^{2}$
Δείγμα 1	3,82	3,85	100,8	0,58	0,335
Δείγμα 2	3,82	3,85	100,6	0,46	0,207
Δείγμα 3	3,82	3,84	100,4	0,22	0,050
Δείγμα 4	3,82	3,80	99,59	-0,60	0,365
Δείγμα 5	3,82	3,82	99,96	-0,24	0,058
Δείγμα 6	3,82	3,83	100,4	0,18	0,033
Δείγμα 7	3,82	3,80	99,45	-0,74	0,548
Δείγμα 8	3,82	3,83	100,3	0,15	0,022

Πίνακας 2.3: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας 1^{ης} ημέρας

Μέση τιμή %: 100,2

Διακύμανση:
$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,231\%$$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 481

Σχετική τυπική απόκλιση: %*rsd* = $\frac{s}{x_{mean}}$ ×100% = 0,480%

Διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

 $x - (t \ge s) \le \mu \le x + (t \ge s) \rightarrow \mu \pm 1,138$

Διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365 x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean} + (t x s)/ \sqrt{N} \rightarrow μ ± 0,430

<u>2^η εργαστηριακή ημέρα</u>

Ζυγίζονται 51,1 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 50 ml με νερό καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος 5 ml στα 100 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,96x10⁻⁴ M (Διάλυμα K2).

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας περιγράφεται στον πίνακα 2.4.

Τα διαλύματα του πίνακα 2.4 εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση του ΟΧΑ.

	Δμα K2 (ml)	Δμα M (ml)	Αραίωση (ml)	Τελική Συγκέντρωση (x10 ⁻⁵ M)
Διάλυμα 1	5	1	25	3,91
Διάλυμα 2	5	1	25	3,91
Διάλυμα 3	5	1	25	3,91
Διάλυμα 4	5	1	25	3,91
Διάλυμα 5	5	1	25	3,91
Διάλυμα 6	5	1	25	3,91
Διάλυμα 7	5	1	25	3,91
Διάλυμα 8	5	1	25	3,91

Πίνακας 2.4: Θεωρητική σύσταση των διαλυμάτων για τον έλεγχο επαναληψιμότητας.

Το Διάλυμα Μ είναι πλήρως φωτολυμένο διάλυμα ΟΧΑ.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 2.5: Αποτε	ελέσματα επαναληψ	υμότητας 2 ^{ης} ημέρας
--------------------	-------------------	---------------------------------

	C _{θεωρ} (x10 ⁻⁵ M)	C _{πειρ} (x10 ⁻⁵ M)	x _i [C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i — X _{mean}	$(\mathbf{x}_{i} - \mathbf{x}_{mean})^{2}$
Δείγμα 1	3,91	3,92	100,1	0,20	0,041
Δείγμα 2	3,91	3,97	101,5	1,53	2,344
Δείγμα 3	3,91	3,90	99,61	-0,32	0,100
Δείγμα 4	3,91	3,88	99,11	-0,81	0,663
Δείγμα 5	3,91	3,92	100,2	0,32	0,105
Δείγμα 6	3,91	3,93	100,4	0,45	0,203
Δείγμα 7	3,91	3,90	99,56	-0,37	0,134
Δείγμα 8	3,91	3,87	98,91	-1,01	1,023

Μέση τιμή %: 99,92

Διακύμανση:
$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,659\%$$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 812

Σχετική τυπική απόκλιση: %*rsd* = $\frac{s}{x_{mean}}$ × 100% = 0,812%

Διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

x - (t x s) < μ < x + (t x s) \rightarrow μ ± 1,920

Διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365 x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean} + (t x s)/ \sqrt{N} \rightarrow μ ± 0,726

2.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηριακών ημερών εκτιμάται με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και των 2 ημερών. Ο έλεγχος της διαφοράς των διακυμάνσεων των 2 ημερών γίνεται εφαρμόζοντας τη δοκιμασία F 2 άκρων. Εάν η δοκιμασία αποτύχει, για 15 βαθμούς ελευθερίας, τότε η ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

Οπότε
$$F_{\pi \varepsilon \iota \rho \alpha \mu \alpha \tau \iota \kappa \dot{\sigma}} = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0,659}{0,231} = 2,853$$

Η τιμή είναι πολύ μικρότερη της θεωρητικής, *F*_{θεωρητικό} = 6,99, που σημαίνει πως οι διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας μεταξύ των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά και μπορούμε να προχωρήσουμε στον έλεγχο της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

<u>Στατιστική επεξεργασία των 16 τιμών των 2 ημερών</u> Μέση τιμή: 100,061 % Διακύμανση των 2 ημερών

 $s_{1-2}^{2} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{1}} (x_{i} - \overline{x}_{1})^{2} + \sum_{j=1}^{N_{2}} (x_{j} - \overline{x}_{2})^{2}}{N_{1} + N_{2} - 2} = 0,445\% \Rightarrow$ η συνδυασμένη τυπική διακύμανση είναι $s_{1-2} = 0,667\%$ και η σχετική τυπική διακύμανση του συνδυασμού είναι rsd=0,667%

To διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών, για N-1=15 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης (t = 2,131) είναι: x - (t x s) < μ < x + (t x s) \rightarrow μ ± 1,421 Ενώ το διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής: x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean}+ (t x s)/ \sqrt{N} \rightarrow μ ± 0,355 Ο έλεγχος της απόκλισης των 2 μέσων τιμών γίνεται υπολογίζοντας πειραματικά το t και συγκρίνοντάς το με τη θεωρητική του τιμή για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και N₁+N₂-2=14 βαθμούς ελευθερίας.

 $t_{\text{permation}} = \frac{\left|\overline{x_1} - \overline{x_2}\right|}{s} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} = \frac{\left|100, 196 - 99, 925\right|}{0,667} \cdot \sqrt{\frac{8 \times 8}{8 + 8}} = 0,813 < t_{\text{hewriting}} = 2,145)$

Το αποτέλεσμα της παραπάνω δοκιμασίας δείχνει πως οι μέσες τιμές των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά.

2.2.6. Ακρίβεια

Ακολούθως αποδεικνύεται η ακρίβεια της μεθόδου στην περιοχή εργασίας, χρησιμοποιώντας δείγματα συγκεντρώσεων σε όλο το εύρος.

Τα διαλύματα, από τα οποία προκύπτουν τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ακρίβειας παρασκευάζονται ως εξής:

 Ζυγίζονται 11,3 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 50 ml με νερό καθαρότητας HPLC (διάλυμα Δ). Ακολουθούν οι αραιώσεις του διαλύματος:

I) 6 ml στα 25 ml και από αυτό 50 ml στα 100 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 10,38x10⁻⁵ M (Διάλυμα Δ).

II) 10 ml στα 20 ml και από αυτό 6 ml στα 50 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 5,19x10⁻⁵ M (Διάλυμα Ε).

Ζυγίζονται 19,5 mg ΟΧΑ και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml με νερό καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος: 6 ml στα 50 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 8,96x10⁻⁵ M (Διάλυμα Ζ).

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της ακρίβειας παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

	Δμα Δ (ml)	Δμα Ε (ml)	Δμα Ζ (ml)	Δμα Μ (ml)	Αραίωση (ml)	Συγκέντρωση (x10 ⁻⁵ M)
Δείγμα 1	5	0	1	1	25	2,44
Δείγμα 2	5	2	0	1	25	2,49
Δείγμα 3	5	3	0	1	25	2,70
Δείγμα 4	5	0	2	1	25	2,79
Δείγμα 5	5	4	0	1	25	2,91
Δείγμα 6	5	5	0	1	25	3,12
Δείγμα 7	5	0	3	1	25	3,15
Δείγμα 8	5	0	4	1	25	3,51
Δείγμα 9	5	0	5	1	25	3,87
Δείγμα 10	5	0	6	1	25	4,23
Δείγμα 11	5	0	7	1	25	4,58

Πίνακας 2.6: Σύσταση των διαλυμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου

Το Διάλυμα Μ είναι πλήρως φωτολυμένο διάλυμα ΟΧΑ.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

	C _{θεωρ} (x10 ⁻⁵ M)	C _{πειρ} (x10 ⁻⁵ M)	% Ανάκτηση	% Σφάλμα
Δείγμα 1	2,44	2,45	100,6%	0,62%
Δείγμα 2	2,49	2,45	98,46%	-1,54%
Δείγμα 3	2,70	2,74	101,4%	1,40%
Δείγμα 4	2,79	2,76	98,77%	-1,23%
Δείγμα 5	2,91	2,96	101,8%	1,84%
Δείγμα 6	3,12	3,13	100,4%	0,41%
Δείγμα 7	3,15	3,08	97,57%	-2,43%
Δείγμα 8	3,51	3,51	99,93%	-0,07%
Δείγμα 9	3,87	3,83	99,07%	-0,93%
Δείγμα 10	4,23	4,19	99,22%	-0,78%
Δείγμα 11	4,58	4,48	97,75%	-2,24%

Πίνακας 2.7: Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ακρίβειας

Μέσος όρος του % σφάλματος: -0,45 %

Σημειώνεται για τον πίνακα 7 πως η % ανάκτηση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\frac{\Delta C_{\text{perf}}}{\Delta C_{\theta \epsilon \omega \rho}} \times 100\%$$

ενώ το % σφάλμα από τη σχέση:





<u>Σχήμα 2.14:</u> Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές.

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 2.14 ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.

Η εξίσωση που προκύπτει από τα δεδομένα του σχήματος είναι η: C_{πειρ} = (0,9621 ± 0,0182) x Cθεωρ + (0,1048 ± 0,0604)

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την τομή β με τον άξονα των τεταγμένων: Για Ν-1 = 10 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,228 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 2,085 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την κλίση α της καμπύλης: Για Ν-1 = 10 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,228 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 1,66 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η αναλυτική μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για τον έλεγχο σταθερότητας του ΟΧΑ και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ΟΧΑ και των προϊόντων της φωτολυτικής διάσπασης αυτού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ

3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσαρμογή και βελτιστοποίηση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, ειδικής για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο σταθερότητας της CIP ως ελεύθερο μόριο και ως σύμπλοκο με όλες τις διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες. Η μέθοδος είναι ικανή να διαχωρίσει τη CIP από τα προϊόντα της καθώς επίσης και τα προϊόντα φωτολυτικής αποικοδόμησης αυτής μεταξύ τους.

Χρησιμοποιήθηκε αρχικά μέθοδος (A₀), η οποία είχε αναπτυχθεί στο ίδιο εργαστήριο παλαιότερα για την χρωματογραφική ανάλυση μιγμάτων διαφορετικών κινολονών. Στη συγκεκριμένη μέθοδο είχε χρησιμοποιηθεί στήλη Waters Spherisorb ODS (4,6x250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 5 μm, ενώ η ροή ήταν 1,8 ml/min. Η κινητή φάση ήταν μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=2,5 με 0,2 % τριαιθυλαμίνη σε αναλογία 25/75 και θερμοκρασία δωματίου [189]. Όγκος εισαγωγής δείγματος 20μl.

Η μέθοδος ελέγχεται με δείγματα υδατικού διαλύματος CIP αρχικής συγκέντρωσης 3,86x10⁻⁵ M, τα οποία έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία λυχνίας τόξου αερίου Ξένου και έχουν αποικοδομηθεί κατά ποσοστό τουλάχιστον 20 %. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός της CIP και των προϊόντων φωτοχημικής αποικοδόμησης.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια η μέθοδος αυτή να προσαρμοστεί στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου προγράμματος και να βελτιωθεί προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την χρωματογραφική ανάλυση της CIP τόσο παρουσία προϊόντων φωτοχημικών μετατροπών όσο και παρουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών, α) φυσικών, β) συνθετικών παραγώγων των φυσικών κυκλοδεξτρινών, τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο και γ) νέων συνθετικών κυκλοδεξτρινών. Οι νέες αυτές κυκλοδεξτρίνες έχουν παρασκευαστεί από τον συνεργαζόμενο φορέα, για τους σκοπούς του προγράμματος.

Στην παρούσα μελέτη οι χρωματογραφικές συνθήκες μεταβάλλονται όπως παρουσιάζονται παρακάτω. Ο όγκος εισαγωγής του δείγματος παραμένει σταθερός στα 20μl.

Ρυθμιστικά διαλύματα

Ζυγίζονται 3,40 gr KH₂PO₄ και 4,35 gr K₂HPO₄, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 500 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ρύθμιση στο επιθυμητό pH με τη βοήθεια διαλύματος H₃PO₄.

3.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου

Στη νέα μέθοδο διατηρήθηκε η κινητή φάση της μεθόδου Α₀ και ως στήλη χρησιμοποιήθηκε η C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm. Η ροή ελαττώθηκε εφόσον περάσαμε σε στήλη με μικρότερες διαστάσεις.

Μέθοδος Α1

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

<u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,2% τριαιθυλαμίνη pH=2,5 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Θερμοκρασία στήλης: Θερμοκρασία περιβάλλοντος

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 278 nm



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 3.1: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₁. Η CIP εκλούεται στα 16,3 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Στη μέθοδο A₁ η CIP εκλούεται σε χρόνο 16,3 min, ενώ εμφανίζεται αρχικά μόνο ένα προϊόν διάσπασης στα 13,3 min. Το προϊόν αυτό διαχωρίζεται ικανοποιητικά από την κύρια κορυφή, αλλά ο χρόνος ανάλυσης θεωρείται μεγάλος.

Στη κινητή φάση της μεθόδου A₀ είχε προστεθεί μικρή ποσότητα τριαιθυλαμίνης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών. Στη μέθοδο A₁ παρατηρείται ότι το σχήμα της κορυφής της CIP είναι αρκετά συμμετρικό και ελέγχεται εάν η προσθήκη τριαιθυλαμίνης, η οποία περιλαμβάνεται στη μέθοδο A₀ είναι απαραίτητη.

3.1.2. Απουσία τριαιθυλαμίνης

Διατηρούνται οι χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου A₁, αλλά η ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος στο 2,5 γίνεται χωρίς να έχει προηγουμένως προστεθεί η τριαιθυλαμίνη (Μέθοδος A₂).



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 3.2: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₂. Η CIP εκλούεται στα 15,0 min (απουσία τριαιθυλαμίνης).

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η απομάκρυνση της τριαιθυλαμίνης από την κινητή φάση δεν επηρέασε τη συμμετρία της κορυφής της CIP, ενώ ταυτόχρονα ελαττώθηκε ο χρόνος έκλουσής της στα 15,0 min.

Υπάρχει η τάση, οι προσπάθειες βελτίωσης των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας να κατευθύνονται σε όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είτε επιβαρύνουν το περιβάλλον είτε κοστίζει πολύ ακριβά η καταστροφή τους. Έτσι, προσανατολιζόμαστε σε διαφορετικούς τρόπους για να επιταχύνουμε την έκλουση.

Στη συνέχεια μελετάται η διαφοροποίηση του χρωματογραφήματος από την εφαρμογή αυξανόμενων θερμοκρασιών στη στήλη και η πιθανή εμφάνιση νέων κορυφών.

3.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η στήλη τοποθετείται σε φούρνο σταθερών θερμοκρασιών και δοκιμάζονται τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες διατηρούνται σταθερές.

Στα χρωματογραφήματα, τα οποία λαμβάνονται, παρατηρείται ένα προϊόν φωτολυτικής διάσπασης και τροποποιείται ο χρόνος έκλουσης όπως διαπιστώνεται και από τον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Χρόνοι ανάσχεσης CIP σε σχέση με τη θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης.

	Θερμοκρασία°C	Χρόνος ανάσχεσης προϊόντος (min)	Χρόνος ανάσχεσης CIP (min)
Μέθοδος Α ₃	35	11,1	13,3
Μέθοδος Α₄	45	8,7	10,3
Μέθοδος Α₅	55	7,6	9,0

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Όπως ήταν αναμενόμενο, με εφαρμογή θερμοκρασίας στη στήλη επιτυγχάνεται η μείωση του χρόνου έκλουσης της κορυφής της CIP και ελάττωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Με την εφαρμογή αυξανόμενης θερμοκρασίας δεν εμφανίζονται επιπλέον χρωματογραφικές κορυφές, που να αποδίδονται σε προϊόντα διάσπασης. Για να αποφευχθούν όμως ακραίες συνθήκες για την χρωματογραφική στήλη, διατηρείται η θερμοκρασία των 35 °C, όπου ο χρόνος έκλουσης της CIP είναι 13,3 min.

Στη συνέχεια γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της μεθόδου με μεταβολή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων.

3.1.4. Μεταβολή του pH της κινητής φάσης

Ελέγχεται εάν μικρή αύξηση του pH του διαλύματος μπορεί να βελτιώσει το χρωματογραφικό αποτέλεσμα και να διαχωριστούν επιπλέον προϊόντα διάσπασης. Επιλέγεται το pH 3,0 και εφαρμόζονται και πάλι αυξανόμενες θερμοκρασίες στη στήλη, ενώ οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες δε μεταβάλλονται.

Χρησιμοποιείται επιπλέον δείγμα, το οποίο έχει υποστεί ακτινοβολία για ελαφρώς μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

Κινητή φάση: Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (25:75 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 278 nm

Μέθοδος A₆: Θερμοκρασία στήλης 35 °C.

Μέθοδος Α_{7:} Θερμοκρασία στήλης 40 °C.

Μέθοδος A₈: Θερμοκρασία στήλης 45 °C.

Μέθοδος Α₉: Θερμοκρασία στήλης 55 °C.

Λαμβάνονται τα χρωματογραφήματα:



Σχήμα 3.3: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₆ (35 °C). Η CIP εκλούεται στα 12,6 min.



Σχήμα 3.4: Χρωματογράφημα της μεθόδου Α₇ (40 °C). Η CIP εκλούεται στα 11,6 min.



Σχήμα 3.5: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₈ (45 °C). Η CIP εκλούεται στα 10,3 min.



<u>Σχήμα 3.6:</u> Χρωματογράφημα της μεθόδου A_9 (55 °C). Η CIP εκλούεται στα 8,4 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Με τις νέες συνθήκες εργασίας, παρατηρούνται επιπλέον προϊόντα φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP σε κάθε επιλεγμένη θερμοκρασία, όπως φαίνεται και από τα χρωματογραφήματα που παρατίθενται. Τόσο ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης της CIP όσο και ο διαχωρισμός της κύριας κορυφής και των προϊόντων διάσπασης κρίνονται ικανοποιητικά στη μέθοδο A₆, με θερμοκρασία στήλης 35 °C στο συγκεκριμένο pH=3,0. Τα προϊόντα φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP, τα οποία φαίνεται να διαχωρίζονται με τις χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου A₆ είναι έξι. Η εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών στη στήλη επιδρά αρνητικά στο διαχωρισμό, όπου οδηγεί σε μερική συνέκλουση μεταξύ των κορυφών των προϊόντων αποικοδόμησης.

Στη μέθοδο Α6, η οποία έχει επιλεγεί ως τώρα βέλτιστη, ο χρόνος έκλουσης της CIP είναι 12,6 min (σχήμα 3.3).

Στη συνέχεια γίνεται προσπάθεια για να βελτιωθεί ο χρόνος ανάλυσης με τους ακόλουθους τρόπους: τροποποίηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη και προσθήκη νέου οργανικού τροποποιητή.

3.1.5. Τροποποίηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης

Μεταβάλλεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και ελέγχεται η επίδραση της στο χρωματογραφικό αποτέλεσμα. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες διατηρούνται σταθερές. Στο πείραμα που ακολουθεί η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης αυξάνεται από 0,5 στα 0,6 ml/min.

Μέθοδος Α₁₀

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

<u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (25:75 v/v)

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 35 °C.

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,60 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 278 nm
Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:



Σχήμα 3.7: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₁₀. Η CIP εκλούεται στα 11,2 min.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η αύξηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης οδήγησε σε μικρή ελάττωση του χρόνου ανάλυσης (η CIP εκλούεται στα 11,2 από τα 12,6 min).

Ωστόσο, ο διαχωρισμός των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης με τη μέθοδο Α₁₀ οδηγεί σε μερική συνέκλουση, οπότε δεν επιχειρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση στην ταχύτητα ροής.

3.1.6 Επίδραση οργανικού τροποποιητή

3.1.6. Α. Προσθήκη δεύτερου οργανικού τροποποιητή

Ακολούθως ελέγχεται η επίδραση της προσθήκης δεύτερου οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, στην χρωματογραφική ανάλυση της CIP, παρουσία των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης αυτής. Αναμένεται, ο δεύτερος οργανικός διαλύτης να οδηγήσει σε μεταβολή των υφιστάμενων ισορροπιών.

Επιλέγεται για το σκοπό αυτό το ακετονιτρίλιο και πραγματοποιείται αντικατάσταση μικρής ποσότητας (5 ml μεθανόλης) από αντίστοιχο όγκο ακετονιτριλίου. Το ποσοστό του ρυθμιστικού διαλύματος παραμένει σταθερό και αποτελεί το 75% της κινητής φάσης.

Μέθοδος Α₁₁

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm. <u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ακετονιτρίλιο / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (20:5:75 v/v) <u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 35 °C. <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min <u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 278 nm

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η προσθήκη ενός ακόμη οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση οδηγεί σε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών των προϊόντων διάσπασης, χωρίς σημαντική επίδραση στο χρόνο ανάλυσης. Η CIP εκλούεται στα 12,4 min και το πρώτο προϊόν διάσπασης εκλούεται ταυτόχρονα με το μέτωπο του διαλύτη, επομένως εγκαταλείπεται η προσθήκη ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.

3.1.6. Β. Αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη μεθανόλη στην κινητή φάση

Στην συνέχεια ελέγχεται η επίδραση της μεταβολής της αναλογίας του οργανικού διαλύτη στη κινητή φάση. Το ποσοστό της μεθανόλης αυξάνεται από 25 σε 35 %.



Λαμβάνεται το χρωματογράφημα:

Σχήμα 3.8: Χρωματογράφημα της μεθόδου A₁₂. Η CIP εκλούεται στα 7,617 min.

Μέθοδος Α₁₂

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm. <u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (35:65 v/v) <u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 35 °C. <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 278 nm

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η αύξηση της αναλογίας του οργανικού διαλύτη στη κινητή φάση οδηγεί σε συνέκλουση των κορφών των προϊόντων διάσπασης μεταξύ τους.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται μικρότερη μεταβολή της αναλογίας του οργανικού διαλύτη στη κινητή φάση. Η αναλογία της μεθανόλης αυξάνεται από 25 (μέθοδος A₆) σε 30 %. Ταυτόχρονα ελαττώνεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών των προϊόντων διάσπασης.

Μέθοδος Α₁₃

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM RP₈ (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

Κινητή φάση: Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (30:70 v/v)

<u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 35 °C.

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,30 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 278 nm

Η CIP εκλούεται στα 15,552 min. Με τις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες αυξάνεται ο χρόνος ανάλυσης, ενώ παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη των προϊόντων φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP μεταξύ τους παρόλο που ελαττώθηκε και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Από την παραπάνω πορεία επιλέχθηκαν οι συνθήκες της μεθόδου Α₆ ως βέλτιστες, με την οποία διαχωρίζονται έξι προϊόντα διάσπασης και ακολουθεί η επικύρωση της μεθόδου.

Χρωματογραφικές συνθήκες:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως C₁₈ X_{TERRA}TM (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm.

<u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (25:75 v/v) <u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 35 °C.

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης: 278 nm



Σχήμα 3.9: Χρωματογράφημα της επιλεγμένης μεθόδου A₆ και τα φάσματα υπεριώδους που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για την CIP (278 nm).

Η μέθοδος θα αξιολογηθεί όσον αφορά στη γραμμικότητα, στην ακρίβεια, στην επαναληψιμότητα και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τις οδηγίες ICH. Ταυτόχρονα θα αξιολογηθούν διαλύματα που περιέχουν τις χρησιμοποιούμενες κυκλοδεξτρίνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ

Η μέθοδος αξιολογείται όσον αφορά στη γραμμικότητα, στην ακρίβεια, στην επαναληψιμότητα και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τις οδηγίες ICH [190].

3.2.1. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση με εμφανιζόμενη κορυφή, η οποία μπορεί αξιόπιστα να αποδοθεί στη CIP. Το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται στην περίπτωση αυτή με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N), εφόσον η αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει θόρυβο γραμμής βάσης. Εάν είναι γνωστός ή μετρήσιμος ο θόρυβος της γραμμής βάσης, τότε ως όριο ανίχνευσης θεωρείται η ποσότητα της CIP με σήμα 3,33 φορές τον θόρυβο αυτό.

Για τη μέτρηση του θορύβου της γραμμής βάσης εισάγεται στο χρωματογράφο τυφλό δείγμα. Το δείγμα αυτό έχει την ίδια σύσταση με τα δείγματα της CIP, δίχως να περιέχει CIP (στη συγκεκριμένη περίπτωση μεθανόλη/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 σε αναλογία 25:75). Καταγράφεται το σήμα του ανιχνευτή για 30 min από το χρώνα έκλουσης της CIP. Στην περιοχή όπου δεν εκλούεται καμία ουσία, από το χρωματογράφημα που λαμβάνεται υπολογίζεται το σήμα του θορύβου στα 5x10⁻⁵ AU.

Η απόκριση του τυφλού συγκρίνεται με την απόκριση που υπολογίζεται από τα δείγματα της CIP. Για να μπορεί να αποδοθεί μία κορυφή, η οποία εμφανίζεται στο χρόνο έκλουσης της CIP σε αυτή, θα πρέπει το σήμα της να είναι 3,33 φορές μεγαλύτερο του σήματος του θορύβου. Παρασκευάζεται σειρά δειγμάτων CIP, γνωστών χαμηλών συγκεντρώσεων, τα οποία εισάγονται στον χρωματογράφο. Καταγράφεται η έκλουση της CIP σε αυτά και υπολογίζεται το σήμα από το ύψος των σχηματιζόμενων κορυφών.

Το όριο ανίχνευσης της CIP υπολογίζεται στα 3,09x10⁻⁸ M, εφόσον η απόκριση αυτού του διαλύματος CIP είναι 1,65x10⁻⁴ AU.

3.2.2. Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης, σε αντιστοιχία με το όριο ανίχνευσης, υπολογίζεται επίσης με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N). Στην περίπτωση αυτή, ο λόγος S/N θα πρέπει να είναι για το όριο ποσοτικοποίησης 10.

Για κάθε δείγμα που εισάγεται στον χρωματογράφο υπολογίζεται ο λόγος της απόκρισης αυτού προς την απόκριση του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 10,81x10⁻⁸ M, εφόσον η απόκριση αυτού του διαλύματος CIP είναι 5x10⁻⁴ AU.

3.2.3. Γραμμικότητα

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας 14 διαλύματα CIP γύρω από την περιοχή εργασίας (3,86x10⁻⁵ M), με εύρος από 6,74x10⁻⁷ M έως 9,43x10⁻⁵ M.

Zυγίζονται 13,0 mg CIP και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως $3,37 \times 10^{-4}$ M (A). Ακολουθούν οι αραιώσεις του διαλύματος A: 2 ml στα 10 ml (Γ11, 6,74 $\times 10^{-5}$ M), 7 ml στα 25 ml (Γ13, 9,43 $\times 10^{-5}$ M) και 1 ml στα 10 ml (Γ7, 3,37 $\times 10^{-5}$ M). Από το διάλυμα Γ13 πραγματοποιείται αραίωση 1 ml στα 2 ml και προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 4,72 $\times 10^{-5}$ M (Γ9). Από το διάλυμα Γ7 πραγματοποιούνται αραιώσεις 1 ml στα 5 ml, 2 ml στα 5 ml και 5 ml στα 10 ml και προκύπτουν διαλύματα συγκεντρώσεων 6,74 $\times 10^{-6}$ M (Γ1), 1,35 $\times 10^{-5}$ M (Γ3) και 1,68 $\times 10^{-5}$ M (Γ4) αντίστοιχα. Από το διάλυμα Γ1 πραγματοποιείται αραίωση 1 ml στα 10 ml και προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 6,74 $\times 10^{-7}$ M (Γ0). Οι αραιώσεις γίνονται σε κάθε περίπτωση με νερό καθαρότητας HPLC.

Ζυγίζονται 10,9 mg CIP και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 5,65x10⁻⁴ M (B). Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος B: 2 ml στα 20 ml (Γ10, 5,65x10⁻⁵ M), 7 ml στα 50 ml (Γ12, 7,91x10⁻⁵ M) και 7 ml στα 100 ml (Γ8, 3,96x10⁻⁵ M). Από το διάλυμα Γ10 πραγματοποιούνται οι αραιώσεις: 1 ml στα 5 ml (Γ2, 1,13x10⁻⁵ M), 2 ml στα 5 ml (Γ5, 2,26x10⁻⁵ M) και 5 ml στα 10 ml (Γ6, 2,82x10⁻⁵ M). Οι αραιώσεις γίνονται σε κάθε περίπτωση με νερό καθαρότητας HPLC.

Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2. Από το κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις εισαγωγές των 20 μl.

Διάλυμα	Г0	Г1	Г2	Г3	Г4
Συγκέντρωση (x10⁻⁵ M)	0,07	0,67	1,13	1,35	1,68
	27681	283511	516852	595762	892424
Επιφάνεια	27639	280416	517254	291357	887835
	27313	279019	514429	590002	890318
Μέση Τιμή	27544	280982	516178	592374	890192
% Σχετική					
Τυπική	0,731	0,818	0,296	0,508	0,258
Απόκλιση					
Διάλυμα	Г5	Г6	Γ7	Г8	Г9
Συγκέντρωση (x10⁻⁵ M)	2,26	2,82	3,37	3,95	4,72
	1275147	1586937	2040898	2540675	2913166
Επιφάνεια	1268409	1586817	2015117	2539809	2919006
	1262432	1576831	2012651	2539762	2908497
Μέση Τιμή	1268663	1583528	2022889	2540082	2913556
% Σχετική					
Τυπική	0,501	0,366	0,773	0,020	0,181
Απόκλιση					
					1
Διάλυμα	Г10	Г11	Г12	Г13	
Συγκέντρωση (x10⁻⁵ M)	5,65	6,74	7,91	9,43	
	3452519	4214307	5110353	6088249	
Επιφάνεια	3439956	4225799	5114561	6103701	
	3426061	4218434	5153455	6079110	
Μέση Τιμή	3439512	4219513	5126123	6090353	
% Σχετική Τυπική	0 385	0 138	0.464	0.204	
Απόκλιση	0,000	0,100	0,404	0,204	

Πίνακας 3.2: Τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς.



<u>Σχήμα 3.10:</u> Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας της CIP.

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι:

Eπιφάνεια = $(6,62 \times 10^{10} \pm 8,29 \times 10^{8}) \times C_{ciprofloxacin} - (199633,87 \pm 3821,80)$

$$\begin{split} \underline{\Sigma \tau \alpha \tau \iota \sigma \tau \kappa \dot{\eta} \ \epsilon \pi \epsilon \xi \epsilon \rho \gamma \alpha \sigma (\alpha \ \tau \eta \zeta \ \epsilon \upsilon \theta \epsilon (\alpha \zeta :} \\ \Sigma \upsilon v \tau \epsilon \lambda \epsilon \sigma \tau \dot{\eta} \zeta \ \sigma \upsilon \sigma \chi \dot{\epsilon} \tau \iota \sigma \eta \zeta \ R^2 &= 0,9998 \\ \overline{\Sigma \tau \alpha \theta \epsilon \rho \dot{\eta} \ \alpha \pi \dot{\sigma} \kappa \lambda \iota \sigma \eta \ \kappa \lambda \dot{\iota} \sigma \eta \zeta \ \alpha : \ s_{\alpha} &= 8,285 \times 10^8 \\ \overline{\Sigma \tau \alpha \theta \epsilon \rho \dot{\eta} \ \alpha \pi \dot{\sigma} \kappa \lambda \iota \sigma \eta \ \tau \sigma \upsilon \dot{\eta} \zeta \ \beta : \ s_{\beta} &= 3821,80 \\ \Gamma \iota \alpha \ P &= 95 \ \% \ \kappa \alpha \iota \ N - 2 &= 12 \ \beta \alpha \theta \mu o \dot{\upsilon} \zeta \ \epsilon \lambda \epsilon \upsilon \theta \epsilon \rho (\alpha \zeta, \ t = 2,179 \\ \overline{\Omega} \rho \iota \alpha \ \epsilon \mu \pi \iota \sigma \tau \sigma \dot{\upsilon} v \eta \zeta \ \gamma \iota \alpha \ \kappa \lambda \dot{\iota} \sigma \eta : \ \alpha \pm t \ x \ s_{\alpha} \to 6,44 \times 10^{10} < \alpha < 6,81 \times 10^{10} \\ \overline{\Omega} \rho \iota \alpha \ \epsilon \mu \pi \iota \sigma \tau \sigma \dot{\upsilon} v \eta \zeta \ \gamma \iota \alpha \ \tau \sigma \upsilon \dot{\eta} : \ \beta \pm t \ x \ s_{\beta} \to -2,08 \ \times 10^5 < \beta < -1,96 \ \times 10^5 \end{split}$$



Σχήμα 3.11: Διάγραμμα υπολοίπων της γραμμικότητας.

Άθροισμα υπολοίπων: Σ = 3,16x10⁻¹⁵

3.2.4. Επαναληψιμότητα

Παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα με τελικές συγκεντρώσεις στο 100% της περιοχής εργασίας, δηλαδή περίπου στα 3,86x10⁻⁵ Μ. Τα διαλύματα αυτά αναλύονται χρωματογραφικά και υπολογίζεται η περιεχόμενη σε αυτά ποσότητα CIP. Το πείραμα επαναλαμβάνεται και 2^η εργαστηριακή ημέρα, με καινούργια σειρά οκτώ διαλυμάτων.

Τα αποτελέσματα της κάθε ημέρας, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω. Ζυγίζονται 14,7 mg CIP και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος 5 ml στα 100 ml. Οι αραιώσεις γίνονται με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,90x10⁻⁴ M (Διάλυμα K1).

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στον πίνακα 3.3, χρησιμοποιώντας και διάλυμα πλήρους φωτολυμένης CIP (Διάλυμα M), για τον έλεγχο πιθανών παρεμποδίσεων.

Πίνακας 3.3: Θεωρητική σύσταση των διαλυμάτων για την 1^η ημέρα ελέγχου της επαναληψιμότητας.

	Δμα K1 (ml)	Δμα M (ml)	Αραίωση (ml)	Τελική Συγκέντρωση (x10 ⁻⁵ M)
Διάλυμα 1	5	1	25	3,80
Διάλυμα 2	5	1	25	3,80
Διάλυμα 3	5	1	25	3,80
Διάλυμα 4	5	1	25	3,80
Διάλυμα 5	5	1	25	3,80
Διάλυμα 6	5	1	25	3,80
Διάλυμα 7	5	1	25	3,80
Διάλυμα 8	5	1	25	3,80

Τα διαλύματα του πίνακα 3.3 εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση της CIP.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα από τον έλεγχο επαναληψιμότητας της 1^{ης} ημέρας.

	C _{θεωρ} (x10 ⁻⁵ M)	C _{πειρ} (x10 ⁻⁵ M)	Χ _i [C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i — X _{mean}	$(\mathbf{x}_{i} - \mathbf{x}_{mean})^{2}$
Δείγμα 1	3,80	3,76	98,77	-1,04	1,084
Δείγμα 2	3,80	3,82	100,5	0,67	0,446
Δείγμα 3	3,80	3,81	100,3	0,53	0,280
Δείγμα 4	3,80	3,81	100,3	0,47	0,220
Δείγμα 5	3,80	3,79	99,60	-0,21	0,043
Δείγμα 6	3,80	3,80	100,0	0,23	0,053
Δείγμα 7	3,80	3,76	99,05	-0,76	0,576
Δείγμα 8	3,80	3,80	99,92	0,11	0,013

Μέση τιμή %: 99,81

Διακύμανση: $s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,388\%$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 623

Σχετική τυπική απόκλιση: %*rsd* = $\frac{s}{x_{mean}} \times 100\% = 0,624\%$

Το διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας και το επιλεγόμενο διάστημα εμπιστοσύνης:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

x - (t x s) < μ < x + (t x s) \rightarrow μ ± 1,473

Διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

 x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean} + (t x s)/ $\sqrt{N} \rightarrow \mu \pm 0,557$

2^η εργαστηριακή ημέρα

Ζυγίζονται 15,4 mg CIP και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος 5 ml στα 100 ml. Οι αραιώσεις γίνονται με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 2,00x10⁻⁴ M (Διάλυμα K2).

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας περιγράφεται στον πίνακα 3.5.

Πίνακας	3.5:	Θεωρητική	σύσταση	των	διαλυμάτων	για	тην	2 ^ŋ	ημέρα	ελέγχου	της
επαναληι	μιμότι	ητας.									

	Δμα K2 (ml)	Δμα M (ml)	Αραίωση (ml)	Τελική Συγκέντρωση (x10⁻⁵ M)
Διάλυμα 1	5	1	25	4,00
Διάλυμα 2	5	1	25	4,00
Διάλυμα 3	5	1	25	4,00
Διάλυμα 4	5	1	25	4,00
Διάλυμα 5	5	1	25	4,00
Διάλυμα 6	5	1	25	4,00
Διάλυμα 7	5	1	25	4,00
Διάλυμα 8	5	1	25	4,00

Τα διαλύματα του πίνακα 3.5 εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση της CIP. Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

	C _{θεωρ} (x10 ⁻⁵ M)	C _{πειρ} (x10 ⁻⁵ M)	X _i [C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i – X _{mean}	$(\mathbf{x}_{i} - \mathbf{x}_{mean})^{2}$
Δείγμα 1	4,00	4,03	100,7	0,25	0,061
Δείγμα 2	4,00	4,05	101,2	0,77	0,598
Δείγμα 3	4,00	4,02	100,6	0,16	0,024
Δείγμα 4	4,00	4,05	101,3	0,80	0,647
Δείγμα 5	4,00	3,96	99,04	-1,43	2,045
Δείγμα 6	4,00	3,97	99,38	-1,09	1,188
Δείγμα 7	4,00	4,07	101,7	1,21	1,461
Δείγμα 8	4,00	3,99	99,80	-0,67	0,448

Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα από τον έλεγχο επαναληψιμότητας της 2^{ης} ημέρας.

Μέση τιμή %: 100,5

Διακύμανση:
$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,925\%$$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 962

Σχετική τυπική απόκλιση: % $rsd = \frac{s}{x_{mean}} \times 100\% = 0.957\%$

Το διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας και το επιλεγόμενο διάστημα εμπιστοσύνης:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

x - (t x s) < μ < x + (t x s) \rightarrow μ ± 2,275

Διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής:

Για N-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t = 2,365

 x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean} + (t x s)/ $\sqrt{N} \rightarrow \mu \pm 0.860$

3.2.5. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηριακών ημερών εκτιμάται με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και των 2 ημερών, οι οποίες δε θα πρέπει να διαφέρουν σημαντικά. Ο έλεγχος της διαφοράς των διακυμάνσεων των 2 ημερών γίνεται εφαρμόζοντας τη δοκιμασία F 2 άκρων. Εάν η δοκιμασία αποτύχει, για 15 βαθμούς ελευθερίας, τότε η ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

Οπότε
$$F_{\pi \varepsilon \iota \rho \alpha \mu \alpha \tau \iota \kappa \dot{\sigma}} = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0.925}{0.388} = 2.384.$$

Η τιμή είναι πολύ μικρότερη της θεωρητικής, $F_{\theta εωρητικό} = 6.99$, που σημαίνει πως οι διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας μεταξύ των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά και μπορούμε να προχωρήσουμε στον έλεγχο της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

<u>Στατιστική επεξεργασία των 16 τιμών των 2 ημερών</u>

Μέση τιμή: 100,141 % Διακύμανση των 2 ημερών

$$s_{1-2}^{2} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{1}} (x_{i}^{2} - \overline{x}_{1}^{2})^{2} + \sum_{j=1}^{N_{2}} (x_{j}^{2} - \overline{x}_{2}^{2})^{2}}{N_{1}^{2} + N_{2}^{2} - 2} = 0,656\% \Rightarrow$$

η συνδυασμένη τυπική διακύμανση είναι $s_{1-2} = 0.810\%$ και η σχετική τυπική διακύμανση του συνδυασμού είναι rsd=0.809%

Το διάστημα αξιοπιστίας των επιμέρους τιμών, για N-1=15 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης (t = 2,131) είναι:

 $x - (t \times s) \le \mu \le x + (t \times s) \rightarrow \mu \pm 1,726$

Evώ το διάστημα αξιοπιστίας της μέσης τιμής: x_{mean} - (t x s)/ \sqrt{N} < μ < x_{mean}+ (t x s)/ \sqrt{N} \rightarrow μ ± 0,446

Ο έλεγχος της απόκλισης των 2 μέσων τιμών γίνεται υπολογίζοντας πειραματικά το t και συγκρίνοντάς το με τη θεωρητική του τιμή για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και N₁+N₂-2=14 βαθμούς ελευθερίας.

$$t_{\text{teiramatiko}} = \frac{\left|\overline{x_1} - \overline{x_2}\right|}{s} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} = \frac{\left|99.808 - 100.475\right|}{0.810} \cdot \sqrt{\frac{8 \times 8}{8 + 8}} = 1.647 < t_{\text{dewrytiko}} (= 2,145)$$

Το αποτέλεσμα της παραπάνω δοκιμασίας δείχνει πως οι μέσες τιμές των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά.

3.2.6. Ακρίβεια

Ακολούθως ελέγχεται η ακρίβεια της μεθόδου, χρησιμοποιώντας δείγματα συγκεντρώσεων σε όλο το εύρος της περιοχή εργασίας.

Τα διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των δειγμάτων για τον έλεγχο της ακρίβειας προκύπτουν ως εξής:

- Ζυγίζονται 7,4 mg CIP και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml.
 Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος:
- I) 5 ml στα 250 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 3,84x10⁻⁶ M (Διάλυμα X).
- Ζυγίζονται 10,5 mg CIP και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 10 ml.
 Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος:
- I) 1 ml στα 50 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 5,44x10⁻⁵ M (Διάλυμα Ζ).
 Ακολουθεί αραίωση του διαλύματος Ζ: 5 ml στα 100 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 2,72x10⁻⁶ M (Διάλυμα 00).
- II) 3 ml στα 50 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 3,84x10⁻⁶ M (Διάλυμα Υ).

III) 4 ml στα 50 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 2,18x10⁻⁴ M (Διάλυμα 0).

Οι αραιώσεις γίνονται σε κάθε περίπτωση με νερό καθαρότητας HPLC.

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της ακρίβειας παρουσιάζεται στον πίνακα 3.7.

	Δμα X (ml)	Δμα Υ (ml)	Δμα Z (ml)	Δμα 0 (ml)	Δμα 00 (ml)	Αραίωση (ml)	Συγκέντρωση (M)
Δείγμα 1	5	0	0	0	0	25	7,67x10⁻ ⁷
Δείγμα 2	5	0	0	0	2	25	9,85x10⁻ ⁷
Δείγμα 3	5	0	0	0	4	25	1,20x10⁻ ⁶
Δείγμα 4	5	0	0	0	6	25	1,42x10⁻ ⁶
Δείγμα 5	5	0	1	0	0	25	2,94x10⁻ ⁶
Δείγμα 6	5	0	2	0	0	25	5,12x10⁻ ⁶
Δείγμα 7	5	0	3	0	0	25	7,30x10⁻ ⁶
Δείγμα 8	5	0	4	0	0	25	9,48x10⁻ ⁶
Δείγμα 9	5	0	6	0	0	25	1,38x10⁻⁵
Δείγμα 10	5	0	10	0	0	25	2,25x10⁻⁵
Δείγμα 11	5	5	0	0	0	25	3,34x10⁻⁵
Δείγμα 12	5	0	0	5	0	25	4,43x10 ⁻⁵
Δείγμα 13	5	10	0	0	0	25	6,61x10 ⁻⁵
Δείγμα 14	5	0	0	10	0	25	8,79x10⁻⁵
Δείγμα 15	5	10	5	0	0	25	7,70x10⁻⁵

Πίνακας 3.7: Σύσταση των διαλυμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδα

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

	C _{θεωρ} (M)	C _{πειρ} (M)	% Ανάκτηση	% Σφάλμα
Δείγμα 1	7,67x10 ⁻⁷	7,65x10 ⁻⁷	99,71	-0,286
Δείγμα 2	9,85x10 ⁻⁷	9,66x10 ⁻⁷	98,09	-1,909
Δείγμα 3	1,20x10 ⁻⁶	1,21x10 ⁻⁶	100,1	0,077
Δείγμα 4	1,42x10 ⁻⁶	1,44x10 ⁻⁶	101,5	1,473
Δείγμα 5	2,94x10 ⁻⁶	2,99x10 ⁻⁶	101,4	1,393
Δείγμα 6	5,12x10 ⁻⁶	5,19x10 ⁻⁶	101,4	1,436
Δείγμα 7	7,30x10 ⁻⁶	7,33x10⁻ ⁶	100,4	0,423
Δείγμα 8	9,48x10⁻ ⁶	9,57x10⁻ ⁶	101,0	1,049
Δείγμα 9	1,38x10⁻⁵	1,37x10⁻⁵	99,30	-0,698
Δείγμα 10	2,25x10⁻⁵	2,26x10⁻⁵	100,3	0,318
Δείγμα 11	3,34x10⁻⁵	3,33x10⁻⁵	99,85	-0,146
Δείγμα 12	4,43x10⁻⁵	4,44x10⁻⁵	100,1	0,065
Δείγμα 13	6,61x10⁻⁵	6,57x10⁻⁵	99,43	-0,571
Δείγμα 14	7,70x10⁻⁵	7,77x10⁻⁵	101,0	0,992
Δείγμα 15	8,79x10⁻⁵	8,74x10⁻⁵	99,46	-0,545

Πίνακας 3.8: Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ακρίβειας.

Μέσος όρος του % σφάλματος: 0,185 %

Σημειώνεται για τον πίνακα 3.8 πως η % ανάκτηση υπολογίζεται από τη σχέση:

% ανάκτηση = $\frac{\Delta C_{\rm perf}}{\Delta C_{\rm deap}} \times 100\%$

ενώ το % σφάλμα από τη σχέση:

% σφάλμα = $\frac{\Delta C_{\text{πειρ}} - \Delta C_{\theta \text{εωρ}}}{\Delta C_{\theta \text{εωρ}}} \times 100\%$

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 3.12 ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.



<u>Σχήμα 3.12:</u> Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές.

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την τομή β με τον άξονα των τεταγμένων: Για Ν-1 = 14 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,145 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,244 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την κλίση α της καμπύλης: Για Ν-1 = 14 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,145 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,268 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η αναλυτική μέθοδος θεωρήθηκε κατάλληλη για τον έλεγχο σταθερότητας της CIP και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της CIP και των προϊόντων της φωτολυτικής διάσπασης αυτής.

3.2.7. Αξιολόγηση μεθόδου κυπροφλοξακίνης παρουσία κυκλοδεξτρινών.

Ο εγκλεισμός ενός μορίου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης ενδέχεται να επηρεάσει το συντελεστή απορρόφησης στο υπεριώδες, επομένως τροποποιείται το λαμβανόμενο σήμα στον ανιχνευτή και οδηγούμαστε σε αποκλίσεις από το νόμο του Beer [191-193]. Προκειμένου η μέθοδος που αναπτύχθηκε να εφαρμοστεί στα σύμπλοκα της CIP με τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες χωρίς προβλήματα ακρίβειας, αξιολογείται παρουσία αυτών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πίνακα 3.9.

Παρασκευάζονται διαλύματα υδροχλωρικής CIP παρουσία βCD και MalβCD σε διαφορετικές αναλογίες 2:1, 1:1, 1:3.

Πίνακας 3.9: Σχετικές τυπικές αποκλίσεις διαλυμάτων CIP παρουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών και αναλογίες περιοχών απορρόφησης της CIP σταθερής συγκέντρωσης 3,86x10⁻⁵ Μ παρουσία και απουσία αυτών.

	σιπροφοξασίνη [CIP] _n / Κυκλοδεξτρίνη [CD] _m	RSD %	Ανάκτηση % $\frac{[CIP]_n - [CD]_m}{[CIP]_n} \times 100\%$
βCD	2:1	0,27	99,26
>>	1:1	0,09	100,26
>>	1:3	0,99	98,37
MalβCD	2:1	0,40	100,36
>>	1:1	0,14	100,62
>>	1:3	1,04	102,70
bpsp+ManOHNH ₂	1:1	0,88	100,28
gpsp+ManOHNH₂	1:1	1,43	99,35
gpsp+NAcGluOHNH ₂	1:1	0,62	100,31
bpsp+GalOHNH ₂	1:1	0,74	103,37
bpsp+NAcGalOHNH ₂	1:1	0,93	99,10
bpsp+NAcGluOHNH ₂	1:1	0,58	101,24
bpsp+FucOHNH ₂	1:1	0,59	100,04

όπου η: τα μόρια της CIP και m: τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης που προστίθενται.

Εξαιτίας της περιορισμένης διαθεσιμότητας σε συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, παρασκευάζονται επιλεκτικά διαλύματα CIP παρουσία των συνθετικών κυκλοδεξτρινών

bpsp+ManOHNH₂, gpsp+ManOHNH₂, gpsp+NAcGluOHNH₂, bpsp+GalOHNH₂, bpsp+SalOHNH₂, bpsp+NAcGluOHNH₂ και bpsp+FucOHNH₂ σε αναλογίες 1:1.

Η αναλυτική μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό παρουσία κυκλοδεξτρινών, αφού όπως διαπιστώνεται δεν υπάρχουν αποκλίσεις. Κατά συνέπεια, η αποδέσμευση του φαρμάκου από το σύμπλοκό του με την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη κυκλοδεξτρίνη, προηγείται της εισόδου του φαρμάκου στον ανιχνευτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΕΣ ΦΩΤΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.

Είναι γνωστό ότι τα φάρμακα, τα οποία ανήκουν στη κατηγορία των κινολονών παρουσιάζουν ιδιαίτερα προβλήματα φωτοσταθερότητας, με αποτέλεσμα να προκαλείται φωτοτοξικότητα και φωτοευαισθητοποίηση [194-217]. Για να διαπιστωθεί η πιθανή απώλεια δραστικού συστατικού αφενός μεν κατά τη διάρκεια παρασκευής του συμπλόκου και αφετέρου κατά τη διάρκεια που αυτό παραμένει εγκλεισμένο μέσα στο υπερμοριακό σύμπλεγμα, έγιναν μελέτες φωτολυτικής αποικοδόμησης των επιλεγμένων κινολονών που μελετήθηκαν. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε λυχνία τόξου αερίου Ξένου, με τη βοήθεια της οποίας επιτυγχάνεται βέλτιστη προσομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας σε ότι αφορά στην φασματική κατανομή, όπως ορίζουν οι Διεθνείς Κανονιστικές Διατάξεις (ICH) [218].

Για το ΟΧΑ οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε υδατικά διαλύματα του φαρμάκου. Μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης στην κινητική φωτοσταθερότητας του φαρμάκου, όπως επίσης και η επίδραση της συμπλοκοποίησης με κυκλοδεξτρίνη.

4.1.1. Μελέτη επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης στην ταχύτητα της φωτοαποικοδόμησης του οξολινικού οξέος

Προετοιμασία δειγμάτων

Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς: Ζυγίζονται 20,0 mg (7,66x10⁻⁵ mol) ΟΧΑ και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml. Προστίθεται 60 μl διαλύματος NaOH 10%, για την μετατροπή του ΟΧΑ σε μετά νατρίου άλας και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα συγκεντρώσεως 1,5x10⁻³ M (Διάλυμα ΟΧΑ, pH=9,6).

Από το διάλυμα ΟΧΑ με κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς ως εξής: Μεταφέρονται διαδοχικά από 1 ml διαλύματος ΟΧΑ σε ογκομετρικές φιάλες των 10, 20, 25 και 50 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτουν τα διαλύματα ΟΧΑ₁ (1,5x10⁻⁴ M), ΟΧΑ₂ (7,5x10⁻⁵ M), ΟΧΑ₃ (6,0x10⁻⁵ M) και ΟΧΑ₄ (3,0x10⁻⁵ M) αντίστοιχα.

Το διάλυμα ΟΧΑ₄ χρησιμοποιείται και στην καμπύλη αναφοράς ως 3,0x10⁻⁵ M (C₁).

Από το διάλυμα ΟΧΑ₁ μεταφέρεται 1 ml σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1,5x10⁻⁵ M (C₂).

Από το διάλυμα ΟΧΑ₂ μεταφέρονται διαδοχικά από 1 ml σε ογκομετρικές φιάλες των 10 και 20 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτουν διαλύματα συγκέντρωσης 7,5x10⁻⁶ M (C₃) και 3,75x10⁻⁶ M (C₅) αντίστοιχα.

Από το διάλυμα ΟΧΑ₃ μεταφέρονται διαδοχικά από 1 ml σε ογκομετρικές φιάλες των 10 και 25 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτουν διαλύματα συγκέντρωσης 6,0x10⁻⁶ M (C₄) και 2,4x10⁻⁶ M (C₇) αντίστοιχα.

Από το διάλυμα ΟΧΑ₄ μεταφέρονται διαδοχικά από 1 ml σε ογκομετρικές φιάλες των 10, 25 και 50 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτουν διαλύματα συγκέντρωσης 3,0x10⁻⁶ M (C₆), 1,2x10⁻⁶ M (C₈) και 6,0x10⁻⁷ M (C₉) αντίστοιχα.

Οι αραιώσεις γίνονται με νερό καθαρότητας HPLC.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου φωτοσταθερότητας</u>: Παρασκευάζονται τρία διαλύματα ΟΧΑ διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αυτά προκύπτουν από το διάλυμα ΟΧΑ μετά από τις ακόλουθες αραιώσεις:

Μεταφέρεται 1 ml διαλύματος ΟΧΑ σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Από αυτό μεταφέρεται 1 ml και αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml. Προκύπτει διάλυμα ΟΧΑ 3,0x10⁻⁶ M (ΦΟΧΑ₁).

Μεταφέρεται 1 ml διαλύματος ΟΧΑ σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Από αυτό μεταφέρεται 1 ml και αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προκύπτει διάλυμα ΟΧΑ 6,0x10⁻⁶ M (ΦΟΧΑ₂)

Μεταφέρεται 1 ml διαλύματος ΟΧΑ σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Από αυτό μεταφέρεται 1 ml και αραιώνεται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προκύπτει διάλυμα ΟΧΑ 1,5x10⁻⁵ M (ΦΟΧΑ₃)

Στην συνέχεια 3,5 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρεται σε κυψελίδα, η οποία τοποθετείται στην συσκευή με πηγή ακτινοβολίας λυχνία τόξου αερίου Ξένου. Λαμβάνεται μηδενικό δείγμα και ακολούθως ένα δείγμα κάθε 5 ώρες, t=0, t=5 h, t=10 h, t=15 h και t=20 h. Αυτό επαναλαμβάνεται σε όλα τα διαλύματα διαφορετικής αρχικής συγκέντρωσης ΦΟΧΑ₁₋₃. <u>Προκατεργασία τελικών δειγμάτων:</u> Τα 50 μΙ διαλύματος ΦΟΧΑ₁, τα οποία δειγματοληπτούνται κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης, μεταφέρονται με μικροπιπέτα στους αντίστοιχους χρόνους (0, 5, 10, 15 και 20 h) σε ισάριθμα σκοτεινόχρωμα υάλινα φιαλίδια και αραιώνονται με 450 μΙ κινητής φάσης. Τα υάλινα φιαλίδια πωματίζονται, ανακινούνται, τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη και αναλύονται χρωματογραφικά αμέσως μετά τη λήψη τους, ώστε να αποφευχθούν τυχόν αντιδράσεις διάσπασης κατά τη φύλαξη αυτών σε σκοτεινό μέρος. Από κάθε δείγμα γίνονται τρεις εισαγωγές. Σε κάθε εισαγωγή διοχετεύονται 20μΙ στη χρωματογραφική διάταξη.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται η μέθοδος ΟΧΑ₃₄, η οποία και είναι ειδική για τον έλεγχο φωτοσταθερότητας του ΟΧΑ και αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο 2.1 με συνθήκες:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XBridgeTM C18 3.0×150 mm με διάμετρο σωματιδίων 3.5μm.

<u>Θερμοκρασία στήλης</u>: 30 °C.

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3,5 (20:80 v/v),

0,005% βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 268 nm

Διάλυμα ΦΟΧΑ₁ (3,0×10⁻⁶ M):

Παρακολουθείται η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ.



<u>Γράφημα 4.1:</u> Φωτολυτική αποικοδόμηση διαλύματος ΟΧΑ αρχικής συγκέντρωσης 3,0×10⁻⁶ Μ.

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 35288 × (Συγκέντρωση) – 1,3465, όπου R^2 =0,9998

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που περιγράφονται στο σχήμα 4.1 η συγκέντρωση του ΟΧΑ ακολουθεί αρχικά μηδενοταξική κινητική και ακολούθως η κινητική μεταβάλλεται. Η συγκέντρωση του ΟΧΑ δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο στο αρχικό τμήμα της καμπύλης:

(*Συγκέντρωση*)= [-0,0766 x (*χρόνο*ς)] + 3,0259, όπου R²=0,9964

Η ευθεία περιγράφεται από μια εξίσωση, η οποία προκύπτει με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και της οποίας ο πρωτοβάθμιος όρος αντιστοιχεί στην κλίση της και εκφράζει ταυτόχρονα τη σταθερά ταχύτητας της συγκεκριμένης αντίδρασης φωτοαποικοδόμησης. Η σταθερά ταχύτητας εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωση x χρόνος⁻¹: k_1 = (7,66±0,79)×10⁻² M.h⁻¹.

Το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη εργασίες της ερευνητικής μας ομάδας [193, 219].

Με τη βοήθεια της σταθεράς ταχύτητας υπολογίζεται ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$ σύμφωνα με τον τύπο που ισχύει στην περίπτωση που ο ρυθμός της φωτοεπαγόμενης διάσπασης ακολουθεί μηδενοταξική κινητική και είναι: $t_{1/2} = C_0/2k$

Επομένως στο διάλυμα ΦΟΧΑ₁ υπολογίζεται $t_{1/2}$ = (19,58±2.01) h.

Διάλυμα ΦΟΧΑ₂ (6,0×10⁻⁶ M):

Παρακολουθείται η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ, όπως στο προηγούμενο δείγμα.



<u>Γράφημα 4.2:</u> Φωτολυτική αποικοδόμηση διαλύματος ΟΧΑ αρχικής συγκέντρωσης 6,0×10⁻⁶ Μ.

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 31051 x (Συγκέντρωση) + 5,0x10⁻¹⁰, όπου R²=0,9998

Όπως συμβαίνει και στο διάλυμα ΦΟΧΑ₁, τα αποτελέσματα που περιγράφονται στο σχήμα 4.2. δείχνουν ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης του ΟΧΑ σε συνάρτηση με το χρόνο είναι ευθύγραμμη μόνον στο αρχικό τμήμα και στη συνέχεια η κινητική μεταβάλλεται:

(*Συγκέντρωση*) = [-0,1817 × (*χρόνος*)] + 5,8997, όπου R²=0,9918

Η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος ημιζωής στο διάλυμα ΦΟΧΑ₂ υπολογίζονται:

 k_2 = (18,17±0,26)×10⁻² M.h⁻¹ και $t_{1/2}$ = (16,51±0,24) h αντίστοιχα.

Διάλυμα ΦΟΧΑ₃ (15×10⁻⁶ M):

Παρακολουθείται, ομοίως, η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ.



<u>Γράφημα 4.3:</u> Φωτολυτική αποικοδόμηση διαλύματος ΟΧΑ αρχικής συγκέντρωσης 15×10⁻⁶ M.

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 111086 × (Συγκέντρωση) - 3,0x10⁻¹⁰, όπου R²=0,9996

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.3 η συγκέντρωση του ΟΧΑ δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο στο αρχικό τμήμα της καμπύλης και ακολούθως παραμένει σταθερή:

(Συγκέντρωση)= [-0,5778 × (χρόνος)] + 14,962, όπου R²=0,9995 Η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος ημιζωής στο διάλυμα ΦΟΧΑ₃ υπολογίζονται: k₃= (57,78±0,19)×10⁻² M.h⁻¹ και t_{1/2} = (12,98±0,04) h αντίστοιχα.

Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Η γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία παρέχει στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, 3,0-15,0×10⁻⁶ Μ ευθεία γραμμή στο αρχικό τμήμα, οπότε οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η φωτοαποικοδόμηση του ΟΧΑ ακολουθεί αρχικά κινητική μηδενικής τάξης. Στη συνέχεια ο ρυθμός της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης του ΟΧΑ μεταβάλλεται. Υπολογίζονται οι σταθερές ταχύτητας για κάθε διαφορετικό διάλυμα από το αρχικό μηδενοταξικό τμήμα της αντίστοιχης καμπύλης της φωτολυτικής αποικοδόμησης.

Κατασκευάζεται η γραφική παράσταση των σταθερών ταχύτητας σε συνάρτηση με τις αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων του ΟΧΑ.



<u>Γράφημα 4.4:</u> Γραφική απεικόνιση των σταθερών ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης του ΟΧΑ σε συνάρτηση με την αρχική συγκέντρωση των υδατικών διαλυμάτων του.

Διαπιστώθηκε ότι η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης αυτής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου (σχήμα 4.4). Αυξανομένης της αρχικής συγκέντρωσης των διαλυμάτων, το ΟΧΑ φωτοαποικοδομείται ταχύτερα, οδηγώντας ταυτόχρονα σε μείωση του χρόνου ημιζωής του φαρμάκου.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων του ΟΧΑ, τα οποία εκτίθενται σε ακτινοβολία, προκαλεί τόσο σημαντική αύξηση της ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης ώστε να συνεπάγεται μείωση του χρόνου ημιζωής του φαρμάκου.

4.1.2. Μελέτη επίδρασης της συμπλοκοποίησης με υδροξυπροπυλο-βκυκλοδεξτρίνη στην ταχύτητα της φωτοαποικοδόμησης του οξολινικού οξέος

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της σύμπλεξης με υδροξυπροπυλο-βκυκλοδεξτρίνη, στο ρυθμό της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ, χρησιμοποιώντας διαλύματα όπου το ΟΧΑ βρίσκεται σε ελεύθερη και συμπλοκοποιημένη μορφή. Η αρχική συγκέντρωση του ΟΧΑ και στα δύο διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν η ίδια.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων:</u> Παρασκευάζονται δύο διαλύματα ΟΧΑ της ίδιας συγκέντρωσης. Το ένα διάλυμα θα περιέχει ισομοριακή ποσότητα HPβCD, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου ΟΧΑ:HPβCD είναι 1:1 (κεφ.1.1.3). Παρασκευάζεται διάλυμα ΦΟΧΑ₂ (6,0x10⁻⁶ M).

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα HPβCD (1,8 mg, 1,2x10⁻⁶ mol), τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με το διάλυμα OXA₃, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει κυκλοδεξτρίνη και OXA σε ισομοριακή ποσότητα. Ακολουθεί αραίωση 1 ml στα 10 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 6,0x10⁻⁶ M για το OXA (Διάλυμα ΦΚ). Το διάλυμα ΦΚ υπόκειται στην διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.1.

Στην συνέχεια 3,5 ml από κάθε ένα από τα διαλύματα ΦΟΧΑ₂ και ΦΚ μεταφέρονται σε κυψελίδες και τοποθετούνται στην συσκευή με πηγή ακτινοβολίας λυχνία τόξου αερίου Ξένου.

Ακολουθεί συλλογή δειγμάτων σε συγκεκριμένους χρόνους, κατεργασία και ανάλυση αυτών με την ίδια διαδικασία, η οποία έχει περιγραφεί νωρίτερα στο κεφάλαιο 4.1.1 (σελ.186).

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς και των φωτολυμένων δειγμάτων κατασκευάζονται οι ακόλουθες γραφικές παραστάσεις:

Διάλυμα ΦΟΧΑ₂ (6,0×10⁻⁶ M):

Παρακολουθείται η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ελεύθερου ΟΧΑ. Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

```
Επιφάνεια κορυφής = 24096 x (Συγκέντρωση) – 1,0x10<sup>-9</sup>, όπου R<sup>2</sup>=0,9998
```

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του ΟΧΑ σε συνάρτηση με το χρόνο είναι ευθύγραμμη μόνον στο αρχικό τμήμα. Εφόσον λαμβάνονται υπόψη τα τέσσερα πρώτα σημεία παρατηρείται μηδενοταξική κινητική, η οποία μεταβάλλεται στη συνέχεια: (*Συγκέντρωση*)= [-0,1780 x (χρόνος)] + 6,0024, όπου R²=0,9999,

 $k_2 = (17,80\pm0,26) \times 10^{-2} \text{ M.h}^{-1} \text{ kar } t_{1/2} = (16,85\pm0,24) \text{ h.}$

Διάλυμα ΦΚ (6,0×10⁻⁶ Μ):

Στη συνέχεια παρακολουθείται η συγκέντρωση των διαφόρων δειγμάτων κατά τη πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ στο σύμπλοκο.

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

```
Επιφάνεια κορυφής = 12121 x (Συγκέντρωση) + 11965, όπου R^2=0,9995
```

Η συγκέντρωση του συμπλόκου ΟΧΑ:ΗΡβCD δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

(Συγκέντρωση) = [-0,0817 x (χρόνος)] + 5,9338, όπου R²=0,9934, k_{ΦK} = (8,17±0,27)×10⁻² M.h⁻¹ και t_{1/2} = (36,72±1,2) h.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Σε δείγματα 6,0×10⁻⁶ M (ΦΟΧΑ₂), η γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων του ΟΧΑ σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία αποτελείται από ένα αρχικό ευθύγραμμο τμήμα μηδενοταξικής κινητικής, όπως είχε διαπιστωθεί και στη προηγούμενη ενότητα. Σε διάλυμα του συμπλόκου εγκλεισμού με την HPβCD ίδιας αρχικής συγκέντρωσης σε ΟΧΑ, η φωτοαποικοδόμηση του ΟΧΑ ακολουθεί αποκλειστικά κινητική μηδενικής τάξης. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται σε ένα κοινό γράφημα (σχήμα 4.5).



<u>Γράφημα 4.5:</u> Συγκριτική γραφική απεικόνιση της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης του ΟΧΑ σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με την ΗΡβCD 1:1. Αρχική συγκέντρωση ΟΧΑ 6,0×10⁻⁶ Μ.

Όπως φαίνεται και από την σημαντική ελάττωση της σταθεράς ταχύτητας του ΟΧΑ από (17,80±0,26)×10⁻² M.h⁻¹ σε (8,17±0,27)×10⁻² M.h⁻¹ στο σύμπλοκο με την ΗΡβCD, η σταθερότητα του ΟΧΑ βελτιώνεται σε μεγάλο βαθμό μετά τον εγκλεισμό. Με τη βοήθεια της σταθεράς ταχύτητας υπολογίζεται για κάθε διάλυμα ο χρόνος ημιζωής t_{1/2} και επιβεβαιώνεται με την αύξηση στο χρόνο ημιζωής του ΟΧΑ, ότι παρουσία ΗΡβCD ο ρυθμός φωτολυτικής αποικοδόμησης του ΟΧΑ ελαττώνεται σημαντικά.

Ο εγκλωβισμός των μορίων του ΟΧΑ στην ΗΡβCD δεν προκαλεί καμία αρνητική επίπτωση στη σταθερότητα των μορίων, αντίθετα οδηγεί σε σταθεροποίηση του δραστικού συστατικού κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία. Κατά συνέπεια, η βελτίωση της σταθερότητας του ΟΧΑ στο φως με τη συμπλοκοποίηση, μπορεί να αναμένεται ότι θα συμβεί και σε σύμπλοκα με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες, καθώς και με τις νέες συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες.

4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ

Όπως то ОХА, έτσι και η CIP παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα φωτοσταθερότητας, зц αποτέλεσμα να φωτοτοξικότητα προκαλείται και φωτοευαισθητοποίηση. Για να διαπιστωθεί η πιθανή απώλεια δραστικού συστατικού αφενός μεν κατά τη διάρκεια παρασκευής των συμπλόκων της με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες και αφετέρου κατά τη διάρκεια που αυτή παραμένει εγκλεισμένη μέσα στο υπερμοριακό σύμπλεγμα, μελετήθηκε η επίδραση της συμπλοκοποίησης στη σταθερότητα της CIP [194-217]. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε λυχνία τόξου αερίου Ξένου, με τη βοήθεια της οποίας επιτυγχάνεται βέλτιστη προσομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας σε ότι αφορά στην φασματική κατανομή, όπως ορίζουν οι Διεθνείς Κανονιστικές Διατάξεις (ICH) [218].

Για τη CIP οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε υδατικά διαλύματα του φαρμάκου, καθώς και σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών. Παράγοντες οι οποίοι είναι πιθανό να μεταβάλλουν τη ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP και μελετήθηκε η επίδρασή τους είναι: η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου, το pH των διαλυμάτων που υφίστανται την ακτινοβολία, η παρουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών και η παρουσία αλάτων καλίου. Στη συνέχεια περιγράφεται η μελέτη επίδρασης των διαφορετικών παραμέτρων στο ελεύθερο φάρμακο και στα σύμπλοκα με τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες και συνθετικά παράγωγα κυκλοδεξτρινών, διαθέσιμων στο εμπόριο, αλλά και νέων συνθετικά τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών, που έχουν συντεθεί από τον συνεργαζόμενο φορέα ΕΚΕΦΕ Δημόκριτο, στα πλαίσια του προγράμματος αυτού.

Μελετήθηκαν: α) η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της ελεύθερης CIP (4.2.1), β) η επίδραση της σύμπλεξης με βCD στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP (4.2.2), γ) η επίδραση της σύμπλεξης με μονοϋποκατεστημένη με σάκχαρα κυκλοδεξτρίνη (επίδραση της MalβCD σε διαφορετικά pH 7,4, 6,0 και 3,0) (4.2.3), δ) η επίδραση της προσθήκης άλατος KCI στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP παρουσία και απουσία κυκλοδεξτρινών σε διαφορετικά pH (4.2.4), ε) η επίδραση της σύμπλεξης με τις περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες bpsp και gpsp στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP σε διαλύματα pH 6,0 (4.2.5) στ) η επίδραση της προσθήκης της περι-υποκατεστημένης bpsp με υποκαταστάτες το σάκχαρο γαλακτοζαμίνη (bpsp+GalOHNH₂) στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP ως μίγμα δραστικού συστατικού και συνθετικής

κυκλοδεξτρίνης και ως σύμπλοκο σε υδατικά διαλύματα (4.2.6) και ε) η επίδραση της σύμπλεξης με διαφορετικές περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους σάκχαρα, στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP σε υδατικά διαλύματα.

4.2.1. Μελέτη επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης στην ταχύτητα της φωτοαποικοδόμησης της ελεύθερης κυπροφλοξακίνης

Αρχικά, μελετήθηκε ο ρυθμός της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης της CIP σε διαλύματα διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων (ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων pH 7,4).

Προετοιμασία δειγμάτων

<u>Ρυθμιστικά διαλύματα:</u> Ζυγίζονται 3,40 gr KH₂PO₄ και 4,35 gr K₂HPO₄, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 500 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ρύθμιση στο επιθυμητό pH με τη βοήθεια διαλύματος H₃PO₄ ή NaOH.

<u>Πυκνό διάλυμα CIP (Διάλυμα A):</u> Ζυγίζονται 14,9 mg (3,86×10⁻² mol) CIP (MB 385,82), τα οποία αντιστοιχούν σε 12,8 mg κυπροφλοξακίνη βάση (MB 331,32), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP 3,86×10⁻⁴ M.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται διαλύματα CIP διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αυτά προκύπτουν από το πυκνό διάλυμα CIP A μετά από κατάλληλες αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4 ως εξής:

Μεταφέρονται 2 ml διαλύματος Α σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ2 (7,72×10⁻⁶ M).

Μεταφέρονται 3 ml διαλύματος Α σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ3 (11,58×10⁻⁶ M).

Μεταφέρονται 4 ml διαλύματος Α σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ4 (15,44×10⁻⁶ M).

Μεταφέρεται 1 ml διαλύματος Α σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ5 (3,86×10⁻⁵ M). Μεταφέρονται 2 ml διαλύματος Α σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ6 (7,72×10⁻⁵ M).

Μεταφέρεται 1 ml διαλύματος Σ6 σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα Σ1 (1,54×10⁻⁶ M).

Πειραματική διαδικασία φωτόλυσης: Στην συνέχεια 3,5 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρονται σε κυψελίδες και τοποθετούνται στην συσκευή με πηγή ακτινοβολίας λυχνία τόξου αερίου Ξένου. Λαμβάνονται μηδενικά δείγματα της CIP στην αρχή, δηλαδή πριν από την έκθεση των δειγμάτων στην ακτινοβολία της πηγής και ακολούθως δείγματα κάθε 15 min. Η φωτόλυση διαρκεί από 1,5 έως 3 ώρες και λαμβάνονται τα αντίστοιχα δείγματα. Τα δείγματα εγχύονται στο χρωματογραφικό σύστημα μετά από κατάλληλη αραίωση. Συγκεκριμένα λαμβάνονται 50 μΙ φωτολυμένου δείγματος, μεταφέρονται στους κατάλληλους χρόνους με μικροπιπέτα σε ισάριθμα υάλινα φιαλίδια και αραιώνονται με 450 μΙ κινητής φάσης. Τα υάλινα φιαλίδια πωματίζονται, αναδεύονται, τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη και αναλύονται χρωματογραφικά αμέσως μετά τη λήψη τους, ώστε να αποφευχθούν τυχόν αντιδράσεις διάσπασης κατά τη φύλαξη αυτών σε σκοτεινό μέρος. Το κάθε δείγμα εισάγεται στη χρωματογραφική διάταξη τρεις φορές, 20μl τη φορά. Σε κάθε περίπτωση παρασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για τη CIP. Όλα τα αποτελέσματα προκύπτουν από τρεις επαναλήψεις των πειραμάτων.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται η μέθοδος A₆, η οποία είναι ειδική για τον έλεγχο φωτοσταθερότητας της CIP, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1 με συνθήκες:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως Xterra C18 (4,6 x 150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3 μm.

<u>Κινητή φάση:</u> Μεθανόλη / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=3,0 (25:75 v/v) <u>Θερμοκρασία στήλης:</u> 35 °C.

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,50 ml/min

<u>Μήκος κύματος ποσοτικοποίησης:</u> 278 nm

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την χρωματογραφική ανάλυση των φωτολυμένων δειγμάτων κατασκευάζονται οι ακόλουθες γραφικές παραστάσεις:



<u>Σχήμα 4.6:</u> Φωτολυτική αποικοδόμηση διαλύματος CIP αρχικής συγκέντρωσης: α) Σ1 (1,54×10⁻⁶ M), β) Σ2 (7,72×10⁻⁶ M), γ) Σ3 (11,58×10⁻⁶ M), δ) Σ4 (15,44×10⁻⁶ M), ε) Σ5 (3,86×10⁻⁵ M) και στ) Σ6 (7,72×10⁻⁵ M) σε pH 7,4.

Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Η συγκέντρωση της CIP στα διαλύματα που υφίστανται την ακτινοβολία αποτελεί εκθετική συνάρτησή του χρόνου έκθεσης στην ακτινοβολία. Η γραφική απεικόνιση του δεκαδικού λογαρίθμου των συγκεντρώσεων των φωτολυμένων δειγμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία παρέχει σε κάθε συγκέντρωση ευθεία γραμμή, οπότε οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η φωτοαποικοδόμηση της CIP ακολουθεί πρωτοταξική κινητική.

Κάθε ευθεία, η οποία προκύπτει με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, περιγράφεται από μια εξίσωση, της οποίας ο πρωτοβάθμιος όρος αντιστοιχεί στην κλίση της και εκφράζει ταυτόχρονα τη σταθερά ταχύτητας της συγκεκριμένης αντίδρασης φωτοαποικοδόμησης. Με τη βοήθεια της σταθεράς ταχύτητας υπολογίζεται για κάθε διάλυμα ο χρόνος ημιζωής t_{1/2} σύμφωνα με τον τύπο που ισχύει στην περίπτωση που ο ρυθμός της φωτοεπαγόμενης διάσπασης ακολουθεί πρωτοταξική κινητική και είναι: t_{1/2} = 0,693/k

Πίνακας 4.1: Σταθερές ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης των διαλυμάτων CIP διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων Σ1 έως Σ6 σε pH 7,4 και οι αντίστοιχοι χρόνοι ημίσειας ζωής.

Διάλυμα	Αρχική συγκέντρωση (M)	Σταθερά ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης k (min ⁻¹)	Χρόνος ημιζωής t _{1/2} (min)
Σ1	1,54×10 ⁻⁶	k _{Σ1} =(8,11±0,046)×10 ⁻²	(8,55±0,05)
Σ2	7,72×10⁻ ⁶	k _{Σ2} =(6,15±0,06)×10 ⁻²	(11,27±0,11)
Σ3	11,58×10 ⁻⁶	k _{Σ3} =(5,78±0,02)×10 ⁻²	(11,99±0,04)
Σ4	15,44×10⁻ ⁶	k _{Σ4} =(5,04±0,015)×10 ⁻²	(13,75±0,04)
Σ5	3,86×10⁻⁵	k _{Σ5} =(2,21±0,01)×10 ⁻²	(31,36±0,14)
Σ6	7,72×10⁻⁵	$k_{\Sigma 6}$ =(1,96±0,015)×10 ⁻²	(35,36±0,27)





Ο δεκαδικός λογάριθμος των σταθερών ταχύτητας δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση:

log (σταθερά ταχύτητας) = [-0,143 x (συγκέντρωση) - 1,0812], όπου R²=0,9984.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων συμπεραίνεται ότι η σταθερά ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση του δείγματος που φωτολύεται. Αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης οδηγεί σε ελάττωση της ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης της CIP. Η αυξημένη σταθερότητα των διαλυμάτων της στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, προκαλεί αντίστοιχα αύξηση στους χρόνους ημιζωής.

4.2.2. Μελέτη επίδρασης της σύμπλεξης με β-κυκλοδεξτρίνη στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης

Μελετήθηκε η επίδραση του συμπλόκου CIP:βCD στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης του φαρμάκου σε διαλύματα ρυθμιστικών αλάτων pH 7,4. <u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται δύο διαλύματα CIP της ίδιας συγκέντρωσης. Στο ένα διάλυμα θα προστεθεί ισομοριακή ποσότητα βCD, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου CIP:βCD είναι 1:1 (κεφ.1.2.2).

Παρασκευάζεται διάλυμα Σ5 συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, το οποίο θα αποτελέσει το πρώτο διάλυμα. Η αραίωση πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4.

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα βCD (2,2 mg, MB 1135, 1,94×10⁻⁶ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml, προστίθενται 5 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει βCD και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Πειραματική διαδικασία παρασκευής συμπλόκου: Το διάλυμα CIP:βCD 1:1 υφίσταται τη διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.2.1.

Πειραματική διαδικασία φωτόλυσης: Στην συνέχεια 3,5 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρονται σε κυψελίδες και τοποθετούνται στην συσκευή με πηγή ακτινοβολίας λυχνία τόξου αερίου Ξένου. Ακολουθεί συλλογή δειγμάτων σε συγκεκριμένους χρόνους, κατεργασία των δειγμάτων και ανάλυση αυτών με την ίδια διαδικασία, η οποία έχει περιγραφεί νωρίτερα στο κεφάλαιο 4.2.1.

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων κατασκευάζονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

Διάλυμα κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 109260 x (Συγκέντρωση) + 1076,4, όπου R^2 =0,9998

Η συγκέντρωση της CIP παρουσιάζει εκθετική σχέση ως προς το χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία. Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0097 x (χρόνος)] - 4,4191, όπου R^2 =0,9993

Υπολογίζονται η σταθερά ταχύτητας και ο χρόνος ημιζωής: $k_{CIP}=(2,23\pm0,01)\times10^{-2}$ min⁻¹ και $t_{1/2,CIP}=(31,08\pm0,14)$ min αντίστοιχα.

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 7,4: Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

```
Επιφάνεια κορυφής = 110061 x (Συγκέντρωση) + 82,164, όπου R^2=0,9999
```

Ομοίως, το γράφημα που απεικονίζει την πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP στο διάλυμα του συμπλόκου έχει εκθετική μορφή. Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο: log (συγκέντρωση) = [-0,0092 x (χρόνος)] - 4,4207, όπου R²=0,9993, $k_{CIP:\beta CD}$ =(2,12±0,007)×10⁻² min⁻¹ και t_{1/2,CIP:βCD} = (32,69±0,11) min.

Τα παραπάνω γίνονται περισσότερο αντιληπτά από το ακόλουθο συγκριτικό γράφημα.





Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η πορεία της φωτοαποικοδόμησης της CIP και του συμπλόκου της με τη βCD (σχήμα 4.8) σε pH 7,4 αποκαλύπτει εκθετική σχέση της συγκέντρωσης της CIP με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία. Στη συνέχεια μετατρέπουμε τις παραπάνω συναρτήσεις στην λογαριθμική τους μορφή.

Η γραφική απεικόνιση του δεκαδικού λογαρίθμου των συγκεντρώσεων των φωτολυμένων δειγμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία, παρέχει ευθεία γραμμή και σε αυτή την περίπτωση, για κάθε διάλυμα που φωτολύεται ανεξάρτητα από την παρουσία βCD. Οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η φωτοαποικοδόμηση της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης CIP ακολουθεί πρωτοταξική κινητική σε pH 7,4.

Παρουσία βCD η σταθερά ταχύτητας που υπολογίζεται στο pH 7,4 είναι ελαφρώς μικρότερη και καθώς ο ρυθμός φωτοαποικοδόμησης της CIP ελαττώνεται, ο χρόνος ημιζωής αυτής αυξάνεται.

Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ των μορίων της CIP και της βCD οδηγεί σε ελαφρά σταθεροποίηση του φαρμάκου κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία.

4.2.3. Μελέτη επίδρασης της σύμπλεξης με μονοϋποκατεστημένη με σάκχαρα κυκλοδεξτρίνη στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης Μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη: επίδραση της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης σε διαφορετικά pH.

Θα μελετηθεί συγκριτικά η συμπεριφορά της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου της με τη MalβCD σε διαλύματα ρυθμιστικών αλάτων διαφορετικών περιοχών pH. Σε αλκαλική περιοχή η CIP φέρει ιονισμένη καρβοξυλομάδα, ενώ σε όξινη περιοχή πρωτονιωμένη αμινομάδα. Επιλέγονται τα pH 7,4, 6,0 και 3,0 καθώς αναμένεται, ανάλογα με την ομάδα που είναι ιονισμένη και τον βαθμό ιονισμού να επηρεάζεται η σταθερότητα της CIP και του συμπλόκου της.

4.2.3.1. Μελέτη της φωτολυτικής αποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου της με μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σε pH 7,4

Μελετήθηκε η επίδραση της σύμπλεξης με τη MalβCD στην ταχύτητα της φωτοαποικοδόμησης της CIP σε διαλύματα ρυθμιστικών αλάτων pH 7,4. <u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται δύο διαλύματα CIP της ίδιας συγκέντρωσης. Στο ένα διάλυμα θα προστεθεί ισομοριακή ποσότητα MalβCD, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου CIP:βCD είναι 1:1 (κεφ.1.2.1.3). Παρασκευάζεται διάλυμα Σ5 συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, το οποίο θα αποτελέσει το πρώτο διάλυμα. Η αραίωση πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4.

Ζυγίζεται στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα MalβCD (6,3 mg, MB 1629,45, 3,87×10⁻⁶ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml, προστίθενται 10 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει κυκλοδεξτρίνη και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Το σύμπλοκο παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία, η οποία έχει περιγραφεί νωρίτερα στο κεφάλαιο 1.2.1.1.

Ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων (κεφ. 4.2.1).

Διάλυμα υδροχλωρικής κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 102088 x (Συγκέντρωση) – 331,65, όπου R^2 =0,9997

Η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP σε pH 7,4 αποτελεί εκθετική συνάρτηση του χρόνου. Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0089 x (χρόνος)] - 4,4005, όπου R^2 =0,9975,

 $k_{CIP,pH 7,4}$ = (2,05±0,02)×10⁻² min⁻¹ και $t_{1/2,CIP,pH 7,4}$ = (33,80±0,33) min.

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 108075 x (Συγκέντρωση) + 166,1, όπου R^2 =0,9998

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0089 x (χρόνος)] - 4,4259, όπου R^2 =0,9985,

 $k_{\text{CIP:MalβCD,pH 7,4}}$ =(2,05±0,03)×10⁻² min⁻¹ και $t_{1/2,\text{CIP:MalβCD,pH 7,4}}$ = (33,80±0,49) min.

Τα παραπάνω γίνονται καλύτερα αντιληπτά αν αποδοθούν σε κοινό γράφημα:



Σχήμα 4.9: Συγκριτικό γράφημα της φωτολυτικής αποικοδόμησης σε pH 7,4 της CIP σε διαλύματα ελεύθερου φαρμάκου και του 1:1 συμπλόκου της με MalβCD (3,86×10⁻⁵ M).

Αποτελέσματα

Η πορεία της φωτοαποικοδόμησης της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου της με τη MalβCD σε pH 7,4 (σχήμα 4.9) αποκαλύπτει εκθετική σχέση της συγκέντρωσης της CIP σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία. Η γραμμική συνάρτηση της λογαριθμικής μορφής παραμένει και μετά τη συμπλοκοποίηση της CIP με τη MalβCD στο διάλυμα που φωτολύεται.

Σε διάλυμα pH 7,4 της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου της με MalβCD, η ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP παραμένει δίχως σημαντική μεταβολή. Η σταθερά ταχύτητας, όπως υπολογίζεται από τις εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και στις δύο περιπτώσεις είναι ίση με k_{pH 7,4} = (2,05±0,03)×10⁻² min⁻¹.

4.2.3.2. Μελέτη της φωτολυτικής αποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου της με μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σε pH 6,0:

Ακολούθως σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η επίδραση του pH, ελέγχεται τι συμβαίνει σε περισσότερο όξινο διάλυμα (pH 6,0), ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος διατηρούνται σταθερές.

Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης: Παρασκευάζονται δύο διαλύματα CIP της ίδιας συγκέντρωσης. Στο ένα διάλυμα θα προστεθεί ισομοριακή ποσότητα MalβCD.
Παρασκευάζεται διάλυμα Σ5 συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, το οποίο θα αποτελέσει το πρώτο διάλυμα. Η αραίωση πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 6,0.

Ζυγίζεται στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα MalβCD (6,3 mg, MB 1629,45, 3,87×10⁻⁶ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml, προστίθενται 10 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 6,0, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει κυκλοδεξτρίνη και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζεται το σύμπλοκο όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Διάλυμα υδροχλωρικής κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 104353 x (Συγκέντρωση) + 2210,5, όπου R^2 =0,9998

Η συγκέντρωση της CIP στο pH 6,0 είναι εκθετική συνάρτηση του χρόνου έκθεσης στην ακτινοβολία. Ο λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0052 x (χρόνος)] - 4,4272, όπου R²=0,9889,

 $k_{\text{CIP,pH 6,0}} = (1,20\pm0,015) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP,pH 6,0}} = (57,75\pm0,72) \text{ min}.$

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

```
Επιφάνεια κορυφής = 98106 x (Συγκέντρωση) + 1351,8, όπου R^2=0,9999
```

Η εκθετική σχέση της CIP στο διάλυμα του συμπλόκου ως προς το χρόνο σε pH 6,0 επαναλαμβάνεται. Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0045 x (χρόνος)] - 4,4096, όπου R²=0,9951,

 $k_{\text{CIP:Mal\betaCD,pH 6,0}} = (1,04\pm0,021) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:Mal\betaCD, pH 6,0}} = (66,63\pm1.34) \text{ min}.$

Τα παραπάνω γίνονται περισσότερο αντιληπτά από το συγκριτικό γράφημα (σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.10: Συγκριτική γραφική απεικόνιση της φωτοεπαγόμενης διάσπασης σε pH 6,0 της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου της με την MalβCD 1:1 (3,86×10⁻⁵ M).

Αποτελέσματα

Η φωτοαποικοδόμηση της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης CIP ακολουθεί πρωτοταξική κινητική και στο pH 6,0.

Η σταθερά ταχύτητας στο pH 6,0 είναι μικρότερη παρουσία MalβCD.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου CIP:MalβCD οδηγεί σε σταθεροποίηση του φαρμάκου κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται στο ίδιο γράφημα, σε pH 6,0 και 7,4, οι συναρτήσεις των log που εκφράζουν τη πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης CIP.



Σχήμα 4.11: Συγκριτική γραφική απεικόνιση σε pH 7,4 και 6,0 του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της ελεύθερης CIP σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης σε ακτινοβολία.



Σχήμα 4.12: Συγκριτική γραφική απεικόνιση σε pH 7,4 και 6,0 του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου CIP:MalβCD σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης σε ακτινοβολία.

Αποτελέσματα

Σε διαλύματα pH 6,0 οι φωτοεπαγόμενες μετατροπές που υφίσταται η CIP βαίνουν με αργότερο ρυθμό από ότι σε pH 7,4. Σε διαλύματα pH 6,0 η δημιουργία συμπλόκου με MalβCD βελτιώνει ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα.

4.2.3.3. Μελέτη της φωτολυτικής αποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου της με μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σε pH 3,0:

Μελετήθηκε η επίδραση της σύμπλεξης με τη MalβCD στην ταχύτητα της φωτοαποικοδόμησης της CIP σε διαλύματα με pH 3,0.

Στη συνέχεια μελετάται αν η περαιτέρω ελάττωση στην τιμή του pH οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη σταθεροποίηση παρουσία MalβCD, όταν οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρούνται σταθερές.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται δύο διαλύματα CIP της ίδιας συγκέντρωσης. Στο ένα διάλυμα θα προστεθεί ισομοριακή ποσότητα MalβCD.

Παρασκευάζεται διάλυμα Σ5 συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, το οποίο θα αποτελέσει το πρώτο διάλυμα. Η αραίωση πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 3,0. Ζυγίζεται στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα MalβCD (6,3 mg, MB 1629,45, 3,87×10⁻⁶ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml, προστίθενται 10 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 3,0, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει κυκλοδεξτρίνη και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζεται το σύμπλοκο όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Διάλυμα υδροχλωρικής κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 3,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 97106 x (Συγκέντρωση) - 7360,6, όπου R^2 =0,9992

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 3,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 99969 x (Συγκέντρωση) + 15739, όπου R^2 =0,9998

Παρακολουθείται η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP σε ελεύθερη μορφή και στο διάλυμα του συμπλόκου και κατασκευάζεται το συγκριτικό γράφημα.



Σχήμα 4.13: Συγκριτική γραφική παράσταση της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης σε pH 3,0 της ελεύθερης CIP και του συμπλόκου της με τη MalβCD 1:1 (3,86×10⁻⁵ M).

Αποτελέσματα

Όπως διαπιστώνεται από τις γραφικές απεικονίσεις, σε pH 3,0 η συγκέντρωση της CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τη MalβCD, δε μεταβάλλεται σημαντικά σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία.

Συμπεράσματα

Στα διαλύματα με pH 7,4, 6,0 και 3,0, η φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο της με τη MalβCD ακολουθεί πρωτοταξική κινητική.

Στα τρία pH που μελετήθηκαν, όσο περισσότερο όξινο ήταν το διάλυμα, τόσο σταθερότερο ήταν το δραστικό συστατικό.

Σε pH 7,4 ο σχηματισμός του συμπλόκου CIP:MalβCD δεν επηρεάζει τη σταθερότητα του φαρμάκου κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία.

Σε pH 6,0 υπάρχει σημαντική βελτίωση της σταθερότητας. Είναι γνωστό ότι σε όξινη περιοχή, ευνοείται ο σχηματισμός των μοριακών διμερών της CIP, τα οποία όπως φαίνεται καθυστερούν τις φωτολυτικές διαδικασίες.

Η δημιουργία συμπλόκου με τη MalβCD σε pH 6,0 επηρεάζει τη σταθερότητα της CIP. Στη συγκεκριμένη συγκέντρωση η συμπλοκοποίηση ευνοεί τη σταθεροποίηση του φαρμάκου.

Σε pH 3,0 η συγκέντρωση του φαρμάκου διατηρείται σχεδόν σταθερή στην ακτινοβολία ανεξάρτητα από την παρουσία της MalβCD.

4.2.4. Μελέτη επίδρασης της προσθήκης άλατος KCI στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης παρουσία και απουσία κυκλοδεξτρινών σε διαφορετικά pH

Η προσθήκη αλάτων καλίου παρουσιάζει συχνά φωτοπροστατευτική επίδραση σε δραστικά μόρια. Επομένως, στη περίπτωση της CIP η προσθήκη αλάτων, όπως το KBr ή το KCl, θα μπορούσε να βελτιώσει τη φωτοσταθερότητα της δραστικής ένωσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης άλατος KCl στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP σε διαφορετικά pH.

4.2.4.1. Μελέτη της φωτολυτικής αποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου της με τη β-κυκλοδεξτρίνη και τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη μετά τη προσθήκη KCl σε διαλύματα pH 7,4

Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης: Παρασκευάζονται τρία διαλύματα CIP συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, απουσία και παρουσία ισομοριακής ποσότητας MalβCD ή βCD όπως περιγράφονται παρακάτω. Κάθε διάλυμα παρασκευάζεται έτσι ώστε να περιέχει 0,075 M KCI.

Ζυγίζονται 54 mg KCl και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει CIP σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁵ M.

Ζυγίζονται 54 mg KCl και 1,3 mg MalβCD (MB 1629,45, 7,98×10⁻⁷ mol), προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 20 ml με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει MalβCD και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Ζυγίζονται 54 mg KCl και 0,9 mg βCD (MB 1135, 7,93×10⁻⁷ mol), προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 20 ml με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει βCD και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζονται τα σύμπλοκα όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Διάλυμα κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ παρουσία KCl 0,075 Μ σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 109306 x (Συγκέντρωση) + 940,2, όπου R^2 =0,9999

Παρουσία KCI 0,075 M σε pH 7,4, υφίσταται η εκθετική σχέση της συγκέντρωσης της CIP με το χρόνο.

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,01 x (χρόνος)] - 4,4362, όπου R²=0,9917,

 $k_{CIP,KCI,pH 7,4} = (2,30\pm0,015) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,CIP,KCI,pH 7,4} = (30,13\pm0,19) \text{ min}.$

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ παρουσία KCI 0,075 M σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 105016 x (Συγκέντρωση) - 532,52, όπου R^2 =0,9999

Παρουσία KCI 0,075 M σε pH 7,4, το γράφημα που παρουσιάζει τη πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP στο διάλυμα του συμπλόκου με τη MalβCD εξακολουθεί να έχει εκθετική μορφή.

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0099 x (χρόνος)] - 4,4059, όπου R^2 =0,994,

 $k_{\text{CIP:MalβCD,KCI,pH 7,4}}$ =(2,28±0,02)×10⁻² min⁻¹. και $t_{1/2,\text{CIP:MalβCD,KCI,pH 7,4}}$ = (30,40±0,27) min.

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ παρουσία KCl 0,075 M σε pH 7,4:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 106619 x (Συγκέντρωση) + 131,78, όπου R^2 =0,9999

Παρουσία KCl 0,075 M σε pH 7,4, η συνάρτηση που παρουσιάζει τη πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP στο διάλυμα του συμπλόκου με τη βCD είναι εκθετική, όπως παραπάνω.

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0093 x (χρόνος)] - 4,4166, όπου R²=0,9978,

 $k_{\text{CIP:}\beta\text{CD,KCI,pH 7,4}} = (2,14\pm0,02) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:}\beta\text{CD,KCI,pH 7,4}} = (32,38\pm0,30) \text{ min}.$

Τα παραπάνω γίνονται καλύτερα αντιληπτά αν αποδοθούν σε κοινό γράφημα.



Σχήμα 4.14: Συγκριτική φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση παρουσία KCI (0,075 M) της CIP (3,86×10⁻⁵ M, pH 7,4) σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο 1:1 με βCD και MalβCD.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η φωτοαποικοδόμηση της CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τη βCD ή τη MalβCD παρουσία και του KCl σε pH 7,4 ακολουθεί πρωτοταξική κινητική.

Διαπιστώνεται ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες παρουσία MalβCD υπάρχει μικρή βελτίωση στη σταθερότητα της CIP, ενώ σχετικά μεγαλύτερη είναι η σταθεροποίηση παρουσία βCD.

Συγκρίνοντας τα τελευταία αποτελέσματα (παρουσία KCl, σε pH 7,4) με τα αντίστοιχα πειράματα όπου δεν έχει προστεθεί άλας καλίου διαπιστώνονται τα εξής:

Στο αλκαλικό περιβάλλον (pH 7,4), η φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP ($t_{1/2}$ = 31,08 min) επιταχύνεται παρουσία KCI ($t_{1/2}$ = 30,13 min). Η επιτάχυνση αυτή παρατηρείται και για τα σύμπλοκα με τη βCD ($t_{1/2}$ = 32,69 και 32,38 min απουσία και παρουσία KCI, αντίστοιχα) και τη MalβCD ($t_{1/2}$ = 33,80 και 30,40 min απουσία και παρουσία KCI, αντίστοιχα).



Σχήμα 4.15: Συγκριτική φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση απουσία και παρουσία KCI (0,075 M) της CIP (3,86×10⁻⁵ M, pH 7,4) σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο 1:1 με βCD και MalβCD.

Η CIP φέρει ελεύθερη καρβοξυ- και αμινομάδα. Σε κατάλληλες συνθήκες, οι ομάδες αυτές ιονίζονται και αναπτύσσουν δεσμούς με άλλα μόρια CIP, σχηματίζοντας μοριακά διμερή της CIP. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η παρουσία μοριακών διμερών επιβραδύνει τις φωτολυτικές διαδικασίες. Η παρουσία αλάτων καλίου μπορεί

να εμποδίσει τη δημιουργία μοριακών διμερών, επιδιαλυτώνοντας τις πολικές ομάδες της CIP και να επιταχύνει τη φωτολυτική αποικοδόμησή της.

4.2.4.2. Μελέτη της φωτολυτικής αποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου της με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη μετά τη προσθήκη άλατος KCI σε διαλύματα pH 6,0

<u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται τρία διαλύματα CIP συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M, απουσία και παρουσία ισομοριακής ποσότητας MalβCD ή βCD ως ακολούθως. Κάθε διάλυμα περιέχει 0,075 M KCI.

Ζυγίζονται 54 mg KCl και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 6,0. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει CIP σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁵ M.

Ζυγίζονται 54 mg KCl και 1,3 mg MalβCD (MB 1629,45, 7,98×10⁻⁷ mol), προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 6,0. Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει MalβCD και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζονται τα σύμπλοκα όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Διάλυμα υδροχλωρικής κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ παρουσία KCI 0,075 Μ σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 104110 x (Συγκέντρωση) - 519,62, όπου R^2 =0,9997

Παρουσία KCl 0,075 M σε pH 6,0, η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP είναι εκθετική.

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωσης) = [-0,0048 x (χρόνος)] - 4,4314, όπου R^2 =0,9885,

 $k_{\text{CIP,KCI,pH 6,0}} = (1,11\pm0,02) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ } \kappa \alpha \text{ } t_{1/2,\text{CIP,KCI,pH 6,0}} = (62,43\pm1,12) \text{ min}$

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης 3,86×10⁻⁵ Μ παρουσία KCI 0,075 M σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 107727 x (Συγκέντρωση) - 2361,7, όπου R^2 =0,9999

Ομοίως, παρουσία KCl 0,075 M σε pH 6,0 παρακολουθείται η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP σε διάλυμα συμπλόκου με τη MalβCD και έχει εκθετική μορφή.

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωσης) = [-0,0047 x (χρόνος)] - 4,4526, όπου R^2 =0,9908,

 $k_{\text{CIP:MalβCD,KCI,pH 6,0}} = (1,08\pm0,017) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ και } t_{1/2,\text{CIP:MalβCD,KCI,pH 6,0}} = (64,16\pm1,01) \text{ min}.$

Τα παραπάνω γίνονται καλύτερα αντιληπτά αν αποδοθούν στο ίδιο γράφημα.



Σχήμα 4.16: Συγκριτική φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση παρουσία KCI (0,075 M) της CIP (3,86×10⁻⁵ M, pH 6,0) σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο με τη MalβCD 1:1.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η φωτοαποικοδόμηση της CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τη MalβCD παρουσία του KCI και σε pH 6,0 ακολουθεί πρωτοταξική κινητική.

Διαπιστώνεται ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες παρουσία MalβCD υπάρχει μικρή βελτίωση στη σταθερότητα της CIP.

Συγκρίνοντας τα τελευταία αποτελέσματα (παρουσία KCl, σε pH 6,0) με τα αντίστοιχα πειράματα όπου δεν έχει προστεθεί άλας καλίου διαπιστώνονται τα εξής:

Στο όξινο περιβάλλον (pH 6,0), η φωτολυτική αποικοδόμηση της ελεύθερης CIP (t_{1/2}=57,75 min) επιβραδύνεται παρουσία KCI (t_{1/2}=62,43 min).

Αντιθέτως, στο διάλυμα του συμπλόκου με τη MalβCD παρατηρείται επιτάχυνση της φωτολυτικής αποικοδόμηση της CIP (t_{1/2}=66,63 και 64,16 min απουσία και παρουσία KCI, αντίστοιχα).



Σχήμα 4.17: Συγκριτική φωτοεπαγόμενη αποικοδόμηση απουσία και παρουσία KCl (0,075 M) της CIP (3,86×10⁻⁵ M, pH 6,0) σε ελεύθερη μορφή και στο σύμπλοκο με τη MalβCD 1:1.

Στο όξινο περιβάλλον (pH 6,0), η αναμενόμενη φωτοπροστατευτική επίδραση από την προσθήκη των αλάτων καλίου παρατηρείται μόνο στο διάλυμα της ελεύθερης CIP.

Η παρουσία του KCl θεωρείται ότι δεν οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της φωτοχημικής δραστικότητας του δραστικού μορίου, εγκαταλείπεται και δεν δοκιμάζεται στις υπόλοιπες κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν. 4.2.5. Μελέτη επίδρασης της σύμπλεξης με τις περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες bpsp και gpsp στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης σε διαλύματα pH 6,0

bpsp και gpsp: περι-υποκατεστημένη βCD και γCD, αντίστοιχα, με υποκαταστάτες 6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ ομάδες

Μελετήθηκε η επίδραση της συμπλοκοποίησης της CIP με δύο νέες, συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, τις bpsp και gpsp στην ταχύτητα της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης του φαρμάκου.

Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης: Παρασκευάζονται δύο διαλύματα με την ίδια συγκέντρωση CIP και ισομοριακή ποσότητα διαφορετικής συνθετικής κυκλοδεξτρίνης ως ακολούθως:

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα συνθετικής κυκλοδεξτρίνης bpsp (3,7 mg, MB 1906, 1,94×10⁻⁶ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και προστίθενται 5 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194).

Σε μια δεύτερη ογκομετρική φιάλη των 50 ml, μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα συνθετικής κυκλοδεξτρίνης gpsp (4,2 mg, MB 2177, 1,93×10⁻⁶ mol) και προστίθενται 5 ml πυκνού διαλύματος CIP A.

Οι δύο φιάλες αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 6,0, ώστε τα διαλύματα που θα προκύψουν να περιέχουν κυκλοδεξτρίνη και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζεται το σύμπλοκο όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων κατασκευάζονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:bpsp 3,86×10⁻⁵ Μ σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 99700 x (Συγκέντρωση) + 1691,4, όπου R^2 =0,9999

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0039 x (χρόνος)] - 4,4291, όπου R²=0,9955,

 $k_{\text{CIP:bpsp,pH 6,0}} = (8,9\pm0,1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:bpsp,pH 6,0}} = (77,86\pm0,87) \text{ min}.$

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:gpsp 3,86×10⁻⁵ M σε pH 6,0:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 102431 x (Συγκέντρωση) + 2171,1, όπου R^2 =0,9999

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

```
log (συγκέντρωση)= [-0,0045 x (χρόνος)] - 4,4316, όπου R<sup>2</sup>=0,9961 και
```

```
k_{\text{CIP:gpsp,pH 6,0}} = (1,04\pm0,015) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:gpsp,pH 6,0}} = (66,63\pm0,96) \text{ min}.
```

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η φωτοαποικοδόμηση της CIP εξακολουθεί να παρουσιάζει πρωτοταξική κινητική μετά από τη σύμπλεξη με τις δύο νέες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες bpsp και gpsp που δοκιμάστηκαν.

Παρατηρείται ότι παρουσία bpsp ή gpsp η σταθερότητα της CIP βελτιώνεται.

Στην συνέχεια η πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της ελεύθερης CIP αρχικής συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M σε pH 6,0 και των συμπλόκων της με όλες τις συνθετικές κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν μέχρι στιγμής, συνοψίζονται σε ένα κοινό γράφημα.



Σχήμα 4.18: Συγκριτική φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP (3,86×10⁻⁵ M, pH 6,0), σε διαλύματα ελεύθερου φαρμάκου και των συμπλόκων της με MalβCD, bpsp και gpsp.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 4.18 ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ της CIP και των διαφορετικών συνθετικών περι-υποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών, οδηγεί σε σταθεροποίηση του φαρμάκου κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία.

Στο όξινο περιβάλλον (pH 6,0), η φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP (t_{1/2}=57,75 min) επιβραδύνεται παρουσία των κυκλοδεξτρινών που φέρουν ως υποκαταστάτη σάκχαρο (MalβCD, t_{1/2}=66,63) και περι-υποκατεστημένη γCD με υποκαταστάτες 6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ ομάδες (gpsp, t_{1/2}=66,63) καθώς και βCD με υποκαταστάτες 6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ ομάδες (bpsp, t_{1/2}=77,86).

Η βελτίωση της φωτοσταθερότητας της CIP που οφείλεται στον εγκλεισμό μπορεί να αποτυπωθεί με αύξουσα σειρά CIP<CIP:MalβCD=CIP:gpsp<CIP:bpsp.

Τα αποτελέσματα αυτά θεωρήθηκαν πολύ σημαντικά, διότι μας φανέρωσαν: α) την απουσία αρνητικής επίδρασης των περι-υποκατεστημένων β- και γCDs στη φωτοσταθερότητα της CIP όταν βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκων με αυτές και β) τη βελτίωση της φωτασταθερότητας της CIP σε κάθε περίπτωση, η οποία αποτελεί βασικό αρνητικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου δραστικού μορίου.

4.2.6. Μελέτη επίδρασης της προσθήκης της περι-υποκατεστημένης bpsp με υποκαταστάτες το σάκχαρο γαλακτοζαμίνη (bpsp+GalOHNH₂) στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης α) ως μίγμα δραστικού συστατικού και συνθετικής κυκλοδεξτρίνης και β) ως σύμπλοκο σε υδατικά διαλύματα

Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης: Παρασκευάζονται διαλύματα CIP της ίδιας συγκέντρωσης με τη προσθήκη σε αυτά ισομοριακής κάθε φορά ποσότητας κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂.

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα συνθετικής κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂ (3,9 mg, MB 2045,2, 1,91×10⁻⁶ mol) μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml, προστίθενται 5 ml πυκνού διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC, ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να περιέχει κυκλοδεξτρίνη και CIP σε ισομοριακή ποσότητα συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε νερό, προκειμένου να διευκολυνθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου, καθώς ο εγκλεισμός ευνοείται θερμοδυναμικά (ΔΗ) στο υδατικό περιβάλλον. Το λιπόφιλο δραστικό συστατικό ή μέρος αυτού εισχωρεί στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, η οποία έχει σχετικά μεγαλύτερη λιποφιλία από την εξωτερική επιφάνεια.

Μέρος του παραπάνω διαλύματος υφίσταται τη διαδικασία συμπλοκοποίησης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1, με τη μέθοδο α (σύμπλοκο 30 °C) και ένα άλλο μέρος του διαλύματος με τη μέθοδο β (σύμπλοκο 60 °C), οπότε παραλαμβάνεται το σύμπλοκο CIP:bpsp+GalOHNH₂ σε υδατικό διάλυμα.

Το υπόλοιπο φωτολύεται απευθείας (μίγμα).

Ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων κατασκευάζονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

Διάλυμα κυπροφλοξακίνης: bpsp+GalOHNH₂ μίγμα (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 99853 x (Συγκέντρωση) - 5524,8, όπου R²=0,9999

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0019 x (χρόνος)] - 4,4454, όπου R²=0,9905,

 $k_{CIP:bpsp+GalOHNH2,μíγμα}$ =(4,4±0,1)×10⁻³ min⁻¹ και $t_{1/2,CIP: bpsp+GalOHNH2,μíγμα}$ =(157,50±3,58) min.

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης: bpsp+GalOHNH₂ 30 °C (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 94371 x (Συγκέντρωση) - 12279, όπου R^2 =0,9954

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0012 x (χρόνος)] + 0,5632, όπου R²=0,9909,

Διάλυμα συμπλόκου κυπροφλοξακίνης: bpsp+GalOHNH₂ 60 °C (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 90231 x (Συγκέντρωση) - 2843,6, όπου R^2 =0,9998

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0021 x (χρόνος)] - 4,4523, όπου R²=0,9905,

 $k_{\text{CIP:bpsp+GalOHNH2,60 °C}}$ = (4,8±0,1)×10⁻³ min⁻¹ και $t_{1/2,\text{CIP:bpsp+GalOHNH2,60 °C}}$ = (144,38±3,01) min.

Τα αποτελέσματα της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP παρουσία bpsp+GalOHNH₂ υπό τη μορφή μίγματος σε νερό ή συμπλόκου σε νερό που μελετήθηκαν, συνοψίζονται σε ένα κοινό γράφημα, προκειμένου να έχουμε συγκριτικά συμπεράσματα.



Σχήμα 4.19: Συγκριτική γραφική απεικόνιση της φωτοεπαγόμενης αποικοδόμησης της ελεύθερης CIP και διαλύματος CIP:bpsp+GalOHNH₂ 1:1 μίγμα και σύμπλοκο στους 30 και στους 60 °C.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η πρωτοταξική κινητική της φωτοαποικοδόμησης της CIP παραμένει και παρουσία της περι-υποκατεστημένης συνθετικής βCD: bpsp+GalOHNH₂.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 4.19 η παρουσία της bpsp+GalOHNH₂ ($t_{1/2}$ =247,50, 144,38 και 157,50 στο σύμπλοκο στους 30, στους 60 °C και στο μίγμα αντίστοιχα) οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της σταθερότητας της CIP σε διαλύματα στο νερό ($t_{1/2}$ = 91,18).

Το σύμπλοκο που παρασκευάζεται με τη μέθοδο α (30 °C) είναι εκείνο που οδηγεί στη σημαντικότερη βελτίωση της σταθερότητας της CIP και αυτή η μέθοδος επιλέγεται στη συνέχεια για τη παρασκευή των συμπλόκων με κυκλοδεξτρίνες που φέρουν περι-υποκαταστάτες σάκχαρα. Το σύμπλοκο που παρασκευάζεται με τη μέθοδο β (60 °C) οδηγεί σε μικρότερη βελτίωση σε σχέση με το μίγμα, πιθανώς λόγω των υφιστάμενων υδρολύσεων στις οποίες είναι ευαίσθητες οι νέες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες. 4.2.7. Μελέτη επίδρασης της σύμπλεξης με διαφορετικές περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους σάκχαρα, στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της κυπροφλοξακίνης σε υδατικά διαλύματα

<u>Παρασκευή διαλυμάτων φωτόλυσης:</u> Παρασκευάζονται διαλύματα CIP 3,86×10⁻⁵ M, με τη προσθήκη σε αυτά ισομοριακής κάθε φορά ποσότητας διαφορετικής κυκλοδεξτρίνης. Οι κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες δοκιμάζονται είναι συνθετικές, περι-υποκατεστημένες και φέρουν ως υποκαταστάτες και σάκχαρα. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε κάθε περίπτωση με νερό καθαρότητας HPLC.

Μεταφέρονται 2 ml διαλύματος CIP A (κεφάλαιο 4.2.1, σελ 194) σε ογκομετρική φιάλη 20 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα CIP συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Ζυγίζονται 2,5 mg συνθετικής κυκλοδεξτρίνης bpsp+ManOHNH₂ (MB 3188,34, 7,84×10⁻⁷ mol), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζονται 2,8 mg συνθετικής κυκλοδεξτρίνης gpsp+ManOHNH₂ (MB 3643,82, 7,68×10⁻⁷ mol), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζονται 1,3 mg MalβCD (MB 1629,45, 7,98×10⁻⁷ mol), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζονται 3,1 mg gpsp+NAcGluOHNH₂ (MB 3972,23, 7,80×10⁻⁷ mol), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζονται 2,5 mg bpsp+GalOHNH₂ (MB 3188,34, 7,84×10⁻⁷ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC.



Ζυγίζεται 2,7 mg bpsp+NAcGalOHNH₂ (MB 3473,21, 7,73×10⁻⁷ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζεται 2,7 mg bpsp+NAcGluOHNH₂ (MB 3475,70, 7,77×10⁻⁷ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Ζυγίζεται 2,4 mg bpsp+FucOHNH₂ (MB 3076,35, 7,704×10⁻⁷ mol), μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, προστίθενται 2 ml πυκνού διαλύματος CIP A και αραιώνονται μέχρι χαραγής.



Στη συνέχεια παρασκευάζονται τα σύμπλοκα όπως έχει ήδη περιγραφεί με τη μέθοδο α (κεφ. 1.2.1.1) και ακολουθεί η γνωστή διαδικασία προετοιμασίας, φωτόλυσης, συλλογής, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Στην ίδια κατεργασία υποβάλλεται και το σκέτο διάλυμα κυκλοδεξτρίνης, προκειμένου να έχουμε συγκριτικά αποτελέσματα.

Παρακολουθείται η συγκέντρωση της CIP σε ελεύθερη μορφή και στα διαλύματα των συμπλόκων σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης σε ακτινοβολία αερίου Ξένου και κατασκευάζονται οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις, που αποδίδουν τη πορεία της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP σε κάθε περίπτωση.

Διάλυμα κυπροφλοξακίνης 3,86×10⁻⁵ Μ:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

```
Επιφάνεια κορυφής = 94583 x (Συγκέντρωση) + 1052, όπου R^2=0,9993
```

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0033 x (χρόνος)] + 0,5296, όπου R^2 =0,9956,

 $k_{CIP}=(7,6\pm0,1)\times10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ } \kappa \alpha \text{ } t_{1/2,CIP}=(91,18\pm1,19) \text{ min}.$

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:bpsp+ManOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 100587 x (Συγκέντρωση) - 543,59, όπου R^2 =0,9996

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0024 x (χρόνος)] + 0,4975, όπου R^2 =0,9954,

 $k_{\text{CIP:bpsp+ManOHNH2}} = (5,5\pm0,28) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:bpsp+ManOHNH2}} = (126,0\pm6,41) \text{ min}.$

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:gpsp+NAcGluOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 89278 x (Συγκέντρωση) + 39641, όπου R^2 =0,9917

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

log (συγκέντρωση) = [-0,0027 x (χρόνος)] + 0,5899, όπου R^2 =0,9939,

 $k_{CIP:gpsp+NAcGluOHNH2}=(6,2\pm0,36)\times10^{-3} \text{ min}^{-1}, t_{1/2,CIP:gpsp+NAcGluOHNH2}=(111,77\pm6,48) \text{ min}.$

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:gpsp+ManOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Επιφάνεια κορυφής = 157403 x (Συγκέντρωση) - 18730, όπου R^2 =0,9944

Στην συνέχεια τα αποτελέσματα της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP αρχικής συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ Μ σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τις

log (συγκέντρωση) = [-0,0018 x (χρόνος)] + 0,5773, όπου R²=0,9955, $k_{CIP:bpsp+FucOHNH2} = (4,1\pm0,14) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,CIP:bpsp+FucOHNH2} = (169,02\pm5,77) \text{ min}.$

Επιφάνεια κορυφής = 64165 x (Συγκέντρωση) + 130,58, όπου R^2 =0,9999 Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:bpsp+FucOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

log (συγκέντρωση) = [-0,0023 x (χρόνος)] + 0,5499, όπου R^2 =0,9921, $k_{\text{CIP:bpsp+NAcGluOHNH2}} = (5,3\pm0,14) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:bpsp+NAcGluOHNH2}} = (130,75\pm3,45) \text{ min}.$

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

Επιφάνεια κορυφής = 55476 x (Συγκέντρωση) - 2300,6, όπου R^2 =0,9996

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:bpsp+NAcGluOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

 $k_{\text{CIP:bpsp+NAcGalOHNH2}} = (6,4\pm0,15) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,\text{CIP:bpsp+NAcGalOHNH2}} = (108,28\pm2,54) \text{ min}.$

log (συγκέντρωση) = [-0,0021 x (χρόνος)] + 0,5541, όπου R²=0,9985,

συνάρτηση με το χρόνο:

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε

Επιφάνεια κορυφής = 53283 x (*Συγκέντρωση*) - 1330,2, όπου R²=0,9999

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:bpsp+NAcGalOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

 $k_{\text{CIP:bpsp+GalOHNH2}} = (2,8\pm0,1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ } \kappa \alpha \text{i} t_{1/2,\text{CIP:bpsp+GalOHNH2}} = (247,50\pm8,84) \text{ min}.$

log (συγκέντρωση) = [-0,0012 x (χρόνος)] + 0,5632, όπου R^2 =0,9909,

συνάρτηση με το χρόνο:

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε

Επιφάνεια κορυφής = 94371 x (Συγκέντρωση) - 12279, όπου R^2 =0,9954

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς:

Σύμπλοκο κυπροφλοξακίνης:bpsp+GalOHNH₂ (3,86×10⁻⁵ M):

 $k_{CIP:qpsp+ManOHNH2} = (4,6\pm0, 28) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ kal } t_{1/2,CIP:qpsp+ManOHNH2} = (150,65\pm9,17) \text{ min}.$

log (συγκέντρωση) = [-0,002 x (χρόνος)] + 0,5234, όπου R^2 =0,9934,

Ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης δίνει ευθύγραμμη σχέση σε συνάρτηση με το χρόνο:

συνθετικές κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν, συνοψίζονται σε ένα κοινό γράφημα, προκειμένου να έχουμε συγκριτικά συμπεράσματα.



Σχήμα 4.20: Συγκριτική γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της CIP σε διαλύματα ελεύθερου φαρμάκου και των συμπλόκων της με τις νέες περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες σε νερό, που φέρουν στο μόριό τους σάκχαρο σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η πρωτοταξική κινητική της φωτοαποικοδόμησης της CIP υφίσταται και παρουσία όλων των νέων περι-υποκατεστημένων με υποκαταστάτες και σάκχαρα συνθετικών κυκλοδεξτρινών.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 4.20 ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ της CIP και όλων των διαφορετικών περι-υποκατεστημένων συνθετικών κυκλοδεξτρινών, που φέρουν στο μόριό τους σάκχαρο, οδηγεί σε σταθεροποίηση του φαρμάκου κατά την έκθεσή του στην ακτινοβολία.

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ανάλυσης των υπερμορίων συγκαταλέγονται και μέθοδοι ελέγχου μεταβολής της ταχύτητας των αντιδράσεων. Στην περίπτωση της

συγκεκριμένης μελέτης, η μεταβολή που παρατηρείται στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP όταν αυτή βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκου με όλες τις συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες αποδεικνύει το σχηματισμό των συμπλόκων.

Πίνακας 4.2: Σταθερές ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης των διαλυμάτων ελεύθερης CIP και συμπλόκων μεταξύ της CIP και όλων των διαφορετικών περι-υποκατεστημένων συνθετικών κυκλοδεξτρινών, που φέρουν στο μόριό τους σάκχαρο και οι αντίστοιχοι χρόνοι ημίσειας ζωής.

Διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης 3,86×10 ⁻⁵ (Μ)	Κυκλοδεξτρίνη	Σταθερά ταχύτητας φωτοαποικοδόμησης k (min ⁻¹)	Χρόνος ημιζωής t _{1/2} (min)	
CIP		(7,6±0,1)×10 ⁻³	(91,18±1,19)	
CIP:bpsp+ManOHNH ₂	bpsp+ManOHNH ₂	(5,5±0,28)×10 ⁻³	(126,0±6,41)	
CIP:gpsp+NAcGluOHNH ₂	gpsp+NAcGluOHNH ₂	(6,2±0,36)×10 ⁻³	(111,77±6,48)	
CIP:gpsp+ManOHNH ₂	gpsp+ManOHNH ₂	(4,6±0, 28)×10 ⁻³	(150,65±9,17)	
CIP:bpsp+GalOHNH ₂	bpsp+GalOHNH ₂	(2,8±0,1)×10 ⁻³	(247,50±8,84)	
CIP:bpsp+NAcGalOHNH ₂	bpsp+NAcGalOHNH ₂	(6,4±0,15)×10⁻³	(108,28±2,54)	
CIP:bpsp+NAcGluOHNH ₂	bpsp+NAcGluOHNH ₂	(5,3±0,14)×10 ⁻³	(130,75±3,45)	
CIP:bpsp+FucOHNH ₂	bpsp+FucOHNH ₂	(4,1±0,14)×10 ⁻³	(169,02±5,77)	

Η περι-υποκατεστημένη συνθετική κυκλοδεξτρίνη, που φέρει στο μόριό της σάκχαρο και η οποία βελτιώνει τη σταθερότητα της CIP σε μεγαλύτερο βαθμό, είναι η bpsp+GalOHNH₂ ($t_{1/2}$ =247,50) και ακολουθούν με φθίνουσα σειρά οι bpsp+FucOHNH₂ ($t_{1/2}$ =169,02) > gpsp+ManOHNH₂ ($t_{1/2}$ =150,65) > bpsp+NAcGluOHNH₂ ($t_{1/2}$ =130,75) > bpsp+ManOHNH₂ ($t_{1/2}$ =126,0) > gpsp+NAcGluOHNH₂ ($t_{1/2}$ =111,77) > bpsp+NAcGalOHNH₂ ($t_{1/2}$ =108,28) > CIP ($t_{1/2}$ =91,08).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΑΛΤΟΖΥΛΟ-β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ NMR

Η παρουσία ορισμένων εκδόχων σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα είναι δυνατό να επηρεάσει τη δραστικότητα του φαρμάκου και την αποτελεσματικότητα του δραστικού συστατικού. Επομένως, όταν συμβαίνει αυτό, σύμφωνα με τις ισχύουσες Διεθνείς Κανονιστικές Διατάξεις θα πρέπει να υπάρχει μέθοδος προσδιορισμού και των εκδόχων. Στην παρούσα εργασία τα έκδοχα που μελετήθηκαν είναι οι διάφορες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία συμπλόκου με τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Φαίνεται πως λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυκλοδεξτρινών και των κινολονών που δοκιμάστηκαν και περιγράφονται νωρίτερα (κεφάλαιο 4) επηρεάζεται τουλάχιστον η φωτοσταθερότητα του φαρμάκου, συνήθως δε βελτιώνεται. Επίσης, σε ιδανικές συνθήκες, το δραστικό συστατικό που βρίσκεται προστατευμένο στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης υπό τη μορφή συμπλόκου εγκλεισμού, θα αποδεσμευτεί εκλεκτικά στον ιστό που έχει προσβληθεί από μικρόβια που αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με την συγκεκριμένη κυκλοδεξτρίνη, ως αποτέλεσμα ενός μηχανισμού στοχευμένης δράσης. Οι κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες διαθέτουν συνδεδεμένα σάκχαρα στο μόριό τους, όπως η MalβCD και οι νέες συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες συντέθηκαν στα πλαίσια του συγκεκριμένου προγράμματος, μπορεί να επηρεάσουν τη δραστικότητα ενός φαρμάκου, καθώς η εκλεκτική αποδέσμευση στην περιοχή της λοίμωξης, μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Επομένως θα πρέπει να υπάρχει μέθοδος προσδιορισμού αυτών.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό των κυκλοδεξτρινών, οι δυνατότητες ανάλυσής τους είναι περιορισμένες. Όπως είναι γνωστό, οι κυκλοδεξτρίνες δε διαθέτουν χρωμοφόρες ομάδες, επομένως αποκλείονται μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού όπου δεν λαμβάνεται σήμα. Επίσης αποκλείονται οι ανιχνευτές φθορισμού, εφόσον οι κυκλοδεξτρίνες δεν φθορίζουν. Οι μέθοδοι, οι οποίες προτείνονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Σκέδασης Φωτός (ELSD) και η Φασματοσκοπία Μάζας MS. Όσον αφορά στη φασματοσκοπία MS, οι συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες έχουν πολύ μεγάλα μοριακά βάρη, τα οποία υπερβαίνουν τη διακριτική ικανότητα του διαθέσιμου οργάνου στο παρόν εργαστήριο και επομένως η δυνατότητα εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου καθίσταται αδύνατη στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Αντιθέτως, η υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή ELS είναι δυνατή και θα μελετηθεί σε επόμενο κεφάλαιο. Επίσης θεωρήσαμε ότι θα ήταν δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (qNMR) με τη βοήθεια χρήσης εσωτερικού προτύπου.

Στη παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ταυτόχρονου προσδιορισμού της CIP και της MalβCD σε σύμπλοκα με στοιχειομετρική αναλογία 1:1, με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR. Η σύμπλεξη των δραστικών μορίων με κυκλοδεξτρίνες, έχει στόχο τη βελτιστοποίηση της δραστικότητάς τους και ειδικότερα της αντιμικροβιακής δράσης αυτών έναντι ανθεκτικών στελεχών των παθογόνων μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός των κυκλοδεξτρινών και των δραστικών συστατικών των οποίων τη δράση επηρεάζουν κρίνεται αναγκαίος.

5.1. Μέθοδος qNMR

Η μέθοδος στηρίζεται στη συσχέτιση των τιμών ολοκλήρωσης των κορυφών συντονισμού επιλεγμένων πρωτονίων με το εσωτερικό πρότυπο.

α) Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της CIP, επιλέχθηκαν να ολοκληρώνονται οι κορυφές συντονισμού των Η-5 και Η-8, οι οποίες δεν εμφανίζουν επικάλυψη με κορυφές της κυκλοδεξτρίνης. Στους υπολογισμούς χρησιμοποιείται το άθροισμα των ολοκληρώσεων των δύο επιλεγμένων πρωτονίων, αφού μετά από τη σχετική επεξαργασία των δεδομένων λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα.

β) Στην περίπτωση της MalβCD, για τους υπολογισμούς ολοκληρώνονται και χρησιμοποιούνται οι κορυφές των H-4 της γλυκόζης του μαλτοζυλο- υποκαταστάτη και συγκεκριμένα της γλυκόζης που δε συνδέεται απευθείας με τη βCD (B, σχήμα 1.16). Τα συγκεκριμένα πρωτόνια δίνουν τριπλή κορυφή συντονισμού στα φάσματα ¹H NMR (3,38 ppm), η οποία μπορεί να ολοκληρωθεί με ακρίβεια, αφού δεν εμφανίζεται στο ίδιο σημείο άλλη κορυφή.

γ) Οι ενώσεις: βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο, υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου, επτανοσουλφονικό οξύ, αδαμανταναμίνη και βρωμιούχο τετραμεθυλαμμώνιο ελέχθησαν ως προς τη καταλληλότητά τους για χρήση ως εσωτερικά πρότυπα. Τα φάσματα ¹Η NMR αυτών παρουσία του συμπλόκου CIP και MalβCD παρουσιάζονται στη συνέχεια (σχήμα 5.1)

δ) Ως εσωτερικό πρότυπο επιλέχτηκε το βρωμιούχο τετραμεθυλαμμώνιο (TMA). Το φάσμα του TMA παρουσιάζει κορυφή στα 3,1528 ppm και δεν αλληλεπικαλύπτεται με τις κορυφές του φάσματος της CIP (σχήμα 5.2) ούτε με τις κορυφές του φάσματος της MalβCD (σχήμα 5.5). Επιπλέον, το TMA έχει πολύ μικρό όγκο σε σύγκριση με τα εγκλειόμενα μόρια, επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος να εκδιωχτούν από την εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών εξαιτίας του επιλεγμένου εσωτερικού προτύπου και να προκαλέσουν φασματικές μεταβολές.

ε) Οι ολοκληρώσεις πραγματοποιούνται και οι τιμές τους υπολογίζονται σε συνάρτηση με την ολοκλήρωση της κορυφής συντονισμού του TMA, στην οποία αποδίδεται η τιμή 12,00 (καθώς η επιφάνεια κορυφής είναι ανάλογη προς τον αριθμό των πυρήνων που συντονίζονται, δηλαδή 12 πρωτόνια).

στ) Όλα τα φάσματα ¹Η NMR λαμβάνονται με τις ίδιες συνθήκες (το εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε όλα τα δείγματα σε σταθερή συγκέντρωση, λαμβάνονται 144 scans).

Το φάσμα κάθε δείγματος λαμβάνεται από δύο έως τρεις φορές με τις ίδιες συνθήκες (144 scans) σε όργανο ισχύος 600 MHz NMR. Το πείραμα επαναλαμβάνεται και δεύτερη εργαστηριακή ημέρα σε όργανο ισχύος 400 MHz NMR.

Στη συνέχεια η μέθοδος διερευνήθηκε όσον αφορά στη γραμμικότητα, στην ακρίβεια, καθώς και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.





Σχήμα 5.1: Φάσμα ¹Η NMR σε D₂O CIP:MalβCD (α) παρουσία εσωτερικού προτύπου βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου (β), υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου, (γ) επτανοσουλφονικού οξέος (δ) και αδαμανταναμίνης (ε).

5.2. Αξιολόγηση μεθόδου ποσοτικής ανάλυσης με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

5.2.1. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογιστεί από την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσης της καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

LOD = (3,3xSD) / b

όπου SD η τυπική απόκλιση και b η κλίση της ευθείας της καμπύλης αναφοράς.

Το όριο ανίχνευσης της MalβCD προσδιορίζεται στα 1,51x10⁻³ M (400 MHz NMR) και στα 6,39x10⁻⁴ M (600 MHz NMR), με τον υπολογιστικό τρόπο.

Το όριο ανίχνευσης της CIP προσδιορίζεται στα 6,64x10⁻⁴ M (400 MHz NMR) και στα 5,37x10⁻⁴ M (600 MHz NMR), με τον υπολογιστικό τρόπο.

5.2.2. Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να υπολογιστεί με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσης της καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

LOQ = (10xSD) / b

όπου SD η τυπική απόκλιση και b η κλίση της ευθείας της καμπύλης αναφοράς.

Το όριο ποσοτικοποίησης της MalβCD προσδιορίζεται στα 4,58x10⁻³ M (400 MHz NMR) και στα 1,94x10⁻³ M (600 MHz NMR), με τον υπολογιστικό τρόπο.

Το όριο ποσοτικοποίησης της CIP προσδιορίζεται στα 2,01x10⁻³ M (400 MHz NMR) και στα 1,63x10⁻³ M (600 MHz NMR), με τον υπολογιστικό τρόπο.

5.2.3. Έλεγχος γραμμικότητας στα διαλύματα της κυπροφλοξακίνης

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας επτά διαλύματα CIP με εύρος συγκεντρώσεων από 1,5×10⁻² M έως 6,0×10⁻² M. Σε κάθε διάλυμα προστίθεται ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου αναφοράς. Η ουσία, η οποία επιλέγεται ως εσωτερικό πρότυπο στην παρούσα εργασία είναι το βρωμιούχο τετραμεθυλαμμώνιο (TMA) σε συγκέντρωση 1,1×10⁻² M.

Παρασκευή πυκνού διαλύματος βρωμιούχου τετραμεθυλαμμωνίου (TMA): Ζυγίζονται 50,0 mg (3,24×10⁻⁴ mol) TMA (MB 154,06), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με διάλυμα D₂O. Προκύπτει διάλυμα TMA συγκεντρώσεως 6,49×10⁻² M. Από αυτό το διάλυμα θα προστίθενται 100 μl σε κάθε σωληνάκι NMR. Η τελική συγκέντρωση του TMA στα διαλύματα καμπύλης αναφοράς θα είναι 1,08×10⁻² M. Παράλληλα λαμβάνεται το φάσμα διαλύματος TMA (τυφλό) συγκέντρωσης 1,08×10⁻² M με τις ίδιες συνθήκες (144 scans), το οποίο παρασκευάζεται με αραίωση 100 μl πυκνού διαλύματος TMA στα 600 μl με D₂O.

Παρασκευή πυκνού διαλύματος υδροχλωρικής CIP (Διάλυμα Α): Ζυγίζονται 175,0 mg (4,54×10⁻⁴ mol) CIP, HCI (MB 385,82), τα οποία αντιστοιχούν σε 150,3 mg

κυπροφλοξακίνης βάσης (MB 331,32), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με διάλυμα D₂O. Προκύπτει διάλυμα 0,91×10⁻¹ M.



D₂O πάνω αριστερά).

<u>Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς CIP:</u> Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος A σε D₂O:

100 μΙ στα 600 μΙ (Σ1, 1,51×10⁻² M), 150 μΙ στα 600 μΙ (Σ2, 2,27×10⁻² M), 200 μΙ στα 600 μΙ (Σ3, 3,02×10⁻² M), 250 μΙ στα 600 μΙ (Σ4, 3,78×10⁻² M), 300 μΙ στα 600 μΙ (Σ5, 4,54×10⁻² M), 350 μΙ στα 600 μΙ (Σ6, 5,29×10⁻² M) και 400 μΙ στα 600 μΙ (Σ7, 6,05×10⁻² M). Σε κάθε σωληνάκι NMR προστίθενται 100 μΙ διαλύματος TMA.

Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων όπως και το άθροισμα των ολοκληρώσεων των λαμβανόμενων κορυφών που αποδίδονται στα Η-5 και Η-8 της CIP, σε συνάρτηση με την ολοκλήρωση της κορυφής του TMA παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1(600 MHz NMR) και 5.2 (400 MHz NMR).

Διάλυμα	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	Σ5	Σ6	Σ7
Συγκέντρωση (×10 ⁻² Μ)	1,51	2,27	3,02	3,78	4,54	5,29	6,05
Ολοκλήρωση κορυφής Η-8 (Α)	1,7794	2,5798	3,8477	-	5,9860	6,5928	7,8098
Ολοκλήρωση κορυφής Η-5 (Β)	1,8913	2,7732	4,0143	-	5,7750	6,3223	7,5326
Άθροισμα ολοκληρώσεων (A+B)	3,6707	5,3530	7,8620	-	11,7610	12,9151	15,3424

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς για την CIP (600 MHz NMR).

Κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος καταστράφηκε το δείγμα 4.



Σχήμα 5.3: Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας της CIP (600 MHz NMR).

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (σχήμα 5.3) είναι: (Άθροισμα ολοκληρώσεων) = 2,5528 (Συγκέντρωση) - 0,1657, όπου R²=0,9997.

Πίνακας	5.2: Αποτελέσ	υατα της καυπύ	λης αναφοράς	νια την CIP	(400 MHz NMR)
Invarias		ματα της καμπο	πης αναφορας		

Διάλυμα	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	Σ5	Σ6	Σ7
Συγκέντρωση (×10 ⁻² Μ)	1,51	2,27	3,02	3,78	4,54	5,29	6,05
Ολοκλήρωση κορυφής Η-8 (Α)	1,4520	2,4048	3,1686	4,0607	4,7016	5,2908	6,2374
Ολοκλήρωση κορυφής Η-5 (Β)	1,4798	2,6132	3,2009	4,1154	4,7400	5,3750	6,3022
Άθροισμα ολοκληρώσεων (A+B)	2,9318	5,0180	6,3695	8,1761	9,4416	10,6658	12,5396





Η ευθεία παλινδρόμησης (σχήμα 5.4) εκφράζεται από τη σχέση: (Άθροισμα ολοκληρώσεων) = 2,0404 (Συγκέντρωση) + 0,1648, όπου R²=0,9995.

5.2.4. Έλεγχος γραμμικότητας στα διαλύματα της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας επτά διαλύματα MalβCD με εύρος συγκεντρώσεων από 1,67×10⁻² M έως 6,67×10⁻² M. Σε κάθε διάλυμα προστίθεται η ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου αναφοράς TMA (1,08×10⁻² M). <u>Παρασκευή πυκνού διαλύματος MalβCD (Διάλυμα B):</u> Ζυγίζονται 815,0 mg (5,00×10⁻⁴ mol) MalβCD (MB 1629,45), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με διάλυμα D₂O. Προκύπτει διάλυμα 1,00×10⁻¹ M.

<u>Παρασκευή διαλυμάτων καμπύλης αναφοράς:</u> Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος Β σε D₂O:

100 μΙ στα 600 μΙ (Γ1, 1,67×10⁻² M), 150 μΙ στα 600 μΙ (Γ2, 2,50×10⁻² M), 200 μΙ στα 600 μΙ (Γ3, 3,33×10⁻² M), 250 μΙ στα 600 μΙ (Γ4, 4,17×10⁻² M), 300 μΙ στα 600 μΙ (Γ5, 5,00×10⁻² M), 350 μΙ στα 600 μΙ (Γ6, 5,84×10⁻² M) και 400 μΙ στα 600 μΙ (Γ7, 6,67×10⁻² M). Σε κάθε σωληνάκι NMR προστίθενται 100 μΙ διαλύματος TMA.

Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων όπως και η ολοκλήρωση των λαμβανόμενων κορυφών για τη MalβCD στα φάσματα πρωτονίου ¹Η NMR, σε συνάρτηση με το εσωτερικό πρότυπο παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3 (600 MHz NMR) και στον πίνακα 5.4 (400 MHz NMR).



Σχήμα 5.5: Φάσμα MalβCD παρουσία εσωτερικού προτύπου TMA σε D₂O. Η κορυφή στα 3,38 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο H-4 γλυκόζης του μαλτοζυλο-υποκαταστάτη, γλυκόζη που δε συνδέεται με τη κυκλοδεξτρίνη.

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς για την MalβCD (600 MHz NMR).

Διάλυμα	Г1	Г2	Г3	Г4	Г5	Г6	Г7
Συγκέντρωση (×10 ⁻² Μ)	1,67	2,50	3,33	4,17	5,00	5,84	6,67
Ολοκλήρωση κορυφής Η-4 (Δ)	3,5664	4,8819	6,5985	8,3876	9,9295	11,0559	13,2361



<u>Σχήμα 5.6:</u> Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας της MalβCD (600 MHz NMR).

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (σχήμα 5.6) είναι: (Ολοκλήρωση)= 1,9145 (Συγκέντρωση) + 0,2569, όπου R^2 =0,9998

Διάλυμα	Г1	Г2	Г3	Г4	Г5	Г6	Г7
Συγκέντρωση (x10 ⁻² M)	1,67	2,50	3,33	4,17	5,00	5,84	6,67
Ολοκλήρωση κορυφής Η-4 (Δ)	3,1830	4,4945	5,5758	7,4857	8,7002	9,9235	11,4238

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς για την MalβCD (400 MHz NMR).





Η ευθεία παλινδρόμησης εκφράζεται από τη σχέση: (Ολοκλήρωση) = 1,6582 (Συγκέντρωση) + 0,344, όπου R^2 =0,9994.

5.2.5 Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης στα διαλύματα του συμπλόκου της με τη κυπροφλοξακίνη

Ακολούθως αποδεικνύεται η ακρίβεια της μεθόδου για την MalβCD στην περιοχή εργασίας, χρησιμοποιώντας δείγματα συγκεντρώσεων σε όλο το εύρος από 1,67 έως 6,67×10⁻² Μ. Το πείραμα για την MalβCD πραγματοποιείται με σκοπό τον εντοπισμό των συστηματικών σφαλμάτων και συνεπώς στοχεύει στον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου ποσοτικού NMR στον προσδιορισμό της MalβCD.

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της ακρίβειας παρουσιάζεται στον πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5: Σύσταση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στον έλεγχο ακρίβειας της MalβCD στα διαλύματα συμπλόκου της με τη CIP.

	Δμα Α (μΙ)	Δμα Β (μΙ)	Δμα ΤΜΑ (μl)	D₂O (µI)	[MalβCD] (x10 ⁻² M)	[CIP] (x10 ⁻² M)
Δείγμα 1	100	100	100	300	1,67	1,51
Δείγμα 2	100	150	100	250	2,50	1,51
Δείγμα 3	100	200	100	200	3,33	1,51
Δείγμα 4	100	250	100	150	4,17	1,51
Δείγμα 5	100	300	100	100	5,00	1,51
Δείγμα 6	100	350	100	50	5,84	1,51
Δείγμα 7	100	400	100	-	6,67	1,51

Τα διαλύματα υφίστανται διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (μέθοδος α), οπότε παραλαμβάνεται το σύμπλοκο της CIP με τη MalβCD. Στη συνέχεια λαμβάνονται τα φάσματα με τις ίδιες συνθήκες, ολοκληρώνονται οι κορυφές των πρωτονίων της MalβCD και λαμβάνονται οι τιμές σε συνάρτηση με αυτές του εσωτερικού προτύπου. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται η ανακτώμενη συγκέντρωση της MalβCD. Τα φάσματα λαμβάνονται αρχικά σε 400 MHz NMR και ακολούθως σε 600 MHz NMR.



Σχήμα 5.8: Φάσμα συμπλόκου CIP και MalβCD παρουσία εσωτερικού προτύπου TMA σε D₂O.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.6: Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού MalβCD (600 MHz NMR)

	Ολοκλήρωση κορυφής Η-4 _{cp} (Δ)	C _{θεωρ} (x10 ⁻²)	C _{πειρ} (x10 ⁻²)	% Ανάκτηση
Δείγμα 1	3,5254	1,67	1,71	102,4 %
Δείγμα 2	4,9877	2,50	2,47	98,80 %
Δείγμα 3	6,6301	3,33	3,32	99,84 %
Δείγμα 4	8,4720	4,17	4,29	102,9 %
Δείγμα 5	9,9492	5,00	5,06	101,2 %
Δείγμα 6	11,4846	5,84	5,86	100,5 %
Δείγμα 7	13,1962	6,67	6,76	101,3 %

Σημειώνεται για τον πίνακα 5.6 πως η % ανάκτηση υπολογίζεται από τη σχέση:

 $(\Delta C_{\pi\epsilon\iota\rho}/\Delta C_{\theta\epsilon\omega\rho})x100\%$



<u>Σχήμα 5.9:</u> Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών της MalβCD σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές (600 MHz NMR).

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 5.9, ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την τομή β:

Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,447 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 1,870 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την κλίση α: Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,447 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,389 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Πίνακας 5.7: Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού MalβCD (400 MHz NMR).

	Ολοκλήρωση κορυφής Η-4 _{cp} (Δ)	C _{θεωρ} (x10 ⁻²)	C _{πειρ} (x10 ⁻²)	% Ανάκτηση
Δείγμα 1	3,0748	1,67	1,65	98,79 %
Δείγμα 2	4,5687	2,50	2,55	101,9 %
Δείγμα 3	5,9494	3,33	3,38	101,4 %
Δείγμα 4	7,0919	4,17	4,07	97,63 %
Δείγμα 5	8,9008	5,00	5,16	103,2 %
Δείγμα 6	9,8180	5,84	5,71	97,92 %
Δείγμα 7	11,6485	6,67	6,82	102,2 %



Σχήμα 5.10: Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών της MalβCD σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές (400 MHz NMR).
Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 5.10, ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την τομή β: Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,447 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,314 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την κλίση α:

Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,447 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,092 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

5.2.6. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της κυπροφλοξακίνης στα διαλύματα του συμπλόκου της με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη

Ακολούθως αποδεικνύεται η ακρίβεια της μεθόδου για την CIP στην περιοχή εργασίας, χρησιμοποιώντας δείγματα συγκεντρώσεων σε όλο το εύρος από 1,51 έως 6,05×10⁻² Μ. Το πείραμα για την CIP πραγματοποιείται με σκοπό τον εντοπισμό των συστηματικών σφαλμάτων και συνεπώς στοχεύει στον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου ποσοτικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στον προσδιορισμό της CIP.

Πίνακας 5.8: Σύσταση των διαλυμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της CIP στα διαλύματα συμπλόκου της με τη MalβCD.

	Δμα Α	Δμα Β	Δμα ΤΜΑ	D_2O	C MalβCD	C CIP
	(µI)	(µI)	(µI)	(µl)	(x10⁻² M)	(x10 ⁻² M)
Δείγμα 1	100	100	100	300	1,67	1,51
Δείγμα 2	150	100	100	250	1,67	2,27
Δείγμα 3	200	100	100	200	1,67	3,02
Δείγμα 5	300	100	100	100	1,67	4,54
Δείγμα 6	350	100	100	50	1,67	5,29
Δείγμα 7	400	100	100	-	1,67	6,05

Κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου πειράματος καταστράφηκε το δείγμα 4.

Η παρασκευή των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της ακρίβειας παρουσιάζεται στον πίνακα 5.8.

Τα διαλύματα υφίστανται διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (μέθοδος α), οπότε λαμβάνεται το σύμπλοκο. Στη συνέχεια λαμβάνονται τα φάσματα με τις ίδιες συνθήκες, ολοκληρώνονται οι κορυφές των επιλεγμένων πρωτονίων της CIP και λαμβάνονται οι τιμές σε συνάρτηση με αυτές του εσωτερικού προτύπου. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται η ανακτώμενη συγκέντρωση της CIP. Τα φάσματα λαμβάνονται αρχικά σε 400 MHz NMR και ακολούθως σε 600 MHz NMR.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας	5.9:	Στατιστική	επεξεργασία	αποτελεσμάτων	για	τον	έλεγχο	ακρίβειας	της
μεθόδου ΄	προσά	διορισμού (CIP (600 MHz	NMR).					

	Άθροισμα ολοκληρώσεων (H-5+H-8)	C _{θεωρ} (x10 ⁻²)	C _{πειρ} (x10 ⁻²)	% Ανάκτηση
Δείγμα 1	3,7217	1,51	1,52	100,7 %
Δείγμα 2	5,5382	2,27	2,23	98,52 %
Δείγμα 3	7,5455	3,02	3,01	99,89 %
Δείγμα 5	11,5496	4,54	4,59	101,2 %
Δείγμα 6	13,4546	5,29	5,33	100,8 %
Δείγμα 7	15,0172	6,05	5,95	99,34 %



Σχήμα 5.11: Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών της CIP σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές (600 MHz NMR).

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 5.11, ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την τομή β: Για Ν-1 = 5 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,571 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 1,780 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την κλίση α: Για Ν-1 = 5 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,571 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 0,891 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Πίνακας 5.10: Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων για τον έλεγχο ακρίβειας της μεθόδου προσδιορισμού CIP (400 MHz NMR).

	Άθροισμα ολοκληρώσεων (H-5+H-8)	C _{θεωρ} (x10⁻²)	C _{πειρ} (x10 ⁻²)	% Ανάκτηση
Δείγμα 1	3,2353	1,51	1,50	99,53 %
Δείγμα 2	4,8806	2,27	2,31	101,9 %
Δείγμα 3	6,1389	3,02	2,93	96,82 %
Δείγμα 5	9,1619	4,54	4,41	97,21 %
Δείγμα 6	11,0395	5,29	5,33	100,7 %
Δείγμα 7	12,7209	6,05	6,15	101,7 %

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 5.12, ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.





Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την τομή β: Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,571 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 1,000 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμόζοντας την μηδενική υπόθεση για την κλίση α: Για Ν-1 = 6 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,571 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 1,944 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Συμπεράσματα

Μετά την αξιολόγηση της μεθόδου διαπιστώνεται ότι λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα με όργανο ισχύος 600 MHz, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, καλύτερη γραμμικότητα και μεγαλύτερη ακρίβεια.

Συγκριτικά το όριο ανίχνευσης της MalβCD υπολογίζεται στα $1,51 \times 10^{-3}$ M (400 MHz NMR) και στα $6,39 \times 10^{-4}$ M (600 MHz NMR), ενώ της CIP προσδιορίζεται στα $6,64 \times 10^{-4}$ M (400 MHz NMR) και στα $5,37 \times 10^{-4}$ M (600 MHz NMR).

Το όριο ποσοτικοποίησης της MalβCD προσδιορίζεται στα $4,58 \times 10^{-3}$ M (400 MHz NMR) και στα $1,94 \times 10^{-3}$ M (600 MHz NMR), ενώ της CIP υπολογίζεται στα $2,01 \times 10^{-3}$ M (400 MHz NMR) και στα $1,63 \times 10^{-3}$ M (600 MHz NMR).

Φαίνεται πως σε μαγνητικά πεδία υψηλότερης ισχύος, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ευαισθησία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΑΛΤΟΖΥΛΟ-β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια ταυτόχρονου προσδιορισμού της CIP και της MalβCD με φασματοσκοπία NMR, όπως αναπτύχθηκε και περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο (5). Παρόλο που ο ταυτόχρονος προσδιορισμός είναι εφικτός, υπήρχε διαφοροποίηση στην επαναληψιμότητα της μεθόδου, ανάλογα με τις κορυφές που επιλέγονταν να ολοκληρωθούν κάθε φορά. Στη συνέχεια, με σκοπό τη βελτίωση των αποτελεσμάτων, το ενδιαφέρον μας στράφηκε στον ανιχνευτή σκέδασης φωτός και την ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου για τον προσδιορισμό των εκδόχων, στην προκειμένη περίπτωση των κυκλοδεξτρινών.

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή ELS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CIP και της κυκλοδεξτρίνης. Η κυκλοδεξτρίνη, που χρησιμοποιήθηκε είναι συνθετικό παράγωγο της βCD και φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο μόριο του σακχάρου μαλτόζη. Η μέθοδος επικυρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του συμπλόκου CIP:MalβCD. Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση Scatchard με τη συγκεκριμένη μέθοδο και βρέθηκε η σταθερά σύνδεσης του φαρμάκου με την κυκλοδεξτρίνη.

6.1. Χρωματογραφικές συνθήκες για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, της κυπροφλοξακίνης και του συμπλόκου τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή σκέδασης φωτός

Η ΜαΙβCD στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης αναμένεται ότι θα εκλούεται πρώτη. Έτσι, σε πολλά βήματα ενίεται και ελέγχεται πρώτα η συμπεριφορά της CIP, η οποία αναμένεται να έχει το μέγιστο χρόνο συγκράτησης στις δεδομένες χρωματογραφικές συνθήκες. Εφόσον ο χρόνος ανάσχεσης της CIP είναι μικρός, η ΜαΙβCD που θα εκλούεται ακόμα γρηγορότερα, γεγονός ανεπιθύμητο, δεν αξιολογείται καθόλου και οι χρωματογραφικές συνθήκες τροποποιούνται καταλλήλως. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το σύμπλοκο CIP:MalβCD, το οποίο ενίεται και μελετάται η χρωματογραφική του συμπεριφορά.

Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων (stock solutions):

Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με νερό καθαρότητας HPLC.

<u>Πυκνό διάλυμα CIP:</u> Ζυγίζονται 10,0 mg CIP (11,6 mg CIP, 0,03 mol) και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml (3,02×10⁻⁴ M).

<u>Πυκνό διάλυμα MalβCD:</u> Ζυγίζονται 10,0 mg (6,14×10⁻³ mol) MalβCD και αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 100 ml (6,1×10⁻⁵ M).

<u>Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας:</u>

Στη συνέχεια παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας, όπου οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε κινητή φάση. Τα δείγματα σε κινητή φάση εγχύονται στο χρωματογραφικό σύστημα και καταγράφεται η απόκρισή τους από τον ανιχνευτή σκέδασης φωτός. Ο συντελεστής ευαισθησίας του ανιχνευτή ρυθμίζεται στο 12.

Διάλυμα εργασίας CIP: 2,5 ml πυκνού διαλύματος CIP αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 3,02×10⁻⁵ M.

Διάλυμα εργασίας MalβCD: 2,5 ml πυκνού διαλύματος MalβCD αραιώνονται μέχρι χαραγής σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 6,1×10⁻⁵ M.

Διάλυμα εργασίας MalβCD:CIP 1:1 w/w: 2,5 ml πυκνού διαλύματος MalβCD και 2,5 ml πυκνού διαλύματος CIP μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Μέθοδος Μ₁:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm

<u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / νερό (50:50 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min

<u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 60° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζεται ως μια ευρεία κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 4,958 min. Για να βελτιωθεί η συμμετρία της κορυφής επιλέγεται να αυξηθεί το ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.

Μέθοδος Μ2:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / νερό (60:40 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 60° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζεται ως μια περισσότερο συμμετρική κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 4,408 min. Η MalβCD εμφανίζει κορυφή στα 2,500 min. Το διάλυμα που περιέχει το 1:1 w/w μίγμα τους εμφανίζει κορυφές με χρόνους ανάσχεσης τα 2,508 min, που αντιστοιχεί στη MalβCD και τα 4,300 min, που αντιστοιχεί στην CIP (σχήμα 6.1).



Σχήμα 6.1: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₂ διαλύματος εργασίας μίγματος CIP:MalβCD. Η MalβCD εκλούεται στα 2,508 min και η CIP 4,300 min.

Η κορυφή της CIP δεν είναι συμμετρική και ο διαχωρισμός που έχει επιτευχθεί θεωρείται ότι επιδέχεται βελτίωση, καθώς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να αποδειχθεί ανεπαρκής, οπότε κρίνεται απαραίτητη η ρύθμιση του υδατικού τμήματος της κινητής φάσης σε ορισμένο pH. Σύμφωνα με τη φαρμακοποιΐα και πειραματικές μελέτες με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού το pH 3 θεωρείται καταλληλότερο για την ανάλυση της CIP. Στο συγκεκριμένο pH το μόριο της CIP έχει πρωτονιωμένη την αμινομάδα και μη ιονισμένη την καρβοξυλομάδα, όπως μπορεί να διαπιστωθεί και από τις τιμές pKa₁=6,09 και pKa₂=8,62. Η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης πραγματοποιείται με τη βοήθεια υδατικού διαλύματος τριφθοροξικού οξέος.

Ταυτόχρονα, με σκοπό τη βελτίωση της μεθόδου, η θερμοκρασία εξάτμισης αυξάνεται προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης εξάτμιση του διαλύτη, αφήνοντας μόνο στερεά σωματίδια της ουσίας, καθώς το φως σκεδάζεται αποτελεσματικότερα από στερεά σωματίδια.

Μέθοδος Μ₃:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (60:40 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Στο διάλυμα που περιέχει 1:1 w/w μίγμα των μελετώμενων ουσιών, οι κορυφές συνεκλούονται και ο διαχωρισμός κρίνεται ακατάλληλος. Τροποποιείται η σύσταση της κινητής φάσης και συγκεκριμένα ελαττώνεται η συμμετοχή του εκλουστικού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση.

Μέθοδος Μ₄:

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα με τριφθοροξικού οξέος pH=3 (50:50 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 2,758 min. Η ΜαΙβCD δίνει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 2,533 min. Το διάλυμα που περιέχει το 1:1 w/w μίγμα τους δίνει αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές με χρόνους ανάσχεσης από τα 2,300 ως τα 2,741 min, επομένως υπό αυτές τις χρωματογραφικές συνθήκες ο διαχωρισμός δεν κρίνεται ικανοποιητικός (σχήμα 6.2). Η τρίτη κορυφή που εμφανίζεται αποδίδεται σε

προσμίξεις της CIP, αφού στα προκαταρκτικά πειράματα δε χρησιμοποιήθηκε απόλυτα καθαρή ουσία.

Η αναλογία του οργανικού διαλύτη μεταβάλλεται με στόχο τη βελτίωση του διαχωρισμού.



Σχήμα 6.2: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₃ διαλύματος εργασίας μίγματος CIP:MalβCD.

Μέθοδος Μ₅:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (40:60 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,7 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Το διάλυμα που περιέχει 1:1 w/w μίγμα των ουσιών εμφανίζει κορυφές με χρόνους ανάσχεσης από τα 2,716 ως τα 3,350 min, αλλά και πάλι ο διαχωρισμός τους δε θεωρείται ικανοποιητικός (σχήμα 6.3). Επιχειρείται επιπλέον ελάττωση του εκλουστικού οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 6.3: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₅ διαλύματος εργασίας μίγματος CIP:MalβCD.

Μέθοδος Μ₆:

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×250 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (35:65 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,7 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η MalβCD εμφανίζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 3,050 min. Η CIP εμφανίζει κορυφή στα 3,490 min. Το διάλυμα που περιέχει το 1:1 w/w μίγμα τους εμφανίζει αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές από τα 2,775 ως τα 3,500 min (σχήμα 6.4).



Σχήμα 6.4: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₆ διαλύματος εργασίας μίγματος CIP:MalβCD.

Διερευνώνται εκ νέου όλες οι παράμετροι, προκειμένου να διαπιστωθούν οι ιδανικές συνθήκες για το διαχωρισμό της CIP και της MalβCD και την ανάλυσή τους. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκε νέα στήλη με ίδιο υλικό πλήρωσης.

Μέθοδος Μ₇:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm

<u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος pH=3 (40:60 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 1,0 ml/min

<u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζει κορυφή με πολύ μικρό χρόνο ανάσχεσης στα 1,358 min (σχήμα 6.5), επομένως οι χρωματογραφικές συνθήκες τροποποιούνται, προκειμένου να επιτευχθεί καθυστέρηση στην έκλουση της CIP.



Σχήμα 6.5: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₇ διαλύματος εργασίας CIP.

Μέθοδος Μ₈:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm *Κινητή φάση:* Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (30:70 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,9 ml/min

<u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP παρουσιάζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 1,700 min (σχήμα 6.6).

Ο χρόνος που προηγείται δε θεωρείται αρκετός για την έκλουση της MalβCD και απαιτείται περεταίρω αύξηση του χρόνου ανάσχεσης της CIP, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα της γρήγορης και ταυτόχρονης έκλουσης των δύο ενώσεων. Μειώνονται παράλληλα η ροή και η περιεκτικότητα του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.



Σχήμα 6.6: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₈ διαλύματος εργασίας CIP.

Αποτελέσματα

Η CIP εκλούεται στα 1,700 min.

Μέθοδος Μ₉:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (20:80 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 66° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP παρουσιάζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 2,508 min Η MalβCD εξακολουθεί να εμφανίζει κορυφή με μικρό χρόνο ανάσχεσης τα 1,825 min. Το διάλυμα που περιέχει το 1:1 w/w μίγμα τους εμφανίζει κορυφές με ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ τους, με χρόνους ανάσχεσης στα 1,825 και στα 2,525 min (σχήμα 6.7).



Σχήμα 6.7: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₉ διαλύματος εργασίας μίγματος CIP:MalβCD.

Στη συνέχεια παρασκευάζονται νέα διαλύματα CIP και MalβCD, όπως περιγράφονται παρακάτω. Χρησιμοποιείται CIP υψηλότερης καθαρότητας, κατά συνέπεια επαναλαμβάνονται ορισμένες αναλογίες μεθόδων που προηγήθηκαν στην κινητή φάση, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα προηγούμενα βήματα και τροποποιούνται οι χρωματογραφικές συνθήκες ανάλογα με τα αποτελέσματα που παρατηρούνται, σε μια προσπάθεια περαιτέρω βελτίωσης της μεθόδου. Η θερμοκρασία εξάτμισης αυξάνεται στους 70° C. Η ταχύτητα ροής και η αναλογία των οργανικών διαλυτών μεταβάλλονται ταυτόχρονα.

Έτσι, μελετάται η χρωματογραφική συμπεριφορά των δύο μορίων με αρχική αναλογία οργανικού/υδατικού διαλύτη 50:50, η οποία ελαττώνεται σταδιακά προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος μεταξύ τους διαχωρισμός, ενώ παράλληλα μειώνεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Επιπλέον παρασκευάζεται το σύμπλοκο CIP και MalβCD και ελέγχεται η χρωματογραφική του συμπεριφορά με τις επιλεγμένες συνθήκες.

Παρασκευή διαλυμάτων:

<u>Πυκνό διάλυμα CIP (Διάλυμα A):</u> Ζυγίζονται 14,9 mg (3,86x10⁻⁵ mol) CIP σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP MalβCD 3,86×10⁻⁴ M.

Διάλυμα εργασίας CIP: Πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος A 1:10 με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα CIP 3,86×10⁻⁵ Μ.

<u>Πυκνό διάλυμα MalβCD (Διάλυμα B):</u> Ζυγίζονται 6,29 mg (3,86x10⁻⁶ mol) MalβCD (MB 1629,45), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα MalβCD 3,86×10⁻⁴ M.

Διάλυμα εργασίας MalβCD: Πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος Β 1:10 με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα MalβCD 3,86×10⁻⁵ M.

<u>Παρασκευή συμπλόκου:</u> Για την παρασκευή του συμπλόκου CIP και MalβCD 1 ml διαλύματος A και 1 ml διαλύματος B τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα μίγματος CIP και MalβCD 3,86×10⁻⁵ M. Το μίγμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες και υφίσταται διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (σελ. 103, μέθοδος α).

Μέθοδος Μ₁₀:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm

<u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (50:50 v/v)

<u>Ταχύτητα ροής:</u> 1,00 ml/min

<u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 70° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζει κορυφή με πολύ μικρό χρόνο ανάσχεσης (1,192 min, σχήμα 6.8), με τη MalβCD να αναμένεται ακόμη πιο γρήγορα. Επομένως οι χρωματογραφικές συνθήκες τροποποιούνται, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση και να αυξηθεί η συγκράτηση της CIP στη χρωματογραφική στήλη. Κατά συνέπεια, προσπαθούμε να καθυστερήσουμε την έκλουση της CIP, ελαττώνοντας τη συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη.



Σχήμα 6.8: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₁₀ διαλύματος CIP 3,86×10⁻⁵ M.

Μέθοδος Μ₁₁:

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (30: 70 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 1,00 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 70° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εμφανίζει και πάλι κορυφή με πολύ μικρό χρόνο ανάσχεσης στα 2,383 min (σχήμα 6.9), επομένως οι χρωματογραφικές συνθήκες τροποποιούνται, προκειμένου να καθυστερήσουμε την έκλουση της CIP με ελάττωση της αναλογίας του οργανικού διαλύτη και ταυτόχρονα μικρή μείωση της ταχύτητας ροής.



Σχήμα 6.9: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₁₁ διαλύματος CIP 3,86×10⁻⁵ M.

Μέθοδος Μ₁₂:

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (20:80 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,9 ml/min

<u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 70° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP εκλούεται στα 3,558 min (σχήμα 6.10).

Επιχειρείται επιπλέον αύξηση στο χρόνο ανάσχεσης της CIP με μικρή ελάττωση του οργανικού διαλύτη ακετονιτρίλιο, προτού ενεθούν στο χρωματογραφικό σύστημα η MalβCD και το σύμπλοκο.



Σχήμα 6.10: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδο M₁₂ διαλύματος CIP 3,86×10⁻⁵ M.

Μέθοδος Μ₁₃:

Στατική φάση: Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm <u>Κινητή φάση:</u> Ακετονιτρίλιο / διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH=3 (15:85 v/v) <u>Ταχύτητα ροής:</u> 0,8 ml/min <u>Θερμοκρασία εξάτμισης:</u> 70° C

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η CIP παρουσιάζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 6,316 min. Η MalβCD παρουσιάζει κορυφή με χρόνο ανάσχεσης τα 2,058 min.

Όταν ενεθεί το διάλυμα του συμπλόκου, εξακολουθούν να εμφανίζονται δύο κορυφές. Η πρώτη εκλούεται στα 2,117 min και αποδίδεται στη MalβCD, ενώ η δεύτερη έχει χρόνο ανάσχεσης στα 6,500 min και είναι η κορυφή της CIP (σχήμα 6.11). Διαφορετική κορυφή για το σύμπλοκο δεν παρατηρείται. Οι κορυφές είναι συμμετρικές, εκλούονται σε ικανοποιητικούς χρόνους και έχουν καλό διαχωρισμό. Οι χρωματογραφικές συνθήκες M₁₃ επιλέγονται ως βέλτιστες και χρησιμοποιούνται για τις μελέτες που ακολουθούν.



Σχήμα 6.11: Χρωματογράφημα που λαμβάνεται με τη μέθοδος M₁₃ σε διάλυμα συμπλόκου CIP και MalβCD.

Παρασκευή διαλυμάτων CIP για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς (έλεγχος γραμμικότητας CIP):

Σε όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν, οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων CIP επιλέγονται με τρόπο, ώστε να καλύπτουν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στα μικροβιολογικά πειράματα.

Παρασκευάζεται διάλυμα CIP A $(3,86 \times 10^{-4} \text{ M})$, όπως περιγράφεται νωρίτερα στο κεφάλαιο 6.1 (σελ. 244). Σε αυτό πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αραιώσεις: 1:50, 1:20, 2:25, 1:10, 3:25, 3:20 και 5:25. Προκύπτουν διαλύματα συγκεντρώσεων 0,772 (A₀), 1,93 (A₁), 3,088 (A₂), 3,86 (A₃), 4,632 (A₄), 5,79 (A₅) και 7,72×10⁻⁵ M (A₆) αντίστοιχα.

Οι αραιώσεις των διαλυμάτων πραγματοποιούνται σε κάθε περίπτωση με κινητή φάση.

Τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται και οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς κατασκευάζονται σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες.





Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της CIP που προέκυψε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι:

 $log A = (1,65\pm0,02) log C + (13,16\pm0,10), \mu \in \mathbb{R}^2 = 0,999$

Παρασκευή διαλυμάτων MalβCD για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς (έλεγχος γραμμικότητας MalβCD):

Σε όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν, οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων MalβCD επιλέγονται με τρόπο, ώστε να καλύπτουν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στα μικροβιολογικά πειράματα.

Παρασκευάζεται διάλυμα MalβCD B ($3,86 \times 10^{-4}$ M), όπως περιγράφεται νωρίτερα στο κεφάλαιο 6.1 (σελ. 244). Σε αυτό πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αραιώσεις: 0,1:10, 0,3:10, 0,5:10, 0,7:10 και 1:10. Προκύπτουν διαλύματα συγκεντρώσεων 0,386 (a), 1,158 (b), 1,93 (c), 2,702 (d) και 3,86×10⁻⁵ M (e) αντίστοιχα.

Οι αραιώσεις των διαλυμάτων πραγματοποιούνται σε κάθε περίπτωση με κινητή φάση.





Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς της MalβCD που προέκυψε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι:

 $log A = (1,21\pm0,05) log C + (12,22\pm0,23), \mu \in \mathbb{R}^2 = 0,9955$

Έλεγχος πιθανής κατακράτησης της κυκλοδεξτρίνης στους μικροβιοκρατείς ηθμούς:

Στη συνέχεια, τα διαλύματα MalβCD, c και e διηθούνται από μικροβιοκρατείς ηθμούς (φίλτρα Steriflip [®] Filter Unit GP Millipore Express[®] PLUS PS Membrane, μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,22 μm), από τα οποία θα διηθούνται στη συνέχεια τα διαλύματα που προορίζονται για τους μικροβιολογικούς ελέγχους. Δείγματα από τα διηθημένα διαλύματα εγχύονται στο χρωματογραφικό σύστημα και λαμβάνονται εκ νέου μετρήσεις για αυτά πριν και μετά τη διήθηση προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα κατακράτησης ουσίας στα φίλτρα. Τα εμβαδά κορυφών, τα οποία λαμβάνονται φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί:

MalβCD	Προ διήθησης	Μετά τη Διήθηση	
Διάλυμα c	3695608	3740280	
Διάλυμα e	7375950	7323507	

|--|

Όπως φαίνεται και από τα εμβαδά κορυφών, τα οποία λαμβάνονται, θεωρείται ότι δεν υφίσταται κατακράτηση ουσίας στα χρησιμοποιούμενα φίλτρα. Επομένως η διαδικασία της διήθησης από μικροβιακρατείς ηθμούς μπορεί να εφαρμοστεί στα δείγματά μας χωρίς να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

6.2. Εφαρμογή της μεθόδου HPLC-ELSD στην ανάλυση διαλυμάτων κυπροφλοξακίνης, μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης και του συμπλόκου τους

Η συγκέντρωση της CIP στα διαλύματα διατηρείται σταθερή και μεταβάλλεται αυτή της MalβCD.

Χρησιμοποιούνται διαλύματα CIP (A, 3,86×10⁻⁴ M) και MalβCD (B, 3,86×10⁻⁴ M), τα οποία παρασκευάζονται όπως έχουν περιγραφεί νωρίτερα στο κεφάλαιο 6.1 (σελ. 244). Από αυτά με τις ακόλουθες αραιώσεις παρασκευάζονται πέντε διαλύματα Σ1 έως Σ5, τα οποία στη συνέχεια θα υποστούν διαδικασία συμπλοκοποίησης. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με κινητή φάση.

Τα διαλύματα που προκύπτουν έχουν όλα σταθερή συγκέντρωση 3,86×10⁻⁵ M σε CIP.

Διάλυμα Σ1: 1 ml δ/τος Α και 500 μl δ/τος Β μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/0,5). Η συγκέντρωση σε MalβCD είναι 1,93×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ2: 1 ml δ/τος Α και 750 μl δ/τος Β μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/0,75). Η συγκέντρωση σε MalβCD είναι 2,895×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ3: 1 ml δ/τος Α και 1 ml δ/τος Β μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1). Η συγκέντρωση σε MalβCD είναι 3,86×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ4: 1 ml δ/τος Α και 1250 μl δ/τος Β μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1,25). Η συγκέντρωση σε MalβCD είναι 4,825×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ5: 1 ml δ/τος Α και 1500 μl δ/τος Β μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1,5). Η συγκέντρωση σε MalβCD είναι 5,79×10⁻⁵ M.

Τα διαλύματα Σ1 έως Σ5 τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες και υφίστανται διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (σελ. 103, μέθοδος α).

Λαμβάνονται τελικά τα σύμπλοκα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης, η περιοχή που καλύπτει η κορυφή, η οποία αποδίδεται στη CIP διαρκώς ελαττώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της MalβCD.

Η αναμενόμενη επιφάνεια, που πρέπει να καλύπτει η κορυφή, η οποία αποδίδεται στη CIP σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς είναι περίπου 8×10⁵ σε κάθε περίπτωση, δεδομένου ότι η συγκέντρωσή της διατηρείται σταθερή στα διαλύματα Σ1 έως Σ5. Οι λαμβανόμενες επιφάνειες κορυφών του φαρμάκου και της κυκλοδεξτρίνης (εμβαδά κορυφών) φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 6.2:

	Επιφάνεια κορυφής της CIP	Επιφάνεια κορυφής της MalβCD
Διάλυμα Σ1	753211	3367242
Διάλυμα Σ2	679012	5560711
Διάλυμα Σ3	353791	8272414
Διάλυμα Σ4	319003	9340146
Διάλυμα Σ5	343336	10398980

Πίνακας 6.2: Επιφάνειες κορυφών για τη CIP και τη MalβCD.

Η περιοχή που καλύπτει η κορυφή της CIP, από το διάλυμα Σ1 στο Σ5, μειώνεται όσο αυξάνει η συγκέντρωση της MalβCD. Είναι πιθανό αυτό να οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου, επομένως το λαμβανόμενο σήμα από τη σκέδαση της ακτινοβολίας που προκαλείται από τα μόρια της CIP, θα οφείλεται στη συγκέντρωση της CIP που δεν έχει εγκλειστεί στη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

Στη συνέχεια ελέγχεται αν ο εγκλεισμός επηρεάζει την αναλογικότητα των εμβαδών των κορυφών που αποδίδονται στη MalβCD. Κατασκευάζεται η γραφική παράσταση του λογαρίθμου της επιφάνειας των κορυφών της MalβCD σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης των αντίστοιχων διαλυμάτων της. Ουσιαστικά, αυτή η γραφική απεικόνιση αντιστοιχεί σε μια καμπύλη αναφοράς για την MalβCD.

Σε μια προσπάθεια να επιβεβαιωθεί η προηγούμενη άποψη, ελέγχεται κατά πόσο είναι δυνατό να υπάρχουν αποκλίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων, στις οποίες αντιστοιχούν οι επιφάνειες των κορυφών της MalβCD (πειραματικές τιμές) των διαλυμάτων Σ1 έως Σ5 από τις θεωρητικές τιμές της επιφάνειας των κορυφών της MalβCD, σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς (σχήμα 6.14).



Σχήμα 6.14: Γραφική παράσταση για τη MalβCD σε διάλυμα συμπλόκου της με τη CIP.

Όπου: $log A = (1,0504\pm0,0481) log C + (11,4938\pm0,2141)$, με R²=0,9937

Η σχέση του δεκαδικού λογαρίθμου των συγκεντρώσεων της MalβCD στα διαλύμα Σ1 έως Σ5 και του δεκαδικού λογαρίθμου της επιφάνειας των κορυφών αυτών παραμένει γραμμική, όπως στη καμπύλη αναφοράς.

Η σύγκριση των εξισώσεων που προκύπτουν α) από την καμπύλη αναφοράς για τη MalβCD (σχήμα 6.13) και β) από τη γραφική παράσταση για τη MalβCD παρουσία συμπλόκου (σχήμα 6.14) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απόκριση του οργάνου δεν επηρεάζεται από την παρουσία συμπλόκου.

Επομένως, η μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της MalβCD μπορεί να εφαρμοστεί παρουσία CIP και του μεταξύ τους συμπλόκου εφόσον δεν υπάρχουν αποκλίσεις. Η παρουσία του συμπλόκου δεν επηρεάζει τη σκέδαση της ακτινοβολίας που προκαλεί η MalβCD και το λαμβανόμενο σήμα.

Προς επιβεβαίωση των προηγούμενων συμπερασμάτων πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των θεωρητικών και πειραματικών τιμών για τη συγκέντρωση της MalβCD.



Σχήμα 6.15: Γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών σε συνάρτηση με τις πειραματικές τιμές για τη MalβCD σε διάλυμα συμπλόκου αυτής με τη CIP.

Ο έλεγχος της πιθανότητας ύπαρξης σταθερού σφάλματος πραγματοποιείται εφαρμόζοντας τη μηδενική υπόθεση για την τομή της γραφικής παράστασης του σχήματος 6.15 ενώ για την ύπαρξη αναλογικού σφάλματος, η μηδενική υπόθεση εφαρμόζεται στην κλίση της.

Η εξίσωση που προκύπτει από τα δεδομένα του σχήματος 6.2.2 είναι η:

 $C_{\pi\epsilon i\rho}$ = 0,8256 × $C_{\theta\epsilon \omega \rho}$ + 6×10⁻⁶, όπου R²=0,9888

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την τομή β με τον άξονα των τεταγμένων: Για Ν-1 = 4 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,776 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 2,6793 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει σταθερό σφάλμα στην μέθοδο.

Εφαρμογή της μηδενικής υπόθεσης για την κλίση α της καμπύλης: Για Ν-1 = 4 βαθμούς ελευθερίας και 95% διάστημα εμπιστοσύνης t_{θεωρ} = 2,776 Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει t_{πειρ} = 2,4369 < t_{θεωρ}

Ως εκ τούτου δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής και συνεπώς δεν υπάρχει αναλογικό σφάλμα στην μέθοδο.

Η παρουσία του συμπλόκου δεν επηρεάζει την απόκριση του οργάνου για τη MalβCD.

6.3. Προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης

Η σταθερά σύνδεσης της CIP με τη MalβCD θα προσδιοριστεί με την ανάλυση Scatchard. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στην κατασκευή του διαγράμματος Scatchard, με τη βοήθεια του οποίου τα δεδομένα της ισορροπίας σχηματισμού ενός συμπλόκου μπορούν να εκφραστούν με γραμμική σχέση. Στον άξονα των x τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις του δεσμευμένου φαρμάκου προς τη συγκέντρωση της MalβCD, ενώ στον άξονα των y τοποθετούνται οι τιμές του κλάσματος του δεσμευμένου προς το ελεύθερο φάρμακο επί τη συγκέντρωση της MalβCD. Εφόσον η μεταξύ τους συνάρτηση είναι ευθεία γραμμή, η κλίση της ευθείας ισούται με το λόγο 1/K_{ass}, όπου K_{ass} η σταθερά σύνδεσης στην ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου [113, 220-224].

Η ανάλυση Scatchard περιγράφεται από την εξίσωση:

 $r/c = nK_{ass} + rK_{ass}$

όπου r είναι ο λόγος της συγκέντρωσης του δεσμευμένου μορίου προς το σύνολο των διαθέσιμων θέσεων σύνδεσης (στην προκειμένη περίπτωση είναι ο λόγος της συγκέντρωσης της συμπλοκοποιημένης CIP προς τη συγκέντρωση της MalβCD), c είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου μορίου (ελεύθερη CIP), K_{ass} είναι η σταθερά σύνδεσης και n είναι ο αριθμός των θέσεων δέσμευσης.

Επομένως η εξίσωση Scatchard προσαρμόζεται:

 $C_{\text{CIP},\sigma\text{uv}\delta}/(C_{\text{Mal}\beta\text{CD}}xC_{\text{CIP},\epsilon\lambda\epsilon\text{u}\theta}) = (C_{\text{CIP},\sigma\text{uv}\delta}/C_{\text{Mal}\beta\text{CD}})xK_{\text{ass}} + nK_{\text{ass}}$

Η συγκέντρωση της MalβCD διατηρείται σταθερή και μεταβάλλεται αυτή της CIP. Τα σύμπλοκα παρασκευάζονται σε επίπεδα συγκεντρώσεων αντίστοιχων με αυτά της καμπύλης αναφοράς της CIP.

Παρασκευάζονται τα διαλύματα CIP (A, 3,86×10⁻⁴ M) και MalβCD (B, 3,86×10⁻⁴ M), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.1 (σελ. 244). Από αυτά με τις ακόλουθες αραιώσεις παρασκευάζονται πέντε διαλύματα Σ6 έως Σ10, τα οποία στη συνέχεια θα υποστούν διαδικασία συμπλοκοποίησης. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με κινητή φάση.

Τα διαλύματα που προκύπτουν έχουν όλα σταθερή συγκέντρωση 3,86×10⁻⁵ M σε MalβCD.

Διάλυμα Σ6: 1 ml δ/τος B και 500 μl δ/τος A μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/0,5). Η συγκέντρωση σε CIP είναι 1,93×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ7: 1 ml δ/τος B και 750 μl δ/τος A μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/0,75). Η συγκέντρωση σε CIP είναι 2,895×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ8: 1 ml δ/τος B και 1 ml δ/τος A μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1). Η συγκέντρωση σε CIP είναι 3,86×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ9: 1 ml δ/τος B και 1250 μl δ/τος A μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1,25). Η συγκέντρωση σε CIP είναι 4,825×10⁻⁵ M.

Διάλυμα Σ10: 1 ml δ/τος Β και 1500 μl δ/τος Α μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής (αναλογία: 1/1,5). Η συγκέντρωση σε CIP είναι 5,79×10⁻⁵ M.

Τα διαλύματα Σ6 έως Σ10 τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες και υφίστανται τη διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (σελ. 103, μέθοδος α).

Η συνολική συγκέντρωση της CIP στα διαλύματα, θα είναι ίση με το άθροισμα της συγκέντρωσης της ελεύθερης CIP και της συγκέντρωσης της CIP που έχει συμπλοκοποιηθεί.

 $C_{CIP} = C_{CIP,\epsilon\lambda\epsilon \upsilon\theta} + C_{CIP,\sigma\upsilon\nu\delta}$

Η συγκέντρωση της ελεύθερης CIP (C_{CIP,ελευθ}) βρίσκεται πειραματικά, από τη χρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή σκέδασης φωτός, σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε (κεφάλαιο 6.1) και τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς. Η συγκέντρωση της συμπλοκοποιημένης CIP (C_{CIP,συνδ}) υπολογίζεται με αφαίρεση της ελεύθερης από την ολική συγκέντρωση CIP που περιέχει το αρχικό διάλυμα.

Το αναμενόμενο εμβαδόν κορυφής για τη MalβCD σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς είναι περίπου 75×10⁵. Φαίνεται ότι ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός δεν δύναται να προσδιορίσει τη συγκέντρωση της CIP μετά τον εγκλεισμό στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και δε δίνει αντίστοιχες αυξομειώσεις στην απόκρισή του για την MalβCD. Οι λαμβανόμενες επιφάνειες κορυφών φαρμάκου και κυκλοδεξτρίνης (εμβαδά κορυφών) φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 6.3.

	Επιφάνεια κορυφής της CIP	Επιφάνεια κορυφής της MalβCD
Διάλυμα Σ6	267987	7225305
Διάλυμα Σ7	570063	8537713
Διάλυμα Σ8	683286	6630502
Διάλυμα Σ9	902567	7970185
Διάλυμα Σ10	1092052	6197025

Πίνακας 6.3: Επιφάνειες κορυφών για την CIP.

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται και σύμφωνα με την ανάλυση Scatchard υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης και της συνδεδεμένης CIP με τη MalβCD και κατασκευάζεται η αντίστοιχη γραφική παράσταση (σχήμα 6.16).

Η γραφική απόδοση του λόγου της συγκέντρωσης της συμπλοκοποιημένης CIP προς τη συγκέντρωση της MalβCD (άξονας x) σε συνάρτηση με το λόγο της συμπλοκοποιημένης κυκλοδεξτρίνης προς τη συγκέντωση της MalβCD επί τη συγκέντρωση της ελεύθερης CIP (άξονας y) υποδεικνύει τη γραμμική τους εξάρτηση. Η εξίσωση που αποδίδει αυτή τη σχέση είναι:

y=13116 *x* + 1105,3, με R²=0,9703



Σχήμα 6.16: Γραφική απεικόνιση του λόγου των συγκεντρώσεων συμπλοκοποιημένης CIP και MalβCD επί την ελεύθερη CIP σε συνάρτηση με το λόγο των συγκεντρώσεων συμπλοκοποιημένης CIP και MalβCD. Η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου CIP:MalβCD ισούται σύμφωνα με την ανάλυση Scatchard με την κλίση της παραπάνω ευθείας K_{ass}=1,3x10⁴ M⁻¹ (σχήμα 6.16).

Το σύμπλοκο CIP:MalβCD είναι αρκετά σταθερό, καθώς η σταθερά σύνδεσης θεωρείται από τις υψηλότερες της βιβλιογραφίας. Η παραπάνω σταθερά μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι η σύνδεση με ανταγωνιστικούς παράγοντες, όπως π.χ. η αδαμαντανόνη, είναι δυνατόν να προκαλέσει την απελευθέρωση της εγκλεισμένης CIP. Με αυτό τον τρόπο θα επιβεβαιωνόταν ότι η ελάττωση στην απόκριση του οργάνου για την CIP οφείλεται αποκλειστικά στη σύμπλεξη. Στο κεφάλαιο 6.4 που ακολουθεί ελέγχονται πιθανοί ανταγωνιστικοί παράγοντες.

6.4. Έλεγχος διαφόρων λιπόφιλων ενώσεων για την ανταγωνιστική σύνδεσή τους με την μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη

Γίνεται προσπάθεια εύρεσης κατάλληλου παράγοντα για την εκδίωξη της συνολικής ποσότητας της CIP που έχει εγκλωβιστεί στην κοιλότητα της MalβCD. Ο υπολογισμός αυτής της ποσότητας θα οδηγήσει έμμεσα στον προσδιορισμό της CIP, η οποία έχει συμπλοκοποιηθεί. Είναι επιθυμητό στα δείγματα, στα οποία έχει προστεθεί ο ανταγωνιστικός παράγοντας η απόκριση για τη CIP να είναι αυξημένη και να επανέρχεται στα επίπεδα των διαλυμάτων της ελεύθερης CIP.

Ελέγχονται συνολικά τρεις λιπόφιλες ενώσεις, για την ανταγωνιστική τους σύνδεση με τη MalβCD: η 2-αδαμαντανόνη, η φαινολοφθαλεΐνη και η 1-αδαμανταναμίνη, οι οποίες είναι γνωστό ότι σχηματίζουν πολύ σταθερά σύμπλοκα.

Παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει σύμπλοκο, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (σελ. 103, μέθοδος α). Παράλληλα παρασκευάζονται διαλύματα CIP (3,86×10⁻⁵ M) και MalβCD (3,86×10⁻⁵ M) και υπόκεινται και αυτά στις συνθήκες της συμπλοκοποίησης.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα 2-αδαμαντανόνης σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁴ Μ. Ζυγίζονται 2,9 mg (1,93x10⁻⁵ mol) 2-αδαμαντανόνης (MB 150,22), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα 2-αδαμαντανόνης 3,86×10⁻⁴ Μ.

Ακολούθως παρασκευάζεται διάλυμα υδροχλωρικής 1-αδαμανταναμίνης σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁴ Μ. Ζυγίζονται 3,6 mg (1,92x10⁻⁵ mol) υδροχλωρικής 1αδαμανταναμίνης (MB 187,72), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα 2αδαμαντανόνης 3,84×10⁻⁴ Μ.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁴ Μ. Ζυγίζονται 12,3 mg (3,86x10⁻⁵ mol) φαινολοφθαλεΐνης (MB 318.33), τα οποία διαλύονται αρχικά σε αιθανόλη, στη συνέχεια μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα 2αδαμαντανόνης 3,86×10⁻⁴ M.

Από 5 ml διαλύματος συμπλόκου και του εκάστοτε ανταγωνιστικού παράγοντα μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με κινητή φάση. Λαμβάνονται δείγματα από τα διαλύματα που προκύπτουν, τοποθετούνται για ανάδευση σε συσκευή Vortex και ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα (μέθοδος M₁₃ κεφάλαιο 6.1).

Τόσο η 2-αδαμαντανόνη, όσο και η φαινολοφθαλεΐνη κρίνονται ακατάλληλες για το σκοπό, για τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν μια και δεν κατάφεραν να εκδιώξουν τη CIP στο σύνολό της από την κοιλότητα της MalβCD. Αυτό διαπιστώνεται από τα εμβαδά της κορυφής, η οποία αποδίδεται στη CIP, όταν εγχύεται διάλυμα συμπλόκου παρουσία και απουσία 2-αδαμαντανόνης ή φαινολοφθαλεΐνης. Επιπλέον, έχουν πολύ μεγάλο χρόνο ανάσχεσης στις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες και καθυστερούν σημαντικά το χρόνο αναλύσεως, γι΄ αυτό και δεν προτιμήθηκαν.

Αντιθέτως η υδροχλωρική 1-αδαμανταναμίνη εκλούεται στα 4,000 min περίπου, μεταξύ της MalβCD και της CIP. Η διαχωριστικότητα κρίνεται ικανοποιητική, ο χρόνος ανάλυσης δεν καθυστερεί, όμως αλλοιώνεται η συμμετρία των κορυφών CIP και MalβCD (σχήμα 6.17). Επιπρόσθετα σε ισομοριακή ποσότητα με τη CIP καταφέρνει να την εκδιώξει από την κοιλότητα της MalβCD σε ποσοστό μεγαλύτερο από εκείνο των υπολοίπων ανταγωνιστικών παραγόντων που χρησιμοποιηθήκαν. Στη συνέχεια η υδροχλωρική 1-αδαμανταναμίνη προστίθεται σε περίσσεια, με σκοπό την απομάκρυνση της CIP στο σύνολό της και τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης αυτής, που είχε αρχικά συμπλοκοποιηθεί. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται ενδεικτικά τα εμβαδά που καλύπτουν οι κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στη CIP, για διαλύματα CIP, αλλά και συμπλόκου της με MalβCD παρουσία και απουσία υδροχλωρικής 1-αδαμανταναμίνης. Σε όλα τα διαλύματα η συγκέντρωση της CIP που έχει προστεθεί είναι σταθερή, επομένως αυξομειώσεις στο εμβαδόν, οφείλονται σε εγκλεισμό της CIP στο διάλυμα του συμπλόκου και σε εκδίωξη αυτής από τη κοιλότητα της MalβCD παρουσία τη κοιλότητα της MalβCD παρουσία απο τη κοιλότητα τος αυδοχλωρικής 1-αδαμανταναμίνη στο ειδιάλυματα η συγκέντρωση της CIP που έχει προστεθεί

πίνακα 6.4 ούτε η 1-αδαμανταναμίνη είναι ικανή να εκδιώξει τη συνολική ποσότητα της CIP από τη κοιλότητα της MalβCD, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο για ποσοτικούς προσδιορισμούς της CIP παρουσία MalβCD.

Πίνακας 6.4: Εμβαδά κορυφών για τη CIP και το σύμπλοκό της με τη MalβCD, απουσία και παρουσία 1-αδαμανταναμίνης.

Κυπροφλοξακίνη	Κυπροφλοξακίνη στο σύμπλοκο	Κυπροφλοξακίνη στο σύμπλοκο παρουσία 1- αδαμανταναμίνης
2209635	1821047	2002101



Σχήμα 6.17: Χρωματογράφημα διαλύματος συμπλόκου CIP:MalβCD παρουσία 1αδαμανταναμίνης. Η CIP εκλούεται στα 7,525, η MalβCD στα 1,825 και η 1αδαμανταναμίνη στα 4,291 min.

6.5. Επικύρωση μεθόδου ELSD

Ακολουθεί επικύρωση της μεθόδου με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες (μέθοδος M₁₃). Η μέθοδος θα αξιολογηθεί όσον αφορά στη γραμμικότητα, στην επαναληψιμότητα, στην ακρίβεια με πειράματα ανάκτησης και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τις οδηγίες ICH.

6.5.1. Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίζεται με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N), εφόσον η αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει θόρυβο γραμμής βάσης.

Το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογιστεί και με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσεως της καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

LOD = (3, 3xSD) / b

όπου SD η τυπική απόκλιση και b η κλίση της ευθείας της καμπύλης αναφοράς.

Το όριο ανίχνευσης της MalβCD προσδιορίζεται στα 7,79x10⁻⁷ M, με τον υπολογιστικό τρόπο.

Το όριο ανίχνευσης της CIP προσδιορίζεται ομοίως στα 9,89x10⁻⁷ Μ.

6.5.2. Όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίζεται επίσης με βάση την προσέγγιση του λόγου σήμα προς θόρυβο (S/N), εφόσον η αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει θόρυβο γραμμής βάσης.

Το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογιστεί και με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσεως της καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

LOQ = (10xSD) / b

όπου SD η τυπική απόκλιση και b η κλίση της ευθείας της καμπύλης αναφοράς.

Το όριο ποσοτικοποίησης της MalβCD προσδιορίζεται στα 1,94x10⁻⁶ M, με τον δεύτερο τρόπο.

Το όριο ποσοτικοποίησης της CIP προσδιορίζεται ομοίως στα 2,47x10⁻⁶ Μ.

6.5.3. Γραμμικότητα για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πέντε διαλύματα γύρω από την περιοχή εργασίας (3,86×10⁻⁵ M), με εύρος από 1,93×10⁻⁵ M έως 4,25×10⁻⁵ M.

Παρασκευάζονται <u>Διάλυμα Α</u> και <u>Διάλυμα Β</u>, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.1 (σελ. 244). Ακολουθούν αραιώσεις των διαλυμάτων Α και Β σε κινητή φάση: Από 1 ml στα 20 ml (Γ1, 1,93×10⁻⁵ M), 1,6 ml στα 20 ml (Γ2, 3,09×10⁻⁵ M), 1,8 ml στα 20 ml (Γ3, 3,47×10⁻⁵ M), 1 ml στα 10 ml (Γ, 3,86×10⁻⁵ M) και 1,1 ml στα 10 ml (Γ5, 4,25×10⁻⁵ M).

Οι συγκεντρώσεις των τελικών διαλυμάτων και τα εμβαδά των λαμβανόμενων κορυφών για τη CIP και τη MalβCD παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5. Από το κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις με τέσσερις εισαγωγές των 20 μl.

Διάλυμα	Г1	Г2	Г3	Г4	Г5	
Συγκέντρωση C (×10 ⁻⁵ M)	1,93	3,09	3,47	3,86	4,25	
Log C	-4,71	-4,51	-4,46	-4,41	-4,37	
	825126	1440362	1530070	1786206	1908881	
Εμβαδόν	789713	1343141	1486655	1774773	1981344	
κορυφής CIP	807865	1514316	1526214	1722921	1881382	
	774883	1370813	1520214	1730534	1001302	
Μέση Τιμή Α	799396,75	1417158	1514313	1753608,50	1923865,67	
Log A	5,90	6,15	6,18	6,24	6,28	
% Σχετική Τυπική Απόκλιση	2,73	5,41	1,59	1,80	2,68	
Διάλυμα	Г1	Г2	Г3	Г4	Г5	
Συγκέντρωση C (×10 ⁻⁵ M)	1,93	3,09	3,47	3,86	4,25	
Log C	-4,71	-4,51	-4,46	-4,41	-4,37	
Ευβαδόν	4427089	7620832	8039993	8581538	9619412	
κοομφής	4193302	7383597	8066001	8456798	9306465	
MalßCD	4174501	7755671	7989656	8277325	0384049	
maipez	4026805	7596626	1000000	8469978	9004040	
Μέση Τιμή Α	4205424,25	7589181,50	8031883,33	8446409,75	9436641,67	
Log A	6,62	6,88	6,91	6,93	6,97	
% Σχετική Τυπική Απόκλιση	3,93	2,03	0,48	1,49	1,73	

Πίνακας 6.5: Τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς.



Σχήμα 6.18: Ευθείες παλινδρόμησης που προέκυψαν κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας.

Από τη καμπύλη αναφοράς (σχήμα 6.18) προκύπτει για την MalβCD η σχέση: *log A* = (1,0172±0,0938) *log C* + (11,4331±0,4217), όπου R²=0,9951

και για τη CIP η σχέση: log A = (1,1122±0,0459) log C + (11,1507±0,2066), όπου R^2 =0,9949

Τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονται εκ νέου, όπως περιγράφηκαν παραπάνω και το πείραμα επαναλαμβάνεται δεύτερη και τρίτη εργαστηριακή ημέρα.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι ευθείες παλινδρόμησης, οι οποίες αντιστοιχούν σε κάθε περίπτωση.

Από τη καμπύλη αναφοράς (σχήμα 6.19) προκύπτει για την MalβCD η σχέση: *log* $A = (1,2741\pm0,0566) \log C + (12,5240\pm0,2563)$, όπου R²=0,9961 και για τη CIP η σχέση: *log* $A = (0,8949\pm0,1019) \log C + (9,8804\pm0,4611)$, όπου R²=0,9947



<u>Σχήμα 6.19:</u> Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον δεύτερο έλεγχο της γραμμικότητας.



<u>Σχήμα 6.20:</u> Ευθεία παλινδρόμησης που προέκυψε κατά τον τρίτο έλεγχο της γραμμικότητας.

Από τη καμπύλη αναφοράς (σχήμα 6.20) προκύπτει για την MalβCD η σχέση: *log* $A = (1,1614\pm0,1055)$ *log* $C + (12,0348\pm0,4744)$,όπου R²=0,9958 και για τη CIP η σχέση: *log* $A = (1,0643\pm0,0633)$ *log* $C + (10,7092\pm0,2844)$, όπου R²=0,9895
6.5.4. Επαναληψιμότητα

Παρασκευάζονται οκτώ διαλύματα CIP παρουσία MalβCD, με τελικές συγκεντρώσεις στο 100% της περιοχής εργασίας, δηλαδή περίπου στα 3,86×10⁻⁵ M. Τα διαλύματα αυτά αναλύονται χρωματογραφικά και υπολογίζεται η περιεχόμενη σε αυτά ποσότητα CIP. Το πείραμα επαναλαμβάνεται και 2^η εργαστηριακή ημέρα, με καινούργια σειρά οκτώ διαλυμάτων.

Τα αποτελέσματα της κάθε ημέρας, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

<u>1^η εργαστηριακή ημέρα</u>

Η συγκέντρωση των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας περιγράφεται στον πίνακα 6.6 που ακολουθεί.

Τα διαλύματα εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση της CIP.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

	C _{θεωρ}	C _{πειρ}	Xi	~ ~	$(x + x)^2$	
	(×10⁻⁵M)	(×10⁻⁵M)	[C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i — X _{mean}	(∧ı [—] ∧mean)	
Δείγμα 1	3,86	3,92	101,6	1,02	1,03	
Δείγμα 2	3,86	3,91	101,2	0,66	0,43	
Δείγμα 3	3,86	3,79	99,8	-0,78	0,61	
Δείγμα 4	3,86	3,90	101,1	0,51	0,26	
Δείγμα 5	3,86	3,87	3,87 100,3 -0,2		0,05	
Δείγμα 6	3,86	3,88	100,5	-0,04	0,01	
Δείγμα 7	3,86	3,86	100,1	-0,46	0,21	
Δείγμα 8	3,86	3,86	99,88	88 -0,68		

Πίνακας 6.6:	Αποτελέσματα	επαναληψιμότητας	1 ^{ης} ημέρας.
--------------	--------------	------------------	-------------------------

Μέση τιμή %: 100,56

Διακύμανση:
$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,44\%$$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 66

Σχετική τυπική απόκλιση: % $rsd = \frac{s}{x_{mean}} \times 100\% = 0,66\%$

<u>2^η εργαστηριακή ημέρα</u>

Η συγκέντρωση των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας περιγράφεται στον πίνακα 6.7 που ακολουθεί.

Τα διαλύματα εισάγονται στην χρωματογραφική διάταξη και υπολογίζονται για κάθε περίπτωση η ανακτώμενη συγκέντρωση της CIP.

Τα αποτελέσματα, καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία παρουσιάζονται παρακάτω.

	C _{θεωρ}	C _{πειρ}	Xi		$(x, y, y)^2$	
	(×10⁻⁵M)	(×10⁻⁵M)	[C _{πειρ} / C _{θεωρ} *100 %]	X _i — X _{mean}	(∧ı [—] ∧mean)	
Δείγμα 1	3,86	3,90	101,1	0,70	0,49	
Δείγμα 2	3,86	3,85	99,78	-0,59	0,35	
Δείγμα 3	3,86	3,86	100,1	-0,27	0,07	
Δείγμα 4	3,86	3,93	101,8	1,44	2,06	
Δείγμα 5	3,86	3,85	99,67	-0,70	0,49	
Δείγμα 6	3,86	3,89	100,8	0,46	0,21	
Δείγμα 7	3,86	3,87	100,2	-0,13	0,02	
Δείγμα 8	3,86	3,84	99,46	-0,91	0,82	

Πίνακας 6.7: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας 2^{ης} ημέρας.

Μέση τιμή %: 100,37

Διακύμανση:
$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - x_{mean})^2}{n-1} = 0,64\%$$

Τυπική απόκλιση: s₁ = ±0, 80

Σχετική τυπική απόκλιση: % $rsd = \frac{s}{x_{mean}} \times 100\% = 0,80\%$

Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηριακών ημερών εκτιμάται με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και των 2 ημερών. Ο έλεγχος της διαφοράς των διακυμάνσεων των 2 ημερών γίνεται εφαρμόζοντας τη δοκιμασία F 2 άκρων. Εάν η δοκιμασία αποτύχει, για

15 βαθμούς ελευθερίας, τότε η ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

Οπότε
$$F_{\pi \varepsilon \iota \rho \alpha \mu \alpha \tau \iota \kappa \phi} = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0.64}{0.44} = 1.48$$

Η τιμή είναι πολύ μικρότερη της θεωρητικής, *F*_{θεωρητικό} = 6.99, που σημαίνει πως οι διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας μεταξύ των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά και μπορούμε να προχωρήσουμε στον έλεγχο της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

Στατιστική επεξεργασία των 16 τιμών των 2 ημερών

Μέση τιμή: 100,46 %

$$s_{1-2}^{2} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{1}} (x_{i}^{2} - \overline{x}_{1}^{2})^{2} + \sum_{j=1}^{N_{2}} (x_{j}^{2} - \overline{x}_{2}^{2})^{2}}{N_{1}^{2} + N_{2}^{2} - 2} = 0,54\% \Rightarrow$$

Διακύμανση των 2 ημερών:

η συνδυασμένη τυπική διακύμανση είναι $s_{1-2} = 0,74\%$ και η σχετική τυπική διακύμανση του συνδυασμού είναι rsd=0,73%

Ο έλεγχος της απόκλισης των 2 μέσων τιμών γίνεται υπολογίζοντας πειραματικά το t και συγκρίνοντάς το με τη θεωρητική του τιμή για διάστημα εμπιστοσύνης 95% και N₁+N₂-2=14 βαθμούς ελευθερίας.

$$t_{\text{permatuko}} = \frac{\left|\overline{x_1} - \overline{x_2}\right|}{s} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} = \frac{\left|100.56 - 100.37\right|}{0.74} \cdot \sqrt{\frac{8 \times 8}{8 + 8}} = 1.027 < t_{\text{bewrytuko}} (= 2,145)$$

Το αποτέλεσμα της παραπάνω δοκιμασίας δείχνει πως οι μέσες τιμές των 2 ημερών εργασίας δεν διαφέρουν σημαντικά.

6.5.6. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης σε διαλύματα συμπλόκου της με τη κυπροφλοξακίνη, με πειράματα ανάκτησης

Τα πειράματα ανάκτησης για την MalβCD πραγματοποιούνται με σκοπό τον εντοπισμό των συστηματικών σφαλμάτων και συνεπώς στοχεύουν στον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου στον προσδιορισμό της MalβCD.

Στην παρούσα μελέτη εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα αρχικά διάλυμα συμπλόκου CIP και MalβCD 1:1.

Αναμιγνύονται 1 ml δ/τος Α και 1 ml δ/τος Β (κεφ. 6.1, σελ. 244), το μίγμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμο περιέκτη και υπόκειται τη διαδικασία συμπλοκοποίησης (κεφάλαιο 1.2.1.1, σελ. 103, μέθοδος α). Λίγο πριν την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα το λαμβανόμενο διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα συμπλόκου 1:1 συγκέντρωσης 1,93×10⁻⁵ M.

Από την ανάλυση αυτού του δείγματος (άγνωστο δείγμα) προσδιορίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, η άγνωστη συγκέντρωση της MalβCD C₀.

Σε δεύτερο στάδιο προστίθεται στο διάλυμα του συμπλόκου, γνωστή συγκέντρωση αναλύτη MalβCD, έτσι ώστε να προκύψει γνωστή μεταβολή συγκέντρωσης για τη MalβCD ΔC (εμβολιασμένο δείγμα). Το εμβολιασμένο αυτό δείγμα (spiked) αναλύεται με την ίδια ακριβώς διαδικασία, η οποία εφαρμόστηκε και στο άγνωστο δείγμα και βρίσκεται η C_{sp}.

Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα της ουσίας που εμβολιάζεται, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς. Επιπρόσθετα λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση που η προσθήκη διπλασιάζει περίπου την αρχική συγκέντρωση. Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτές τις προϋποθέσεις ακολουθεί η περιγραφή παρασκευής του εμβολιασμένου δείγματος.

Το διάλυμα συμπλόκου 1:1 συγκέντρωσης 1,93×10⁻⁵ Μ παρασκευάζεται και πάλι με τη βοήθεια της μεθόδου α, η οποία έχει περιγραφεί παραπάνω, οπότε λαμβάνεται το σύμπλοκο. Λίγο πριν την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα, προστίθεται στο λαμβανόμενο διάλυμα 1 ml διαλύματος B. Το μίγμα, το οποίο προκύπτει μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με κινητή φάση.

Τα C₀ και C_{sp} υπολογίζονται κάθε φορά από την καμπύλη αναφοράς της ημέρας. Η ανάκτηση R υπολογίζεται από τις σχέσεις:

1) % $R = \frac{(C_{sp} - C_o)}{\Delta C} \times 100$ (αυστηρός τύπος)

Με τη βοήθεια του αυστηρού τύπου η ανάκτηση υπολογίζεται σε 107,54 %, ενώ η παρουσία της CIP δεν επηρεάζει την χρωματογραφική ανάλυση της MalβCD.

2) %
$$R = \frac{C_{sp}}{(C_o + \Delta C_{o})} \times 100$$
 (ελαστικός τύπος)

Με τη βοήθεια του ελαστικού τύπου η ανάκτηση υπολογίζεται σε 104,04 %, ενώ η παρουσία της CIP δεν επηρεάζει την χρωματογραφική ανάλυση της MalβCD.

6.5.7. Έλεγχος ακρίβειας προσδιορισμού της κυπροφλοξακίνης σε διαλύματα συμπλόκου της με τη μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνη, με πειράματα ανάκτησης

Τα πειράματα ανάκτησης για τη CIP πραγματοποιούνται με τρόπο αντίστοιχο, όπως στην περίπτωση της MalβCD. Τελικός σκοπός και πάλι ο εντοπισμός των συστηματικών σφαλμάτων και συνεπώς ο έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου στον προσδιορισμό και της CIP.

Στην παρούσα μελέτη εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα αρχικά διάλυμα συμπλόκου CIP και MalβCD 1:1.

Αναμιγνύονται 1 ml δ/τος Α και 1 ml δ/τος Β (κεφ. 6.1, σελ. 244), το μίγμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμο περιέκτη και υπόκειται τη διαδικασία συμπλοκοποίησης (κεφάλαιο 1.2.1.1, σελ. 103, μέθοδος α). Λίγο πριν την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα το λαμβανόμενο διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με κινητή φάση. Προκύπτει διάλυμα συμπλόκου 1:1 συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ M.

Από την ανάλυση αυτού του δείγματος (άγνωστο δείγμα) προσδιορίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, η άγνωστη συγκέντρωση της CIP C₀.

Σε δεύτερο στάδιο προστίθεται στο διάλυμα του συμπλόκου, γνωστή συγκέντρωση αναλύτη CIP, έτσι ώστε να προκύψει γνωστή μεταβολή συγκέντρωσης για τη CIP ΔC (εμβολιασμένο δείγμα). Το εμβολιασμένο αυτό δείγμα (spiked) αναλύεται με την ίδια ακριβώς διαδικασία, η οποία εφαρμόστηκε και στο άγνωστο δείγμα και βρίσκεται η C_{sp}.

Ακολουθεί η περιγραφή παρασκευής του εμβολιασμένου δείγματος.

Το διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης 3,86×10⁻⁵ παρασκευάζεται και πάλι με τη βοήθεια της μεθόδου α, η οποία έχει περιγραφεί παραπάνω. Λίγο πριν την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα, προστίθεται στο λαμβανόμενο διάλυμα 1 ml διαλύματος Α. Το μίγμα, το οποίο προκύπτει μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με κινητή φάση.

Τα C₀ και C_{sp} υπολογίζονται κάθε φορά από την καμπύλη αναφοράς της ημέρας. Η ανάκτηση R υπολογίζεται από τις σχέσεις:

1) %
$$R = \frac{(C_{sp} - C_o)}{\Delta C} \times 100$$
 (αυστηρός τύπος)

Με τη βοήθεια του αυστηρού τύπου η ανάκτηση της CIP υπολογίζεται σε 108,24 %, ενώ η παρουσία της MalβCD δεν επηρεάζει την χρωματογραφική ανάλυση της CIP.

2) %
$$R = \frac{C_{sp}}{(C_o + \Delta C_{-})} \times 100$$
 (ελαστικός τύπος)

Με τη βοήθεια του ελαστικού τύπου η ανάκτηση της CIP υπολογίζεται σε 105,14 %, ενώ η παρουσία της MalβCD δεν επηρεάζει την χρωματογραφική ανάλυση της CIP.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για την ανάλυση της MalβCD παρουσία της CIP, σε διάλυμα που περιέχει μίγμα ή σύμπλοκο αυτών. Η χρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή σκέδασης φωτός μπορεί να εφαρμοστεί ως μέθοδος επιλογής για την ανάλυση των κυκλοδεξτρινών και άλλων ενώσεων, που στερούνται χρωμοφόρων ομάδων.

Η μέθοδος HPLC-ELSD που αναπτύχθηκε δίνει μικρότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και υπερέχει σε σχέση με τη φασματοσκοπία ποσοτικού NMR όσον αφορά στη γραμμικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου, με το μειονέκτημα της αδυναμίας του ταυτόχρονου προσδιορισμού CIP και MalβCD παρουσία του συμπλόκου τους

Η μέθοδος ποσοστικού NMR που αναπτύχθηκε υπερέχει σε ορθότητα και επιπλέον είναι η μοναδική που επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό CIP και MalβCD παρουσία του συμπλόκου τους

6.6. Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου HPLC-ELS στη χρωματογραφική διάταξη HPLC-UV

Σύμφωνα με τα πειράματα που προηγήθηκαν στη χρωματογραφική HPLC-ELS, η απόκριση του ανιχνευτή σκέδασης φωτός ήταν μικρότερη για την CIP σε διαλύματα του συμπλόκου της με τη MalβCD συγκριτικά με διαλύματα ελεύθερου φαρμάκου, ίδιας αρχικής συγκέντρωσης σε CIP. Αν και δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη διαφοροποίηση στην απόκριση του ανιχνευτή για τη MalβCD, το φαινόμενο αποδόθηκε στο σχηματισμό συμπλόκου. Φαίνεται ότι ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός δεν δύναται να προσδιορίσει τη συγκέντρωση της CIP μετά τον εγκλεισμό της στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης και δε δίνει αντίστοιχες αυξομειώσεις στην απόκρισή του για τη MalβCD. Επομένως το λαμβανόμενο σήμα από τη σκέδαση της ακτινοβολίας για την CIP, θα οφείλεται στη συγκέντρωση της ελεύθερης CIP.

Με την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου HPLC-ELS στη χρωματογραφική διάταξη HPLC-UV, αναμένονται αντίστοιχες διαφοροποιήσεις. Εφόσον με τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στην απόκριση του ανιχνευτή σκέδασης φωτός για την CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο, ενδέχεται το σύμπλοκο να εξέρχεται αυτούσιο από τη χρωματογραφική στήλη ή να μεταβάλλεται η συμπεριφορά της συμπλοκοποιημένης CIP. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει στην HPLC-UV, όπου η MalβCD δεν απορροφά, να δούμε μεταβολή στην επιφάνεια κορυφής της CIP ή ακόμα και δεύτερη κορυφή για την CIP, με διαφορετικό χρόνο έκλουσης.

Παρασκευάζονται τα διαλύματα CIP, MalβCD και του συμπλόκου τους 1:1, σε συγκέντρωση 3,86×10⁻⁵ M, όπως περιγράφεται νωρίτερα (κεφάλαιο 6.1).

Μέρος του διαλύματος της ελεύθερης CIP φυλάσσεται σε σκοτεινό χώρο (Σ1) και το υπόλοιπο υπόκειται στις συνθήκες δημιουργίας συμπλόκου (Σ2).

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση HPLC-UV των διαλυμάτων με τις χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου M₁₃:

<u>Στατική φάση:</u> Στήλη αντιστρόφου φάσεως XTerra® RP18 (4,6×150 mm) με διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm

Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο / διάλυμα τριφθοροξικού οξέος pH 3,0 (15:85 v/v)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατασκευάζεται ο πίνακας 6.8.

Πίνακας 6.8: Εμβαδά κορυφών CIP σε ελεύθερη μορφή Σ1 και ως σύμπλοκο με τη MalβCD.

	CIP (Σ1)	CIP (Σ2)	Σύμπλοκο
Εμβαδά κορυφών	30038414	30795642	13166561



Σχήμα 6.21: Χρωματογράφημα της μεθόδου M₁₃ σε διάλυμα συμπλόκου CIP:MalβCD 1:1 (3,86×10⁻⁵ M) στην χρωματογραφική διάταξη HPLC-UV.

Αποτελέσματα

Η χρωματογραφική ανάλυση στο UV εμφανίζει μία κορυφή για την CIP, είτε βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή είτε ως σύμπλοκο με τη MalβCD (σχήμα 6.21). Σύμφωνα με την επιφάνεια κορυφής της ελεύθερης CIP (πίνακας 6.8), λαμβάνονται παραπλήσια εμβαδά κορυφών είτε φυλάσσεται σε σκοτεινό χώρο (Σ1) είτε υπόκειται στις συνθήκες δημιουργίας συμπλόκου (Σ2). Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου, εφόσον τηρούνται οι προφυλάξεις που αναφέρονται στο κεφ. 7.3.1 (σελ. 305) δεν επηρεάζει την απόκριση του φαρμάκου στο UV. Αντιθέτως, παρουσία MalβCD, η CIP εμφανίζει σημαντικά ελαττωμένη περιοχή απορρόφησης (43,83 %). Κατά συνέπεια η μειωμένη απορρόφηση οφείλεται στη συμπλοκοποίηση. Η δημιουργία συμπλόκου προκαλεί μεταβολή στο ηλεκτρονικό περιβάλλον της CIP γεγονός που επηρεάζει τη μοριακή απορροφητικότητά της.

6.7. Μελέτη επίδρασης της παρουσίας συμπλόκου κυπροφλοξακίνης και μαλτοζυλο-β-κυκλοδεξτρίνης στην απορρόφηση της υδροχλωρικής κυπροφλοξακίνης με φασματοσκοπία UV

Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας UV μετρήθηκε η απορρόφηση της CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τη MalβCD. Οι μετρήσεις έγιναν στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για τη CIP (278 nm).

Παρασκευή διαλυμάτων:

Διάλυμα CIP: Ζυγίζονται 15,1 mg CIP (MB 385,82), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 20 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP (ΣΥ) συγκεντρώσεως 1,95×10⁻³ M.

Πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος ΣΥ 1:10. Προκύπτει διάλυμα CIP ΣΥ₁ 1,95×10⁻⁴ M.

Διάλυμα MalβCD: Ζυγίζονται 63,5 mg MalβCD (MB 1629,45), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα MalβCD (MY) συγκεντρώσεως 1,95×10⁻³ M.

Πραγματοποιείται αραίωση του διαλύματος MY 1:10. Προκύπτει διάλυμα MalβCD MY₁ 1,95×10⁻⁴ M.

<u>Παρασκευή συμπλόκου:</u> Για την παρασκευή του συμπλόκου CIP και MalβCD 1 ml διαλύματος ΣΥ και 1 ml διαλύματος MY τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα μίγματος CIP και MalβCD 1,95×10⁻⁴ M. Το μίγμα τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες και ακολουθεί η διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου (κεφ. 1.2.1.1, μέθοδος α).

Ακολούθως προσδιορίζονται οι μέγιστες απορροφήσεις στο λ_{max} και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.9.

Πίνακας 6.9: Τιμές των απορροφήσεων στο λ_{max}=278 nm των διαλυμάτων της CIP σε ελεύθερη μορφή και ως σύμπλοκο με τη MalβCD.

CIP	276 nm	316,4 nm		
Ελεύθερη:	0,684	0,200		
Σύμπλοκο:	0,570	0,172		

Αποτελέσματα

Παρατηρούνται μεταβολές στην απορρόφηση της CIP στο UV (πίνακας 6.9), παρουσία MalβCD, οι οποίες και αποδίδονται στη συμπλοκοποίηση. Η παρουσία της MalβCD, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απορρόφησης των διαλυμάτων της CIP στα φάσματα UV. Η απορρόφηση της CIP στο σύμπλοκο αντιστοιχεί στο 85 % της απορρόφησης της ελεύθερης CIP.

Παρατηρείται μεγάλη απόκλιση της μεταβολής στην απορρόφηση του διαλύματος συμπλόκου όταν αυτό ελέγχεται στο νερό (UV, 85 %) και στην κινητή φάση (HPLC, 43,83 %). Η απόκλιση είναι αναμενόμενη και απαντάται συχνά εφόσον χρησιμοποιείται κινητή φάση ως διαλυτικό μέσο. Το φαινόμενο οφείλεται α) στο γεγονός ότι η παρουσία οργανικού διαλύτη αυξάνει τη λιποφιλία του διαλύματος, επομένως δεν ευνοείται θερμοδυναμικά η είσοδος της CIP στην επίσης λιπόφιλη κοιλότητα της MalβCD και β) στο γεγονός ότι στο όξινο περιβάλλον (pH=3) της κινητής φάσης η CIP είναι ιονισμένη, επομένως θα έχει μικρότερη σταθερά σύνδεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΟΛΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

7.1. Προκαταρκτικά πειράματα παρασκευής και ελέγχου μικροβιολογικών διαλυμάτων κυπροφλοξακίνης παρουσία διαφορετικών κυκλοδεξτρινών

Παρασκευάζονται στείρα διαλύματα της CIP και των συμπλόκων της με διάφορες κυκλοδεξτρίνες με σκοπό τον έλεγχο της μικροβιολογικής δραστικότητας αυτών έναντι ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών του κολοβακτηριδίου *E.coli* καθώς και άλλων μικροβίων. Οι κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συμπλόκων είναι οι: 1) βCD, 2) HPβCD, 3) MeβCD και 4) MalβCD του εμπορίου, καθώς και οι συνθετικές: 1) bpsp, 2) gpsp, 3) bpen, 5) bpsp+GalOHNH₂ και 5) bpsp+ManOHNH₂. Ακολουθεί η εύρεση των αντίστοιχων τιμών MIC για διαφορετικά στελέχη μικροβίων, τα οποία έχουν απομονωθεί κυρίως από το ουροποιητικό σύστημα ασθενών δύο νοσοκομείων:

- Α) Νομαρχιακό Νοσοκομείο Πατησίων
- καθώς επίσης και στελέχη που παραχωρήθηκαν από το τμήμα Μικροβιολογίας των:
- Β) Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιου Αθηνών
- Γ) Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Παρασκευή διαλυμάτων:

Οι κυκλοδεξτρίνες που ελέγχονται αρχικά είναι: η βCD, η ΗΡβCD και η ΜeβCD του εμπορίου καθώς επίσης και οι περι-υποκατεστημένες συνθετικές κυκλοδεξτρίνες bpsp και gpsp. Οι κυκλοδεξτρίνες προστίθενται σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με το φάρμακο.

Διάλυμα Α: Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα CIP (διάλυμα Α), από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου. Οι αραιώσεις γίνονται σε κάθε περίπτωση με νερό καθαρότητας HPLC.

Ζυγίζονται 46,96 mg CIP (MB=385,82), καθαρότητας 99,19 %. Τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Προκύπτει διάλυμα CIP, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 4 mg/ml CIP βάσης (MB=331,35).

Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου:

Παρασκευάζεται διάλυμα B₁ ελεύθερης CIP και διαλύματα συμπλόκων της CIP με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες, B₂ έως B₆. Κάθε διάλυμα περιέχει την ίδια συγκέντρωση CIP, που αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

Διάλυμα CIP B₁: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 B₂: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 10,96 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα CIP:HPβCD B₃: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα HPβCD (MB=1500, 14,49 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MeβCD 1:1 B₄: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MeβCD (MB=1300, 12,55 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1 B₅: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα συνθετικής κυκλοδεξτρίνης bpsp (MB=1906, 18,41 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής. Διάλυμα συμπλόκου CIP:gpsp 1:1 B₆: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα συνθετικής κυκλοδεξτρίνης gpsp (MB=2177, 21,02 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Λαμβάνεται με μικροπιπέτα 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα B₁ έως B₆ (χρονική στιγμή t₀=0) και φυλάσσεται, για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε CIP (χρωματογραφικός έλεγχος).

Τα διαλύματα B₂ έως B₆ υφίστανται διαδικασία συμπλοκοποίησης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (μέθοδος α). Το διάλυμα B₁ υποβάλλεται στις ίδιες συνθήκες.

Λαμβάνεται, ομοίως, 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα B₁ έως B₆ και φυλάσσεται, για να πραγματοποιηθεί χρωματογραφικός έλεγχος των δειγμάτων και να διαπιστωθεί η σταθερότητα των διαλυμάτων CIP στην διαδικασία της παρασκευής και παραλαβής των συμπλόκων.

Μετά την παραλαβή των συμπλόκων, τα διαλύματα B₁ έως B₆ διηθούνται από φίλτρα Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων

0,22 μm της εταιρείας Millipore, προκειμένου να παραλάβουμε στείρα διαλύματα κατάλληλα για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen για την αποφυγή της επιμόλυνσης των διαλυμάτων.

Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση λαμβάνεται 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα και φυλάσσεται, για τον έλεγχο κατακράτησης ουσίας στα φίλτρα. Σε αυτό το στάδιο η δειγματοληψία πραγματοποιείται με αποστειρωμένες σύριγγες προκειμένου να διατηρηθεί η μικροβιολογική καθαρότητα των διαλυμάτων. Τέλος, τα αποστειρωμένα διαλύματα σφραγίζονται και τοποθετούνται σε καταψύκτη στους -30 °C, όπου διατηρείται η στειρότητα των διαλυμάτων.

Τα δείγματα από κάθε κατεργασία: παρασκευή (χρόνος t₀), ανακίνηση και διήθηση των διαλυμάτων, συγκεντρώνονται και αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται η μέθοδος A₆, η οποία αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο 3.1.

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης κατασκευάζεται το ιστόγραμμα της επιφάνειας που καλύπτει η κορυφή της CIP σε κάθε δείγμα, που λαμβάνεται μετά τη παρασκευή των διαλυμάτων B₁ έως B₆, μετά την ανακίνηση και μετά την διήθηση αυτών. Τα αποτελέσματα από κάθε διάλυμα παρουσιάζονται σε ένα κοινό γράφημα:



Σχήμα 7.1: Συγκριτικό ιστόγραμμα της επιφάνειας της κορυφής της CIP σε διαλύματά της σε ελεύθερη μορφή (B₁) και σε μορφή συμπλόκου με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες (B₂₋₆), για δειγματοληψίες που έγιναν μετά τη παρασκευή, μετά την ανακίνηση και μετά τη διήθηση των διαλυμάτων.

Αποτελέσματα

Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της CIP καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ελαττώνεται. Η απώλεια αυτή φτάνει έως και 30% της αρχικής συγκέντρωσης της CIP. Κατά συνέπεια, τα διαλύματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μικροβιολογικό έλεγχο, εφόσον δεν είναι γνωστή η συγκέντρωση της CIP στα τελικά διαλύματα. Σύμφωνα με την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων, που λαμβάνονται μετά από κάθε κατεργασία, η περιεκτικότητα σε CIP είναι μικρότερη τόσο μετά την διαδικασία συμπλοκοποίησης όσο και μετά τη διήθηση, για τη λήψη στείρων διαλυμάτων. Το φαινόμενο παρατηρείται και παρουσία κυκλοδεξτρινών, με διαφορετική ένταση σε κάθε περίπτωση. Μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση της CIP παρατηρείται στο διάλυμα του συμπλόκου με τη bpsp (B₅).

Συμπεράσματα

Η ελάττωση της συγκέντρωσης της CIP μετά την διαδικασία της συμπλοκοποίησης και της διήθησης για την παρασκευή στείρων διαλυμάτων, ανεξάρτητα από τη παρουσία κυκλοδεξτρινών, μπορεί να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω λόγους, οι οποίοι θα πρέπει να διερευνηθούν για την ορθή παρασκευή των μικροβιολογικών διαλυμάτων:

- Η CIP παρουσιάζει ευαισθησία στην φωτεινή ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να φωτολύεται κατά την έκθεσή της σε αυτή, προς σχηματισμό ποικίλων προϊόντων διάσπασης. Έτσι, αν το φάρμακο δεν προστατευτεί επαρκώς από την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων παρασκευής, ανακίνησης και διήθησης των διαλυμάτων, μέρος του φαρμάκου θα έχει καταστραφεί μέχρι την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων. Ο βαθμός στον οποίο έχει εξελιχτεί η φωτόλυση θα είναι αντίστοιχος με το ποσό απώλειας της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε κάθε δείγμα.
- Όσον αφορά στη διαδικασία διήθησης, είναι πιθανό μέρος του φαρμάκου να κατακρατείται στα φίλτρα είτε να προσροφάται στις σύριγγες, με τις οποίες πραγματοποιείται η δειγματοληψία. Η κατακράτηση στα φίλτρα μπορεί να οφείλεται είτε σε απόφραξη των πόρων μετά τη διήθηση ορισμένου όγκου διαλύματος, οπότε η πλεονάζουσα ποσότητα μορίων φαρμάκου κατακρατείται, είτε σε παρεμπόδιση λόγω μεγέθους, της διήθησης μορίων μεγάλου μοριακού βάρους. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι σύμπλοκα με κυκλοδεξτρίνες, μοριακά διμερή ή αλυσίδες μορίων φαρμάκου.

7.2. Προσπάθειες παρασκευής στείρων διαλυμάτων για τους μικροβιολογικούς ελέγχους

7.2.1. Πείραμα αυξανόμενων συγκεντρώσεων σε β-κυκλοδεξτρίνη

Σκοπός του πειράματος είναι να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν αποκλίσεις στη χρωματογραφική μέθοδο. Διερευνάται εάν η παρουσία κυκλοδεξτρίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επηρεάζει τα χαρακτηριστικά της μεθόδου και τη σταθερότητα του φαρμάκου στη φωτεινή ακτινοβολία. Είναι πιθανό η παρουσία κυκλοδεξτρίνης να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την απορρόφηση ενέργειας κατά την έκθεση του φαρμάκου στη φωτεινή ακτινοβολία.

Παρασκευάζονται τέσσερα διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης σε CIP, στα οποία προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις κυκλοδεξτρίνης. Η κυκλοδεξτρίνη που επιλέγεται, είναι η βCD και προστίθεται σε αναλογία 1:1, 1:2, 1:5 και 1:20 με το φάρμακο. Επίσης παρασκευάζεται ένα διάλυμα μάρτυρας CIP B₁, το οποίο δεν περιέχει κυκλοδεξτρίνη. Κάθε διάλυμα περιέχει την ίδια συγκέντρωση CIP, που αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

Παρασκευή διαλυμάτων με διαφορετική στοιχειομετρία σε βCD:

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα A CIP, όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 7.1, από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με νερό καθαρότητας HPLC.

Διάλυμα CIP B₁: Λαμβάνονται 800 μΙ διαλύματος Α, τα οποία περιέχουν 9,66x10⁻⁶ mol ουσίας, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 (B₂): Λαμβάνονται 800 μl (9,66x10⁻⁶ mol) διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 10,96 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:2: Λαμβάνονται 800 μl (9,66x10⁻⁶ mol) διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται διπλάσια της ισομοριακής ποσότητα βCD (MB=1135, 21,92 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:5: Λαμβάνονται 800 μl (9,66x10⁻⁶ mol) διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ποσότητα βCD πενταπλάσια της ισομοριακής (MB=1135, 54,80 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:20: Λαμβάνονται 800 μl (9,66x10⁻⁶ mol) διαλύματος Α και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 25 ml. Προστίθεται ποσότητα βCD εικοσαπλάσια της ισομοριακής (MB=1135, 219,20 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Απομακρύνεται 1 ml δείγμα από το κάθε διάλυμα (χρονική στιγμή $t_0=0$) και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά η περιεκτικότητά του σε CIP.

Παρασκευάζονται τα σύμπλοκα όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 1.2.1.

Μετά τη διαδικασία συμπλοκοποίησης, λαμβάνεται 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά η περιεκτικότητά τους σε CIP και να διαπιστωθεί η σταθερότητα των διαλυμάτων.

Τα δείγματα, τα οποία έχουν φυλαχθεί από κάθε στάδιο κατεργασίας, παρασκευή των διαλυμάτων (χρόνος t₀) και διαδικασία συμπλοκοποίησης, συγκεντρώνονται και αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα.

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης κατασκευάζεται το ιστόγραμμα της επιφάνειας της κορυφής της CIP σε διαλύματα συμπλόκου της με βCD σε διαφορετικές αναλογίες.



Σχήμα 7.2: Ιστόγραμμα της επιφάνειας της κορυφής της CIP, σε διαλύματα συμπλόκου CIP:βCD με διαφορετικές αναλογίες σε βCD, μετά τα στάδια παρασκευής και συμπλοκοποίησης.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Σε κάθε περίπτωση παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης της CIP τόσο στο διάλυμα, στο οποίο δεν έχει προστεθεί βCD όσο και στα διαλύματα, τα οποία περιέχουν βCD σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μεγαλύτερη ελάττωση παρατηρείται στο διάλυμα της ελεύθερης CIP.

Επομένως ακολούθως θα πρέπει:

α) τα διαλύματα CIP καθ' όλη τη διάρκεια της παρασκευής να προστατεύονται συνεχώς από την ηλιακή ακτινοβολία, ενώ αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η παρασκευή τους να τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια.

β) να ελεγχθεί η επίδραση των φίλτρων κατά τη διαδικασία της διήθησης των διαλυμάτων CIP και ειδικότερα η πιθανότητα κατακράτησης ουσίας σε αυτά.

7.2.2. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης από τα χρησιμοποιούμενα φίλτρα

Είναι πιθανό, κατά τη διαδικασία διήθησης των διαλυμάτων, τα οποία προορίζονται για τους μικροβιολογικούς ελέγχους, μέσω ειδικών μικροβιοκρατών ηθμών σε στείρο περιβάλλον, να κατακρατηθεί δραστική ουσία στα φίλτρα.

Για την διερεύνηση της πιθανότητας κατακράτησης του φαρμάκου, των κυκλοδεξτρινών ή του μεταξύ τους συμπλόκου στα φίλτρα, επιλέγεται το διάλυμα της CIP:βCD 1:20. Για τη διήθηση χρησιμοποιούνται φίλτρα Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm της εταιρείας Millipore. Ακολούθως πραγματοποιείται η διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται στείρο διάλυμα κατάλληλο για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, παρουσία φλόγας λύχνου Bunsen, για την προστασία του διαλύματός από μικροβιακή επιμόλυνση. Πραγματοποιείται δειγματοληψία σε κάθε στάδιο, δηλαδή μετά την παρασκευή, μετά την διαδικασία συμπλοκοποίησης και μετά τη διήθηση του διαλύματος. Όλα τα δείγματα αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα.

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης κατασκευάζεται το ιστόγραμμα της επιφάνειας που καλύπτει η κορυφή της CIP, στο διάλυμα CIP:βCD 1:20.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η επιφάνεια της κορυφής της CIP ελαττώνεται σε ποσοστό 7,06 % μετά την διήθηση του διαλύματος συμπλόκου CIP:βCD 1:20 (σχήμα 7.3).





Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στα χρησιμοποιούμενα φίλτρα. Τα φίλτρα μπορεί να κατακρατούν το ίδιο το φάρμακο, εφόσον είναι δυνατόν σε πυκνά διαλύματα να σχηματίζονται εκτεταμένα συσσωματώματα μορίων CIP, συνδεδεμένων μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Επίσης τα φίλτρα μπορεί να κατακρατούν μόρια κυκλοδεξτρινών εξαιτίας του όγκου τους. Η κατακράτηση κυκλοδεξτρινών στην επιφάνεια των φίλτρων, μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό στοιβάδας αδιαπέραστης από τα μόρια του φαρμάκου. Τέλος, στα φίλτρα μπορεί να κατακρατούνται τα σύμπλοκα του φαρμάκου με τις διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η τελική συγκέντρωση της CIP στο διηθημένο διάλυμα θα είναι ελαττωμένη και η κορυφή αυτής θα καλύπτει μικρότερη περιοχή.

7.2.3. Μελέτη επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης του συμπλόκου κυπροφλοξακίνης:bpsp

Για την διερεύνηση της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP, κατά την διαδικασία παρασκευής και αποστείρωσης των δειγμάτων, χρησιμοποιείται το διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1 (B₅), το οποίο έχει παρασκευαστεί νωρίτερα (κεφ. 7.1) για μικροβιολογικούς ελέγχους. Το διάλυμα αυτό, που έχει ήδη υποστεί τις διαδικασίες συμπλοκοποίησης και διήθησης, τοποθετείται σε υάλινο σωλήνα των 10 ml με εσμυρισμένο πώμα και εκτίθεται σε ηλιακή ακτινοβολία για 30 min με ταυτόχρονη ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Στην συνέχεια λαμβάνεται

δείγμα 1 ml, το οποίο αναλύεται χρωματογραφικά. Οι χρωματογραφικές συνθήκες διατηρούνται όπως παραπάνω. Τέλος παρουσιάζεται σε ιστόγραμμα η επιφάνεια της κορυφής της CIP, στο διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1, για δειγματοληψία μετά τη παρασκευή, ανακίνηση, διήθηση και έκθεση αυτού στην ηλιακή ακτινοβολία.



Σχήμα 7.4: Ιστόγραμμα της επιφάνειας κορυφής της CIP, στο διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1, σε δείγματα που λαμβάνονται μετά τη παρασκευή, ανακίνηση, διήθηση και έκθεση του διαλύματος στην ηλιακή ακτινοβολία.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 7.4, η επιφάνεια της κορυφής της CIP ελαττώνεται σημαντικά μετά την διήθηση, αλλά και μετά την έκθεση του διαλύματος συμπλόκου CIP:bpsp 1:1 στην ηλιακή ακτινοβολία. Επομένως η μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως είναι η κατακράτηση στο φίλτρο και η φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP.

7.2.4. Μελέτη επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης των συμπλόκων της κυπροφλοξακίνης με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες

Στη συνέχεια πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στην ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP, σε διαλύματα συμπλόκων της με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες. Αναμένεται κάθε κυκλοδεξτρίνη να έχει διαφορετική επίδραση στη CIP, θετική είτε αρνητική. Η απορρόφηση της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας και η φωτολυτική αποικοδόμηση της CIP θα πραγματοποιείται σε διαφορετικό βαθμό στα σύμπλοκα σε σχέση με το ελεύθερο φάρμακο.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στα σύμπλοκα της CIP με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες, χρησιμοποιούνται τα διαλύματα B₂ έως B₆, τα οποία παρασκευάστηκαν στο κεφάλαιο 7.1 για τον μικροβιολογικό έλεγχο. Τα διαλύματα αυτά, μετά τις διαδικασίες συμπλοκοποίησης και διήθησης, τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους -30 °C, όπου διατηρήθηκαν σταθερά μέχρι τη πραγματοποίηση του ελέγχου. Από κάθε διάλυμα B₂-B₆ λαμβάνεται δείγμα πριν από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Στη συνέχεια τα διαλύματα B₂-B₆ τοποθετούνται σε υάλινους σωλήνες και εκτίθενται σε ηλιακή ακτινοβολία. Λαμβάνονται δείγματα τις χρονικές στιγμές t=15, 30 45 και 60 min. Η μελέτη ολοκληρώνεται την ίδια ημέρα, για όλα τα διαλύματα. Τα δείγματα συλλέγονται και αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται σε ένα κοινό γράφημα, προκειμένου να έχουμε συγκριτική μελέτη για τη φωτολυτική αποικοδόμηση, μετά από έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, των διαλυμάτων B₂-B₆.



Σχήμα 7.5: Συγκριτική γραφική παράσταση της επιφάνειας κορυφής της CIP σε διαλύματα συμπλόκων με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες (B₂-B₆) σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 7.5, η συγκέντρωση της CIP, ελαττώνεται μετά την έκθεση των συμπλόκων στην ηλιακή ακτινοβολία, με όλες τις διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες που δοκιμάστηκαν. Κάθε κυκλοδεξτρίνη έχει διαφορετική επίδραση στην ταχύτητα της φωτολυτικής αποικοδόμησης της CIP.

Τα σύμπλοκα με τις gpsp και bpsp, οδηγούν συνολικά από όλα τα στάδια (παρασκευή, συμπλοκοποίηση, διήθηση και έκθεση του διαλύματος σε ηλιακή ακτινοβολία) σε μεγαλύτερη ελάττωση της συγκέντρωσης της CIP, ενώ ακολουθούν τα σύμπλοκα με τις HPβCD και MeβCD. Αντίθετα, με τη βCD παρατηρείται η μικρότερη απώλεια στη συγκέντρωση του φαρμάκου.

7.2.5. Έλεγχος προσρόφησης στα μέσα δειγματοληψίας

Παρασκευάζεται διάλυμα CIP B₁ κατά τα γνωστά. Λαμβάνεται 1 ml δείγμα με σύριγγα και 1 ml δείγμα με πιπέτα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν προσροφάται ουσία σε κάποιο από τα μέσα δειγματοληψίας. Ακολούθως πραγματοποιείται διήθηση του διαλύματος B₁ από φίλτρα Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm της εταιρείας Millipore, προκειμένου να παραλάβουμε στείρο διάλυμα κατάλληλο για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, παρουσία φλόγας λύχνου Bunsen, για προστασία του διαλύματος από μικροβιακή επιμόλυνση. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση λαμβάνεται 1 ml δείγμα με πλαστική αποστειρωμένη σύριγγα και 1 ml δείγμα με πιπέτα. Τα μηδενικά δείγματα, καθώς και τα δείγματα που συλλέγονται μετά από τη διήθηση αναλύονται χρωματογραφικά, όπως παραπάνω (κεφ. 7.1).

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης τα μέσα της δειγματοληψίας δεν προσροφούν ουσία, καθώς η συγκέντρωση της CIP δεν μεταβάλλεται είτε εάν η δειγματοληψία γίνει με πιπέτα είτε εάν η δειγματοληψία γίνει με σύριγγα. Αντίθετα, τα φίλτρα προσροφούν ουσία εφόσον μετά από τη διήθηση η συγκέντρωση του διαλύματος της CIP ελαττώνεται κατά ένα ποσοστό περίπου 10 %.

Η ελάττωση αυτή στο διάλυμα της CIP που χρησιμοποιήθηκε, συγκέντρωσης 3,86x10⁻⁴ M, pH=5,00, μπορεί να οφείλεται στο σχηματισμό μοριακών διμερών ή αλυσίδων μορίων φαρμάκου μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Η διέλευση των σχηματισμών αυτών από τους πόρους των φίλτρων είναι δυνατόν να αποκλειστεί λόγω του μεγέθους τους, με αποτέλεσμα να κατακρατούνται στα φίλτρα και να υπολογίζεται τελικά ελαττωμένη

συγκέντρωση CIP στο διηθημένο διάλυμα, κατά το ποσοστό, το οποίο έχει κατακρατηθεί.

7.2.6. Διερεύνηση περιοχής pH του διαλύματος κυπροφλοξακίνης, στο οποίο είναι πιθανό να καταβυθίζεται ποσότητα ουσίας

Η κατακράτηση ουσίας στα φίλτρα κατά τη διήθηση μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα μόρια CIP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς σχηματίζοντας μοριακά διμερή ή εκτεταμένα συσσωματώματα μορίων φαρμάκου, όπως έχει αποδειχθεί και από προηγούμενο ερευνητικό πρόγραμμα στο ίδιο εργαστήριο, τα οποία λόγω μεγέθους αδυνατούν να διαπεράσουν τα φίλτρα.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της CIP για το σχηματισμό των μοριακών διμερών είναι εφικτή σε ορισμένες συνθήκες pH, στο οποίο τα μόρια της CIP βρίσκονται στην κατάλληλη μορφή ιονισμού. Ευνοϊκές συνθήκες pH έχουμε στην όξινη περιοχή, όπου το πιπεραζινικό άζωτο της CIP είναι πρωτονιωμένο, ενώ η καρβοξυλική ομάδα είναι αδιάστατη και ικανή να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με καρβονυλικές ομάδες του ίδιου ή άλλων μορίων CIP.

Το διάλυμα B₁ έχει όξινο pH=5,00 κατάλληλο για την ανάπτυξη υπερμοριακών συγκροτημάτων CIP. Είναι δυνατόν με αύξηση του pH να αποφύγουμε τον σχηματισμό μοριακών διμερών και αλυσίδων μορίων φαρμάκου, ώστε κατά την διήθηση να μην κατακρατείται ουσία στα φίλτρα.

Για το λόγο αυτό ελέγχεται αρχικά εάν η μεταβολή του pH επηρεάζει τη διαλυτότητα της ουσίας στην συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Παρασκευάζεται διάλυμα B₁ (κεφ. 7.1), προσδιορίζεται το pH του διαλύματος και στη συνέχεια προστίθενται σταδιακά με μικροπιπέτα από 10 μl διαλύματος NaOH συγκεντρώσεως 0,1 M. Μετά από κάθε προσθήκη διαλύματος NaOH προσδιορίζεται εκ νέου το pH και παρατηρείται εάν σε κάποιο pH καταβυθιστεί στερεή ποσότητα CIP. H προσθήκη NaOH πραγματοποιείται μέχρι την ουδέτερη περιοχή, όπου τόσο η πιπεραζινική όσο και η καρβοξυλική ομάδα της CIP είναι μη ιονισμένες, μορφή κρίσιμη για την διαλυτότητα της ουσίας. Στην αλκαλική περιοχή ιονίζεται η καρβοξυλική ομάδα της CIP και η διαλυτότητα αυξάνεται και πάλι. Οι μεταβολές του pH του διαλύματος του φαρμάκου μετά από κάθε προσθήκη διαλύματος NaOH μετρώνται και καταγράφονται στον πίνακα 7.1. Πίνακας 7.1: Ποσότητες διαλύματος ΝαΟΗ 0,1 Μ που προστίθενται και το pH του διαλύματος CIP που προκύπτει μετά από κάθε προσθήκη.

V _{NαOH} (μΙ)	рН						
-	5,00	40	5,63	80	6,07	120	6,83
10	5,17	50	5,74	90	6,21	130	7,05
20	5,34	60	5,85	100	6,39		
30	5,51	70	5,96	110	6,59		

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Δεν παρατηρείται καταβύθιση ουσίας σε κανένα pH, επομένως είναι δυνατόν να παρασκευαστούν διαλύματα σε διαρκώς αυξανόμενα pH, προκειμένου να βρεθεί το κατάλληλο pH, στο οποίο δεν σχηματίζονται αλυσίδες μορίων φαρμάκου. Το κατάλληλο pH βρίσκεται πειραματικά με τη βοήθεια της διήθησης από φίλτρα σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων με διαφορετικά pH. Το πείραμα περιγράφεται στη συνέχεια.

7.2.7. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης σε διαλύματα με διαφορετικά pH

Παρασκευάζονται επτά διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης σε CIP, τα οποία αραιώνονται με ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων αυξανόμενων τιμών pH. Παρασκευή διαλυμάτων :

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα Σ CIP, από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου.

Διάλυμα Σ: Ζυγίζονται 15,02 mg CIP (MB=385,82), καθαρότητας 99,19 %. Τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό καθαρότητας HPLC. Προκύπτει διάλυμα CIP, το οποίο αντιστοιχεί με συγκέντρωση 1,28 mg/ml σε CIP βάση (MB=331,35).

Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου:

Κάθε διάλυμα Σ_1 έως Σ_7 περιέχει την ίδια συγκέντρωση CIP, που αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

Διάλυμα CIP Σ₁: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=4,5.

<u>Διάλυμα CIP Σ₂</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=5,0. <u>Διάλυμα CIP Σ₃</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=6,0. <u>Διάλυμα CIP Σ₄</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=6,5. <u>Διάλυμα CIP Σ₄</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=6,5. <u>Διάλυμα CIP Σ₅</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=6,5. <u>Διάλυμα CIP Σ₅</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,0. <u>Διάλυμα CIP Σ₆</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,5. <u>Διάλυμα CIP Σ₇</u>: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7,5.

Λαμβάνεται με μικροπιπέτα 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα Σ₁₋₇ και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεχθεί χρωματογραφικά η περιεκτικότητά του σε CIP.

Τα διαλύματα Σ₁₋₇ κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους προστατεύονται διαρκώς από το φως, ενώ αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η παρασκευή τους τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια.

Ακολούθως τα διαλύματα Σ₁₋₇ διηθούνται από φίλτρα Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm της εταιρείας Millipore, προκειμένου να παραλάβουμε στείρα διαλύματα κατάλληλα για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, παρουσία φλόγας λύχνου Bunsen, για προστασία των διαλυμάτων από μικροβιακή επιμόλυνση. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση λαμβάνεται 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά και να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποιο pH, στο οποίο δεν κατακρατείται ουσία στα φίλτρα.

Τα δείγματα, τα οποία λαμβάνονται από κάθε στάδιο, συγκεντρώνονται και αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα.



Σχήμα 7.6: Ιστόγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό ελάττωσης της συγκέντρωσης της CIP στα διαλύματα διαφορετικού pH Σ₁₋₇ πριν και μετά τη διήθηση.

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης κατασκευάζεται το ιστόγραμμα της επιφάνειας της κορυφής της CIP στα διαλύματα αυξανόμενων τιμών pH Σ₁₋₇, μετά την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη διαδικασία διήθησης (σχήμα 7.6).

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Η κατακράτηση ουσίας στα φίλτρα (σχήμα 7.6) κατά τη διαδικασία της διήθησης, για την παρασκευή στείρων διαλυμάτων για μικροβιολογικούς ελέγχους εξαρτάται από το pH των αρχικών διαλυμάτων. Σε pH=8 η συγκέντρωση της CIP δεν ελαττώνεται με τη διήθηση. Έτσι, το pH αυτό επιλέγεται για την παρασκευή των μικροβιολογικών διαλυμάτων με σκοπό την παρεμπόδιση κατακράτησης ουσίας στα φίλτρα.

7.2.8. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης σε διαλύματα συμπλόκων της κυπροφλοξακίνης με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες σε pH=8,0

Παρασκευάζονται τέσσερα διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης σε CIP, παρουσία διαφορετικών κάθε φορά κυκλοδεξτρινών, τα οποία αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 8,0. Παρασκευή διαλυμάτων :

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα Σ CIP, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2.6, από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου.

Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου:

Κάθε διάλυμα περιέχει την ίδια συγκέντρωση CIP, που αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

Διάλυμα CIP Σ₇: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=8,0.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 Σ₈: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 4,38 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=8,0.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:HPβCD 1:1 Σ₉: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα HPβCD (MB=1135, 5,79 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=8,0.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MeβCD 1:1 Σ₁₀: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MeβCD (MB=1135, 5,02 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=8,0.

Τα διαλύματα Σ₇₋₁₀ κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους προστατεύονται διαρκώς από το φως, ενώ αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η παρασκευή τους τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια. Λαμβάνεται με μικροπιπέτα 1 ml δείγμα για κάθε διάλυμα Σ₇₋₁₀ και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά η περιεκτικότητά τους σε CIP.

Παρασκευάζονται τα σύμπλοκα όπως περιγράφεται νωρίτερα (κεφάλαιο 1.2.1)

Στη συνέχεια τα διαλύματα Σ₇₋₁₀ διηθούνται από φίλτρα Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm της εταιρείας Millipore, προκειμένου να παραλάβουμε στείρα διαλύματα κατάλληλα για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, παρουσία φλόγας λύχνου Bunsen, για προστασία των διαλυμάτων από μικροβιακή επιμόλυνση. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση λαμβάνεται 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα και φυλάσσεται, για να ελεγχθεί χρωματογραφικά και να διερευνηθεί η κατακράτηση ουσίας σε διαφορετικά pH. Ο χρωματογραφικός έλεγχος όλων των δειγμάτων που συγκεντρώνονται πραγματοποιείται την ίδια ημέρα.



Σχήμα 7.7: Ιστόγραμμα της επιφάνειας κορυφής της CIP σε διάλυμα ελεύθερου φαρμάκου (Σ₇) και διαλύματα συμπλόκων με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες (Σ₈₋₁₀) σε pH=8.

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης κατασκευάζεται το ιστόγραμμα της επιφάνειας κορυφής της CIP, σε διάλυμα ελεύθερου φαρμάκου (Σ₇) και διαλύματα συμπλόκων με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες (Σ₈₋₁₀) στο pH 8,0, τη χρονική στιγμή που παρασκευάζονται τα διαλύματα, μετά την συμπλοκοποίηση καθώς και μετά τη διήθηση αυτών (σχήμα 7.7).

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 7.7 μετά την προσθήκη κυκλοδεξτρινών και τη συμπλοκοποίηση παρατηρείται και στο επιλεγμένο pH=8 κατακράτηση στα χρησιμοποιούμενα φίλτρα, οπότε επιλέγεται άλλη ποιότητα φίλτρων για την αποφυγή κατακράτησης ουσίας σε αυτά. Στη συνέχεια αντικαθίστανται τα φίλτρα από νέα, με διαφορετικό υλικό πλήρωσης και δοκιμάζονται εκ νέου.

7.2.9. Έλεγχος κατακράτησης κατά τη διαδικασία της διήθησης από φίλτρα με διαφορετικό υλικό

Τα φίλτρα: Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm επίσης της εταιρείας Millipore, που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα οδήγησαν σε κατακράτηση ουσίας δημιουργώντας προβλήματα στη χρήση τους για τη διήθηση διαλυμάτων γνωστής με ακρίβεια συγκέντρωσης CIP που προορίζονται για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η κατακράτηση αποφεύγεται σε ρυθμιστικά διαλύματα ορισμένου pH. Η παρουσία των ρυθμιστικών διαλυμάτων μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά των μικροβίων και να μας οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα κατά τους μικροβιολογικούς ελέγχους. Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκαν νέα φίλτρα: Steriflip[®] Filter Unit GP Millipore Express[®] PLUS PS Membrane και μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,22 μm. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατακράτησης ουσίας στα νέα φίλτρα προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά την παρασκευή των διαλυμάτων για τους μικροβιολογικούς ελέγχους.

Παρασκευή διαλυμάτων:

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα Σ CIP, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2.6, από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με νερό καθαρότητας HPLC.

Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου:

Κάθε διάλυμα περιέχει την ίδια συγκέντρωση CIP, που αντιστοιχεί με συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

Διάλυμα CIP Σ₁₁: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 (Σ₁₂): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 4,38 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:HPβCD 1:1 (Σ₁₃): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα HPβCD (MB=1135, 5,79 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MeβCD 1:1 (Σ₁₄): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MeβCD (MB=1135, 5,02 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:gpsp 1:1 (Σ₁₅): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης gpsp (MB=2177, 8,41 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1 (Σ₁₆): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp (MB=1906, 7,36 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MalβCD 1:1 (Σ₁₇): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MalβCD (MB=1629,45, 6,29 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp+GalOHNH₂ 1:1 (Σ₁₈): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂ (MB=2991,4, 11,56 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp+ManOHNH₂ 1:1 (Σ₁₉): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp+ManOHNH₂ (MB=2784,2, 10,76 mg) και αραιώνονται μέχρι χαραγής.

Λαμβάνεται με μικροπιπέτα 1 ml δείγμα για κάθε διάλυμα Σ₁₁₋₁₉ και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά η περιεκτικότητά τους σε CIP.

Τα διαλύματα Σ₁₁₋₁₉ κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους προστατεύονται διαρκώς από το φως, ενώ αμέσως μετά τοποθετούνται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια και ακολουθεί η παρασκευή των συμπλόκων, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.

Στη συνέχεια τα διαλύματα Σ₁₁₋₁₉ διηθούνται από τα νέα φίλτρα Steriflip [®] Filter Unit GP Millipore Express[®] PLUS PS Membrane και μεγέθους πόρων μεμβράνης 0,22 μm, προκειμένου να παραλάβουμε στείρα διαλύματα κατάλληλα για μικροβιολογικούς ελέγχους. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό κενό, παρουσία φλόγας λύχνου Bunsen, για προστασία των διαλυμάτων από μικροβιακή επιμόλυνση. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση λαμβάνεται 1 ml δείγμα από κάθε διάλυμα και φυλάσσεται, προκειμένου να ελεγχθεί χρωματογραφικά και να διαπιστωθεί εάν θα κατακρατείται ουσία στα νέα φίλτρα από διαφορετικό υλικό.

Τα δείγματα, τα οποία λαμβάνονται σε κάθε στάδιο, πριν και μετά την διήθηση αυτών συγκεντρώνονται και αναλύονται χρωματογραφικά την ίδια ημέρα.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης δεν παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης της CIP κατά τη διήθηση. Επομένως, δεν κατακρατείται ουσία στα νέα φίλτρα. Τα φίλτρα διαφορετικού υλικού: Stericap[®]/Steritop[®] Filter Unit, μεμβράνης Durapore (PVDV) και μεγέθους πόρων 0,22 μm επίσης της εταιρείας Millipore επιλέγονται για την διήθηση των μικροβιολογικών διαλυμάτων που θα παρασκευαστούν και θα ελεγχθούν στη συνέχεια. Επιπλέον, τα διαλύματα προστατεύονται διαρκώς από το φως, ενώ τα μικροβιολογικά διαλύματα

7.2.10. Παρασκευή των μικροβιολογικών διαλυμάτων της κυπροφλοξακίνης με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης

Σε μια προσπάθεια να αποφευχθεί η χρήση φίλτρων και το προβληματικό στάδιο της διήθησης, επιχειρείται η παρασκευή των μικροβιολογικών διαλυμάτων σε στερεή μορφή με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης.

Παρασκευή διαλυμάτων :

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα Σ CIP, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2.6, από το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις θα προκύψουν στη συνέχεια τα διαλύματα ελέγχου.

Παρασκευή διαλυμάτων ελέγχου:

Διάλυμα CIP ΣΛ₁: Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ, τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml.

Διάλυμα συμπλόκου CIP:βCD 1:1 (ΣΛ₂): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα βCD (MB=1135, 4,38 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:HPβCD 1:1 (ΣΛ₃): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα HPβCD (MB=1135, 5,79 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MeβCD 1:1 (ΣΛ₄): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MeβCD (MB=1135, 5,02 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:gpsp 1:1 (ΣΛ₅): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης gpsp (MB=2177, 8,41 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp 1:1 (ΣΛ₆): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp (MB=1906, 7,36 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:MalβCD 1:1 (ΣΛ₇): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα MalβCD (MB=1629,45, 6,29 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp+GalOHNH₂ 1:1 (ΣΛ₈): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp+GalOHNH₂ (MB=2991,4, 11,56 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpsp+ManOHNH₂ 1:1 (ΣΛ₉): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpsp+ManOHNH₂ (MB=2784,2, 10,76 mg).

Διάλυμα συμπλόκου CIP:bpen 1:1 (ΣΛ₁₀): Λαμβάνεται 1 ml διαλύματος Σ και τοποθετείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη 10 ml. Προστίθεται ισομοριακή ποσότητα κυκλοδεξτρίνης bpen (MB=1683,5, 6,50 mg).

Παρασκευάζονται τα σύμπλοκα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.2.1.1 (μέθοδος γ). Τα δείγματα που τοποθετούνται στον λυοφιλοποιητή σε συνθήκες κενού και θερμοκρασίας -50 °C παραλαμβάνονται σε στερεή μορφή και παράλληλα στείρα. Για την παρασκευή των μικροβιολογικών διαλυμάτων, τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αναδιαλύονται σε στείρο ενέσιμης μορφής νερό μέχρι τελικού όγκου 10 ml, αμέσως πριν την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών ελέγχων. Σε κάθε περίπτωση των μικροβιολογικών διαλυμα CIP, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 128 μg/ml (3,86x10⁻⁴ M) CIP βάσης.

7.3. Μικροβιολογικά διαλύματα και έλεγχος της δραστικότητας αυτών

Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν στο Νομαρχιακό Νοσοκομείο Πατησίων. Παρασκευάστηκαν στείρα υδατικά διαλύματα της CIP και του ΟΧΑ με σκοπό τον έλεγχο της μικροβιολογικής δραστικότητας αυτών, καθώς και των συμπλόκων τους με διάφορες κυκλοδεξτρίνες. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε έναντι ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών κυρίως του κολοβακτηριδίου (Ε.Coli) αλλά και άλλων παθογόνων

μικροβίων (συγκριτικές μελέτες τιμών MIC). Οι κυκλοδεξτρίνες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συμπλόκων της CIP και του OXA περιλαμβάνουν: α) φυσικές (βCD) και συνθετικές κυκλοδεξτρίνες (HPβCD, MeβCD και MalβCD) του εμπορίου, καθώς και β) συνθετικά ανάλογα των φυσικών κυκλοδεξτρινών (bpsp, gpsp, bpen, bpsp+GalOHNH₂ και bpsp+ManOHNH₂) οι οποίες παρασκευάστηκαν για τους σκοπούς του προγράμματος από τους συναδέλφους του συνεργαζόμενου φορέα (E.K.E.Φ.E. Δημόκριτος). Οι κυκλοδεξτρίνες προστέθηκαν στα διαλύματα του φαρμάκου σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 ή 1:3.

7.3.1. Μέθοδοι παρασκευής στείρων διαλυμάτων

Η παρασκευή των στείρων διαλυμάτων των αντιμικροβιακών φαρμάκων που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους:

Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) παρασκευή των διαλυμάτων των κινολονών και των κυκλοδεξτρινών, (β) ανάμιξη και κατεργασία για να επιτευχθεί η συμπλοκοποίηση και (γ) διήθηση από μικροβιοκρατείς ηθμούς κάτω από άσηπτες συνθήκες. Σε κάθε στάδιο λαμβάνονται δείγματα και αναλύονται με τις αντίστοιχες μεθόδους, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί.

Ο δεύτερος τρόπος παρασκευής δειγμάτων συνίσταται στην αντικατάσταση του σταδίου της διήθησης από λιγότερο προβληματικές μεθόδους και περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) παρασκευή των διαλυμάτων των δραστικών ενώσεων και των κυκλοδεξτρινών, (β) ανάμιξη και κατεργασία προς συμπλοκοποίηση, (γ) κατάψυξη των διαλυμάτων στους -30 °C και (δ) λυοφιλοποίηση αυτών στους -50 °C υπό κενό. Μετά από δοκιμές, συμπεραίνεται ότι το στάδιο β) μπορεί να παραληφθεί, εφόσον δεν υπάρχει ποιοτική και ποσοτική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Κατά συνέπεια το στάδιο αυτό παραλείπεται με οφέλη την εξοικονόμηση χρόνου και την ελαχιστοποίηση της έκθεσης των δειγμάτων σε φως και θερμότητα, που μπορεί να ενεργοποιήσουν αντιδράσεις αποικοδόμησης. Τα δείγματα παραλαμβάνονται σε μορφή λεπτής σκόνης και διατηρούνται σε θερμοκρασία -30 °C. Η ανασύσταση των δειγμάτων πραγματοποιείται με διάλυσή τους σε στείρο νερό, ώστε να χρησιμοποιηθεί στους μικροβιολογικούς ελέγχους.

Στα προκαταρκτικά πειράματα, κατά την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων, τα οποία συλλέγονται σε κάθε στάδιο, διαπιστώθηκε σημαντική ελάττωση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε φαρμακευτικές ουσίες. Η απώλεια του δραστικού συστατικού διαπιστώθηκε τόσο παρουσία όσο και απουσία κυκλοδεξτρινών. Σημαντική ήταν επίσης η ελάττωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε δείγματα, τα οποία είχαν υποστεί το στάδιο της διήθησης από μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Είναι γνωστό ότι τα φάρμακα, τα οποία ανήκουν στη κατηγορία των κινολονών παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα φωτοσταθερότητας. Για το λόγο αυτό έγιναν μελέτες φωτολυτικής αποικοδόμησης των επιλεγμένων κινολονών με πηγή ακτινοβολίας λυχνία τόξου αερίου Ξένου, τα οποία επιβεβαιώθηκαν με μελέτες στην ηλιακή ακτινοβολία (κεφάλαιο 7.2.3).

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων διαμορφώθηκαν ειδικοί σκοτεινοί χώροι για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων, προκειμένου τα δείγματα να προστατεύονται καθ'όλη την διάρκεια της διαδικασίας από την ηλιακή ακτινοβολία. Τα παλιά φίλτρα αντικαταστάθηκαν από νεότερα. Τα δείγματα παρασκευάζονται σε ουδέτερα, αραιά διαλύματα και φυλάσσονται σε σκοτεινόχρωμους περιέκτες σε θερμοκρασία δωματίου στους ειδικά διαμορφωμένους χώρους.

Επιπρόσθετα έχει διαπιστωθεί με μελέτες Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ότι τα φάρμακα της κατηγορίας των κινολονών σχηματίζουν σε όξινο περιβάλλον διμερή ή συσσωματώματα μορίων φαρμάκου. Οι σχηματισμοί αυτοί είναι πιθανό να δυσχεραίνουν τη διέλευση από τους πόρους των μικροβιοκρατών ηθμών και μέρος του φαρμάκου να κατακρατείται στην επιφάνεια των φίλτρων. Επιπλέον, ο εγκλεισμός φαρμάκου στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμούς μεγάλου μοριακού βάρους, επομένως απαιτείται η χρήση κατάλληλων φίλτρων, που θα επιτρέπουν τη διέλευση των σχηματιζόμενων συμπλόκων

Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων, απέδειξε ότι δεν καταγράφονται απώλειες δραστικού συστατικού (HPLC-UV), αλλά ούτε και των κυκλοδεξτρινών (HPLC-ELSD), εφόσον:

- το υδατικό περιβάλλον διατηρηθεί ουδέτερο (σε όξινο περιβάλλον παρατηρείται απώλεια CIP, την οποία αποδώσαμε στα γνωστά συσσωματώματα που σχηματίζει σε υδατικά διαλύματα)
- οι ηθμοί που θα χρησιμοποιηθούν είναι από κατάλληλα υλικά που δεν προσροφούν τις εν λόγω ουσίες
- όλες οι διαδικασίες ολοκληρωθούν σε χώρους προστατευμένους από την ηλιακή ακτινοβολία
- τα δείγματα φυλάσσονται στους -30 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν

Μετά τη λήψη των παραπάνω προληπτικών μέτρων τα πειράματα επαναλήφθηκαν και η απώλεια δραστικού συστατικού από κάθε στάδιο είχε μειωθεί στο ελάχιστο. Έτσι, έγινε δυνατή η παρασκευή δειγμάτων από την κατηγορία των κινολονών για τους μικροβιολογικούς ελέγχους σε γνωστή, με ακρίβεια, συγκέντρωση του δραστικού συστατικού, προκειμένου η εύρεση των τιμών MIC να οδηγήσει σε αξιόπιστα αποτελέσματα.

MIC είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, που μπορεί και αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού.

Ακολούθησε μικροβιολογικός έλεγχος και η εύρεση των αντίστοιχων τιμών MIC των διαλυμάτων στα διαφορετικά στελέχη των μικροβίων, τα οποία απομονώθηκαν από το ουροποιητικό σύστημα ασθενών.

7.3.2. Πειραματική διαδικασία μικροβιολογικού ελέγχου

Ο μικροβιολογικός έλεγχος και η εύρεση των αντίστοιχων τιμών MIC των σκευασμάτων πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά στελέχη μικροβίων, τα οποία απομονώθηκαν από το ουροποιητικό σύστημα ασθενών.

Για τη πραγματοποίηση των μικροβιολογικών ελέγχων χρησιμοποιήθηκαν πλάκες 96 φρεατίων (σχήμα 7.8). Στη πρώτη και δεύτερη στήλη τοποθετήθηκε το διάλυμα του αντιμικροβιακού φαρμάκου (CIP ή OXA) σε ελεύθερη μορφή ή σε μορφή συμπλόκου με τις επιλεγμένες κυκλοδεξτρίνες σε συγκέντρωση: 128μg/100μl. Σε κάθε σειρά τοποθετείται και ελέγχεται διαφορετικό διάλυμα.

Το διάλυμα του αντιμικροβιακού παρασκευάζεται με διάλυση στείρας λυοφιλοποιημένης κόνεως σε αποστειρωμένο νερό (pH=8). Η πρώτη στήλη περιέχει μόνο το διάλυμα του αντιμικροβιακού και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο και την επιβεβαίωση της στειρότητας του διαλύματος. Σε κάθε ένα από τα υπόλοιπα φρεάτια (εκτός της πρώτης στήλης) τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό (100μl) κατάλληλο για την επώαση των μικροβίων.

Το θρεπτικό υλικό, το οποίο επιλέχτηκε ήταν το Müler Hinton Broth. Αυτό αποτελείται από άγαρ, άμυλο, καζεΐνη και εκχύλισμα βόειου κρέατος και είναι ρυθμισμένο σε ουδέτερο pH.

Στη δεύτερη στήλη η συγκέντρωση του διαλύματος αντιμικροβιακού έχει υποδιπλασιαστεί (64μg/100μl). Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις με τη μεταφορά 100μl διαλύματος με τη βοήθεια μικροπιπέτας από το δεύτερο στο τρίτο φρεάτιο,

ανάμιξη με το θρεπτικό υλικό, λήψη και μεταφορά 100μl από το τρίτο στο τέταρτο φρεάτιο κ.ο.κ. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος υποδιπλασιάζεται σε κάθε αραίωση φτάνοντας στο τελευταίο φρεάτιο κάθε σειράς τη συγκέντρωση 0,0625μg/100μl.

Τέλος, σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται με μικροπιπέτα 1-3μl διάλυμα σε κατάλληλο θρεπτικό υγρό, του επιλεγμένου βακτηριακού στελέχους, το οποίο θα μελετηθεί.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται κάτω από στείρες συνθήκες. Οι πλάκες καλύπτονται και τοποθετούνται σε κλίβανο για επώαση στους 37° C. Μετά την επώαση ελέγχεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε οποιαδήποτε συγκέντρωση, πράγμα που γίνεται αντιληπτό από την εμφάνιση κομβίου, δηλαδή αποικιών ορατών με γυμνό μάτι στο θρεπτικό υλικό. Η ύπαρξη εντοπισμένης βακτηριακής αποικίας στο θρεπτικό υλικό επιβεβαιώνεται με καλλιέργεια υλικού από το συγκεκριμένο φρεάτιο. Η καλλιέργεια γίνεται σε έτοιμους δίσκους με άγαρ (σχήμα 7.8).

Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις (MIC), οι οποίες αποτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε κάθε περίπτωση σημειώνονται και κατασκευάζονται συγκεντρωτικοί πίνακες με τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσία και απουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών για κάθε αντιμικροβιακό (CIP ή OXA) και βακτηριακό στέλεχος που μελετήθηκε. Οι πίνακες αυτοί δείχνουν την ευαισθησία στο αντιμικροβιακό που μελετήθηκε και παρουσιάζονται στη συνέχεια.



Σχήμα 7.8: Πλάκα 96 φρεατίων και δίσκος με άγαρ, στον οποίο έχει γίνει καλλιέργεια με υλικό από φρεάτιο πλάκας όπου υπήρχε εντοπισμένη βακτηριακή αποικία και δείχνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

7.4. Έλεγχος δραστικότητας των φαρμάκων που μελετήθηκαν σε ελεύθερη μορφή και σε μορφή συμπλόκων με διάφορες κυκλοδεξτρίνες

Στη συνέχεια παρατίθενται οι πίνακες με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών πειραμάτων:

Πίνακας 1: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:βCD (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΧΣ	П	είραμα 1	П	Πείραμα 2	
	LILALAOL	LILALAOIL	Сір	Cip : βCD 1 : 1	Сір	Cip : βCD 1 : 3	
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia coli	4061	32	32	32	32	
3	Escherichia coli	4016	32	32	32	32	
4	Escherichia coli	4783	1	16	1	16	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	

Αποτελέσματα

Η συμπλοκοποίηση της CIP με τη βCD δε βελτιώνει τη δραστικότητά της (ίδιες τιμές MIC) σε κανένα από τα πέντε στελέχη *Escherichia coli* που δοκιμάστηκαν (πίνακας 1).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:HPβCD (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (μg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	I	Πείραμα 1	Πείραμα 2		
			Сір	Cip : HPβCD 1 : 1	Сір	Cip : ΗΡβCD 1 : 3	
1	Escherichia Coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia Coli	4061	32	32	32	32	
3	Escherichia Coli	4016	32	32	32	32	
4	Escherichia Coli	4783	1	1	1	1	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	
Ο εγκλεισμός της CIP στην HPβCD δεν αυξάνει τη δραστικότητά της (ίδιες τιμές MIC) έναντι στα πέντε διαφορετικά ανθεκτικά στελέχη Escherichia coli, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:MeβCD (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ		Πείραμα 1	Πείραμα 2		
			Сір	Cip : ΜeβCD 1 : 1	Сір	Cip : ΜeβCD 1 : 3	
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia coli	4061	32	16	32	16	
3	Escherichia coli	4016	32	16	32	16	
4	Escherichia coli	4783	1	1	1	1	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	

Αποτελέσματα

Παρουσία συμπλόκων CIP:MeβCD (πίνακας 3) παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC, καθώς υπάρχουν δύο ανθεκτικά μικροβιακά στελέχη *Escherichia coli* (40%), που αποτρέπεται η ανάπτυξή τους από τη συγκέντρωση 16 μg/ml συμπλόκου, σε σχέση με τη CIP, που απαιτούνται 32 μg/ml.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:gpsp (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (μg/ml)			
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	п	είραμα 1	Πείραμα 2	
			Сір	Cip : gpsp 1 : 1	Сір	Cip : gpsp 1 : 3
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32
2	Escherichia coli	4061	32	32	32	32
3	Escherichia coli	4016	32	32	32	32
4	Escherichia coli	4783	1	2	1	2
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32

Η gpsp δε φαίνεται να βελτιώνει τη δραστικότητα της CIP, όταν σχηματίζει σύμπλοκα με αυτή (πίνακας 4).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpsp (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	П	είραμα 1	Πείραμα 2		
			Сір	Cip : bpsp 1 : 1	Сір	Cip : bpsp 1 : 3	
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia coli	4061	32	16	32	32	
3	Escherichia coli	4016	32	32	32	32	
4	Escherichia coli	4783	1	1	1	16	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	

Αποτελέσματα

Όταν η CIP βρίσκεται υπό τη μορφή συμπλόκου με bpsp παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC σε ένα εκ των πέντε (20%) ανθεκτικών στελεχών *Escherichia coli* που μελετήθηκαν (πίνακας 5).

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpen (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	П	είραμα 1	Πείραμα 2		
			Сір	Cip : bpen 1 : 1	Сір	Cip : bpen 1 : 3	
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia coli	4061	32	32	32	32	
3	Escherichia coli	4016	32	32	32	32	
4	Escherichia coli	4783	1	1	1	16	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	

Τα σύμπλοκα με bpen δεν αυξάνουν τη δραστικότητα της CIP στα στελέχη που μελετήθηκαν (πίνακας 6).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:MalβCD (1:1) και (1:3) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

	BAKTHPIAKO		M.I.C. (μg/ml)				
A/A		ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ		Πείραμα 1	Πείραμα 2		
	ZTENEKOZ		Сір	Cip : MalβCD 1 : 1	Сір	Cip : MalβCD 1 : 3	
1	Escherichia coli	4624	32	32	32	32	
2	Escherichia coli	4061	32	32	32	32	
3	Escherichia coli	4016	32	16	32	16	
4	Escherichia coli	4783	1	4	1	8	
5	Escherichia coli	4008	32	32	32	32	

Αποτελέσματα

Υπάρχει ένα ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (20%) που είναι περισσότερο ευαίσθητο στο σύμπλοκο της CIP με τη MalβCD (πίνακας 7).

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:βCD (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Πεί	ραμα 1	Πείραμα 2		
	LILALAUL		Сір	Cip : βCD 1 : 1	Cip	Cip : βCD 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	8	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-	
6	Enterobacter cloacae	Σ8	2	2	2	2	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	64	64	64	64	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-	

9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64
11	Escherichia coli	CIP4015	8	4	8	4
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,25	-	-
15	Escherichia coli	4037	64	32	-	-
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-
18	Escherichia coli	6033	0,125	0,125	-	-
19	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-
20	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-
21	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-
11	Klebsiella pneumoniae	Σ9	32	32	64	64
12	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16
13	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	64
14	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5	0,5	0,5
15	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128
16	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	64	32	32
17	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
18	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
19	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	32
20	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
21	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
22	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,5
23	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	32
24	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	32	32	32

Παρουσία συμπλόκου CIP:βCD 1:1 (πίνακας 8) παρατηρείται σε ποσοστό 20,83% στα στελέχη που καλλιεργήθηκαν, υποδιπλασιασμός της MIC σε σχέση με τα διαλύματα CIP.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:HPβCD (1:1) έναν	TI
διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.	

			M.I.C. (μg/ml)				
A/A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ	п	είραμα 1	П	είραμα 2	
		ZTEREAUTZ	Сір	Cip : ΗΡβCD 1 : 1	Сір	Cip : ΗΡβCD 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	16	32	16	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	8	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-	
6	Enterobacter cloacae	Σ8	4	8	2	2	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128	64	64	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128			
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64	
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64	
11	Escherichia coli	CIP4015	8	4	4	4	
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-	
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-	
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,125	-	-	
15	Escherichia coli	4037	64	32	-	-	
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-	
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-	
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-	
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-	
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-	

21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	32	64	64	64
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16
23	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	64
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0.5	0.5	0.5	0.5
25	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128
26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	32	32	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	32
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,5
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	32
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	8	32	32

Παρουσία συμπλόκου της CIP με την HPβCD 1:1 (πίνακας 9) παρατηρείται σε ποσοστό 14,71% υποδιπλασιασμός της MIC σε σχέση με τα διαλύματα CIP. Επιπλέον πραγματοποιείται ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους σε ποσοστό 5,89%. Έτσι, για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4625), η MIC από 0,5 μg/ml μειώνεται στα 0,125 μg/ml, ενώ για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Staphylococcus haemolyticus* (Σ₁), η MIC από 32 μg/ml περιορίζεται στα 8 μg/ml. Πίνακας 10: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:MeβCD (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	п	είραμα1	П	είραμα 2	
	LILALAOL		Сір	Cip : ΜeβCD 1 : 1	Сір	Cip : ΜeβCD 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	8	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-	
6	Enterobacter	Σ8	4	4	2	2	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128	64	64	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-	
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64	
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64	
11	Escherichia coli	CIP4015	8	4	4	4	
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-	
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-	
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,125	-	-	
15	Escherichia coli	4037	64	32	-	-	
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-	
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-	
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-	
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-	
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-	
21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	32	64	32	
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16	
23	Klebsiella	CIP4018	-	-	64	64	
24	Listeria	Σ10	0,5	0,5	0,5	1	
25	Proteus	Σ11	128	128	128	128	

	mirabilis					
26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	32	32	32	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	16
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,5
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	32
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	32	32	32

Παρουσία συμπλόκου CIP:MeβCD 1:1 (πίνακας 10) παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC σε ποσοσστό και πάλι 14,71% σε σχέση με τα διαλύματα CIP. Ακόμη υπάρχει ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους σε ποσοστό 2,94%. Έτσι, για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4625), η MIC από 0,5 μg/ml μειώνεται στα 0,125 μg/ml.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:gpsp (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (μg/ml)			
A/A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ	Πε	ίραμα 1	Πείραμα 2	
	ZTENEXUZ	ZTENEAUTZ	Cip	Cip : gpsp 1 : 1	Cip	Cip : gpsp 1 : 1
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	4
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-
6	Enterobacter cloacae	Σ8	4	4	2	2
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128	64	64
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64
11	Escherichia coli	CIP4015	8	8	8	8
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,5	-	-
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,125	-	-
15	Escherichia coli	4037	64	32	-	-
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-
21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	64	64	64
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16
23	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	64
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0.5	0.5	0.5	0.5
25	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128

26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	32	32	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	32
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,5
33	Staphylococcus Epidermidis	36295(4)	-	-	64	32
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	8	32	8

Στην περίπτωση συμπλοκοποίησης της CIP με gpsp 1:1 (πίνακας 11) παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC σε ποσοστό 8,82% σε σχέση με τα διαλύματα CIP. Η ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους εμφανίζεται σε ποσοστό 5,88%. Έτσι, για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4625), η MIC από 0,5 μg/ml μειώνεται στα 0,125 μg/ml, ενώ για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Staphylococcus haemolyticus* (Σ₁), η MIC από 32 μg/ml περιορίζεται στα 8 μg/ml. Πίνακας 12: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpsp (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
A/A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ	Пε	ίραμα 1	Пε	Πείραμα 2	
	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ZTENEXUTZ	Cip	Cip : bpsp 1 : 1	Cip	Cip : bpsp 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	8	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-	
6	Enterobacter cloacae	Σ8	2	2	2	2	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128	128	128	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-	
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64	
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64	
11	Escherichia coli	CIP4015	8	4	8	4	
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-	
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-	
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,125	-	-	
15	Escherichia coli	4037	64	64	-	-	
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-	
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-	
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-	
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-	
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-	
21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	32	64	32	
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16	
23	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	64	
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5	0,5	1	
25	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128	

26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	32	64	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	32
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	1
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	64
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	16	32	16

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού CIP:bpsp 1:1 (πίνακας 12) οδηγούν σε ποσοστό 11,76% σε υποδιπλασιασμό της MIC σε σχέση με τα διαλύματα της CIP. Ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους παρατηρήθηκε σε ποσοστό 2,94%. Έτσι, για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4625), η MIC από 0,5 μg/ml μειώνεται στα 0,125 μg/ml.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpen (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

		M.I.C. (µg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ	Πε	ίραμα 1	Πε	ίραμα 2
	ZTEREKUZ		Сір	Cip : bpen 1 : 1	Сір	Cip : bpen 1 : 1
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	4
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	16
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-
6	Enterobacter cloacae	Σ8	4	4	2	2
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128	64	64
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64
10	Escherichia coli	Σ12	64	32	64	32
11	Escherichia coli	CIP4015	8	8	8	8
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-
14	Escherichia coli	4625	0.5	0.25	-	-
15	Escherichia coli	4037	64	64	-	-
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-
21	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-
22	Klebsiella pneumoniae	Σ9	32	32	64	32
23	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16
24	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	32
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5	0,5	0,5
25	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128

26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	32	32	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	16
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	16
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	1
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	64
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	8	32	32

Στα σύμπλοκα CIP:bpen 1:1 (πίνακας 13) παρατηρείται σε ποσοστό 23,53% στα στελέχη που δοκιμάστηκαν ελάττωση της MIC κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τα διαλύματα CIP, ενώ για τον *Staphylococcus haemolyticus* (Σ₁), κατά δύο τάξεις μεγέθους, πιο συγκεκριμένα από 32 μg/ml περιορίζεται στα 8 μg/ml.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:MalβCD (1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (μg/ml)				
A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΩΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Πε	είραμα 1	Πείρ	ραμα 2	
			Сір	Cip : MalβCD 1 : 1	Сір	Cip : MalβCD 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	32	32	32	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	4	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	16	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	0,125	-	-	
6	Enterobacter cloacae	Σ8	4	4	4	4	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	64	64	64	64	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-	
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64	
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64	
11	Escherichia coli	CIP4015	8	4	8	4	
12	Escherichia coli	6050M	0,5	1	-	-	
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	0,25	-	-	
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,25	-	-	
15	Escherichia coli	4037	64	16	-	-	
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-	
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-	
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-	
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-	
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-	
21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	32	64	32	
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16	
23	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	64	
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5	0,5	0,5	
25	Proteus	Σ11	128	128	128	128	

	mirabilis					
26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	32	64	32
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	16
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	16	32	16
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,5
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	32
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	16	32	16

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού της CIP με τη MalβCD 1:1 (πίνακας 14) οδηγούν στο 26,47% των στελεχών που δοκιμάστηκαν σε υποδιπλασιασμό της MIC σε σχέση με τα διαλύματα CIP, ενώ έχουμε ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους για συγκεκριμένο ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4037), όπου η MIC από 64 μg/ml μειώνεται στα 16 μg/ml.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpsp+GalOHNH2

(1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)				
	ΒΔΚΤΗΡΙΔΚΟ	κολικός		Πείραμα 1	Πείραμα 2		
A/A	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Сір	Cip : bpsb+GaIOHNH ₂ 1 : 1	Сір	Cip : bpsb+GalOHNH ₂ 1 : 1	
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	64	32	64	
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	-	-	4	8	
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	-	-	32	32	
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	-	-	32	32	
5	Cintrobacter frendii	6033	0,125	1	-	-	
6	Enterobacter cloacae	Σ8	4	4	4	4	
7	Enterococcus faecalis	Σ5	128	64	128	64	
8	Enterococcus faecium	Σ2	128	128	-	-	
9	Escherichia faecalis	CIP3633	-	-	64	64	
10	Escherichia coli	Σ12	64	64	64	64	
11	Escherichia coli	CIP4015	4	8	4	8	
12	Escherichia coli	6050M	0,5	32	-	-	
13	Escherichia coli	6050µ	0,5	1	-	-	
14	Escherichia coli	4625	0,5	0,25			
15	Escherichia coli	4037	64	0,25	-	-	
16	Escherichia coli	6021	0,125	0,125	-	-	
17	Escherichia coli	6019p	0,125	0,125	-	-	
18	Escherichia coli	4240	0,25	0,25	-	-	
19	Escherichia coli	6034	0,125	0,125	-	-	
20	Escherichia coli	4239	0,25	0,25	-	-	
21	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	64	64	64	
22	Klebsiella pneumoniae	BL3703	-	-	16	16	
23	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	-	-	64	32	
24	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5	0,5	0,5	
25	Proteus mirabilis	Σ11	128	128	128	128	

26	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	64	64	64	64
27	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	-	-	32	32
28	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	-	-	16	16
29	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	-	-	16	16
30	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	32	32
31	Staphylococcus aureus	BL3923	-	-	0,125	0,125
32	Staphylococcus epidermidis	MR3376	-	-	0,5	0,25
33	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	-	-	64	128
34	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	32	32	32

Παρουσία συμπλόκου CIP:bpsp+GalOHNH₂ 1:1 (πίνακας 15) παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC σε σχέση με τα διαλύματα CIP στο 11,76%, ενώ για το ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4037), η MIC από 64 μg/ml παρουσιάζει σημαντική μείωση κατά οκτώ τάξεις μεγέθους, στα 0,25 μg/ml. Πολλά όμως είναι και τα στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη CIP.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:bpsp+ManOHNH2

(1:1) έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (µg/ml)	
A/A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ		Πείραμα 2
	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Сір	Cip : bpsb+ManOHNH₂ 1 : 1
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	64
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	4	8
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	32	32
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	32	32
5	Enterobacter cloacae	Σ8	2	4
6	Enterococcus faecalis	Σ5	128	64
7	Escherichia coli	Σ12	64	64
8	Escherichia coli	CIP4015	4	4
9	Escherichia faecalis	CIP3633	64	64
10	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	64
11	Klebsiella pneumoniae	BL3703	16	8
12	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	64	32
13	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5
14	Proteus mirabilis	Σ11	128	128
15	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	32	64
16	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	32	32
17	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	16	32
18	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	16	8
19	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32
20	Staphylococcus aureus	BL3923	0,125	0,125
21	Staphylococcus epidermidis	MR3376	0,5	0,5
22	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	64	64
23	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	32

Παρουσία CIP:bpsp+ManOHNH₂ 1:1 (πίνακας 16) υπάρχουν στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο σύμπλοκο (17,39%) και άλλα στη CIP (21,74%).

Πίνακας 17: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:βCD (1:1) μετά από λυοφιλοποίηση των δειγμάτων έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			N	M.I.C. (μg/ml)			
A / A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ		Πείραμα 2			
A/A	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Сір	Cip : β CD (λυοφιλοπ) 1 : 1			
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	64			
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	4	8			
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	32	32			
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	32	32			
5	Enterobacter cloacae	Σ8	2	4			
6	Enterococcus faecalis	Σ5	128	128			
7	Escherichia faecalis	CIP3633	64	64			
8	Escherichia coli	Σ12	64	64			
9	Escherichia coli	CIP4015	4	8			
10	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	64			
11	Klebsiella pneumoniae	BL3703	16	8			
12	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	64	32			
13	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5			
14	Proteus mirabilis	Σ11	128	128			
15	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	32	64			
16	Pseudomonas aeruginosa	BL3351	32	32			
17	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	16	16			
18	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	16	16			
19	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32			
20	Staphylococcus aureus	BL3923	0,125	0,125			
21	Staphylococcus	MR3376	0,5	0,25			

	epidermidis			
22	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	64	64
23	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	16

Από τα στελέχη που δοκιμάστηκαν το 17,39% εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στο σύμπλοκο της CIP με τη βCD 1:1, που παρασκευάστηκε με λυοφιλοποίηση (πίνακας 17), ενώ τα στελέχη που ανταποκρίνονται καλύτερα στη CIP αντιπροσωπεύουν το 21,74% του συνόλου των στελεχών.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα δραστικότητας CIP και συμπλόκου CIP:βCD (1:1) μετά από ανακίνηση/ανάδευση και λυοφιλοποίηση των δειγμάτων έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

			M.I.C. (μg/ml)			
A/A	BAKTHPIAKO	ΚΩΔΙΚΟΣ	Πείραμα 2			
	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	Сір	Cip : βCD (ανακιν/αναδ/λυοφιλ) 1 : 1		
1	Acinetobacter baumanii	Σ6	32	64		
2	Acinetobacter baumanii	CIP4020	4	8		
3	Acinetobacter baumanii	MR3824	32	32		
4	Acinetobacter baumanii	MR3854	32	64		
5	Enterobacter cloacae	Σ8	2	4		
6	Enterococcus faecalis	Σ5	128	64		
7	Escherichia faecalis	CIP3633	64	64		
8	Escherichia coli	Σ12	64	64		
9	Escherichia coli	CIP4015	4	8		
10	Klebsiella pneumoniae	Σ9	64	32		
11	Klebsiella pneumoniae	BL3703	16	16		
12	Klebsiella pneumoniae	CIP4018	64	32		
13	Listeria monocytogenes	Σ10	0,5	0,5		
14	Proteus mirabilis	Σ11	128	128		
15	Pseudomonas aeruginosa	Σ7	32	64		
16	Pseudomonas	BL3351	32	32		

	aeruginosa				
17	Pseudomonas aeruginosa	BL3535	16	32	
18	Pseudomonas aeruginosa	MR3745	16	16	
19	Staphylococcus aureus	Σ3	32	32	
20	Staphylococcus aureus	BL3923	0,125	0,125	
21	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis MR3376		0,25	
22	Staphylococcus epidermidis	36295(4)	64	128	
23	Staphylococcus haemolyticus	Σ1	32	16	

Παρουσία συμπλόκου CIP:βCD 1:1, που παρασκευάστηκε με ανακίνηση, ανάδευση και λυοφιλοποίηση (πίνακας 18), τα στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο σύμπλοκο αντιπροσωπεύουν ποσοστό 21,74% και στη CIP 34,78%.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα δραστικότητας Οξολινικού οξέος (ΟΧΑ) και συμπλόκων αυτού μετά από ανακίνηση/ανάδευση και λυοφιλοποίηση των δειγμάτων έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (μg/ml)					
			ΟΧΑ	ΟΧΑ:βCD 1:1	OXA:HPβCD 1:1	OXA:MeβCD 1:1	OXA:gpsp 1:1	
1	Acinetobacter baumanii	6	16	32	16	8	64	
2	Acinetobacter baumanii	4020	16	16	16	16	16	
3	Staphylococcus epidermidis	45898	64	64	64	128	64	
4	Escherichia coli	44566	128	128	128	128	128	
5	Enterobacter cloacae	44666	128	128	128	128	128	
6	Enterococcus faecium	45395	128	128	128	128	128	
7	Staphylococcus aureus	43565	32	64	64	32	64	
8	Escherichia coli	4015	128	128	64	128	128	
9	Klebsiella pneumoniae	4018	128	128	128	128	128	
10	Staphylococcus haemolyticus	44856	64	64	64	64	64	

Πίνακας 20: Αποτελέσματα δραστικότητας ΟΧΑ και συμπλόκων του με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες μετά από ανακίνηση/ανάδευση και λυοφιλοποίηση των δειγμάτων έναντι διαφόρων ανθεκτικών στελεχών.

	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	M.I.C. (μg/ml)					
A/A			OXA:bpsp 1:1	OXA:bpen 1:1	OXA:MalβCD 1:1	OXA:bpsp+ GalOHNH ₂ 1:1	OXA:bpsp+ ManOHNH ₂ 1:1	
1	Acinetobacter baumanii	6	16	32	8	16	16	
2	Acinetobacter baumanii	4020	16	16	16	32	16	
3	Staphylococcus epidermidis	45898	128	64	64	128	64	
4	Escherichia coli	44566	128	128	128	128	128	
5	Enterobacter cloacae	44666	128	128	128	128	128	
6	Enterococcus faecium	45395	128	128	128	128	128	
7	Staphylococcus aureus	43565	32	64	32	64	64	
8	Escherichia coli	4015	64	128	64	128	128	
9	Klebsiella pneumoniae	4018	128	128	128	128	128	
10	Staphylococcus haemolyticus	44856	64	16	64	128	64	

Αποτελέσματα

Για το ΟΧΑ, τα σύμπλοκα αυτού με διάφορες κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν στην πλειοψηφία τους την ίδια ευαισθησία για τα στελέχη που δοκιμάστηκαν. Η ΗΡβCD, η MeβCD και η bpen, οδηγούν την MIC σε υποδιπλασιασμό για συγκεκριμένα στελέχη σε ποσοστό 10% η κάθε μία, ενώ η MalβCD κατά 20%, σε σχέση πάντα με το ελεύθερο ΟΧΑ (πίνακες 19-20).

Παρατηρήσεις – Συμπεράσματα από τους μικροβιολογικούς ελέγχους

Αρχικά έγιναν δοκιμές της CIP και των συμπλόκων της με βCD, HPβCD, MeβCD, bpsp, gpsp, bpen και MalβCD σε πέντε διαφορετικά ανθεκτικά στελέχη *Escherichia coli* (πίνακες 1-7). Παρατηρούνται θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της δραστικής συγκέντρωσης MIC): σε ποσοστό 40% των στελεχών που μελετήθηκαν παρουσία συμπλόκου CIP:MeβCD (πίνακας 3) και 20% όταν η CIP βρίσκεται υπό τη μορφή συμπλόκου με τη bpsp (πίνακας 5) ή τη MalβCD (πίνακας 7). Τα ίδια στελέχη εμφανίζουν κάθε φορά μεγαλύτερη ευαισθησία στα σύμπλοκα της CIP με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες.

Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές σε τριάντα τέσσερα επιπλέον στελέχη Escherichia coli, Acinetobacter baumanii, Cintrobacter frendii, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia faecalis, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis και Staphylococcus haemolyticus.

Από τα στελέχη που δοκιμάστηκαν, το 17,39-21,74% (ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής του συμπλόκου), εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στο 1:1 σύμπλοκο με τη βCD (πίνακες 8, 17,18). Τα στελέχη που ανταποκρίνονται καλύτερα στην ελεύθερη CIP αντιπροσωπεύουν το 12,50-34,78% του συνόλου των στελεχών.

Στη περίπτωση της HPβCD, το 1:1 σύμπλοκο (πίνακας 9) δίνει θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της MIC) σε ποσοστό 14,71%, ενώ για συγκεκριμένα ανθεκτικά στελέχη πραγματοποιείται ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους σε ποσοστό 5,89%.

Ομοίως, το 1:1 σύμπλοκο με τη ΜeβCD (πίνακας 10) δίνει θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της MIC) σε ποσοστό 14,71%, αλλά υπάρχει ακόμα μεγαλύτερη ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους σε ποσοστό 2,94% για συγκεκριμένα ανθεκτικά στελέχη.

Το 1:1 σύμπλοκο με την gpsp (πίνακας 11) δίνει θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της MIC) σε ποσοστό 8,82%, ενώ με την bpsp (πίνακας 12) 11,76% και με την bpen (πίνακας 13) 23,53%. Η ελάττωση της MIC κατά δύο τάξεις μεγέθους εμφανίζεται σε ποσοστό 5,88% στο σύμπλοκο με την gpsp και 2,94% με τη bpsp ή τη bpen.

Το 1:1 σύμπλοκο με τη MalβCD (πίνακας 14) εμφανίζει υποδιπλασιασμό της MIC στο 26,47% των στελεχών που δοκιμάστηκαν και κατά δύο τάξεις μεγέθους στο 2,94%.

Παρουσία συμπλόκου CIP:bpsp+GalOHNH₂ 1:1 (πίνακας 15) παρατηρείται υποδιπλασιασμός της MIC σε σχέση με τα διαλύματα CIP στο 11,76%, ενώ για το ανθεκτικό στέλεχος *Escherichia coli* (4037), η MIC από 64 μg/ml παρουσιάζει σημαντική μείωση κατά οκτώ τάξεις μεγέθους, στα 0,25 μg/ml.

Τα ίδια κάθε φορά στελέχη εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα σύμπλοκα της CIP με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες. Πολλά όμως είναι και τα στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ελεύθερη CIP.

Παρουσία CIP:bpsp+ManOHNH₂ 1:1 (πίνακας 16) υπάρχουν στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο σύμπλοκο (17,39%) και άλλα στη CIP (21,74%).

Για το ΟΧΑ, τα σύμπλοκα με διάφορες κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν στην πλειοψηφία τους την ίδια ευαισθησία για τα στελέχη που δοκιμάστηκαν.

Η ΗΡβCD, η ΜεβCD και η bpen, οδηγούν την ΜΙC σε υποδιπλασιασμό για συγκεκριμένα στελέχη σε ποσοστό 10% η κάθε μία, ενώ η MalβCD κατά 20%, σε σχέση πάντα με το ελεύθερο ΟΧΑ (πίνακες 19-20).

Έλεγχος ποιότητας και σταθερότητας βελτιωμένων σκευασμάτων, με σύμπλοκα αντιμικροβιακών παραγόντων και συνθετικά τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών Μελέτες δομής και ιδιοτήτων των συμπλόκων

Η προσκόλληση των παθογόνων οργανισμών στους ιστούς υποδοχής του ξενιστή είναι προαπαιτούμενο, για την έναρξη μιας μολυσματικής ασθένειας. Σε πολλά συστήματα η πρόσδεση διευκολύνεται από τις λεκτίνες, που βρίσκονται στην επιφάνεια των βακτηρίων μέσω ενός μηχανισμού μοριακής αναγνώρισης με τα σάκχαρα της επιφάνειας των κυττάρων των ιστών υποδοχής. Η παρουσία σακχάρων που αναγνωρίζονται από τις μικροβιακές λεκτίνες, μπορεί να περιορίσει την επαφή των παθογόνων στελεχών με τους ιστούς του ξενιστή και να εμποδίσει την προσκόλληση των βακτηρίων σε αυτούς.

Στο παρόν έργο χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες (CDς), οι οποίες φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα σάκχαρα (υδατανθρακικά συμπλέγματα, glycoclusters) και στις οποίες με μοριακό εγκλεισμό εγκλωβίστηκαν αντιμικροβιακοί παράγοντες. Οι ουσίες αυτές είναι επτα- και οκτα- υποκατεστημένα παράγωγα της β- και γκυκλοδεξτρίνης, συνδεδεμένα μέσω μικρών γεφυρών με τα σάκχαρα D-(+)-μαννόζη (Man), D-(+)-γαλακτόζη (Gal), D-(+)-γλυκόζη (Glu), L-(-)-φουκόζη (Fuc), N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (NAcGlu) και N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη (NAcGal). Το σκεπτικό της παρούσας εργασίας αφορά σε μια αντιμικροβιακή στρατηγική, η οποία θα στηρίζεται στην γονιδιακή "απαίτηση" της στερεοειδικότητας των βακτηριακών προσκολλητινών των λοιμογόνων στελεχών, τα οποία με τις λεκτίνες που διαθέτουν θα αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα σάκχαρα, ώστε να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της αναγνώρισης και, κυρίως, στόχευση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο παθογόνο βακτήριο. Οι νέες κυκλοδεξτρίνες παρασκευάστηκαν από τις συναδέλφους του συνεργαζόμενου φορέα (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος): Γιαννακοπούλου Κωνσταντίνα, Μαυρίδου Ειρήνη (Ερευνήτριες Α) και Δρ. Λαμπροπούλου Μαρία.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές CDς: α) φυσικές CDς, β) διαθέσιμα στο εμπόριο συνθετικά παράγωγα των φυσικών CDς και γ) συνθετικά τροποποιημένες CDς, οι οποίες φέρουν τα επιλεγμένα σάκχαρα, που θα αναγνωρίζουν και θα προσεγγίζουν επιλεκτικά τα παθογόνα βακτήρια. Στη κοιλότητά των παραπάνω CDς βρίσκονται εγκλωβισμένοι και προστατευμένοι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, οι οποίοι θα μεταφέρονται και θα απελευθερώνονται στο σημείο στόχο, όπου και θα εκδηλώνουν τη δράση τους. Η κατηγορία των αντιμικροβιακών που μελετήθηκε είναι οι κινολόνες: οξολινικό οξύ (OXA) και κυπροφλοξακίνη (CIP), εκπρόσωποι πρώτης και δεύτερης γενιάς αντίστοιχα.

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρασκευή των συμπλόκων των επιλεγμένων αντιμικροβιακών με διάφορες CDς. Στη συνέχεια ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των παραπάνω συμπλόκων. Για τον έλεγχο σταθερότητας, αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού του ΟΧΑ και της CIP, παρουσία των προϊόντων φωτοαποικοδόμησής τους, εκδόχων ή και προσμίξεων. Ελέγχεται εάν ο εγκλεισμός των δραστικών ενώσεων στις CDς επηρεάζει τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων που εγκλείονται. Παρασκευάστηκαν στείρα υδατικά διαλύματα των επιλεγμένων κινολονών και των συμπλόκων τους με τις διάφορες CDς που μελετήθηκαν και πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός έλεγχος σε αυτά (εύρεση MIC). Αφού αποδείχτηκε μεταβολή δραστικότητας στα διαλύματα που περιείχαν σύμπλοκα με τις διάφορες CDς, αναπτύχθηκαν ειδικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό και των CDς, όπως ορίζουν οι Διεθνείς Κανονιστικές Διατάξεις.

Αρχικά παρασκευάστηκε το σύμπλοκο ΟΧΑ με την υδροξυπροπυλο-β-CD (HPβCD). Ο απαιτούμενος χρόνος σχηματισμού και η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου προσδιορίστηκαν με Φασματοσκοπία Υπεριώδους (UV). Ο εγκλεισμός επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) δύο διαστάσεων ROESY. Η στοιχειομετρία του συμπλόκου βρέθηκε 1:1, ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών (κατά Job), και σχεδιάστηκε η πιθανή δομή του δημιουργούμενου συμπλόκου.

Ακολούθησε η παρασκευή των συμπλόκων της CIP με τη βCD και της CIP με τη μαλτοζυλο-β-CD (MalβCD). Επιλέχτηκε η MalβCD ως μια CD που φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένα σάκχαρα και είναι διαθέσιμη στο εμπόριο, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα, καθώς τα παρασκευαζόμενα συνθετικά παράγωγα των CD λαμβάνονταν μετά από χρονοβόρο διαδικασία και σε πολύ μικρές ποσότητες.

Ο σχηματισμός των ανωτέρω συμπλόκων επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία ¹Η NMR δύο διαστάσεων ROESY και με Φασματοσκοπία Μάζας (MS). Σε διάλυμα CIP:βCD 1:1 λαμβάνεται θραύσμα: m/z 1467,5, το οποίο αντιστοιχεί στο σύμπλοκο. Η στοιχειομετρία του συμπλόκου CIP:MalβCD βρέθηκε 1:1 με φασματοσκοπία NMR, ακολουθώντας τη μέθοδο των συνεχών μεταβολών. Η προσθήκη DMSO-*d*₆ στα διαλύματα των πειραμάτων εξάλειψε τη μεταβολή της χημικής μετατόπισης που οφείλεται στα μοριακά διμερή του φαρμάκου. Ελήφθησαν τα φάσματα ¹Η-NMR της CIP, της οκτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(2-ακεταμιδο-2δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpsp+NAcGluOHNH₂) και διαλύματος του 1:1 συμπλόκου τους σε D₂O. Αντίστοιχη μελέτη έγινε με την επτακις{6-δεοξυ-6-θειο-[6-(α,β-D-γαλακτοπυρανοζο-1΄-υλο)-4-αζα-3-οξοεξανο-1-υλο]-6-θειο}-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp+GalOHNH₂). Οι μετατοπίσεις των κορυφών που παρατηρήθηκαν στα φάσματα αποδόθηκαν στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση και στη δημιουργία συμπλόκου. Παρασκευάστηκαν τα σύμπλοκα της CIP με όλες τις συνθετικές CDς επτακις-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6-δεοξυ]-β-κυκλοδεξτρίνη (bpsp), οκτακις-[6-(καρβοξυαιθυλοθειο)-6δεοξυ]-γ-κυκλοδεξτρίνη (gpsp), bpsp+ManOHNH₂, gpsp+ManOHNH₂, bpsp+GalOHNH₂, gpsp+NAcGluOHNH₂, bpsp+NAcGalOHNH₂, bpsp+NAcGluOHNH₂, bpsp+FucOHNH₂ και μελετήθηκε η φωτοσταθερότητα του δραστικού συστατικού που βρίσκεται εγκλωβισμένο στη κοιλότητα των ανωτέρω CDς.

Πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων HPLC, ειδικών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη αντιμικροβιακών παραγόντων και τον έλεγχο φωτοσταθερότητάς τους. Με τη βοήθεια των συγκεκριμένων ειδικών μεθόδων διαχωρίζεται το εκάστοτε δραστικό συστατικό από τα προϊόντα διάσπασης και τα προϊόντα διάσπασης μεταξύ τους, παρουσία των CD ως εκδόχων.

Οι μέθοδοι αξιολογήθηκαν και επικυρώθηκαν σύμφωνα με όσα ορίζουν οι Διεθνείς Κανονιστικές Διατάξεις (International Conference on Harmonization, ICH), για τον έλεγχο ποιότητας και σταθερότητας. Η διαδικασία αξιολόγησης της αναλυτικής μεθόδου εφαρμόστηκε και στα διαλύματα που περιείχαν τις χρησιμοποιούμενες CDς και τα σύμπλοκα των δραστικών συστατικών με αυτές, διαδικασία απαραίτητη, προκειμένου μία αναλυτική μέθοδος να θεωρηθεί κατάλληλη παρουσία CD ως έκδοχο και ως σύμπλοκο.

Μετά τον έλεγχο περιεκτικότητας των δραστικών συστατικών στα δείγματα των συμπλόκων και μετά τη διαπίστωση αποκλίσεων (ελάττωση), οι οποίες οφείλονταν σε φωτοεπαγόμενες αντιδράσεις αποικοδόμησης έγινε εκτενής μελέτη φωτοσταθερότητας των δραστικών συστατικών σε ελεύθερη μορφή και στα αντίστοιχα σύμπλοκα με τις διαφορετικές CDς. Κατά τη μελέτη φωτοσταθερότητας χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία τόξου αερίου Ξένου, σύμφωνα με τις οδηγίες ICH. Μελετήθηκαν οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το ρυθμό φωτοαποικοδόμησης, όπως η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης και της συμπλοκοποίησης στην φωτοσταθερότητα του ΟΧΑ. Βρέθηκε ότι η φωτοαποικοδόμηση του ΟΧΑ είναι ταχύτερη στις υψηλές συγκεντρώσεις και ακολουθεί μηδενοταξική κινητική στο αρχικό τμήμα. Αποδείχτηκε ότι ο εγκλεισμός στην CD δεν επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα του ΟΧΑ βελτιώνεται επίσης σημαντικά, όπως αυτό αποδείχτηκε από τη μέθοδο διαλυτότητας φάσεων.

Οι παράγοντες, οι οποίοι είναι πιθανό να μεταβάλλουν τη ταχύτητα φωτοαποικοδόμησης της CIP και μελετήθηκε η επίδρασή τους είναι: η αρχική συγκέντρωση και το pH των δειγμάτων, η δημιουργία συμπλόκων με CDς. Βρέθηκε ότι η φωτοαποικοδόμηση της CIP ακολουθεί πρωτοταξική κινητική και βελτιώνεται η σταθερότητα της σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και μικρότερες τιμές pH. Ο σχηματισμός συμπλόκων με CDς και ειδικότερα με τις CDς που φέρουν σάκχαρα, δεν επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα, αντίθετα οδηγεί σε σταθεροποίηση του φαρμάκου.

Όπως φαίνεται από εργασίες που εκπονήθηκαν παράλληλα στο συνεργαζόμενο φορέα αποδεικνύεται αλληλεπίδραση των νέων CDς με ζώντα βακτήρια και προσκόλληση σε αυτά, αλλά και από τα μικροβιολογικά πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι η σύμπλεξη με τις νέες CDς συνεπάγεται σε αρκετές περιπτώσεις μεταβολή δραστικότητας. Επομένως, σύμφωνα με τις διατάξεις ICH θα πρέπει να υπάρχει μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού εκτός του δραστικού συστατικού και των CDς.

Αρχικά αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε κατάλληλη μέθοδος για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό CIP και MalβCD, με φασματοσκοπία NMR. Η μέθοδος βασίστηκε στην ολοκλήρωση των κορυφών επιλεγμένων πρωτονίων σε συνάρτηση με την απόκριση ενός εσωτερικού προτύπου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με εξατμιστικό ανιχνευτή σκέδασης φωτός (Evaporative Light Scattering Detector) για την ταυτόχρονη αναλυτική διαδικασία CIP και MalβCD, η οποία επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό της ποσότητας του ελεύθερου φαρμάκου και του συνόλου της κυκλοδεξτρίνης.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε και χρησιμοποιήθηκε ακολούθως στον υπολογισμό της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου με ανάλυση κατά Scatchard.

Συγκριτικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρωματογραφική μέθοδος με ανιχνευτή ELS πλεονεκτεί έναντι της φασματοσκοπικής με NMR (σε όργανα ισχύος 400 και 600 MHz που χρησιμοποιήθηκαν) σε ότι αφορά στην γραμμικότητα και την επαναληψιμότητα της μεθόδου και δίνει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν στο Νομαρχιακό Νοσοκομείο Πατησίων. Παρασκευάστηκαν στείρα υδατικά διαλύματα 1:1 ή 1:3 των δραστικών ενώσεων και των συμπλόκων τους με τις διαφορετικές CDς. Μελετήθηκαν με σκοπό τον συγκριτικό έλεγχο της μικροβιολογικής δραστικότητας αυτών και τον προσδιορισμό της χαμηλότερης συγκέντρωσης αναστολής (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) σε κάθε διάλυμα, έναντι ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών κυρίως του κολοβακτηριδίου (*E.Coli*), αλλά και άλλων παθογόνων μικροβίων.

Η απώλεια δραστικού συστατικού που διαπιστώθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα κατά τον έλεγχο περιεκτικότητας, αποδόθηκε σε φωτοαποικοδομήσεις και σε κατακράτηση στους ηθμούς. Δεν καταγράφονται απώλειες δραστικού συστατικού (HPLC-UV) και των κυκλοδεξτρινών (HPLC-ELSD) στα δείγματα, εφόσον: όλες οι διαδικασίες ολοκληρώνονται

σε προφυλαγμένους από το φως χώρους, το υδατικό περιβάλλον διατηρείται ουδέτερο, οι ηθμοί είναι από κατάλληλα υλικά που δεν προσροφούν τις υπό μελέτη ενώσεις και εφόσον τα δείγματα φυλάσσονται στους -30 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Ακολούθησε μικροβιολογικός έλεγχος και η εύρεση των αντίστοιχων τιμών MIC σε διαφορετικά στελέχη των μικροβίων, τα οποία απομονώθηκαν από το ουροποιητικό σύστημα ασθενών.

Αρχικά έγιναν δοκιμές της CIP και των συμπλόκων της με βCD, HPβCD, μεθυλο-β-CD (MeβCD), bpsp, gpsp, bpen και MalβCD σε πέντε διαφορετικά ανθεκτικά στελέχη *Escherichia coli*. Παρατηρούνται θετικά αποτελέσματα (υποδιπλασιασμός της δραστικής συγκέντρωσης MIC): σε ποσοστό 40% των στελεχών που μελετήθηκαν παρουσία συμπλόκου CIP:MeβCD και 20% όταν η CIP βρίσκεται υπό τη μορφή συμπλόκου με τη bpsp ή τη MalβCD. Τα ίδια στελέχη εμφανίζουν κάθε φορά μεγαλύτερη ευαισθησία στα σύμπλοκα της CIP με διαφορετικές συνθετικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, που φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα σάκχαρα.

Τέλος έγιναν δοκιμές σε τριάντα τέσσερα επιπλέον στελέχη. Τα αποτελέσματα ήταν και πάλι ενθαρρυντικά.

Quality control and stability studies of improved formulations, containing antimicrobial agents and synthetically modified cyclodextrins complexes; structure and properties of complexes

Adhesion of pathogenic organisms to host tissues is the prerequisite for the initation of an infectious disease. In many systems, it is facilitated by lectins present on the surface of the infectious organism that bind to complementary carbohydrates (sugars) on the surface of the host tissues. Sugars recognized by the bacterial lectins can block the adhesion of the bacteria on host tissues. Sugars can be used as anti-adhesive agents, which reduce the contact between host tissues and pathogens.

In this project, synthetically modified cyclodextrins (CDs), coupled with sugars (glycoclusters) were used. The antibacterial agents are encapsulated in the cavity of the glycoclusters. These substances are hepta- and octa- substituted derivatives of β - and γ -cyclodextrin connected via short linkers with the sugars D-(+)-mannose (Man), D-(+)-galactose (Gal), D-(+)-glucose (Glu), L-(-)-fucose (Fuc), N-acetyl-D-glucosamine (NacGlu), N-acetyl-D-galactosamine (NacGal). Blocking of the bacterial lectins, through interactions with these specific sugars and simultaneous release of the encapsulated antibacterial agents to the pathogenic strains is the aim of anti-adhesion therapy of such diseases. CD derivatives with sugars were synthetised by our colleagues at the collaborating institution (NCSR Demokritos): Yannakopoulou Konstantina, Mauridou Irene (Researchers A') and Dr. Lampropoulou Maria.

In the present work, diverse CDs were used: a) natural CDs, b) derivatives of natural CDs, commercially available and c) modified CDs, substituted with selected sugar ligands. CDs are known drug carriers. The antibacterial agents encapsulated and protected in the cavity of the CDs, can be recognized by the bacterial strains and delivered at the target, to exhibit their action. The antibacterials studied belong to the class of quinolones: Oxolinic acid (OXA) and Ciprofloxacin (CIP) both members of first and second generation quinolone antibacterials, respectively.

During this study, the preparation and characterization of the complexes of the selected antibacterials with various CDs was carried out. For the stability testing, methods for the quantitative determination of OXA and CIP in the presence of their photodegradation products, excipients or impurities were developed. Then, it was studied whether the encapsulation of the active compounds in the CD cavity affects the stability of the enclosed drugs. Additionally, sterile aqueous solutions of the selected quinolones and their

complexes with various CDs, were prepared and microbiological tests on them carried out (determination of MIC values). According to changes of the activity demonstrated in solutions containing complexes with different CDs, methods for the quantitation of CDs were also developed.

Initially, the complex of OXA with hydroxypropyl-β-CD (HPβCD) was prepared. The time period required to accomplish complexation and the association constant of the complex were determined using Ultraviolet Spectroscopy (UV). Complex formation was evidenced by two dimensional ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (ROESY). The complex revealed 1:1 stoichiometry, according to continuous variation plot (Job's method) and the possible structure was depicted.

Complexes of CIP with β CD or CIP with Maltosyl β CD (Mal β CD) were also prepared. Most of the preliminary experiments were carried out with Mal β CD, which is a commercially available CD bearing sugar molecules, as the synthetically prepared derivatives were obtained by a time consuming procedure and in very small quantities.

The formation of the above mentioned CIP complexes confirmed by two dimensional (ROESY) ¹H NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry (MS). At MS spectra of 1:1 solution, the molecular ion m/z: 1467.5 which corresponds to the relative molecular mass of CD: β CIP complex was observed. The stoichiometry of CIP:Mal β CD complex determined was 1:1, according to the Job's continuous variation method, by NMR spectroscopy. The addition of DMSO-*d*₆ eliminated the chemical shift displacement due to molecular dimers. ¹H NMR spectra of CIP, gpsp+NAcGluOHNH₂ and their 1:1 complex were recorded in D₂O and comparatively studied. A similar experiment was performed with CIP and bpsp+GalOHNH₂. The chemical shift's displacements observed on spectra were attributed to their intermolecular interaction and the complex formation.

Complexes of CIP with all new synthetic derivatives of CDs: heptakis-[6-(carboxyethysulfur)-6-deoxy]- β -cyclodextrin (bpsp), octacis-[6-(carboxyethysulfur)-6-deoxy]- γ -cyclodextrin (gpsp), bpsp+ManOHNH₂, gpsp+ManOHNH₂, bpsp+GalOHNH₂, gpsp+NAcGluOHNH₂, bpsp+GalOHNH₂, gpsp+NAcGluOHNH₂, bpsp+FucOHNH₂ were also prepared and in all cases the photostability of encapsulated CIP molecules was studied.

New photostability indicating chromatographic HPLC methods, suitable for the quantification of the studied antibacterials were developed and optimised. The new methods were enable to separate the degradation products from active compound and from each other, in the presence of CDs as excipients.

The methods were evaluated and validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, for quality control and stability studies. The method validation experiments were repeatedly applied in samples containing CDs and inclusion complexes with these CDs, in order to assure that the presence of CDs as excipients and as complexes do not generate analytical inaccuracies.

An extensive study on photostability profiles of CIP and OXA in free form and as CDs complexes was necessary, as the drug's concentration was decreased in the samples of the active compounds due to photoinduced degradation of the molecules. The photodegradationn experiments were performed with Xenon lamp, according to ICH guidelines. Factors, which affect the photodegradation rate of OXA, such as the initial concentration and cyclodextrin effect on photostability of OXA were also studied. Investigation of OXA photodegradation profiles under Xenon lamp irradiation at high concentrations confirmed zero order kinetics at first part and faster degradation. It was demonstrated that complex formation does not accelerate drug's degradation, on the contrary, remarkable stabilization of OXA was observed upon complexation. Solubility of OXA was also enhanced by complexation, as proved by phase solubility method.

Factors that are possibly affecting photodegradation of CIP were studied: the initial concentration, the pH values of the media, the complexation with CDs. Studies of CIP photodegradation profiles confirmed first order kinetics and improved stability at higher concentrations, at lower pH values of the media and upon complexation with CDs, especially with the new derivatives of CDs, bearing sugar molecules.

As shown by the work carried out at the collaborating institute, interaction of new CDs with live bacteria and adhesion is demonstrated, such as from the microbiological tests in the present work, complexation with the new CDs concludes in several cases in modification of the activity. Therefore, in accordance to ICH guidelines, a method suitable for the analysis and quantification of CDs in addition to the active ingredients should be developed.

Firstly, for the simultaneous quantification of CIP and MalβCD an appropriate NMR spectroscopy method was developed and evaluated. The method was based on the integral intensities of selected NMR signals comparing them to the response of an internal standard. Secondly, an HPLC method with Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) for the simultaneous quantification of CIP and MalβCD was developed and optimized.

The method was validated and then utilized for the calculation of the formation constant of the complex, by Scatchard analysis.

Using HPLC-ELSD method better results were obtained compared to the NMR spectroscopy (Bruker 400 and 600 MHz) concerning the linearity and accuracy of the method and leads to lower limits of detection and quantitation.

The microbiological tests were performed at the "General Hospital of Patision". Sterile aqueous solutions 1:1 or 1:3 of the active compounds and their complexes with different CDs were prepared and their antimicrobial activity was comparatively studied. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for each solution, against resistant and sensitive strains of *E. Coli* and other pathogens, was determined. The decrease of concentration of active compounds in the samples, observed in preliminary experiments, was attributed to photodegradation and adsorption on the filters used.

The problem of loss of active ingredient (HPLC-UV) and CDs (HPLC-ELSD) in the samples is overcome when: all procedures are completed in places protected from light, the aqueous environment remains neutral, filters consist of suitable materials, that do not adsorb the molecules studied and when samples are stored at -30 °C until used.

Microbiological tests were performed and the corresponding MIC values determined for different strains of bacteria, which were isolated from the urinary tract of patients, were evaluated.

Initial study was conducted with CIP in free form and in complexes with β CD, HP β CD, Me β CD, bpsp, gpsp, bpen and Mal β CD in five different resistant strains of *E.coli*. Positive results were observed (halve of active concentration MIC): in 40 % of the studied strains with CIP:Me β CD complex and 20 % with CIP:bpsp or CIP:Mal β CD complexes. The same strains show higher sensitivity to CIP complexes with the synthetically modified CDs, bearing sugar molecules.

Finally, microbiological assays were conducted on thirty-four additional strains. The results were once again encouraging.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N. Sharon, Biochim. Biophys. Acta, 1760 (2006) 527-537.

2. N. Sharon, H. Lis, Encyclop. Biolog. Chem., 2 (2004) 535-540.

3. Y. Reisner, H. Lis, N. Sharon, Experiment. Cell Res. 97 (1976) 445-448.

4. C. Bies, C.-M. Lehr, J. F. Woodley, Adv. Drug Deliv. Reviews, 56 (2004) 425-435.

5. N. Sharon, H. Lis, Trends Biochem. Sciences, 12 (1987) 488-491.

6. H. Ghazarian, B. Idoni, S. B. Oppenheimer, Acta Histochem., 113 (2011) 236-247.

7. N. Sharon, FEBS Letters, 217 (1987) 145-157.

8. A.S. Khan, B. Kniep, T. A. Oelschlaeger, I. Van Dee, T. Khoronen, J. Hacker, Infect. Immun., 68 (2000) 3541-3547.

9. N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, Carbohydr. Research, 120 (1983) 235-249.

10. M. J. Duncan, E. L. Mann, M. S. Cohen, I. Ofek, N. Sharon, S. N. Abraham, J. Biolog. Chem., 280 (2005) 37707-37716.

11. Y. Eshdat, N. Sharon, Meth. Enzymol., 83 (1982) 386-391.

12. N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, Biochem. Biophys. Res. Commun., 105 (1982) 1426-1432.

13. I. Ofek, E. H. Beachey, N. Sharon, Trends Biochem. Sciences, 3 (1978) 159-160.

14. A. Gbarah, A. M. Mhashilkar, G, Boner, N. Sharon, Biochem. Biophys. Res. Commun., 165 (1989) 1243-1249.

15. N. Sharon, H. Lis, New Comprehens. Biochem., 29 (1997) 475-506.

16. Y. Eshdat, I. Ofek, Y. Yashouv-Gan, N. Sharon, D. Mirelman, Biochem. Biophys. Res. Commun, 78 (1978) 1551-1559.

17. N. Sharon, I. Ofek, Methods Enzymol., 253 (1995) 91-98.

18.P. M. Kaladas, E. A. Kabat, J. L. Iglesias, H. Lis, N. Sharon, Arch. Biochem. Biophys., 217 (1982) 624-637.

19. N. Sharon, I. Ofek, J Gluconj., 17 (2000) 659-664.

20. Lectins, N. Sharon, H. Lis, Editors N. Sharon, H. Lis, Ed. 2nd, Springer, Netherlans, 2007, p.p. 175-240.

21. K. Thankavel, B. Madison, T. Ikeda, A. H. Shah, P. M. Arumugam, S. M. Abraham, J. Clinical Investig., 100 (1997) 1123-1136.

22. G. M. Ruiz-Palacios, L. E. Cervantes, P. Ramos, B. Chavez-Munguia, D. S. Newburg, J. Biolog. Chem., 278 (2003) 14112-14120.
23. M. Kyogashima, V. Ginsburg, H. C. Krivan, Arch. Biochem. Biophys., 270 (1989) 391-397.

24. D. Zopf, S. Roth, Lancet, 347 (1996) 1017-1021.

25. K. A. Karlsson, Molec. Microbiol., 29 (1998) 1-11.

26. I. Ofek, D. L. Hastly, N. Sharon, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 38 (2003) 181-191.

27. N. Sharon, Immunol. Today, 5 (1984) 143-147.

28. R. Goldman, N. Sharon, R. Lotan, Exper. Cell Res., 99 (1976) 408-422.

29. H. Lis, N. Sharon, Curr. Opin. Stuct. Biol., 1 (1991) 741-749.

30. E. L. Heinrich, L.A. Y. Welty, L.R. Banner, S. B. Oppenheimer, 107 (2005) 335-344.

31. T. Umiel, M. Linker-Israeli, M. Itzchaki, N. Trainin, Y. Reisner, N. Sharon, Cell. Immunol., 37 (1978) 134-141.

32. V. R. Sinha, R. Kumria, Int. J. Pharmac., 224 (2001) 19-38.

33. J. D. Schilling, M. A. Mulvey, S. J. Hultgren, Urology, 57 (2001) 56-61.

34. A. Dalhoff, Infection, 33 (2005) 55-70.

35. Pharmaceuticals in the Environment: sources, fate, effects and risks, K. Kümmerer, Editor K. Kümmerer, Ed. 3rd, Springer-Verlag, Freiburg-Germany, 2008, p.p. 75-93.

36. M. Díaz-Alvarez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, Anal. Bioanal. Chem., 393 (2009) 899-905.

37. X-H. Li, Z-H. Zhu, X-L. Cheng, X-D. Yang, J. Pharm. Chem., 41 (2007) 82-87.

37. Infection Control in the Intensive Care Unit, A. R. De Gaudio, S. Rinaldi, A. Novelli, Editors H. K. F. Van Saene, L. Silvestri, M. A. De La Cal, Ed. 2nd, Springer, Italy, 2005, p.p. 91-154.

38. Y. Picó, V. Andreu, Anal. Bioanal. Chem., 387 (2007) 1287-1299.

39. K. A. Talukder, B. K. Khajanchi, M. A. Islam, Z. Islam, D. K. Dutta, M. Rahman, H. Watanabe, G. B. Nair, D. A. Sack, Current Microbiol., 52 (2006) 108-111.

40. D. C. Hooper, J. S. Wolfson, Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 10 (1991) 223-231.

41. N. Wagai, K. Tawara, Arch. Toxicol., 65 (1991) 495-499.

42. G. Hansch, R. P. Verma, Top Heterocycl. Chem., 10 (2007) 43-73.

43. M. Shimizu, J. Infect. Chemother., 1 (1995) 16-29.

44. S. Nakamura, J. Infect. Chemother., 3 (1997) 128-138.

45. B. Wiedemann, P. Heisig, Infection, 22 (1994) 73-79.

46. C. M. Oliphant, G. M. Green, Clinical Pharmacol., 65 (2002) 455-464.

47 Clinical Nephrotoxins, C. A. Vaamonde, G. N. Contreras, J. M. Diego, Editors M. E. De Broe, G. A. Porter, W. M. Bennett, G. A. Verpooten, Ed. 2nd, Kluwer, 2003, p.p. 236-239.

48. V. A. Potemkin, M. A. Ghrisina, A. V. Belik, O. N. Chupakhin, J. Pharm. Chem., 36 (2002) 22-25.

49. Drug Interactions in Infectious Diseases, D. R. P. Guay, Editors S. P. Piscitelli, K. A. Rodvold, M. P. Pai, Ed. 3rd, Springer, New York, 2011, p.p. 277-232.

50. G. S. Rao, S. Ramesh, A. H. Ahmad, H. C. Tripathi, L.D. Sharma, J. K. Malik, Veter. Res. Commun., 25 (2001) 197-204.

51. Nomenclature of Carbohydrates, IUPAC-IUBMB Joint Commission of Biochemical Nomeclature (JCBN), Department of Chemistry, Queen Mary University of London, UK, 1996.

52. O. Berteau, R. Stenutz, Carbohydrate Research, 339 (2004) 929-936.

53. P. J. Moynihan, J. Dentistry, 26 (1998) 209-218.

54. Encyclopedia of human nutricion, C. L. Stylianopoulos, Editors B. Caballero, L. Allen, A. Prentice, Ed. 2nd, Elsevier, 2005, p.p. 303-309.

55. Encyclopedia of Food Sciences and Nutricion, R. F. Tester, J. Karkalas, Editors B. Caballero, L.Trugo, P. M. Finglas, Ed. 2nd, Elsevier, 2003, p.p. 862-875.

56. Encyclopedia of Grain Science, R. N. Chibbar, S. Ganeshan, M. Baga, R. L. Khandelwal, Editor C. Wringley, Elsevier, 2004, p.p. 168-179.

57. S. I. Mussato, I. M. Mancilha, Carbohydrate Polymers, 68 (2007) 587-597.

58. W. H. Krug, J. Franklin Instit., 154 (1902) 349-366.

59. Encyclopedia of Food Science and Nutricion, D A T Southgate, Editors B. Caballero,

L.Trugo, P. M. Finglas, Ed. 2nd, Elsevier, 2003, p.p. 891-898.

60. S. Egavish, B. Shaanan, Trends Biochem. Sci., 22 (1997) 462-467.

61. R. T. Lee, Y. C. Lee, J Glyconj., 17 (2000) 543-551.

62. Encyclopedia of Analytical Science, A. M. Stephen, E. H. Merrifield, Editors P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Ed. 2nd, Elsevier, 2005, p.p. 392-407.

63. Encyclopedia of Separation Science, C. Corradini, Editor I. D. Wilson, Elsevier, 2000, p.p. 2224-2235.

64. E. M. Martin Del Valle, Process Biochem., 39 (2004) 1033-1046.

65. T. A. Good, S. P. Bessman, Anal. Biochem., 9 (1964) 253-262.

66. E. F. Walborg, JR. and L. Christensson, Anal. Chem., 13 (1965) 186-193.

67. G. Gübitz, R. W. Frei, H. Bethke, J. Chromatogr., 117 (1976) 337-343.

68. G. J. Manius, T. M. Y. Liu, L-F. Li Wen, Anal. Biochem., 99 (1979) 365-371.

69. S. F. Carroll, D. R. Nelson, Anal. Chem., 98 (1979) 190-197.

70. O. Pelletier, S. Cadieux, J. Chromatogr., 231 (1982) 225-235.

71. Zs. F. Katona, P. Sass, I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A, 847 (1999) 91-102.

72. Zs. Füzfai, I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A, 1149 (2007) 88-101.

73. F. R. Seymour, S. L. Unruh, D. A. Nehlich, Carbohydrate Research, 191 (1989) 175-189.

74. R. J. Kraus, F. L. Shinnick, J. A. Marlett, J. Chromatogr., 513 (1990) 71-81.

75. D. Fu, R. A. O'Neill, Anal. Biochem., 227 (1995) 377-384.

76. Y. Bao, T. M. J. Silva, R. L. Guerrant, A. A. M. Lima, J. W. Fox, J. Chromatogr. B, 685 (1996) 105-112.

77. M. A. Cox, T. H. Iqbal, B. T. Cooper, K. O. Lewis, Clin. Chim. Acta, 263 (1997) 197-205.

78. G. Eggleston, Food Chem., 65 (1999) 483-491.

79. M. Schiller, H. von der Heydt, F. März, P. C. Schmidt, J. Chromatogr. A, 968 (2002) 101-111.

80. J-S. Jeong, H-J. Kwon, Y-M. Lee, H-R. Yoon, S-P. Hong, J. Chromatogr. A, 1164 (2007) 167-173.

81. H. R. Mellor, A. Adam, F. M. Platt, R. A. Dwek, T. D. Butters, Anal. Biochem., 284 (2000) 136-142.

82. I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A, 845 (1999) 181-195.

83. W. Zhen, C. Yi, Carbohydrate Research, 332 (2001) 209-213.

84. K. Koizumi, Y. Kubota, Y. Okada, T. Utamura, J. Chromatogr., 341 (1985) 31-41.

85. K. Koizumi, Y. Kubota, Y. Okada, T. Utamura, S. Hizukuri, J-I. Abe, J. Chromatogr., 437 (1988) 47-57.

86. K. Koizumi, T. Utamura, Carbohydrate Research, 153 (1986) 55-67.

87. K. Koizumi, Y. Kubota, T. Utamura, S. Horiyama, J. Chromatogr., 368 (1986) 329-337.

88. H. W. Frijlink, J. Visser, B. F. H. Drenth, J. Chromatogr., 415 (1987) 325-333.

89. J. Haginaka, Y. Nishimura, J. Wakai, H. Yasuda, K. Koizumi, T. Nomura, Anal. Biochem., 179 (1989) 336-340.

90. Y. Kubota, M. Fukuda, K. Ohtsuji, K. Koizumi, Anal. Biochem., 201 (1992) 99-102.91. M. Fukuda, Y. Kubota, A. Ikuta, K. Hasegawa, K. Koizumi, Anal. Biochem., 202 (1993) 289-291.

92. S. Cs. Szathmary, J. Chromatogr., 487 (1989) 99-105.

93. G. White, T. Katona, J. P. Zodda, M. N. Eakins, J. Chromatogr., 625 (1992) 157-161.

94. J. Haginaka, Y. Nishimura, H. Yasuda, J. Pharm. Biomed Anal., Vol. 11, No. 10 (1993) 1023-1026.

95. I. Caron, A. Salvador, C. Elfakir, B. Herbreteue, M. Dreux, J. Chromatogr. A, 746 (1996) 103-108.

96. M. Argüeros, M. A. Campanero, J. M. Irache, J. Pharm. Biomed. Anal., 39 (2005) 495-502.

97. P. Y. Grosse, F. Pinguet, J. M. Joulia, C. Astre, F. Bressolle, J. Chromatogr. B, 694 (1997) 219-226.

98. J. Szemán, A. Gerlóczy, K. Csabai, J. Szejtly, G. L. Kis, P. Su, R. Y. Chau, A. Jacober, J. Chromatogr. B, 774 (2002) 157-164.

99. D. J. Platzer, K. A. Millis, E. L. Ciolkowski, T. Ramstad, J. Chromatogr. A, 793 (1998) 57-62.

100. S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A, 897 (2000) 185-193.

101. S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A, 925 (2001) 79-87.

102. R. Jacquet, P. Favetta, C. Elfakir, M. Lafosse, J. Chromatogr. A, 1083 (2005) 106-112.

103. A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, J. Chromatogr. A, 855 (1999) 645-656.

104. F. Giordano, C. Novak, J. R. Moyano, Thermoch. Acta, 380 (2001) 123-151.

105. M. A. Bayomi, K. A. Abanumay, A. A. Al-Angary, Int. J. Pharm., 243 (2002) 107-117.

106. F. Kieken, C. West, K. Keddadouche, C. Elfakir, L. Choisnard, A. Géze, D. Wouessidjewe, J. Chromatogr. A, 1189 (2008) 385-391.

107. R. De Lisi, G. Lazzara, S. Milioto, N. Muratore, J. Phys. Chem. B, 107 (2003) 13150-13157.

108. J. Szemán, K. Csabai, K. Kékesi, L. Szente, G. Varga, J. Chromatogr. A, 1116 (2006) 76-82.

109. Encyclopedia of Seperation Science, R.P.W. Scott, Editor I. D. Wilson, Elsevier, 2000, p.p. 597-602.

110. Encyclopedia of Seperation Science, C. Mazza, Editor I. D. Wilson, Elsevier, 2000, p.p. 1-8.

111. B. H. Hsu, E. Orton, S.-Y. Tang, R. A. Carlton, J. Chrom. B, 725 (1999) 103-112.

112. N. C. Megoulas, M. A. Koupparis, Critical Reviews Anal. Chem., 35 (2005) 301-316.

113. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης: Γιωργία Κώνστα.

114. N. C. Megoulas, M. A. Koupparis, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 73-79.

115. I. Clarot, P. Chaimbault, F. Hasdenteufel, P. Netter, A. Nicolas, J. Chrom. A, 1031 (2004) 281-287.

116. I. Clarot, A. Regazzeti, N. Auzeil, F. Laadani, M. Citton, P. Netter, A. Nicolas, J. Chrom. A, 1087 (2005) 236-244.

117. V. Manyanga, O. Grishina, Z. Yun, J. Hoogmartens, E. Adams, J. Pharm. Biomed. Anal., 45 (2007) 257-262.

118. R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Anal. Bioanal. Chem., 388 (2007) 1663-1672.

119. A. K. Sarri, N. C. Megoulas, M. A. Koupparis, J. Chrom. A, 1122 (2006) 275-278.

120. Z. Spacil, J. Folbrova, N. Megoulas, P. Solich, M. Koupparis, Anal. Chim. Acta, 583 (2007) 239-245.

121. S. Chopra, G. Vanderheyden, J. Hoogmartens, A. V. Schepdael, E. Adams, J. Pharm. Biomed. Anal., 53 (2010) 151-157.

122. D.S. Risley, M.A. Strege, Anal. Chem., 72 (2000) 1736-1739.

123. A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, A. Karlsson, O. Gyllenhaal, J. Chrom. A, 929 (2001) 101-112.

124. M. Agüeros, M.A. Campanero, J.M. Irache, J. Pharm. Biom. Anal., 39 (2005) 495-502.

125. M. Agüeros, P. Areses, M.A. Campanero, H. Salman, G. Quincoces, I. Peñuelas,

J.M. Irache, Eur. J. Pharm. Sciences, 37 (2009) 231-240.

126. M. Koppitz. K. Eis, Drug Discovery Today, 11 (2006) 561-568.

127. C. K. Zacharis, P. D. Zanavaras, J. Pharm. Biomed. Anal., 48 (2008) 483-496.

128. X. Wang, O. Ramström, M. Yan, Analyst, 136 (2011) 4174-4178.

129. P. A. Keifer, Current Opinion Chem. Biol., 7 (2003) 388-394.

130. R. Watanabe, T. Suzuki, Y. Oshima, Toxicon, 56 (2010) 589-595.

131. M. Lavertu, Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann, A. Gupta, J. Pharm. Biomed. Analysis, 32 (2003) 1149-1158.

132. A. Zoppi, M. Linares, M. Longhi, J. Pharm. Biomed. Analysis, 37 (2005) 627-630.

133. U. Holzgrabe, B. W. K. Diehl, I. Wawer, J. Pharm. Biomed. Anal., 17 (1998) 557-616. 134. Y. Jiang, B. David, P. Tu, Y. Barbin, Analytica Chimica Acta, 657 (2010) 9-18.

135. S. Michaleas, E. Antoniadou-Vyza, J. Pharm. Biomed. Analysis, 42 (2006) 405-410.

136. W. He, F. Du, Y, Wu, Y. Wang, X. Liu, H. Liu, X. Zhao, J. Fluorine Chemistry, 127 (2006) 809-815.

137. T. Bayer, C. Schollmayer, U. Holzgrabe, J. Pharm. Biomed. Analysis, 52 (2010) 51-58.

138. U. Holzgrabe, Progress in Nuclear Magnetic Spectroscopy, 57 (2010) 229-240.

139. M. Lee, M. K. Storer, J. W. Blunt, M. Lever, Clinica Chimica Acta, 365 (2006) 264-269.

140. U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer, B. Waibel, J. Pharm. Biomed. Analysis, 38 (2005) 806-812.

141. L. A. C. Pieters, A. J. Vlietinck, J. Pharm. Biomed. Anal., 7 (1989) 1405-1417.

142. F. Malz, H. Jancke, J. Pharm. Biomed. Analysis, 38 (2005) 813-823.

143. S. Bekiroglu, O. Myrberg, K. Östman, M. Ek, T. Arvidsson, T. Rundlöf, B. Hakkarainen, J. Pharm. Biomed. Analysis, 47 (2008) 958-961.

144. V. Rizzo, V. Pinciroli, J. Pharm. Biomed. Analysis, 38 (2005) 851-857.

145. G. Shao, R. Kautz, S. Peng, G. Cui, R. W. Giese, J. Chromat. A, 1138 (2007) 305-308.

146. T. Rundlöf, M. Mathiasson, S. Bekiroglu, B. Hakkarainen, T. Bowden, T. Arvidsson, J. Pharm. Biomed. Analysis, 52 (2010) 645-651.

147. S-Y. Liu, C-Q. Hu, Analytica Chimica Acta, 602 (2007) 114-121.

148. S. Moura, F. G. Carvalho, C. D. Rodrigues-Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine, Phytochemistry Letters, 3 (2010) 79-83.

149. T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fuzimine, K. Nose, T. Hirai, Accred Qual Assur, 14 (2009) 79-86.

150. R. K. Harris, P. Hodgkinson, T. Larsson, A. Muruganatham, J. Prarm. Biomed. Anal., 38 (2005) 858-864.

151. H-C. Holten Lützhøft, W. H-J. Vaes, A. P. Freidig, B. Halling-Sørensen, J. L-M. Hermens, Chemosphere, 40 (2000) 711-714.

152. S. Romero, P. Bustamante, B. Escalera, P. Mura, M. Cirri, J. Pharm. Biomed. Anal., 35 (2004) 715-726.

153. H.-C. H. Lützhøft, W. H-J. Vaes, A. P. Freidig, B. Halling-Sørensen, J. L-M. Hermens, Environ. Sci. Technol., 34 (2000) 4989-4994.

154. J. Tolls, Environ. Sci. Technol., 35 (2001) 3397-3406.

155. N. Maurer, K. F. Wong, M. J. Hope, P. R. Cullis, Bioch. Biophys. Acta, 1374 (1998) 9-20.

156. D. L. Ross, C. M. Riley, Int. J. Pharmaceut., 63 (1990) 237-250.

157. S. A. Breda, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, M. E. Olivera, Int. J. Pharmaceut., 371 (2009) 106-113.

158. A. L. Giraldo, G. A. Peñuela, R. A. Torres-Palma, N. J. Pino, R. A. Palominos, H. D. Mansilla, Water Research, 44 (2010) 5158-5167.

159. R. A. Palominos, A. Mora, M.A. Mondaca, M. Pérez-Moya, H. D. Mansilla, J. Hazard. Mater., 158 (2008) 460-464.

160. H-T. Lai, J-S. Lin, Y-H. Chien, Biores. Technol., 102 (2011) 5425-5430.

161. H-T. Lai, Y-H. Chien, J-S. Lin, Aquacalture, 275 (2008) 96-101.

162. M. E. Hidalgo, C. Pessoa, E. Fernández, A. M. Cárdenas, J. Photochm., Photobiol., A : Chem., 73 (1993) 135-138.

163. H-T. Lai, J-J. Lin, Chemosphere, 75 (2009) 462-468.

164. E. M. Tiefenbacher, E. Haen, B. Przybilla, H. Kurz, J. Pharm. Sciences, 83 (1994) 463-467.

165. Ph. Schmitt-Kopplin, J. Burhenne, D. Freitag, M. Spiteller, A. Kettrup, J. Chromatogr. A, 837 (1999) 253-265.

166. K. Torniainen, S. Tammilehto, V. Ulvi, Int. J. Pharm., 132 (1996) 53-61.

167. T. G. Vasconelos, D. M. Henriques, A. König, A. F. Martins, K. Kümmerer, Chemosphere, 76 (2009) 487-493.

168. X. Van Doorslaer, K. Demeestere, P. M. Heyderickx, H. Van Langenhove, J. Dewulf, Appl. Catal. B: Environm., 101 (2011) 540-547.

169. T. Paul, M. C. Dodd, T. J. Strathmann, Water Research, 44 (2010) 3121-3132.

170. H. Li, J. Sun, Y. Wang, X. Sui, L. Sun, J. Zhang, Z. He, Eur. J. Pharmaceut. Sciences, 42 (2011) 55-64.

171. N. Blanchemain, T. Laurent, S. Haulon, M. Traisnel, C. Neut, J. Kirkpatrick, M. Morcellet, H. F. Hildebrand, B. Martel, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 57 (2007) 675-681.

172. B. Blanco-Fernandez, M. Lopez-Viota, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Carbohydrate Polymers, 85 (2011) 765-774.

173. S. Leprêtre, F. Chai, J-C. Hornez, G. Vermet, C. Neut, M. Descamps, H. F. Hildebrand, B. Martel, Biomaterials, 30 (2009) 6086-6093.

174. N. Blanchemain, Y. Karrout, N. Tabary, C. Neut, M. Bria, J. Siepmann, H. F. Hildebrand, B. Martel, Acta Biomater., 7 (2011) 304-314.

175. J. Chao, D. Meng, J. Li, H. Xu, S. Huang, Spectroch. Acta Part A, 60 (2004) 729-734.

176. C. Jianbin, C. Liang, X. Hao, M. Dongbin, Spectrochim. Acta Part A, 58 (2002) 2809-2815.

177. R. Yang, Y. Fu, L-D. Li, J-M. Liu, Spectrochim. Acta Part A, 59 (2003) 2323-2332. 178. P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, J. Org. Chem. 61 (1996) 903-908.

179. M. Lampropoulou, K. Yannakopoulou, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 70 (2011) 345-352.

180. Διδακτορική διατριβή Μαρία Λαμπροπούλου.

182. S. Letellier, B. Maupas, J.P. Gramond, F. Guyon, P. Gareil, Anal. Chim. Acta, 315 (1995) 357–363.

183. P. K. Zarzycki, H. Lamparczyk, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 165–170.

184. New Trends in Cyclodextrins and Derivatives, Djedaini, F., Perly, B.: NMR of cyclodextrins derivatives and inclusion compounds. In: Duchene, Edition de Sante' Paris, Paris, 1991, pp. 227–231.

185. T. Higuchi, K. A. Connors, Adv. Anal. Chem., 4 (1965) 117–212.

186. Y. Okada, M. Semma, A. Ichikawa, Carbohydrate Research, 342 (2007) 1315-1322.

187. C. T. Jørgensen, A. Svendsen, J. Brask, Carbohydrate Research, 340 (2005) 1233-1237.

188. M. Jug, I. Kosalec, F. Maestrelli, P. Mura, J. Pharm. Biomed. Anal., 54 (2011) 1030-1039.

189. Διδακτορική διατριβή Σωτήρης Μιχαλέας.

190. M. Bakshi, S. Singh, J. Pharm. Biomed. Anal., 28 (2002) 1011-1040.

191. S. Rozou, E. Antoniadou-Vyza, J.Pharm. Biomed. Anal., 18 (1998) 899–905.

192. S. Rozou, E. Antoniadou-Vyza, J. Chromatogr. A, 1041 (2004) 187–193.

193. S. Rozou, A. Voulgari, E. Antoniadou-Vyza, Eur. J. Pharm. Sci. 21 (2004) 661– 669.

194. T. E. Spratt, S. S. Schultz, D. E. Levy, D. Chen, G. Sclüter, G. M. Williams, Chem. Res. Toxicol., 12 (1999) 809-815.

195. H-R. Park, T. H. Kim, K-M. Bark, Eur. J. Med. Chem., 37 (2002) 443-460.

196. A. M. Cárdenas, F. Vargas, E. Fernández, M. H. Hidalgo, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 10 (1991) 249-255.

197. T. Yamamoto, Y. Tsurumaki, M. Takei, M. Hosaka, Y Oomori, Toxicology in Vitro, 15 (2001) 721-727.

198. G. Viola, L. Facciolo, S. Dall' Acqua, F. Di Lisa, M. Canton, D. Vedaldi, A. Fravolini, O. Tabarrini, V. Cecchetti, Toxicology in Vitro, 18 (2004) 581-592.

199. D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kümmerer, Chemosphere, xxx (2011) xxxxxx.

200. M. Budai, P. Gróf, A. Zimmer, K. Pápai, I. Klebovich, K. Ludányi, J. Photochem. Phgotobiol. A:Chem., 198 (2008) 268-273.

201. M. H. Kleinman, M. D. Smith, E. Kurali, S. Kleinpeter, K. Jiang, Y. Zhang, S. A. Kennedy-Gabb, A. M. Lynch, C. D. Geddes, Regul. Toxicol. Pharmacol., 58 (2010) 224-

202. K. Yabe, K. Goto, T. Jindo, M. Sekiguchi, K. Furuhama, Toxicol. Letters, 157 (2005) 203-210.

203. N. Hayashi, Y. Nakata, A. Yazaki, Antimicrob. Agents Cmemother., 48 (2004) 799-803.

204. A. M. Lynch, P. J. Guzzie, D. Bauer, E. Goche, S. Itoh, A. Jacobs, C. A. M. Krul, A. Schepky, N. Tanaka, P. Kasper, Mutation Research/Genetic Toxicol. Environm. Mutag., 723 (2011) 91-100.

205. J. Rimarčík, V. Lukeš, E. Klein, A-M. Kelterer, V. Milata, Z. Vrecková, V. Brezová, J. Photochem. Photobiol. A:Chem., 211 (2010) 47-58.

206. F. Vargas, T. Zoltan, C. Rivas, A. Ramirez, T. Cordero, Y. Díaz, C. Izzo, Y. M.

Cārdenas, V. López, L. Gómez, J, Ortega, A. Fuentes, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 92 (2008) 83-90.

207. R. Alexi, T. Kümpel, K. Kümmerer, Chemosphere, 57 (2004) 505-512.

208. Y. Tokura, J. Dermatol. Science, 18 (1998) 1-10.

232.

209. H. Hjorth Tønnesen, Int. J. Pharm., 225 (2001) 1-14.

210. M. C. Becerra, M. Sarmiento, P. L. Páez, G. Argüello, I. Albesa, J. Photochem. Photobiol. B:Biol., 76 (2004) 13-18.

211. S. Liu, S. Kokot, G. Will, J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Reviews, 10 (2009) 159-172.

212. K. Kümmerer, Chemosphere, M.Bobu, A. Yediler, I. Siminiceanu, S. Schulte-Hostede, Appl. Catal. B:Environm., 83 (2008) 15-23.-434. 213. M.Bobu, A. Yediler, I. Siminiceanu, S. Schulte-Hostede, Appl. Catal. B:Environm., 83 (2008) 15-23.

214. E. De Bell, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, C. Janssen, Chemosphere, 77 (2009) 291-295.

215. A. M. Lynch, M. D. Smith, A. S. Lane, S. A. Robinson, M. H. Kleinman, S.

Kennedy-Gabb, P. Wilcox, R. W. Rees, Regul. Toxicol. Pharmacol., 58 (2009) 219-223.

216. J. Burhenne, M. Ludwig, M. Spiteller, Chemosphere, Vol. 38, No. 6 (1999) 1279-1286.

217. A. Pardakthy, A. Foroumadi, M. Hashemi, S. Rajabalian, M. R. Heidari, Toxicol. In Vitro, 21 (2007) 1031-1038.

218. Photostability of Drugs and Drug Formulations, D.E. Moore, Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions, Editor H.H. Tønnensen, Ed. 2nd, Taylor & Francis, USA, 2003, pp. 63–82.

219. Διδακτορική διατριβή Αφροδίτη Βούλγαρη.

220. S. O. Ugwu, M. J. Alcala, R. Bhardawaj, J. Blanchard, J. Pharm. Biomed. Anal., 19 (1999) 391-397.

221. Y. L. Loukas, V. Vraka, G. Gregoriadis, Int. J. Pharm., 144 (1996) 225-231.

222. D-S. Lee, H-J. Han, K. Kim, W-B. Park, J-K. Cho, J-H. Kim, J. Pharm. Biomed. Anal., 12 (1994) 157-164.

223. Z. Xu, D. Kuang, L. Liu, Q. Deng, J. Pharm. Biomed. Anal., 45 (2007) 54-61.

224. Y. F. Li, C. Z. Huang, X. H. Huang, M. Li, Anal. Chim. Acta, 429 (2001) 311-319.

225. Y. El Ghoul, N. Blanchemain, T. Laurent, C. Campagne, A. El Achari, S. Roudesli,

M. Morcellet, B. Martel, H. F. Hildebrand, Acta Biomater., 4 (2008) 1392-1400.

226. N. Blanchemain, T. Laurent, F. Chai, C. Neut, S. Haulon, V. Krump-konvalinkova, M. Morcellet, B. Martel, C. J. Kirkpatrick, H. F. Hildebrand, Acta Biomater., 4 (2008) 1728-1733.

227. T. Laurent, I. Kacem, N. Blanchemain, F. Gazaux, C. Neut, H.F. Hildebrand, B. Martel, Acta Biomater., 7 (2011) 3141-3149.