



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-MS/MS ΓΙΑ
ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ
ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ»**

**ΤΣΑΚΕΛΙΔΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ
ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ**

ΤΣΑΚΕΛΙΔΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
2. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ , ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
3. ΛΕΚΤΟΡΑΣ, ΓΚΙΚΑ ΕΛΕΝΗ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το θέμα της εργασίας μου αφορά στην ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού αντιβιοτικών με χρωματογραφικό σύστημα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας συζευγμένο με αναλυτή μαζών σε σειρά. Η χρωματογραφία είναι μια ραγδαία εξελισσόμενη διαχωριστική τεχνική, που σε συνδυασμό με σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης μάζας καθίσταται σπουδαίο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό εκατομμυρίων οργανικών ενώσεων σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα. Στόχος είναι η δυνατότητα ανάπτυξης όλο και πιο αξιόπιστων και ικανών πολυμεθόδων, οι οποίες να καλύπτουν τις ανάγκες της ρουτίνας των αναλυτικών εργαστηρίων.

Ένα αναλυτικό εργαστήριο θα πρέπει να είναι ικανό να αναπτύξει και να εφαρμόσει μια αξιόπιστη μέθοδο, όταν καλείται να αναλύσει και να παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα σχετικά με κλινικές μελέτες σε ασθενείς, των οποίων η εξέλιξη της θεραπείας εξαρτάται από τα αποτελέσματα αυτά. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών τεϊκοπλανίνη, βανκομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, κεφοξιτίνη, κεφουροξίμη και δαπτομυκίνη αναδείχθηκε αξιόπιστη μέσα από μια σειρά δοκιμών ελέγχου της αξιοπιστίας, τις οποίες ορίζουν διεθνείς ελεγκτικοί φορείς. Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος περιγράφεται αναλυτικά η οργανολογία UHPLC-MS/MS, δίνονται πληροφορίες σχετικές με το μηχανισμό δράσης των αντιβιοτικών, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και κάποιες μέθοδοι προσδιορισμού τους που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν. Το πρώτο μέρος ολοκληρώνεται με εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων προσδιορισμού των εν λόγω αντιβιοτικών. Στο δεύτερο μέρος περιγράφονται οι δοκιμές βελτιστοποίησης όλων των παραμέτρων ανάπτυξης της μεθόδου, η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα, οι δοκιμές των παραμέτρων ελέγχου της αξιοπιστίας της μεθόδου, δίνονται τα αποτελέσματα και γίνεται συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Από την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ασθενών μετά από συνδεσμοπλαστική πρόσθιου χιαστού συνδέσμου βρέθηκαν τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών στο αίμα των ασθενών μετά από την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγησή τους. Η χορήγηση των αντιβιοτικών έγινε με σκοπό την προφύλαξη των ασθενών από μετεγχειρητικές λοιμώξεις

(αρθρίτιδα). Από τη μελέτη προέκυψε ότι τα αντιβιοτικά κεφουροξίμη, σιπροφλοξασίνη, δαπτομυκίνη και βανκομυκίνη μπορούν να προφυλάξουν τους ασθενείς από απλές βακτηριακές λοιμώξεις μέχρι και σταφυλόκοκκο. Ενώ, η τεϊκοπλανίνη και ιδιαίτερα η κεφοξιτίνη απαιτούν μεγαλύτερη προσοχή στη χορήγηση και πιθανόν η μελέτη τους να απαιτεί περεταίρω διερεύνηση.

Στις ευχαριστίες μου θα συμπεριλάβω αρχικά τον καθηγητή του τμήματος χημείας του Α.Π.Θ. κ. Ι. Παπαδογιάννη και την καθηγήτρια κα Β. Σαμανίδου για το συντονισμό του προγράμματος σπουδών. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που προσπάθησαν να μεταδώσουν τις γνώσεις τους μέσω των διαλέξεών τους στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών. Πιο ειδικά, θα ήθελα να συγκεντρώσω τις ευχαριστίες μου στη λέκτορα της ιατρικής σχολής, κα Ε. Γκίκα, για τον καθορισμό του θέματος και την καθημερινή επίβλεψη της εργασίας μου, και στον επιβλέποντά μου, καθηγητή του τμήματος χημείας κ. Γ. Θεοδωρίδη για την πολύτιμη βοήθεια και την υπομονή του. Επίσης, τον αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος ιατρικής σχολής κ. Ν. Ράικο, ο οποίος μου επέτρεψε να διεκπεραιώσω το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας στο εργαστήριο ιατροδικαστικής και τοξικολογίας του ΑΠΘ, το οποίο διευθύνει. Και τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους φοιτητές της ομάδας του κ. Γ. Θεοδωρίδη, για την επίλυση αποριών μέσα από την εμπειρία τους και την ψυχολογική υποστήριξη, που τόσο απλόχερα μου παρείχαν.

Θεσσαλονίκη,

Σεπτέμβριος 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	i
1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	1
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ	2
1.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (UHPLC).....	5
2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (Mass Spectrometry, MS)	7
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	8
2.2.1 Σύστημα εισαγωγής του δείγματος	8
2.2.2 Πηγή ιόντων	9
2.2.3 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (MS) & Τριπλό τετράπολο (MS/MS).....	10
2.2.5 Σύστημα κενού	13
3. ΣΥΖΕΥΞΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ	15
3.1. ΓΕΝΙΚΑ	15
3.2. ΓΕΙΝΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC-MS	16
4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ UHPLC-MS/MS	18
4.1 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ..	19
4.2 ΣΥΝΗΘΗ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ	20
5. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	22
5.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	22
5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ.....	22
6. ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	24
6.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	24
6.2 ΤΕΪΚΟΠΛΑΝΙΝΗ	24
6.3 ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ.....	26
7. Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ	28
7.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	28
7.2 ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ.....	28
7.2.1 ΚΕΦΟΥΡΟΞΙΜΗ	28
7.2.2 ΚΕΦΟΞΙΤΙΝΗ	29
8. ΛΙΠΟΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	31

8.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	31
8.2	ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗ.....	31
9.	ΦΘΟΡΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ	33
9.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	33
9.2	ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ	33
10.	ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΧΙΑΣΤΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ (ACL Reconstruction) ΜΕ ΑΡΘΡΟΣΚΟΠΗΣΗ	35
10.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	35
11.2	ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ (DRAINED FLUID)	36
11.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC-MS)	37
11.1.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	37
11.2.	ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	37
12.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC-MS).....	38
12.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	38
12.2	ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	38
12.3	ΌΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD-Limit of Detection).....	39
12.4	ΌΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ (Limit of Quantification)	40
12.5	ΑΚΡΙΒΕΙΑ, ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ	41
12.6	ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	42
12.7	ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	42
12.8	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	43
12.9	ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	44
12.10	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	45
12.11	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	45
13.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	46
	ΣΚΟΠΟΣ	53
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
14.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS	55
14.1	ΌΡΓΑΝΟ & ΣΤΗΛΗ	55
14.2	ΣΥΣΚΕΥΕΣ	56
14.3	ΥΛΙΚΑ	56
14.4	ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	56
14.5	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ & ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	57

14.6	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ & ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	58
14.7	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	59
14.8	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ	59
14.9	ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ & ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	61
14.10	ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ.....	63
14.11	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ & ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝΤΟΣ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟΥ ΥΓΡΟΥ	64
15.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	69
15.1.1	Ακρίβεια και Πιστότητα.....	69
15.1.2	Ανάκτηση Εκχύλισης, Επίδραση Υποστρώματος.....	70
15.1.3	Δυνατότητα Αραίωσης του Δείγματος.....	71
15.1.4	Carry Over, Εκλεκτικότητα.....	71
15.1.5	Γραμμικότητα της Καμπύλης βαθμονόμησης & LOD, LOQ	71
15.1.6	Σταθερότητα.....	72
16.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
16.1	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	73
16.1.1	Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων & Καμπύλη βαθμονόμησης.....	73
16.1.2	Προκατεργασία δειγμάτων αίματος και οροαιματηρού υγρού.....	73
16.2	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	74
16.2.1	Ακρίβεια και Πιστότητα.....	74
16.2.2	Ανάκτηση Εκχύλισης, Επίδραση Υποστρώματος.....	74
16.2.3	Δυνατότητα Αραίωσης του Δείγματος.....	76
16.2.4	Carry Over, Εκλεκτικότητα.....	77
16.2.5	Γραμμικότητα της Καμπύλης βαθμονόμησης & LOD, LOQ	78
16.2.6	Σταθερότητα.....	84
16.3	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	84
17.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
	SUMMARY.....	100
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	101

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι τεχνικές που σχετίζονται με τη χρωματογραφία χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες με αρχικές εφαρμογές το διαχωρισμό υλικών όπως χρωστικές που εκχυλίζονται από τα φυτά. Παρ' όλα αυτά ο όρος «χρωματογραφία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1906 από το Ρώσο χημικό και βοτανολόγο Tswett (Mikhail Semenovitch Tswett, 1872- 1919) για να περιγράψει τη δουλειά του για το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών σε ζώνες πάνω σε στήλες από κιμωλία και άλλα υλικά όπως πολυσακχαρίτες, σακχαρόζη και ινδουλίνη. Ο Tswett παρατήρησε τις επιδράσεις που είχαν στο διαχωρισμό τα διαφορετικά υλικά πλήρωσης των στηλών και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Η σημαντικότητα του έργου του αναγνωρίστηκε το 1930, όταν ο Lederer και οι συνεργάτες του πέτυχαν το διαχωρισμό της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης σε διθειάνθρακα και των ξανθοφυλλών από τον κρόκο του αυγού σε στήλη με υλικό πλήρωσης ανθρακικό ασβέστιο σε μορφή σκόνης διαμέτρου 7μm. Στη συνέχεια οι Khun Karner και Ruzicka βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel (1937, 1938 και 1939 αντίστοιχα) για την εργασία τους στη χρωματογραφία.

Στις πρώτες δημοσιεύσεις του Tswett (1906) ο όρος χρωματογραφία αναφερόταν σε μια μέθοδο με την οποία τα συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται σε μια στήλη προσρόφησης με βάση τη ροή του συστήματος. Αργότερα το 1993 ο Διεθνής Οργανισμός Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) έδωσε τον εξής ορισμό: χρωματογραφία είναι η φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μια στατική και μια κινητή προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή ανάμεσα στις φάσεις, την επιλογή των δύο φάσεων, τη διάταξη της στατικής φάσης, τη διεργασία ανάπτυξης και την κλίμακα εφαρμογής. Μια από αυτές τις τεχνικές είναι η υγρή χρωματογραφία.

1.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) άρχισε να αναπτύσσεται τη δεκαετία του '60. με την πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης, σταθερής παροχής. Η HPLC ουσιαστικά είναι εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης των στηλών, οπότε και αναπτύσσονται μεγάλες πιέσεις.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση, ως αποτέλεσμα συνδυασμού των διαφορετικών μηχανισμών. Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της χρωματογραφικής στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο.

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση των μορφών της HPLC, με βάση τις ιδιότητες των ενώσεων που διαχωρίζονται.

Είδη Χρωματογραφίας	Μηχανισμοί Διαχωρισμού
Χρωματογραφία Προσρόφησης (κανονικής και αντίστροφης φάσης)	Εκλεκτική προσρόφηση/εκρόφηση των διαφόρων ενώσεων στη στατική φάση. Αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσης.
Χρωματογραφία Κατανομής	Εκλεκτική κατανομή μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων υγρών (κινητή και στατική φάση σε υγρή κατάσταση)
Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	Διαφορές σε ιοντοανταλλακτικές ιδιότητες, που οφείλονται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.
Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων	Σχηματισμός ζεύγους ιόντων και εκλεκτική κατανομή ή προσρόφηση.
Χρωματογραφία Συγγένειας (Χειρόμορφη Χρωματογραφία)	Εκλεκτική δέσμευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε υποκαταστάτες συνδεδεμένους στην επιφάνεια της στατικής φάσης.
Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους/Διάχυσης Πηκτής	Διαχωρισμός με βάση το σχήμα και το μέγεθος των προσδιοριζόμενων μορίων.

Στα πειράματα που αρχικά έγιναν από τον Tswett είχε χρησιμοποιηθεί μια πολική στατική φάση και η κινητή φάση ήταν περισσότερο άπολη. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας προσρόφησης καλείται «χρωματογραφία κανονικής φάσης».

Στον Πίνακα 1.1 παραπάνω δίνεται η ταξινόμηση των μορφών της HPLC ανάλογα με το μηχανισμό διαχωρισμού. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, οι ταινίες των διάφορων συστατικών, που ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή, αποτυπώνονται στο καταγραφικό μας σύστημα ως καμπύλες Gauss.

Η ποιότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από την ικανότητά της για Διαχωρισμό (Column Efficiency) ή από το Ύψος των Θεωρητικών Πλακών (Height Equivalent of Theoretical Plates, HEPT),

$$H = L/N$$

Όπου L : μήκος στήλης σε cm, N : αριθμός των θεωρητικών πλακών και H : μέσος ύψος των θεωρητικών πλακών.

Ο γενικός τύπος υπολογισμού της ικανότητας της στήλης είναι:

$$N = \alpha (V_r/W)^2$$

Όπου V_r ο όγκος συγκράτησης, W το εύρος της καμπύλης του Gauss και α μια σταθερά αναλογίας.

Μια μεταβλητή, η οποία επηρεάζει την ικανότητα της στήλης είναι η επιλογή του τρόπου αποτίμησης της καμπύλης Gauss.

Για μια ιδανική καμπύλη του Gauss όλοι οι τρόποι αποτίμησης της καμπύλης θα έπρεπε να οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα αν δεν υπήρχε το πρόβλημα σχηματισμού ουράς ή μετώπου "tailing" ή "fronting". Το πρόβλημα αυτό οφείλεται στη μη ιδανική έκλυση του κλάσματος από τη στήλη εξαιτίας της συγκράτησής του από το υλικό πλήρωσης. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να μεταβάλλουμε την πολικότητα του εκλουστικού προσθέτοντας μια αμίνη συνήθως και να πλένουμε σχολαστικά τη στήλη.

Όλες οι στήλες, που χρησιμοποιούνται στην ποσοτική ανάλυση, πρέπει να ελέγχονται για τη διαχωριστική τους ικανότητα με τη μέθοδο «5σ». Η μαθηματική σχέση για τη μέθοδο αυτή είναι:

$$N = 25(V_r/W_{5\sigma})^2$$

όπου $W_{5\sigma}$: το εύρος της καμπύλης του Gauss, το οποίο αντιστοιχεί στο 4,4 % του συνολικού της ύψους.

Η μέθοδος «5σ» είναι η αυστηρότερη μέθοδος ελέγχου της ικανότητας της στήλης συγκρινόμενη με τη μέθοδο εφαπτόμενης (εύρους στήλης, που αντιστοιχεί στο 0% του συνολικού ύψους της στήλης) και τη μέθοδο του μέσου ύψους της καμπύλης.

Η ικανότητα της στήλης εξαρτάται ακόμη από τη σύσταση του διαλύτη έκλουσης, από τη γραμμική του ταχύτητα, από τη θερμοκρασία και από τη μέθοδο αποτίμησης της καμπύλης του Gauss.

Διαχωριστική Ικανότητα (Resolution, R), μιας στήλης είναι η ικανότητα που έχει η στήλη να διαχωρίζει δύο ή και περισσότερα συστατικά.

Ο Purnell (1960) απέδειξε ότι οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης αποδίδονται καλύτερα από τη σχέση:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{a-1}{a} \right) \left(\frac{K'_2}{K'_2+1} \right)$$

όπου N : ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, a : παράγοντας ² διαχωρισμού και K'_2 παράγοντας χωρητικότητας για το συστατικό που εκλούεται τελευταίο.

Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας τις παραπάνω παραμέτρους. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, N , είναι ένας καθαρός αριθμός και σχετίζεται με την κινητική της ανάπτυξης της χρωματογραφίας. Μπορεί δε να μεταβληθεί, μεταβάλλοντας: το ύψος της στήλης, τη διάμετρο των κόκκων του υλικού πλήρωσης της στήλης ή αυξάνοντας ή μειώνοντας την ταχύτητα της κινητής φάσης. Μια αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών, προκαλεί αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας, R .

Οι παράγοντες a και K'_2 , οι οποίοι είναι περισσότερο χημικοί παράγοντες, ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε, τους διαλύτες που χρησιμοποιούμε και τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση[1].

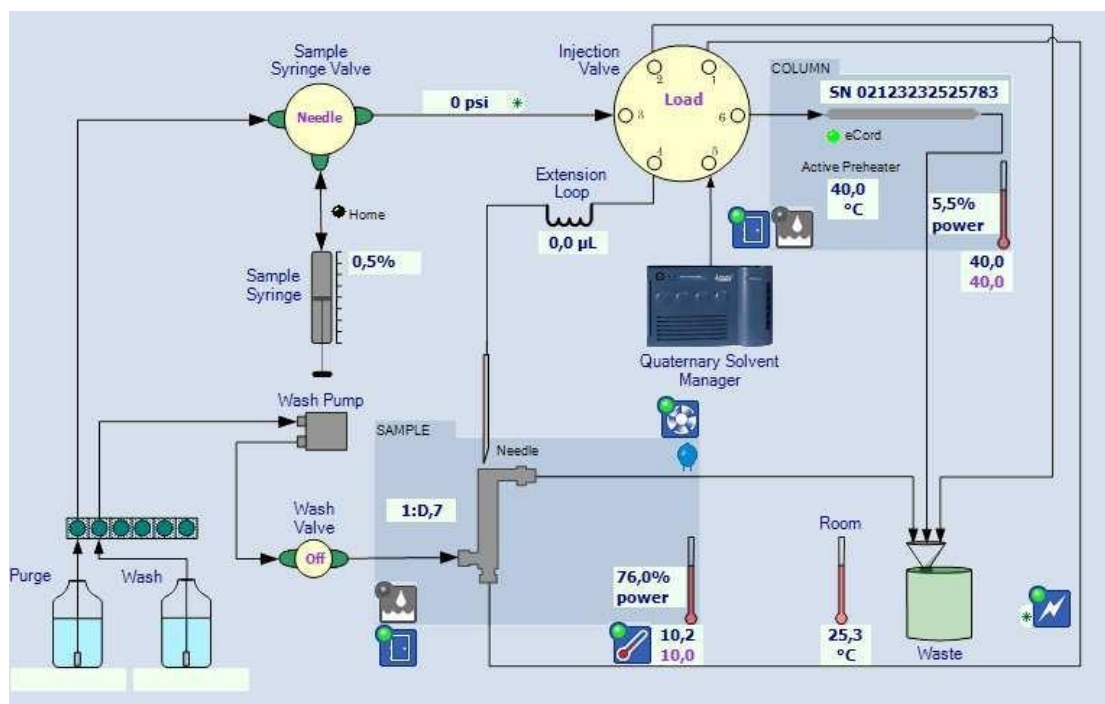
1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (UHPLC)

Η εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας εντοπίζεται στην κατασκευή αναλυτικών στηλών με σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου ($<2\mu\text{m}$), στην κατασκευή πιο ανθεκτικής συνδεσμολογίας για αντοχή σε υψηλότερες ακόμη πιέσεις, με μικρότερες ροές υγρών (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC).

Μία απλή διάταξη ενός συστήματος UHPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: α) τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών, β) την αντλία υψηλής πίεσης, γ) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δ) τη χρωματογραφική στήλη, ε) τον ανιχνευτή και στ) τη μονάδα επεξεργασίας και καταγραφής των δεδομένων. Τα τμήματα αυτά αναπαρίστανται στο σχήμα 1.1.

Επιπλέον μπορούν να προστεθούν και άλλα τμήματα βελτιώνοντας την απόδοση της τεχνικής.

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος μπορεί να αποτελείται από βαλβίδα σταθερού όγκου για έγχυση του δείγματος ή από αυτόματο δειγματολήπτη.
- Η χρωματογραφική στήλη μπορεί να βρίσκεται σε ειδικό θερμοστατούμενο φούρνο, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη επαναληψιμότητα στις μετρήσεις.
- Στον πρώτο ανιχνευτή μπορεί να συνδεθεί σε σειρά και δεύτερος ανιχνευτής.
- Με τη σύνδεση και δεύτερης χρωματογραφικής στήλης σε σειρά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός, ενώ με μια προσθήκη αμέσως πριν τη χρωματογραφική στήλη αυξάνεται ο χρόνος ζωής της τελευταίας.
- Επίσης συνδέοντας μια δεύτερη αντλία και μαζί και ένα κατάλληλο σύστημα επιλογής διαλυτών μετατρέπεται ένα σύστημα χαμηλής πίεσης (Low Pressure) σε υψηλής πίεσης (High Pressure), εξασφαλίζοντας κυρίως πιο επαναλήψιμες ροές των διαλυτών.



Σχήμα 1.1. Τμήματα της ACQUITY UPLC της Waters

2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (Mass Spectrometry, MS)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την πρόσκρουση ηλεκτρονίων σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό, συνήθως, φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παράγουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα, που δείχνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος, ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται *φάσμα μαζών* (mass spectrum) της ένωσης. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Το μοριακό βάρος εκφράζεται στις συνήθεις μονάδες ατομικής μάζας (amu, atomic mass units), με βάση το ισότοπο ^{12}C που, κατά συνθήκη, αντιστοιχεί ακριβώς σε 12,000000 amu. Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται *φασματομετρία μαζών* (mass spectrometry, MS). Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Σήμερα η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων κατά τη διαδικασία σύνθεσης (όπως π.χ. νέων φαρμάκων), για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων, για τη διερεύνηση της παρουσίας και του ποσοστού ισοτόπων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων

2.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ένα τυπικό φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

i. **Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος.** Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εισάγεται στην αέρια ήστην υγρή του μορφή.

ii. **Την πηγή ιόντων.** Εδώ τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

iii. **Τον αναλυτή μαζών.** Εδώ γίνεται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z που φέρουν. Είναι η πραγματική "καρδιά" του συστήματος. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές.

iv. **Τον ανιχνευτή.** Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

v. **Το σύστημα κενού.** Ολόκληρο το φασματόμετρο (πέραν του συστήματος επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.

2.2.1 Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Η εξαέρωση

δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών δειγμάτων, διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Στο δοχείο δείγματος η πίεση που επικρατεί είναι της τάξης των 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση (τυπικά 10^{-5} Torr) από όπου, με σταθερή παροχή, εισάγεται στο χώρο ιοντισμού, όπου επικρατεί ακόμη χαμηλότερη πίεση (τυπικά 10^{-7} Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των παραγόμενων ιόντων. Στη συνδυασμένη τεχνική LC-MS, το υγρό που εκλούεται από τη χρωματογραφική στήλη οδηγείται στην πηγή ιόντων, αφού προηγουμένως απαλλαγεί από τη μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη

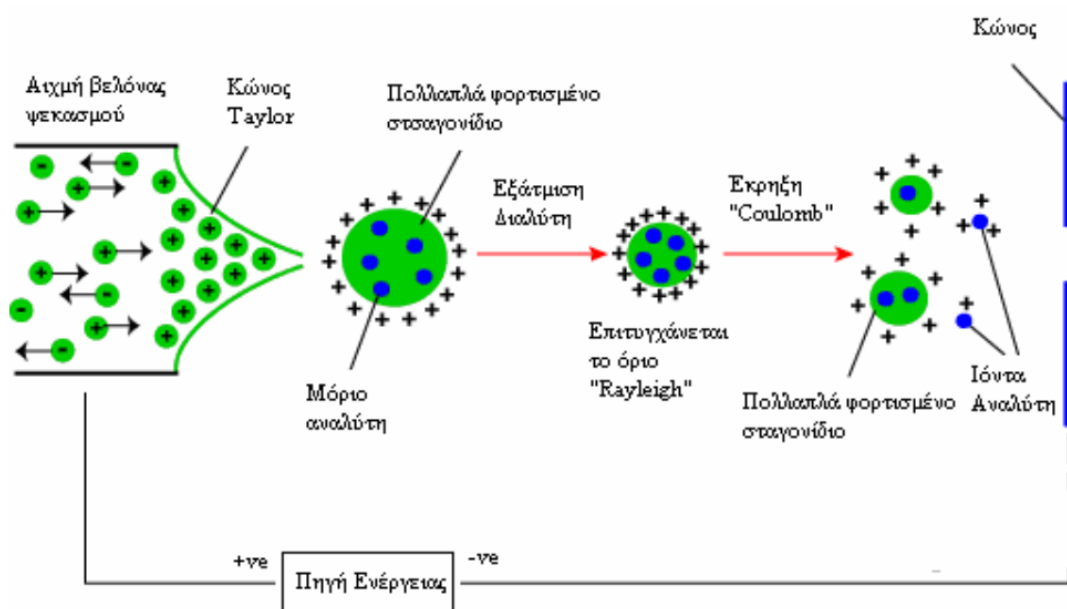
2.2.2 Πηγή ιόντων

Κάθε διακριτό τμήμα του φασματομέτρου μαζών παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και απόδοση του συνόλου. Έτσι η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοσθεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιοντισμού μπορεί να γίνει μεταξύ "μαλακών" και "σκληρών" τεχνικών. "Σκληρές" καλούνται οι τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια, η οποία μεταφέρεται στην προσδιοριζόμενη ένωση κατά τον ιοντισμό, προκαλώντας τις περισσότερες φορές διάσπασή της σε θυγατρικά ιόντα (**θραύση**). "Μαλακές" καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση.

I. Ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray)

Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων V, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Η διάταξη περιγράφεται στο σχήμα 1.2 και ο τρόπος λειτουργίας αναλύεται ως εξής: Η είσοδος του διαλύματος στο σύστημα γίνεται εν ροή μέσα από τριχοειδή σωλήνα. Παράλληλα με τον τριχοειδή βρίσκεται εξωτερικός σωλήνας μέσα από τον οποίο διαβιβάζεται αέριο

που σκοπό έχει τη δημιουργία εκνεφώματος στην άκρη του τριχοειδούς. Ο τριχοειδής είναι γειωμένος, ενώ στο απέναντι ηλεκτρόδιο (counter electrode) εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης των 3.5-5 KV. Κατά τον ψεκασμό του διαλύματος σε περιβάλλον υψηλού δυναμικού ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις διάφορες ενώσεις, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.2. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation)* και εντάσσεται στις μαλακές / ήπιες τεχνικές ιοντισμού. Κατά τον ιοντισμό πολύ μικρό ποσοστό θραύσης λαμβάνει χώρα και τα electrospray φάσματα είναι απλά, καθαρά και εύκολα για εκτίμηση. Για τους λόγους αυτούς η τεχνική αυτή έχει διαδοθεί ιδιαίτερα και απαντάται στα περισσότερα νέα όργανα.



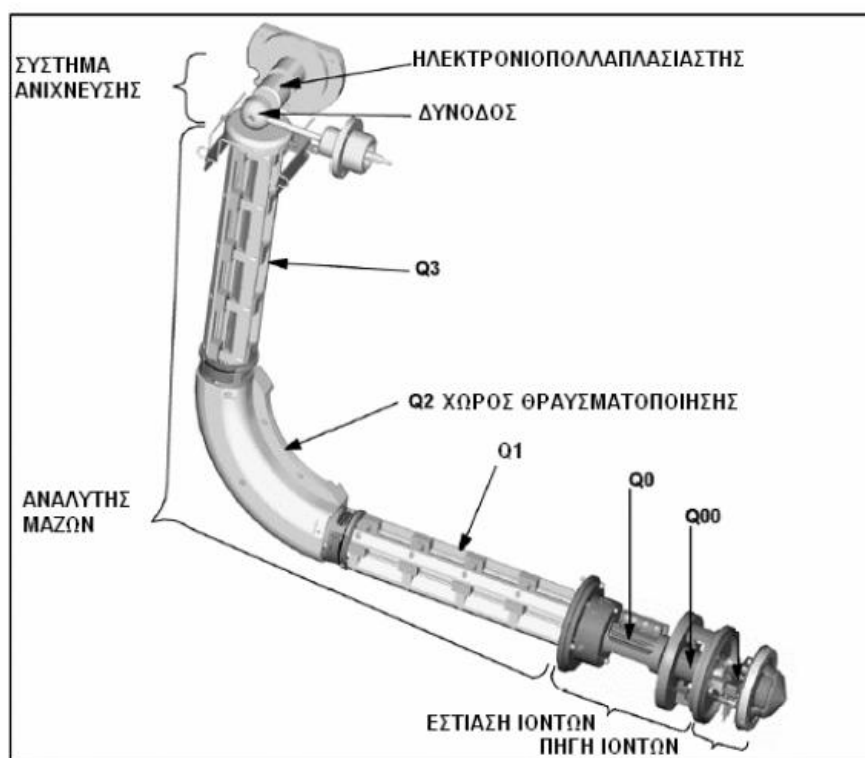
Σχήμα 1.2. Σχηματισμός ιόντων κατά τον ψεκασμό σε ηλεκτρικό πεδίο.

2.2.3 Τετραπολικός αναλυτής μαζών (MS) & Τριπλό τετράπολο (MS/MS)

Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές μαζών γιατί παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα: χαμηλή σχετικά τιμή, συμπαγή κατασκευή, μεγαλύτερες ανοχές, ταχύτερη σάρωση (< 100 ms), δυνατότητα συνδυασμών σε υβριδικά όργανα (όργανα με άνω του ενός αναλυτή μαζών π.χ. QTOF) και τέλος αμεσότερη συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές. Ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ανάλογα με τα οπτικά φίλτρα επιτρέποντας σε ιόντα μίας μόνο τιμής m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλα

τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Για το λόγο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής αποκαλείται συχνά και **φίλτρο μαζών**. Τέσσερις μεταλλικές κυλινδρικές ράβδοι (**πόλοι**) βρίσκονται φορτισμένες ανά απέναντι ζεύγη στο ίδιο συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Στο σύστημα εφαρμόζεται με διαφορά φάσης 180 μοίρες εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (ραδιοσυχνότητα). Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο μετά από επιτάχυνση σε δυναμικό 5-15 V.

Το τριπλό τετράπολο είναι ένας συνδυασμός τριών τετραπόλων, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3. Τριπλά τετράπολα απαντώνται συχνότατα, για την εκμετάλλευση των θετικών στοιχείων του τετραπόλου (ταχεία σάρωση, δυνατότητα εφαρμογής φασματομετρίας μαζών σε σειρά/Tandem MS). Όταν το τριπλό τετράπολο λειτουργεί ως απλός αναλυτής ρυθμίζεται ώστε δύο τετράπολα να συνεισφέρουν μόνο στον εστιασμό της δέσμης των ιόντων (Q2 και Q3, ή Q1 και Q2, αντίστοιχα) και ο διαχωρισμός να γίνεται στο τρίτο τετράπολο (στον τύπο σάρωσης Q1MS, το Q1 χρησιμοποιείται ως ο αναλυτής μαζών, ενώ στον τύπο σάρωσης Q3MS, το Q3 χρησιμοποιείται ως ο αναλυτής μαζών)



Σχήμα 1.3. Αναλυτής Μαζών με τριπλο τετράπολο (QQQ)

Η παρακολούθηση των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους σάρωσης: την πλήρη σάρωση (Full Scan), την παρακολούθηση

επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM), την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM ή Multiple Reaction Monitoring-MRM), τη σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning) και τη σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning). Στο σχήμα 1.4 απεικονίζεται ο τύπος σάρωσης SRM.

Στον τύπο SRM (ή MRM) παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων, όπως η αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος. Στην περίπτωση αυτή παρακολουθείται συγκεκριμένος αριθμός μητρικών / θυγατρικών ιόντων, επιτρέποντας γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Οποιαδήποτε παρεμποδίζουσα ουσία θα πρέπει να σχηματίσει όχι μόνο ένα μητρικό ιόν του ίδιου λόγου m/z με την ουσία στόχο, αλλά θα πρέπει να διασπαστεί και να σχηματίσει και τα ίδια θυγατρικά ιόντα. Επίσης, το υπόβαθρο θορύβου είναι πολύ χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερη ανιχνευσιμότητα, αυξάνοντας ιδιαίτερα την ευαισθησία της μεθόδου.



Σχήμα 1.4. Τύπος σάρωσης SRM.

2.2.4 Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι:

Ι. Φαρανταϊκό κύπελλο (Faraday cup)

Αποτελείται από μια μεταλλική κοιλότητα, που συνδέεται μέσω μιας αντίστασης υψηλής τιμής με τη γείωση του οργάνου. Τα ιόντα που προσπίπτουν στο κύπελλο, εκφορτίζονται και το ρεύμα, που διέρχεται από την αντίσταση

(ιοντικό ρεύμα), προκαλεί την ανάπτυξη ωμικής πτώσης τάσης στα άκρα της ή (για πολύ μικρά ρεύματα) οδηγείται σε κατάλληλο κύκλωμα μετατροπέα i/V . Η τάση ενισχύεται και καταγράφεται σε ποτενσιομετρικό καταγραφέα. Βασικά πλεονεκτήματα του φαρανταϊκού κυπέλλου είναι η απλή κατασκευή και η αξιοπιστία του, ενώ το κύριο μειονέκτημά του είναι η ανάγκη χρησιμοποίησης ενός ενισχυτή υψηλής εμπεδότητας, γεγονός που περιορίζει την ταχύτητα με την οποία μπορεί να σαρωθεί ένα φάσμα μαζών (μετρώντας ρεύματα 10-15A ή μεγαλύτερα).

II. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier)

Είναι η πιο συχνά απαντώμενη διάταξη ανίχνευσης στο φασματόμετρο μαζών. Η κατασκευή ουσιαστικά αποτελείται από γυάλινο ή μεταλλικό σωλήνα με μεταλλική επίστρωση που παρουσιάζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Διαφορά δυναμικού εφαρμόζεται στα δύο άκρα με τρόπο, ώστε να εμφανίζει γραμμική μεταβολή του δυναμικού κατά μήκος του σωλήνα. Η κάθοδος καλύπτεται από επιφάνεια Cu/Be από όπου με τη σύγκρουση ιόντος ακολουθεί εκπομπή ηλεκτρονίων. Ανάλογα με το σχεδιασμό του ανιχνευτή μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση σήματος έως και 10^7 .

2.2.5 Σύστημα κενού

Η λειτουργία των φασματόμετρων μαζών προϋποθέτει τη συνεχή λειτουργία συστήματος παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή 10^{-5} - 10^{-8} Torr, οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα π.χ. στην πηγή ιόντων, θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής ιόντων της εξεταζόμενης ένωσης και την εμφάνιση σημάτων που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας. Στα περισσότερα φασματόμετρα μαζών το κενό πετυχαίνεται με συνδυασμό αντλιών. Περιστροφικές αντλίες μειώνουν αρχικά την πίεση στα 10^{-3} Torr και στη συνέχεια αναλαμβάνουν αντλίες διάχυσης ελαίου. Στα σύγχρονα

φασματόμετρα μαζών χρησιμοποιούνται στροβιλομοριακές αντλίες, που λειτουργούν χωρίς υγρά.

3. ΣΥΖΕΥΞΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (LC-MS. ή εναλλακτικά HPLC-MS) είναι μια τεχνική που συνδυάζει τις φυσικές ικανότητες διαχωρισμού της υγρής, χρωματογραφίας με την δυνατότητα ανάλυσης μάζας της φασματομετρίας μαζών. Η LC-MS είναι μια ισχυρή τεχνική που χρησιμοποιείται για πολλές εφαρμογές λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της μεγάλης εκλεκτικότητας. Γενικά η εφαρμογή της είναι προσανατολισμένη προς τη γενική ανίχνευση και πιθανή ταυτοποίηση των χημικών ουσιών, παρουσία άλλων χημικών ουσιών (σε ένα σύνθετο μείγμα).

Η σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύ ισχυρό συνδυασμό με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Ο συνδυασμός LC-MS είναι το όργανο αναφοράς για την ανάλυση διαφόρων τάξεων ενώσεων όπως μεγαλομόρια, μη πτητικές ενώσεις, θερμοευαίσθητες ενώσεις.

Η σύζευξη με υγρή χρωματογραφία εφαρμόζεται στις περιπτώσεις που απαιτείται ο προσδιορισμός ενώσεων, των οποίων ο προσδιορισμός δεν είναι εφικτός με άλλου είδους χρωματογραφία π.χ. ενώσεων που είτε δεν είναι πτητικές, είτε διασπώνται σε αυξημένη θερμοκρασία. Στην κατηγορία αυτή ουσιαστικά εντάσσεται η πλειοψηφία των βιολογικά δραστικών ενώσεων. Η τεχνική θεωρείται πια απαραίτητο εργαλείο σε μεγάλη σειρά αναλυτικών εργασιών και απαντάται σε πολλά εργαστήρια, όπως φαρμακευτικής ανάλυσης, βιοανάλυσης, ελέγχου τροφίμων, βιοτεχνολογίας κλπ.

Η σύζευξη με υγρή χρωματογραφία απαιτεί τη χρήση διάταξης σύζευξης (interface) αφού ουσιαστικά το ζητούμενο είναι η σύζευξη δυο ασύμβατων τεχνικών. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές διατάξεις σύζευξης με διαφορετική αρχή λειτουργίας η κάθε μια.

Από την πλειάδα των διατάξεων σύζευξης που έχουν αναπτυχθεί τα πιο σημαντικά επιτεύγματα θεωρούνται αυτά που επιτυγχάνουν ιονισμό σε ήπιες συνθήκες και υπό ατμοσφαιρική πίεση. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο interface είναι ο ψεκασμός σε δυναμικό (electrospray). Η χρήση αυτού κάνει

δυνατή την ανάλυση μεγάλου αριθμού οργανικών ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους, σε βιολογικά δείγματα τρόφιμα και άλλα περίπλοκα δείγματα.

Η σύζευξη της φασματομετρίας μαζών με την υγρή χρωματογραφία ήταν για πολλά χρόνια το αντικείμενο της έρευνας, τόσο από την πλευρά της χρωματογραφίας, όσο και από την πλευρά της φασματομετρίας μαζών. Από την πλευρά της χρωματογραφίας τα πλεονεκτήματα της σύζευξης είναι :

1. Η εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή (universal detector).
2. Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής,
3. Η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου,
4. Η δυνατότητα ταυτοποίησης αγνώστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα.

Από την πλευρά της φασματομετρίας μαζών τα πλεονεκτήματα είναι:

1. Η άμεση εισαγωγή μη πτητικών ενώσεων χωρίς την ανάγκη τροποποίησης του μορίου της προσδιοριζόμενης ένωσης.
2. Η εκμετάλλευση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας της υγρής χρωματογραφίας,
3. Ο προσδιορισμός ανεπιθύμητων φαινομένων λόγω της κλασματοποίησης περίπλοκων δειγμάτων.

3.2. ΓΕΙΝΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LC-MS

Στο σύστημα LC/MS, το δείγμα εισάγεται στον υγρό χρωματογράφο μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου και διαχωρίζεται στα επιμέρους συστατικά του καθώς αυτά κινούνται διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης. Τα διαχωρισμένα συστατικά διέρχονται μέσω της γραμμής μεταφοράς και εισέρχονται στο φασματόμετρο μαζών, όπου και αναλύονται. Μπορεί επίσης να γίνει εισαγωγή του δείγματος απευθείας στον ανιχνευτή μέσω ειδικής αντλίας τύπου σύριγγας.

Αμέσως μετά την εισαγωγή του δείγματος στην πηγή API, τα μόρια του ιονίζονται με ψεκασμό σε ηλεκτρικό δυναμικό (electrospray ionization, ESI) ή χημικό ιοντισμό (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Τα παραγόμενα ιόντα ευθυγραμμίζονται και επιταχύνονται μέσω οπτικού

συστήματος προς τον αναλυτή μαζών και αναλύονται με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Στη συνέχεια, τα ιόντα του δείγματος ανιχνεύονται από ένα σύστημα ανίχνευσης, που παράγει σήμα ανάλογο με τον αριθμό των ιόντων που ανιχνεύονται. Το σήμα των ιόντων ενισχύεται από έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων (multiplier) και περνά σε ένα σύστημα δεδομένων για περαιτέρω επεξεργασία, αποθήκευση και απεικόνιση[2].

4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ UHPLC-MS/MS

Οι κύριες εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών είναι η ταυτοποίηση και μελέτη της δομής οργανικών ενώσεων, ο έλεγχος ποιότητας, η ποσοτική ανάλυση καθώς και η ισοτοπική επισήμανση με σταθερά ισότοπα. Ωστόσο βρίσκει εφαρμογές και σε άλλα πεδία

- Φαρμακοκινητική

Η LC-MS χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε φαρμακοκινητικές μελέτες φαρμακευτικών προϊόντων και ως εκ τούτου είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική στο πεδίο της βιοανάλυσης. Οι μελέτες αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το πόσο γρήγορα ένα φάρμακο «φεύγει» από την αιματική ροή του ήπατος, καθώς και τα υπόλοιπα όργανα του σώματος. Η φασματομετρία μαζών (MS) χρησιμοποιείται για αυτό λόγω της υψηλής ευαισθησίας, την εξαιρετική εκλεκτικότητα σε σύγκριση με τον ανιχνευτή UV (εφ' όσον η προσδιοριζόμενη ουσία μπορεί να ιονίζεται κατάλληλα), και τον σύντομο χρόνο ανάλυσης. Ο ανιχνευτής μπορεί να προγραμματίζεται για την επιλογή ορισμένων ιόντων θραύσματος. Η μετρούμενη ποσότητα είναι το άθροισμα των κλασμάτων μορίου που επιλέγεται από τον χειριστή.

- Omics βιοανάλυση

Η LC-MS χρησιμοποιείται και σε αυτό το πεδίο όπου και πάλι πρέπει να ανιχνευθούν και προσδιοριστούν συστατικά περίπλοκων δειγμάτων.

- Ανάπτυξη Φαρμάκων

Η LC-MS χρησιμοποιείται συχνά στην ανάπτυξη φαρμάκων σε πολλά διαφορετικά στάδια συμπεριλαμβανομένων την χαρτογράφηση πεπτιδίων, την χαρτογράφηση γλυκοπρωτεϊνών, την *in vivo* διαλογή φαρμάκων, τον εντοπισμό προσμίξεων, την ποσοτική βιοανάλυση, και τον έλεγχο ποιότητας.

- Έλεγχος προσμίξεων

Το φασματόμετρο μαζών μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες της τάξης των pg ή των pg, μιας πρόσμιξης σε μια ένωση, ιδιαίτερα αν η δομή της πρόσμιξης είναι αρκετά διαφορετική και το μοριακό της βάρος είναι μεγαλύτερο από αυτό του

κύριου συστατικού. Η εμφάνιση επιπρόσθετων κορυφών στο φάσμα μαζών φανερώνει την ύπαρξη προσμίξεων.

- Ποιοτική ανάλυση μίγματος

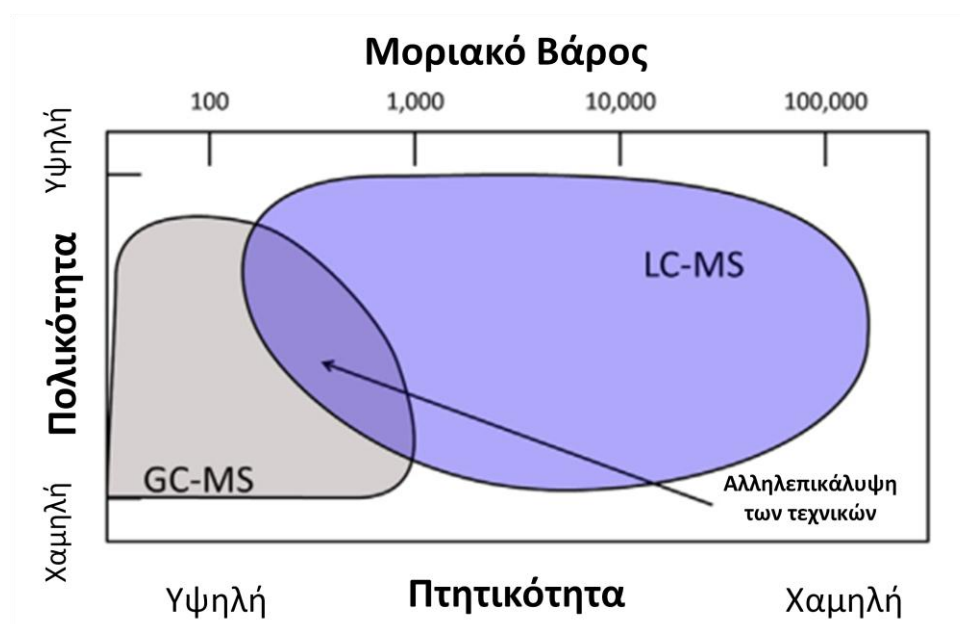
Μπορεί να προσδιοριστεί μεγάλος αριθμός συστατικών σε ένα μίγμα χωρίς να απαιτείται δύσκολη ή περίπλοκη προκατεργασία δείγματος. Τα ύψη των κορυφών στο φάσμα που λαμβάνεται είναι ευθέως ανάλογα της ποσότητας-συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ένωσης.

- Παρακολούθηση θεραπευτικών συγκεντρώσεων φαρμάκων

Η εφαρμογή της τεχνικής για την παράκολούθηση της θεραπευτικής συγκέντρωσης φαρμάκων αναπτύσσεται σε επόμενη παράγραφο.

4.1 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας φαρμάκων για δεκαετίες.



Σχήμα 1.5. Χάρτης επικάλυψης των τεχνικών GC-MS και LC-MS στο χώρο της ανάλυσης των χημικών ενώσεων. Απεικονίζεται η επικάλυψη βασισόμενη στην πτητικότητα (κάτω άξονας των x), την πολικότητα (άξονας των y) και στο μοριακό

βάρος (πάνω άξονας των x). Η τεχνική GC-MS βρίσκει εφαρμογή σε υψηλής πτητικότητας και χαμηλού μοριακού βάρους προσδιοριζόμενα συστατικά, ενώ η τεχνική LC-MS σε χαμηλής πτητικότητας και υψηλής πολικότητας προσδιοριζόμενα συστατικά[3].

Η τεχνική LC-MS αναλύει ταχύτερα ακόμη και μεγαλύτερα μόρια. Αν και υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δύο τεχνικών, η LC-MS/MS παρέχει επιπρόσθετη ταχύτητα και ευαισθησία. Η υγρή χρωματογραφία είναι καταλληλότερη για κλινικά περιστατικά, καθώς τα βιολογικά υλικά απαιτούν μικρότερο χρόνο και σχετικά απλή προκατεργασία δείγματος. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.5 είναι η καταλληλότερη τεχνική για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους.

Τα πλεονεκτήματα που παρέχει η τεχνική LC-MS/MS είναι τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, η ειδικότητα, το μεγάλο εύρος δυναμικής περιοχής (δεν απαιτείται αραίωση σε δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων συστατικών), το μικρότερο κόστος ανάλυσης και ο εύκολος χειρισμός. Ενώ παράλληλα, όλα αυτά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά βελτιώνονται συνεχώς[3].

4.2 ΣΥΝΗΘΗ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ

Τα ούρα, το πλάσμα αίματος και τα υγρά της σιέλου είναι τα πιο συνηθισμένα υποστρώματα στις κλινικές εφαρμογές του LC-MS/MS. Ειδικά στα δύο τελευταία υγρά, εξαιτίας των ενδογενών συστατικών μπορεί να παρατηρηθεί πτώση ή αύξηση του σήματος, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως «επίδραση υποστρώματος». Η πιστότητα και η ακρίβεια της μεθόδου ανάλυσης επηρεάζονται από αυτό το φαινόμενο. Ένας καλός διαχωρισμός στο στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος και στο στάδιο της χρωματογραφικής ανάλυσης είναι απαραίτητος για τον περιορισμό της επίδρασης υποστρώματος στη μέθοδο.

Ο σκοπός της προκατεργασίας του δείγματος είναι η αφαίρεση των παρεμποδισέων, οι οποίες επηρεάζουν δυσμενώς την ανίχνευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων και το χρόνο ζωής της στήλης και του οργάνου. Ένας άλλος ρόλος της μεθόδου προκατεργασίας είναι ο εμπλουτισμός σε ποσότητα ουσίας, προκειμένου να ενταχθεί στο εύρος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Το διάγραμμα ροής της διαδικασίας αυτής είναι καθοριστικής σημασίας για ένα κλινικό εργαστήριο. Η μέθοδος «αραίωσε-και-μετρα» κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος στις κλινικές εφαρμογές παρέχοντας την πιο γρήγορη προκατεργασία δείγματος και καθαρισμό από το υπόστρωμα με απλή αραίωση του δείγματος των ούρων με τη σύσταση των διαλυτών της κινητής φάσης. Τα πράγματα αλλάζουν όταν το δείγμα έχει πολύπλοκο υπόστρωμα, όπως το δείγμα αίματος. Σ' αυτή την περίπτωση απαιτείται καλός καθαρισμός πριν την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα LC-MS/MS[3].

5. ANTIBIOTIKA

5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο όρος «αντιβιοτικό» που έχει επικρατήσει μέχρι σήμερα, αφορά σε φυσικά παράγωγα διαφόρων μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να τους καταστρέφουν. Με την παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων ο όρος «αντιβιοτικά» έχει σήμερα αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο «αντιμικροβιακά» που περιλαμβάνει φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες ικανές να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων και να τα καταστρέφουν.

Τα αντιμικροβιακά δεν είναι δραστικά στους ιούς, διότι προϋπόθεση για τη δράση τους είναι η ικανότητα του παθογόνου να έχει δικό του μεταβολισμό, ενώ οι ιοί αποτελούν «παρασιτούντες» σε βάρος του ανθρωπίνου κυττάρου μικροοργανισμούς. Η πτωχή εξάλλου ανάπτυξη της χημειοθεραπείας κατά των ιών έναντι της πλούσιας ανάπτυξης της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας οφείλεται όχι μόνο στην έλλειψη μεταβολισμού του ιδίου του ιού, αλλά στη δυσκολία παρασκευής φαρμάκων με εκλεκτική τοξικότητα έναντι του εισβολέα, που δεν παραβλάπτουν συγχρόνως το ανθρώπινο κύτταρο-ξενιστή[4].

5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Υπάρχουν πέντε κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών, ακολουθούν κάποια παραδείγματα αυτών και αναπαρίστανται σχηματικά στην εικόνα .

I. Αλληλεπίδραση με τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμες όπως η πενικιλίνη και η κεφαλοσπορίνη παρεμποδίζουν ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της στιβάδας της πεπτιδογλυκάνης.

II. Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Οι οξαζολιδόνες, οι οποίες ανήκουν σε νέα ομάδα αντιβιοτικών, αλληλεπιδρούν με την πλευρά Α του βακτηριακού ριβοσώματος, όπου βρίσκεται το αμινοακυλο-tRNA. Οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση με τη δέσμευσή τους στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Οι μακρολίδες συνδέεται στην 50S υπομονάδα, αναστέλλοντας την επιμήκυνση κατά τη σύνθεση μιας πεπτιδικής αλυσίδας.

III. Παρεμπόδιση με τη σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος

Η ριφαμυκίνη παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση. Οι κινολόνες αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA αλληλεπιδρώντας με την τύπου II τοποϊσομεράση, τη DNA γηράση και την τύπου IV τοποϊσομεράση.

IV. Αναστολή ενός μεταβολικού μονοπατιού

Τα σουλφοναμίδια και η τριμεθοπρίμη μπλοκάρουν το κυριότερο στάδιο της σύνθεσης του φολικού οξέος το οποίο αποτελεί συμπαραάγοντα στη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων, τα σύμπλοκα δόμησης DNA και RNA.

V. Αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης

Η κύρια δράση επικεντρώνεται στην κυτοπλασμική μεμβράνη των Gram-θετικών βακτηρίων, ή στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Το λιποπεπτίδιο δαπτομυκίνη παρουσιάζει ταχεία βακτηριακή δράση δεσμευόμενο στην κυτοπλασμική μεμβράνη με μηχανισμό που στηρίζεται στο ασβέστιο, και ολιγομερίζει την μεμβράνη οδηγώντας σε φραγή της διόδου του καλίου και στον βακτηριακό θάνατο[5].

6. ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

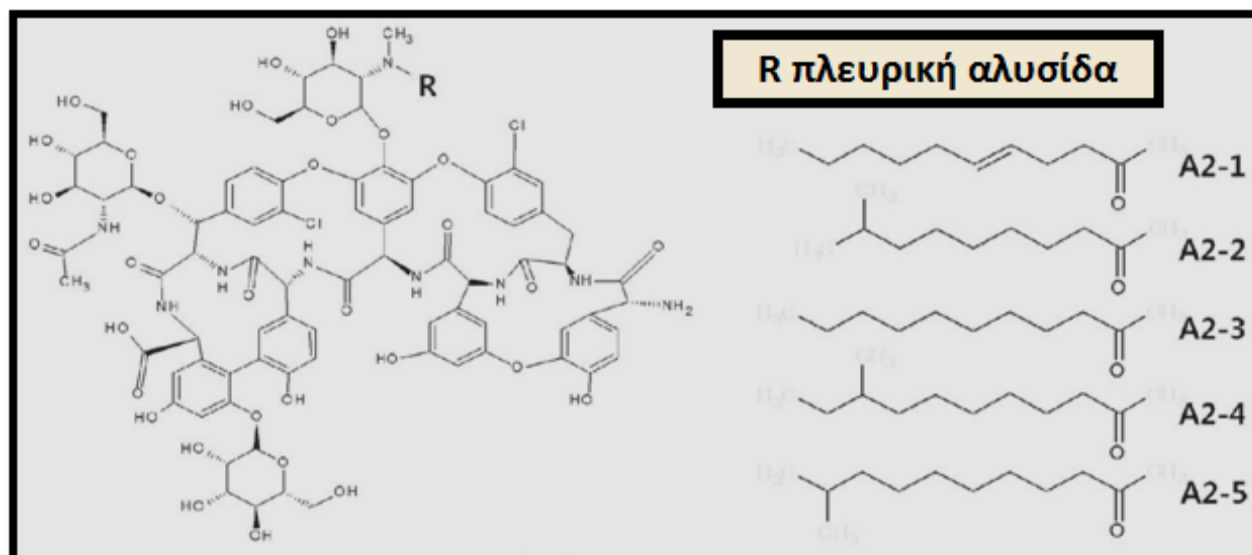
6.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα γλυκοπεπτίδια είναι αντιβιοτικά βακτηριοκτόνα δραστικά έναντι (I) σταφυλοκόκκων, τόσο των στελεχών *Staphylococcus aureus* όσο και των CNS σταφυλοκόκκων (Coagulase-negative staphylococci), συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες, (II) στρεπτοκόκκων (συμπεριλαμβανομένων και των πνευμονιοκόκκων των ανθεκτικών στην πενικιλίνη), (III) εντεροκόκκων, (VI) *Corynebacterium JK*, (V) *Listeria monocytogenes* και (VI) κλωστηριδίων ειδικότερα έναντι του *Clostridium difficile*.

Δύο κύρια αντιβιοτικά συναντώνται σ' αυτή την κατηγορία και είναι και τα δύο ενέσιμα, αλλά διαφέρουν στο χρόνο ημίσειας ζωής τους, ο οποίος είναι 12 ώρες και > 100 ώρες για τη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη αντιστοίχως. Αποβάλλονται από τους νεφρούς βραδέως και δεν απορροφώνται όταν χορηγούνται από το στόμα. Δεν διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Δεν απομακρύνονται με την αιμοκάθαρση. Η βανκομυκίνη δίδεται μόνο ενδοφλεβίως, ενώ η τεϊκοπλανίνη ενδοφλεβίως και ενδομυϊκώς. Σε αντίθεση με τη βανκομυκίνη, η τεϊκοπλανίνη δεν είναι εξ ορισμού νεφροτοξική[4].

6.2 ΤΕΪΚΟΠΛΑΝΙΝΗ

Αρχικά απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε από τον οργανισμό *Actinoplanes teichomyceticus*, το 1978. Συνήθως βρίσκει εφαρμογή σε λοιμώξεις που προκαλούν τα gram θετικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus faecalis*. Αφορά σε πέντε κύρια συστατικά (A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 και A2-5), ένα προϊόν υδρόλυσης (A3-1) και τέσσερα δευτερεύοντα συστατικά (RS-1 με RS-4). Το κύριο συστατικό είναι το μείγμα A2 που καλύπτει το 90-95% της ποσότητας της τεϊκοπλανίνης, ενώ το συστατικό A2-2 είναι η πιο δραστική ένωση και βρίσκεται σε περίσσεια[6].



Σχήμα 1.7. Χημική δομή των ισομορφών της τεϊκοπλανίνης.

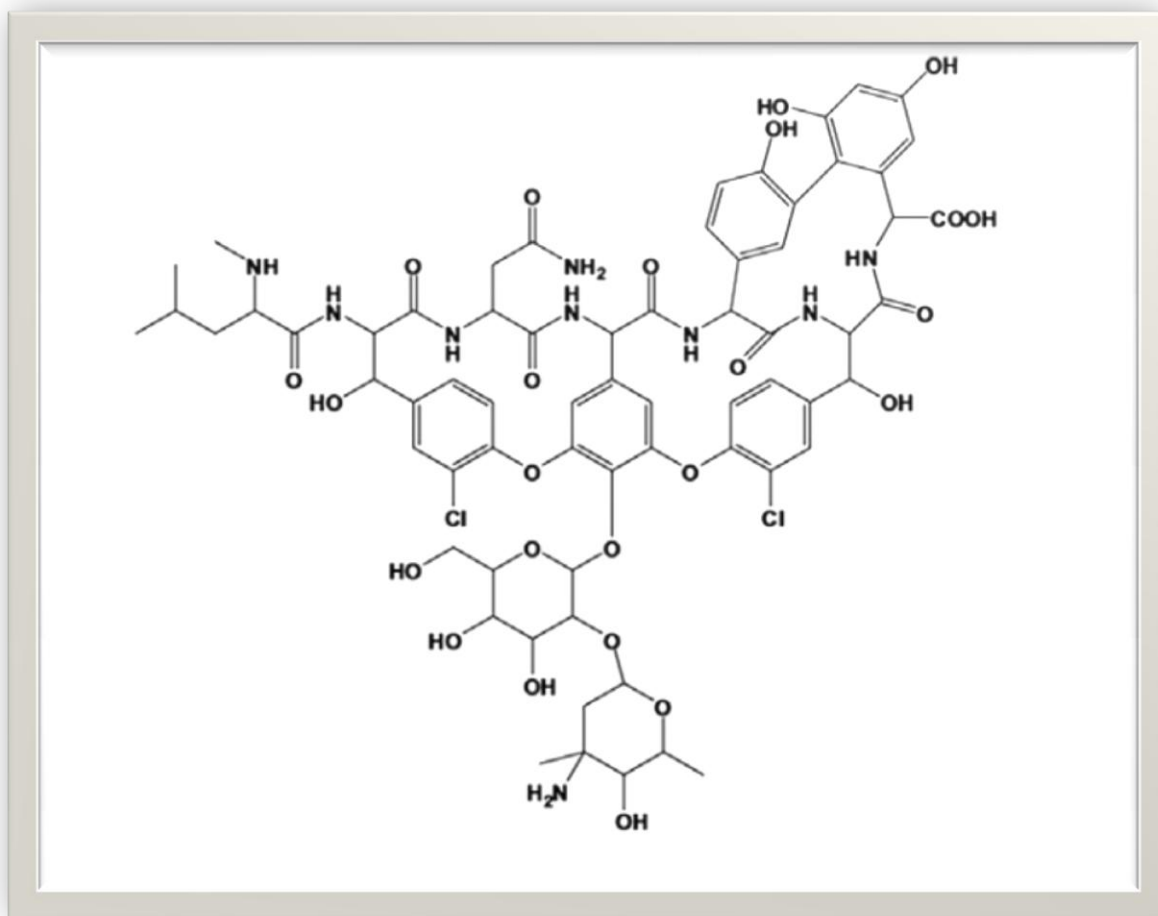
Η τεϊκοπλανίνη παρεμποδίζει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και κατ' επέκταση με τη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της πρωτεΐνης, μέρος της δομής της προσδένεται στο τελικό άκρο D-Ala-D-Ala του μυλπενταπεπτιδίου, εμποδίζοντας την περαιτέρω σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος.

Στην πράξη, τα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν ανοσοχημικές μεθόδους ανάλυσης. Το βασικό μειονέκτημα σ αυτή την περίπτωση είναι οι παρεμποδίσεις και οι διασταυρούμενες αντιδράσεις, οι οποίες μειώνουν σημαντικά την εκλεκτικότητα των μεθόδων αυτών. Πιο συγκεκριμένα, ο ανοσοχημικός προσδιορισμός της τεϊκοπλανίνης υποφέρει από μειωμένη αξιοπιστία στα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, όπου βρίσκονται οι συγκεντρώσεις κλινικής απόφασης. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι, όπως για παράδειγμα οι χρωματογραφικές. Οι πρώτες απόπειρες έγιναν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και ανιχνευτή UV ή φθορισμομετρικό. Στη συνέχεια, ακολούθησαν οι αναλύσεις με απλό τετράπολο, πλήρως ανεπτυγμένες και επικυρωμένες[7]. Ενώ, οι τελευταίες μέθοδοι βασισμένες στο σύστημα LC-MS/MS κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος.

6.3 BANKOMYKINH

Πρόκειται για φυσικό προϊόν του βακτηρίου *Amycolatopsis orientalis*, για αυτό και παρουσιάζονται πολλές παραπλήσιες ενώσεις στο τελικό προϊόν σχετικές με τη διαδικασία της ζύμωσης[8]. Ενδείκνυται για ασθενείς με επίμονες λοιμώξεις gram-θετικών βακτηρίων αλλεργικούς σε πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες. Η κλινική της χρήση χρονολογείται στα 50 έτη, και αντίστοιχα η ανάγκη για προσδιορισμό των επιπέδων στο αίμα έκανε την εμφάνισή της λίγο μετά τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Χρησιμοποιείται τόσο συχνά από τα νοσοκομεία, που θεωρείται δείκτης ρύπανσης των ποταμών από τα νοσοκομειακά απόβλητα. Η συχνή αυτή χρήση οφείλεται στην ιδιότητα του φαρμάκου να καταπολεμά μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη (*S. Aureus*- MRSA). Παρουσιάζει μεγαλύτερη τοξικότητα από την τεϊκοπλανίνη και απαιτεί καθυστέρηση στη διάρκεια της ενδοφλέβιας χορήγησης, από μία έως και δύο ώρες, ανάλογα με τη μάζα εισαγωγής της δραστικής ουσίας στον οργανισμό. Προκαλεί νεφροτοξίκωση, ωτοτοξίκωση και τοξίκωση σχετική με την ενδοφλέβια χορήγηση και τα επίπεδα συγκέντρωσής της, ωστόσο, σχετίζεται κυρίως με τις προσμίξεις, παρά με την ίδια την ένωση. Τελικά, η παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας του φαρμάκου στο αίμα είναι σημαντική τόσο για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, όσο και για την αποφυγή πιθανής τοξίκωσης, με αποτέλεσμα να έχει γίνει εκτεταμένη προσπάθεια για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της, τις τελευταίες δεκαετίες[9].

Η ιστορία της ανάλυσης της βανκομυκίνης ξεκινά με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας περί του 1982, με μικροβιολογικές αναλύσεις, με ανοσοχημεία πολαρικού φθορισμού, ενώ μέχρι σήμερα φτάνουν προσδιορισμοί όπως ανοσοχημεία με ενζυμικό πολλαπλασιασμό, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και υγρή χρωματογραφία[8]. Το 2001 αναπτύχθηκε μέθοδος LC-MS/MS με εν-ροή εκχύλιση του δείγματος[10].



Σχήμα 1.8. Χημική δομή της βανκομικίνης.

Πίνακας 1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες της τείκοπλανίνης και της βανκομικίνη[11].

Παράμετροι	Τείκοπλανίνη	Βανκομικίνη
Υδρόφοβες αλυσίδες	1	0
Αρ. ΟΗ ομάδων	14	3
Αρ. αμινομάδων	1	2
Αρ. καρβοξυλομάδων	1	1
Αρ. αμιδομάδων	8	7
Αρ. αρωμ. ομάδων	7	5
Ισοηλεκτρικό σημείο	4,2 , 6,5	7,2
Log P	0.4	-3.1

7. Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ

7.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η ομάδα των **β-λακταμών** περιλαμβάνει ουσίες οι οποίες στο μόριό τους περιέχουν τον πυρήνα της β-λακτάμης. Τα μέλη της ομάδας είναι:

α) Οι πενικιλίνες, το μόριο των οποίων πλην του τετραμελούς δακτυλίου της β-λακτάμης περιλαμβάνει και τον πενταμελή δακτύλιο της θειαζολιδίνης,

β) Οι κεφαλοσπορίνες, με τον β-λακταμικό και τον εξαμελή δακτύλιο της διυδροθειαζίνης,

γ) Οι μονομπακτάμες, οι οποίες στον βασικό τους πυρήνα περιέχουν μόνο τον δακτύλιο της β-λακτάμης, και

δ) Οι καρμπαπενέμες [4]

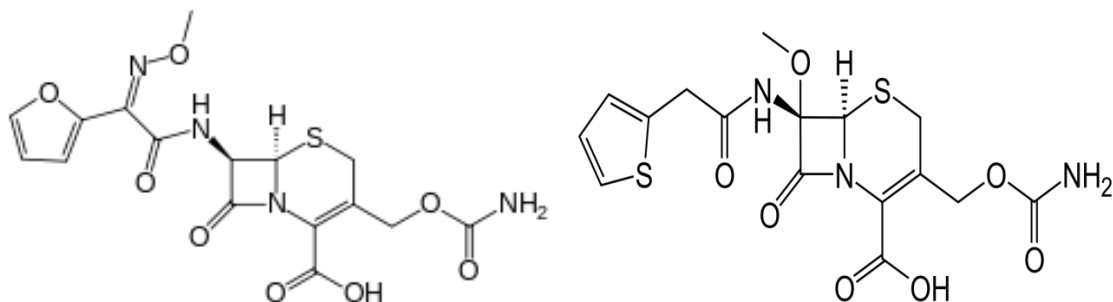
7.2 ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ

Οι κεφαλοσπορίνες είναι αντιβιοτικές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των β-λακταμών, με απαρχές στο Acetamoniun, το οποίο ήταν γνωστό αρχικά ως “Cephalosporium”. Οι κεφαλοσπορίνες απομονώθηκαν από καλλιέργεια *Cephalosporium acetamoniun* που αναπτύχθηκε σε απόνερα στη Σαρδηνεία από τον ιταλό ερευνητή Giuseppe Brotzu. Το 7-αμινοκεφαλοσπορινικό οξύ παράγεται με υδρόλυση της βιολογικά δραστηκής κεφαλοσπορίνης C. Αυτό το οξύ προσδίδει τη χημική δομή στις κεφαλοσπορίνες, μέσω σύντηξης του δακτυλίου της β-λακτάμης με το δακτύλιο διυδροθειαζίνης, οι οποίες αργότερα διαφέρουν στη φύση των συστατικών που προσδένονται στις θέσεις 3 ή/και 7 στον δακτύλιο της κεφαλής. Τέλος, η βακτηριοστατική δράση των κεφαλοσπορινών είναι παρόμοια με αυτή των υπόλοιπων β-λακταμών όπως η πενικιλίνη, με τη διαφορά ότι είναι ανθεκτικά στις πενικιλινάσες[12].

7.2.1 ΚΕΦΟΥΡΟΞΙΜΗ

Το άλας της κεφουροξίμης με νάτριο είναι αντιβιοτικό δεύτερης γενιάς και ανήκει στην κατηγορία των κεφαλοσπορινών. Χρησιμοποιείται τόσο στην ανθρώπινη θεραπεία όσο και στη ζωική, με εξαιρετικά αποτελέσματα ακόμη στην

προφύλαξη από βακτηριακή λοίμωξη. Οφείλει την ευρεία χρήση του στο ευρύ φάσμα αντιβακτηριακής δράσης (σε gram θετικά και αρνητικά βακτήρια), τη σταθερότητα απέναντι στις β-λακταμάσες και στο μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, σε σύγκριση με άλλες κεφαλοσπορίνες ($t_{1/2}$ = 80 λεπτά) που συνεπάγεται με υψηλή δραστική συγκέντρωση της ουσίας σε πλάσμα και ιστούς ανθρώπου.



Σχήμα 1.9. Αριστερά: η χημική δομή της Κεφουροξίμης, δεξιά: της Κεφοξιτίνης.

Οι πιο παλιές αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού της κεφουροξίμης σε βιολογικά δείγματα είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με ανιχνευτή υπεριώδους και οι μέθοδοι βασισμένες σε μικροβιολογικές τεχνικές. Επίσης, υπήρξαν ποιοτικές μέθοδοι ανάλυσης στο παρελθόν. Ωστόσο μέχρι το 2004 δεν είχε πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός της κεφουροξίμης με φασματογράφο μάζας[13].

7.2.2 ΚΕΦΟΞΙΤΙΝΗ

Το άλας της κεφοξιτίνης με νάτριο είναι αντιβιοτικό δεύτερης γενιάς. Η βακτηριοστατική του δράση επικεντρώνεται στην παρεμπόδιση της σύνθεσης της στιβάδας πεπτιδογλυκανίου των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων προκαλώντας ασυνέχεια στη δομή τους. Η βιβλιογραφία σχετικά με την ανάλυση της ένωσης αναφέρεται σε διάφορες μεθόδους ανάλυσης, όπως χρωματομετρικές, UV φασματοσκοπία, φθορισμομετρία, μικροβιολογικές, LC-MS/MS, υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία, ενώ αναφέρθηκε και η χρήση υδρολυτικών και οξειδωτικών αντιδραστηρίων, προκειμένου για την ανάλυση σε βιολογικά δείγματα[12].

Πίνακας 1.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες της κεφοξιτίνης και της κεφουροξίμης[14].

Παράμετροι	Κεφοξιτίνη	Κεφουροξίμη
Διαλ/τα στο νερό	Πλήρως διαλυτά τα άλατα με νάτριο	
pKa (όξινο)	3,59	3,15
pKa (βασικό)	-3,8	-1,1
Υδρόφοβες αλυσίδες	0	0
Δότης H ⁺	3	3
Δέκτης H ⁺	6	7
Πολική Επιφάνεια	148 Å ²	174 Å ²
Log P	0,22	-0,16

8. ΛΙΠΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

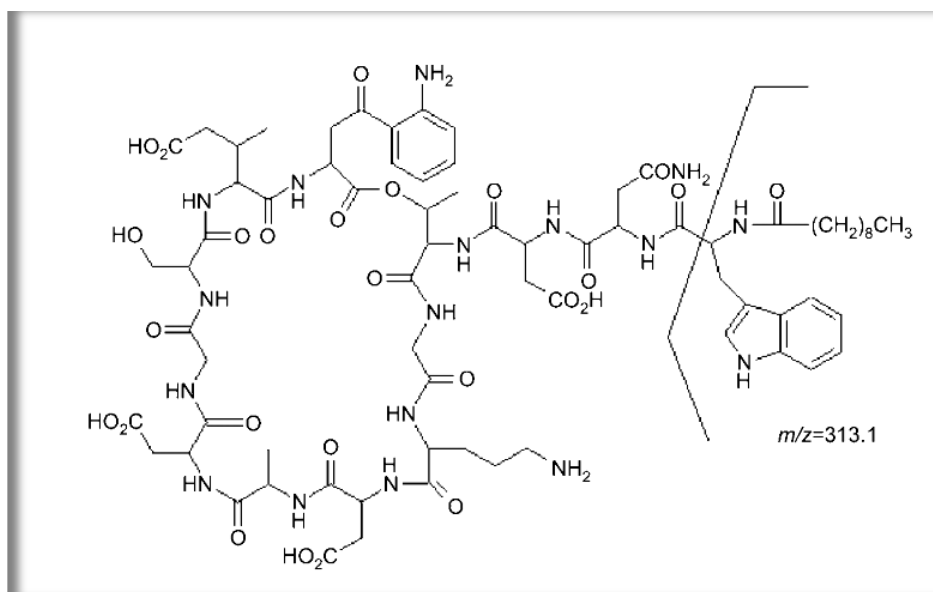
8.1 ΓΕΝΙΚΑ

Όπως προκύπτει και από την ονομασία, τα λιποπεπτίδια διαφέρουν από τα συμβατικά πεπτίδια, λόγω της σύνδεσης μιας ακυλο αλυσίδας σε ένα γραμμικό ή κυκλικό (ολιγο) πεπτίδιο παραπέμποντας σε αμφιφιλικές ιδιότητες. Τα φυσικά λιποπεπτίδια προέρχονται κυρίως από βακτήριο ή μύκητα, εκ των οποίων τα είδη *Pseudomonas* και *Bacillus* έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Οι περισσότερες λιποπεπτιδικές ενώσεις συγκεντρώνουν την αντιβακτηριακή τους δράση στη διάνοιξη πόρου στις μεμβράνες των βακτηρίων προκαλώντας το θάνατό τους. Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκαν σαν καταληκτική λύση σε λοιμώξεις προκαλούμενες από μικροοργανισμούς ανθεκτικούς σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα[15].

8.2 ΔΑΠΤΟΜΥΚΙΝΗ

Η δαπτομυκίνη είναι κυκλικό λιποπεπτίδιο που προέρχεται από τη ζύμωση του μικροοργανισμού *Streptomyces roseosporus* και δρα ενάντια στους Gram-θετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε σύγκριση με άλλα αντιβιοτικά (π.χ. το γλυκοπεπτίδιο αντιβιοτικό βανκομυκίνη και το πολυένιο αντιβιοτικό ναταμυκίνη) η δαπτομυκίνη έχει μηχανισμό δράσης που εξαρτάται από το ασβέστιο, συμπεριλαμβανομένης και της σύνδεσης στις μεμβράνες του βακτηριακού κυττάρου. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση του εκκινητή κατά την παραγωγή του αντιβιοτικού και βρέθηκε ότι αφορά στο πλήθος των αντιβιοτικών με δομές πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από αμινοξέα ή μόρια ακέτυλοσυνενζύμου A. Αυτό αποτελεί αντικείμενο μελέτης πρωτεομικής ανάλυσης[16].

Ο προσδιορισμός της δαπτομυκίνης στο πλάσμα του ανθρώπινου αίματος έχει πραγματοποιηθεί με μικροβιολογικές αναλύσεις, με υψηλής και υπερυψηλής υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, ή με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας. Ενώ, οι τελευταίες τάσεις οδηγούν προς την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας σε σειρά.



Σχήμα 1.10. Η χημική δομή της Δαπτομυκίνης με το θραύσμα προσδιορισμού της.

Πίνακας 1.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες της δαπτομυκίνης[14].

Παράμετροι	Δαπτομυκίνη
pKa	1,27-4,07
Υδρόφοβες αλυσίδες	0
Δότης H ⁺	25
Δέκτης H ⁺	43
Πολική Επιφάνεια	702 Å ²
Ισοηλεκτρικό σημείο	3,8
Log P	-0,47

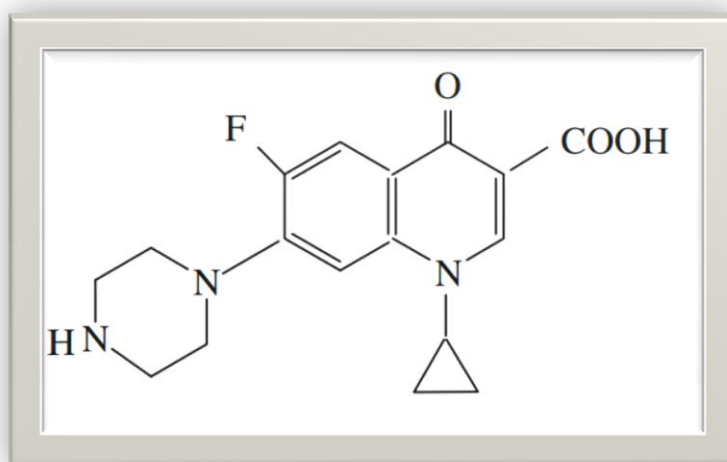
9. ΦΘΟΡΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

9.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι κινολόνες είναι από τις πιο ισχυρές ομάδες συνθετικών αντιβιοτικών και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα στην ιατρική και την κτηνιατρική. Η δράση τους βασίζεται στην επίδρασή τους στο DNA. Οι φθοροκινολόνες ανήκουν στη δεύτερη γενιά των κινολονών και χαρακτηρίζονται από καλύτερη αποτελεσματικότητα απέναντι στα Gram-αρνητικά και Gram-θετικά παθογόνα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα υπόλοιπα αντιβιοτικά[17].

9.2 ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ

Η σιπροφλοξασίνη αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη δεύτερης γενιάς κινολόνη και μπορεί να χορηγηθεί από όλες τις δυνατές οδούς (παρεντερική, στοματική και τοπικά). Έχει αναγνωριστεί από τον USFDA ως αντιμικροβιακός παράγοντας από το έτος 1987.



Σχήμα 1.11. Η χημική δομή της Σιπροφλοξασίνης.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ανάλυσης της σιπροφλοξασίνης, συνήθως ταυτόχρονα με την ανάλυση κι άλλων κινολονών. Μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία φανερώνει ότι έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης στο παρελθόν. Αυτές περιλαμβάνουν

φασματοφωτομετρικές, υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και μικρορευστού χρωματογραφικές μεθόδους[18]. Τα αντιβιοτικά αυτά έχουν απασχολήσει κυρίως τομείς του περιβάλλοντος και των τροφίμων, επειδή είναι συνθετικά και είναι πιο δύσκολη η βιοαποικοδόμησή τους.

Πίνακας 1.5. Φυσικοχημικές ιδιότητες της σιπροφλοξασίνης[14].

Παράμετροι	Σιπροφλοξασίνη
Διαλ/τητα στο νερό	30 mg/mL
pKa (όξινο)	5,76
pKa (βασικό)	8,68
Υδρόφοβες αλυσίδες	0
Αρ. OH ομάδων	0
Αρ. αμινομάδων	1
Αρ. καρβοξυλομάδων	1
Αρ. αμιδομάδων	0
Αρ. αρωμ. ομάδων	2
Ισοηλεκτρικό σημείο	7,4
Πολική Επιφάνεια	72,88 Å ²
Log P	0,28

10. ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΧΙΑΣΤΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ (ACL Reconstruction) ΜΕ ΑΡΘΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

10.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι χιαστοί σύνδεσμοι είναι οι δύο κύριοι σταθεροποιητές της άρθρωσης και συνδέουν το μηρό με την κνήμη (Πρόσθιος Χιαστός, Anterior Cruciate Ligament (ΠΧΣ) – Οπίσθιος Χιαστός, Posterior Cruciate Ligament (ΟΠΧ). Κύριος σταθεροποιητικός παράγοντας που εμποδίζει κυρίως την μπρος-πίσω κίνηση της κνήμης σε σχέση με το μηρό είναι ο ΠΧΣ και απώλεια αυτού προκαλεί μεγάλη αστάθεια στην άρθρωση του γόνατος.

Ο σύνδεσμος τραυματίζεται συνήθως όταν ασκηθεί υπερβολική στροφική δύναμη στο γόνατο, κατά τη διάρκεια ατυχήματος (πτώση, τροχαίο) ή αθλητική δραστηριότητα (ποδόσφαιρο, μπάσκετ, σκι κλπ). Αν επέλθει ρήξη του συνδέσμου, η αντιμετώπιση είναι κατά βάση χειρουργική και ο σύνδεσμος αντικαθίσταται με μόσχευμα που λαμβάνεται από τον ίδιο τον ασθενή. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας, η χειρουργική επέμβαση έχει απλοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό. Η αρθροσκόπηση αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική χειρουργική μέθοδο.

Η λοίμωξη μετά από λαπαροσκοπική επέμβαση στο γόνατο προκειμένου για την αντιμετώπιση της ρήξης χιαστού συνδέσμου είναι σπάνιο φαινόμενο, ωστόσο αποτελεί πιθανά καταστροφική μετεγχειρητική επιπλοκή. Επιπρόσθετοι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε λοίμωξη μπορεί να είναι ο διαβήτης, το κάπνισμα, προηγούμενη χειρουργική επέμβαση ή οι συνακόλουθες χειρουργικές διαδικασίες[19].



Εικόνα 1.1. Μέρος της επέμβασης του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου.

11.2 ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ (DRAINED FLUID)

Δε βρέθηκε βιβλιογραφική αναφορά σχετική με τη μελέτη αυτού του υγρού. Πρόκειται για το υγρό που παροχετεύεται με το πέρας της επέμβασης, μέσω ενός σωλήνα σε ένα άσηπτο σακουλάκι. Το υγρό αυτό αποτελείται από ορό αίματος και ολικό αίμα σε αναλογία μάζας που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

11. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC-MS)

11.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η ανάλυση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υποστρώματα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας πρότυπα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου ποιότητας επιμολυσμένα με πρότυπα αναφοράς. Η καθαρότητα των προτύπων αναφοράς μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Γι αυτό το λόγο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αυθεντικά αναλυτικά πρότυπα αναφοράς γνωστής ταυτότητας και καθαρότητας. Αν είναι δυνατόν, θα πρέπει να είναι ταυτόσημα με την προσδιοριζόμενη ουσία ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια αποδεκτή χημική δομή (ελεύθερο οξύ ή βάση, άλας ή εστέρας) γνωστής καθαρότητας.

11.2. ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στάδια ανάπτυξης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας :

- Συλλογή πληροφοριών από βιβλιογραφικές πηγές, για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν
- Έλεγχος διαλυτότητάς τους με χρήση των προτύπων ουσιών
- Σάρωση στο φασματογράφο μάζας και ανάπτυξη μεθόδου σε αυτόν
- Επιλογή κινητής και στατικής φάσης
- Επιλογή μεθόδου εκχύλισης
- Επιλογή εσωτερικού προτύπου
- Επιλογή της χρωματογραφικής μεθόδου (με βάση τη διαλυτότητα και το χρόνο συγκράτησης του προσδιοριζόμενου συστατικού)

12.ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC-MS)

12.1 ΓΕΝΙΚΑ

Για κάθε προσδιοριζόμενη ουσία στο βιολογικό υπόστρωμα θα πρέπει να γίνεται επικύρωση της μεθόδου. Τόσο η ανάπτυξη όσο και η επικύρωση μιας βιοαναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να περιλαμβάνουν μελέτες της εκλεκτικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας, της ανάκτησης, την καμπύλη βαθμονόμησης, την ευαισθησία, την αναπαραγωγιμότητα και τη σταθερότητα σε επιμολυσμένα δείγματα.

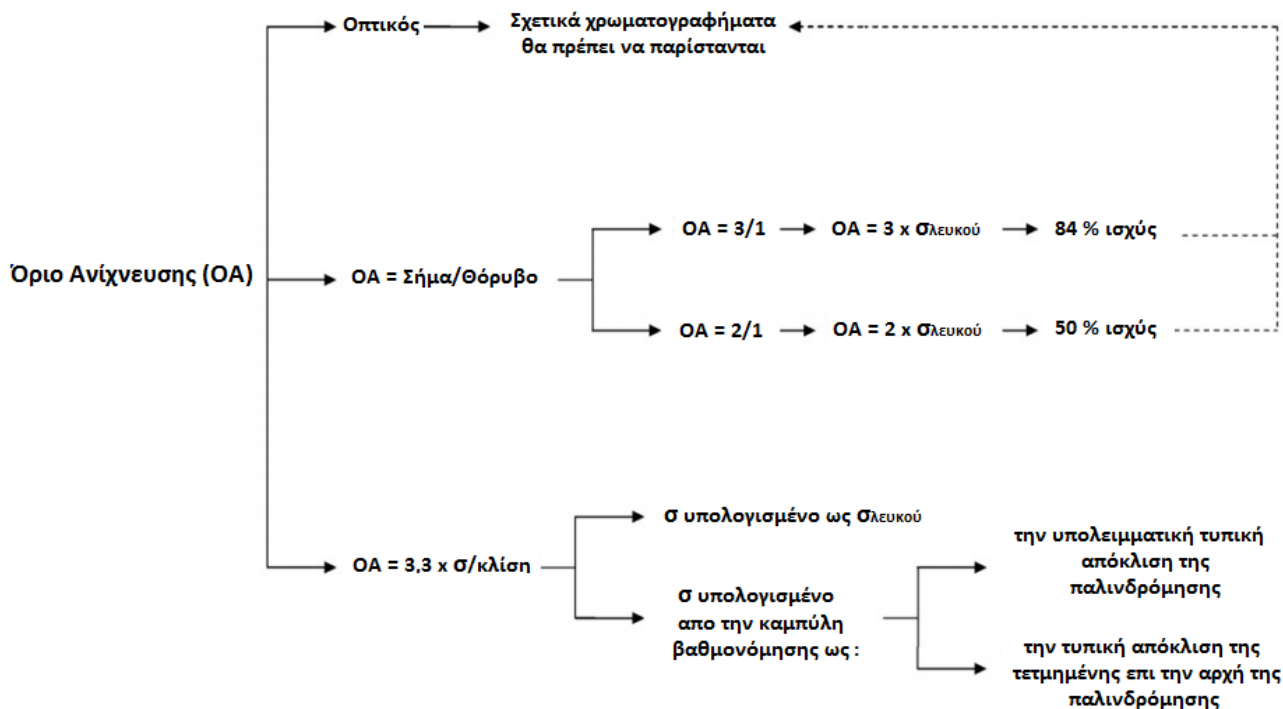
12.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Η καμπύλη βαθμονόμησης δίνει τη σχέση μεταξύ της απόκρισης του οργάνου και της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού. Η σχέση απόκρισης-συγκέντρωσης θα πρέπει να είναι συνεχής και αναπαραγώγιμη. Θα πρέπει το κάθε ένα από τα προσδιοριζόμενα συστατικά να αναπτύσσει τη δική του καμπύλη βαθμονόμησης, αν και μπορούν να συνυπάρχουν στα πρότυπα διαλύματα. Η καμπύλη θα πρέπει να παρασκευάζεται στο βιολογικό υπόστρωμα των δειγμάτων, επιμολύνοντας με γνωστή συγκέντρωση προσδιοριζόμενου συστατικού. Σε σπάνιες περιπτώσεις μόνο, όταν λευκά δείγματα δε μπορούν να παραληφθούν (π.χ. εγκεφαλονωτιαίο υγρό), τότε χρησιμοποιούνται τεχνητά υποστρώματα με αιτιολόγηση. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων θα πρέπει να επιλεγούν στο εύρος που αναμένονται αυτές των πραγματικών δειγμάτων μιας συγκεκριμένης μελέτης. Μια καμπύλη θα πρέπει να αποτελείται από λευκό δείγμα (δείγμα που προκατεργάστηκε χωρίς την προσθήκη της προσδιοριζόμενης ένωσης ή του εσωτερικού προτύπου), ένα μηδενικό δείγμα (σαν το πρώτο, αλλά με εσωτερικό πρότυπο), και τουλάχιστον έξι μη-μηδενικά δείγματα (δείγματα επιμολυσμένα με προσδιοριζόμενη ουσία και εσωτερικό πρότυπο) που καλύπτουν το προβλεπόμενο εύρος συγκεντρώσεων και το κατώτατο όριο ποσοτικής αποτίμησης (Lower Limit of Quantification).

12.3 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD-Limit of Detection)

Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης, που μπορεί πρακτικά να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα, χωρίς απαραίτητα να προσδιορίζεται ποσοτικά από μία αναλυτική μέθοδο. Υπάρχουν διάφορα κριτήρια για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης. Στο σχήμα 1.12 αναπαρίσταται μια σύνοψη αυτών. Οπτικός καθορισμός του ορίου ανίχνευσης λαμβάνει χώρα όταν παρασκευάζονται δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και καθορίζεται το επίπεδο στο οποίο η προσδιοριζόμενη ένωση μπορεί να ανιχνευθεί. Αυτό πετυχαίνεται με επαναληπτικές μετρήσεις διαλυμάτων που αραιώνονται μέχρις ότου το προσδιοριζόμενο συστατικό να πάψει να ανιχνεύεται οπτικά. Σ αυτήν την περίπτωση θα πρέπει να παρέχονται τα αντίστοιχα πειστήρια-χρωματογραφήματα. Μια άλλη προσέγγιση είναι ο υπολογισμός μέσω του λόγου του σήματος προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης, με την προϋπόθεση ότι υφίσταται η κανονικότητα των δεδομένων και αυτά δεν επηρεάζονται από υπολειμματικές τιμές. Αυτή η μέθοδος είναι η πιο δημοφιλής. Ο τρίτος τρόπος υπολογισμού βασίζεται στη σχέση του σήματος προς θόρυβο και προσδιορίζεται συγκρίνοντας τις αποκρίσεις χαμηλών συγκεντρώσεων με αυτές λευκών δειγμάτων, σε συγκεντρώσεις που η απόκρισή τους εξισώνεται με τρεις ή δύο φορές την τυπική απόκλιση του λευκού δείγματος ($3 \times \sigma_{\text{ΛΕΥΚΟΥ}}$ ή $2 \times \sigma_{\text{ΛΕΥΚΟΥ}}$). Όταν χρησιμοποιείται ο συντελεστής τρία, η πιθανότητα β για την απόκτηση εσφαλμένου αρνητικού αποτελέσματος είναι 16%.

Η τελευταία προσέγγιση που παρίσταται στο σχήμα 1.12 βασίζεται στο πηλίκο δύο αναλυτικών παραμέτρων: της τυπικής απόκλισης (σ) και της κλίσης της καμπύλης παλινδρόμησης (ϕ). Η προηγούμενη παράμετρος μπορεί να εκφραστεί ως η τυπική απόκλιση του λευκού δείγματος ($\sigma_{\text{ΛΕΥΚΟΥ}}$), ως υπολειμματική τυπική απόκλιση της καμπύλης βαθμονόμησης ή ως τυπική απόκλιση της τετμημένης επί την αρχή των αξόνων αυτής. Οι οδηγίες σχετικά με την επικύρωση των μεθόδων δεν εκφράζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις προσεγγίσεις που αναπαριστά το σχήμα 1.12. Ωστόσο, προτείνεται η αναφορά του ορίου ανίχνευσης να συνοδεύεται από τον καθορισμό του τρόπου με τον οποίο υπολογίστηκε[20].



Σχήμα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση μεθόδων υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης.

12.4 ΌΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ (Limit of Quantification)

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα. Όπως το όριο ανίχνευσης, έτσι και το όριο ποσοτικής αποτίμησης προσδιορίζεται με διάφορους τρόπους:

1.Οπτικός προσδιορισμός: δείγματα γνωστής συγκέντρωσης παρασκευάζονται και το ελάχιστο επίπεδο το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αποδεκτή αβεβαιότητα είναι το όριο ποσοτικής αποτίμησης.

2.Λόγος σήμα/θόρυβο: οι αποκρίσεις των δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις συγκρίνονται με λευκά δείγματα μέχρι μια συγκέντρωση που παρέχει αναλυτικό αποτέλεσμα δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του λευκού δείγματος ($10 \times \sigma_{\text{ΛΕΥΚΟΥ}}$).

3.Λόγος τυπική απόκλιση/κλίση ($LOQ = 10 \times \sigma/\varphi$): οι παράμετροι σ και φ υπολογίζονται όπως και στο LOD.

Μια άλλη προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιείται πιο συχνά στη βιβλιογραφία και αφορά σε πιο γενικευμένη μορφή ορίζει το όριο ποσοτικής αποτίμησης ως την πιο αναπαραγώγιμα προσδιορίσιμη τιμή πάνω από το LOD ($LOQ = n \times LOD$)[20].

Σύμφωνα με τον FDA, το χαμηλότερο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης μπορεί να γίνει αποδεκτό ως LOQ, με τις εξής προϋποθέσεις:

- Η απόκριση του προσδιοριζόμενου συστατικού είναι τουλάχιστον πέντε φορές μεγαλύτερη αυτής του λευκού δείγματος
- Η κορυφή του συστατικού να είναι εμφανής και ταυτοποιήσιμη, και η σχετική τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων που θα υπολογιστούν μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης να μην ξεπερνά το 20% όπως και η ακρίβειά του.
- Το κατώτερο όριο ποσοτικής αποτίμησης θα πρέπει να υπολογίζεται με τη χρήση τουλάχιστον πέντε δειγμάτων.

12.5 ΑΚΡΙΒΕΙΑ, ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Ο όρος **ακρίβεια** περιγράφει την απόκλιση της μέσης τιμής αποτελέσματος που προέκυψε από τη μέθοδο συγκρινόμενη με την πραγματική τιμή συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ένωσης. Η ακρίβεια προσδιορίζεται με επαναληπτική ανάλυση δειγμάτων τα οποία περιέχουν γνωστές ποσότητες του προσδιοριζόμενου συστατικού (π.χ. QC-quality control). Η ακρίβεια θα πρέπει να υπολογισθεί με τουλάχιστον πέντε προσδιορισμούς για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Τα επίπεδα συγκέντρωσης θα πρέπει να είναι τρία και να καλύπτουν το εύρος ποσοτικής αποτίμησης που παρέχει η καμπύλη βαθμονόμησης. Η μέση τιμή θα πρέπει να βρίσκεται εντός του 15% της ονομαστικής συγκέντρωσης, εκτός του κατώτατου ορίου ποσοτικής αποτίμησης, στο οποίο επιτρέπεται μέχρι και 20% απόκλιση. Η απόκλιση της μέσης από την ονομαστική συγκέντρωση μας παρέχει την ακρίβεια.

Ο όρος **πιστότητα** μιας αναλυτικής μεθόδου περιγράφει την απόκλιση των μετρήσεων, όταν αυτές προκύπτουν από επαναληπτικές μετρήσεις του ίδιου,

ομογενοποιημένου εκχυλίσματος. Θα πρέπει να γίνουν τουλάχιστον πέντε μετρήσεις για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η πιστότητα που προσδιορίζεται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης δε θα πρέπει να ξεπερνάει το 15% του ο συντελεστής μεταβλητότητας, εκτός της συγκέντρωσης στο LLOQ (κατώτατο όριο ποσοτικής αποτίμησης) που μπορεί να φτάσει ως και 20%. Η πιστότητα χωρίζεται στην επαναληψιμότητα μιας ανάλυσης και στην ενδιάμεση πιστότητα και μπορεί να συμπεριλάβει διαφορετικούς αναλυτές, εξοπλισμό, αντιδραστήρια, ή και εργαστήρια.

Τα δείγματα με συγκεντρώσεις που βρίσκονται πάνω από το υψηλότερο σημείο της καμπύλης, θα πρέπει να αραιωθούν. Η ακρίβεια και η πιστότητα των αραιωμένων δειγμάτων θα πρέπει να ελεγχθεί και να αναφερθεί.

12.6 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Γραμμικότητα είναι η ικανότητα της μεθόδου, σε δεδομένη κλίμακα συγκεντρώσεων, να παρέχει αποδεκτή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων και της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης ουσίας στα δείγματα. Η γραμμικότητα των προτεινόμενων μεθόδων, σε κατάλληλη περιοχή τιμών, πρέπει να προσδιορίζεται και να αναφέρεται. Για τον προσδιορισμό της καθαρής δραστικής ουσίας, η περιοχή βαθμονόμησης πρέπει να εκτείνεται (τουλάχιστον κατά 20 %) πέραν της υψηλότερης και χαμηλότερης ονομαστικής συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας σε σχετικά διαλύματα για ανάλυση. Πρέπει να διεξάγονται διπλές δοκιμές βαθμονόμησης σε τρεις ή περισσότερες συγκεντρώσεις. Στην αντίθετη περίπτωση, είναι αποδεκτές οι απλές δοκιμές σε πέντε συγκεντρώσεις. Οι αναφορές που υποβάλλονται πρέπει να περιλαμβάνουν την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης και το συντελεστή προσδιορισμού, καθώς και αντιπροσωπευτικά και κατάλληλα επισημασμένα πειστήρια της ανάλυσης, π.χ. χρωματογραφήματα.

12.7 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η ανάκτηση της εκχύλισης είναι η απόκριση του οργάνου, η οποία προκύπτει από επιμόλυνση και εκχύλιση μιας ποσότητας ουσίας από το

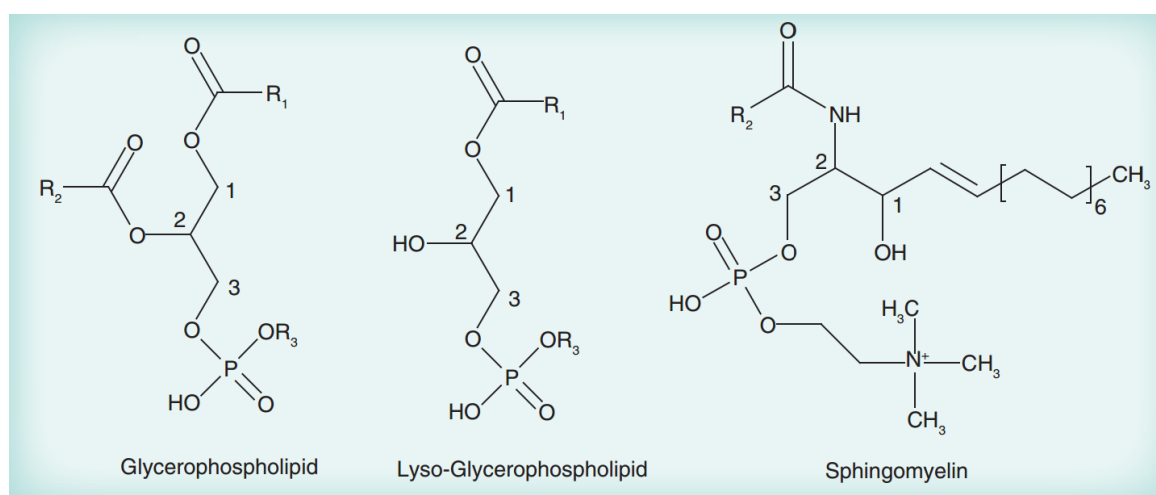
βιολογικό υπόστρωμα, συγκρίνοντας με την απόκριση όταν αυτή η ποσότητα αναλυθεί σε διαλύτες. Η ανάκτηση μιας ουσίας δεν είναι απαραίτητο να είναι 100%, ωστόσο θα πρέπει να είναι ακριβής και αναπαραγώγιμη. Οι δοκιμές ανάκτησης θα πρέπει να διεκπεραιωθούν σε τρεις συγκεντρώσεις (χαμηλή, υψηλή και μεσαία), και να συγκριθούν οι ποσότητες ουσίας που εκχυλίστηκαν με αντίστοιχα διαλύματα μη εκχυλισμένων ποσοτήτων.

12.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Η επίδραση υποστρώματος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις αναλύσεις με MS βιολογικών, περιβαλλοντικών και τροφικών δειγμάτων. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην επίδραση αυτή δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η επίδραση υποστρώματος μπορεί να μειώσει σημαντικά την αξιοπιστία μιας μεθόδου ανάλυσης, μέσω της απόκλισης της καμπύλης αναφοράς από την ορθή. Υπάρχουν δύο τύποι επίδρασης, οι επιδράσεις που μειώνουν και οι επιδράσεις που αυξάνουν το σήμα. Μια εξήγηση για τη μείωση του σήματος των προσδιοριζόμενων ουσιών είναι ο ανταγωνισμός και οι παρεμποδίσεις κατά τη διάρκεια του ιονισμού μεταξύ των ουσιών και συνεκλουόμενων ενώσεων (π.χ. μείωση της επιφανειακής τάσης των μικροσταγόνων στην πηγή ηλεκτροψεκασμού). Αυτές οι ενώσεις μπορεί να είναι ενδογενούς ή εξωγενούς φύσεως. Οι ενδογενείς αποτελούν μέρος του υποστρώματος του δείγματος (π.χ. πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια ή άλατα), ενώ οι εξωγενείς ενώσεις μπορεί να αποτελούν μέρος του χρωματογραφικού συστήματος (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα) ή να εισαχθούν στο εκχύλισμα του δείγματος κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας του (π.χ. πλαστικοποιητές ή πλαστικά μονομερή από στήλες εκχύλισης στερεής φάσης).

Τα φωσφολιπίδια εμπλέκονται σε πολλές βιολογικού τύπου διεργασίες και είναι τα κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Ως εκ τούτου, είναι παρόντα σε πολλά βιολογικά υγρά. Υπάρχουν δύο κύριες δομικές κατηγορίες: τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τις σφιγγομυελίνες. Τα γλυκεροφωσφολιπίδια συντίθενται από γλυκερίνη συνδεδεμένη με τρεις διαφορετικούς υποκαταστάτες. Στον άνθρακα ένα μπορεί να συνδεέται ένα λιπαρό οξύ, ένα αλκύλιο ή ένα βινύλιο. Στον άνθρακα δύο βρίσκεται ένα μακριάς αλυσίδας λιπαρό οξύ. Στον

άνθρακα τρία βρίσκεται ένας εστέρας φωσφορικού οξέος συνδεδεμένος με μια πολική ομάδα. Πιθανές πολικές ομάδες στον άνθρακα τρία είναι η χολίνη, η αιθανολαμίνη, η σερίνη, η ινοσιτόλη, η γλυκερίνη και το φωσφατιδικό οξύ. Αντίθετα, τα λυσο-γλυκεροφωσφολιπίδια δεν είναι εστεροποιημένα στον άνθρακα δύο. Ο υποκαταστάτης στη θέση δύο είναι μια υδροξυλομάδα. Ο σκελετός των σφιγγομυελινών αποτελείται από τη σφιγγοσίνη, η οποία συνδέεται με ένα αμιδικό λιπαρό οξύ στον άνθρακα δύο. Στον άνθρακα τρία η φωσφορική ομάδα εστεροποιείται με μια πολική ομάδα χολίνης. Η φωσφατιδυλοχολίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία συγκριτικά με τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια στο ανθρώπινο πλάσμα[21].



Σχήμα 1.13. Τα κυριότερα είδη φωσφολιπιδίων στο ανθρώπινο αίμα.

12.9 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Εκλεκτικότητα είναι η ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να διαφοροποιεί και να ποσοτικοποιεί την προσδιοριζόμενη ένωση παρουσία άλλων συστατικών του δείγματος. Θα πρέπει να παρέχονται αποδεικτικά στοιχεία για την ταυτότητα της αναλυόμενης ένωσης. Αναλύσεις λευκών δειγμάτων του αναλυόμενου υποστρώματος (πλάσμα, ορός, ή άλλο υπόστρωμα) θα πρέπει να λαμβάνεται από τουλάχιστον έξι πηγές. Το κάθε ένα λευκό δείγμα θα πρέπει να ελεγχθεί για

παρεμποδίσσεις και η εκλεκτικότητα θα πρέπει να εξασφαλιστεί στο κατώτατο όριο ποσοτικής αποτίμησης.

Δυναμικά παρεμποδιστικές ουσίες σε ένα βιολογικό υπόστρωμα μπορεί να είναι ενδογενή συστατικά του δείγματος, μεταβολίτες, προϊόντα αποικοδόμησης, και στη συγκεκριμένη μελέτη παράπλευρα φάρμακα ή ξενοβιοτικά. Κοινώς, σε μία πολύ-μέθοδο θα πρέπει για κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό να γίνεται έλεγχος παρεμποδίσεων από τα άλλα.

12.10 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η ευαισθησία ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα (π.χ. LLOQ).

12.11 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Οι σταθερότητα των φαρμάκων σε ένα βιολογικό υγρό είναι παράγοντας σχετικός με τις συνθήκες αποθήκευσης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, του υποστρώματος και του δοχείου περισυλλογής. Ο έλεγχος της σταθερότητας των προσδιοριζόμενων συστατικών γίνεται κατά τη δειγματοληψία και τη διαχείριση των δειγμάτων, για μεγάλο χρονικό διάστημα (παγωμένο στην κατάψυξη) και μικρό χρονικό διάστημα (πάγκος εργασίας και θερμοκρασία δωματίου), μετά από κύκλους ψύξης-απόψυξης και κατά τη χρονική διάρκεια μέχρι την ανάλυσή του. Επίσης, θα πρέπει να συμπεριληφθεί ο έλεγχος των αποθεματικών πρότυπων διαλυμάτων. Τελικά, όλα τα δείγματα ελέγχου της σταθερότητας παρασκευάζονται με λευκά δείγματα και θα πρέπει να συγκρίνονται με φρέσκα, παρασκευασμένα λίγο πριν την ανάλυσή τους. Θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις στο κάθε δείγμα υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης, ενώ τα αποτελέσματα θα πρέπει να βρίσκονται εντός του 15% της ονομαστικής συγκέντρωσης.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει υπερισχύσει η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά, καθώς παρέχει πιο ευαίσθητες και εκλεκτικές μεθόδους ανάλυσης. Παράλληλα, γίνεται σημαντική προσπάθεια για απλοποίηση των μεθόδων ανάλυσης και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων αντιβιοτικών ουσιών σε διάφορα υποστρώματα. Προς διευκόλυνση του αναγνώστη, οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα με παραπομπές. Στη συνέχεια, οι παραπομπές συνδέονται με παραγράφους επέκτασης των πληροφοριών, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο.

Πίνακας 1.6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Παρατηρήσεις	Τεχνική Ανάλυσης	Προσδ/νες Ενώσεις	Βιολογικό υπόστρωμα	Προκ/σία Δείγματος	Στατική φάση	Κινητές φάσεις	Εσωτερικό Πρότυπο	Χρόνος ανάλυσης (λεπτά)	Έτος δημ/σης	Αναφ.
	LC-MS/MS	A2-2 & A2-3	Ορός	ΚΠ	Acquity UPLC BEH C18	A: Υδ. 1% ο.α. B: 0,1% μ.ο. μεθανόλη	Ριστοκετίνη	Δεν αναφ.	2012	[22]
	LC-MS/MS	A1-3, A2-1, A2-2,3, A2-4,5 & Δαπτομυκίνη & Βανκομυκίνη & Κολιστίνη	Πλάσμα	ΚΠ	Kinetex C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Πολυμυξίνη	10	2013	[23]
§1	LC-MS	A2-1, A2-2,3, A2-4,5	Πλάσμα	ΚΠ	Hypersil Gold C8	A: Υδ. 10mM ο.α.-ακετ/ιο 50-50 B: ακετόνη-ακ/λιο-2-προ/λη (1-1-1) + 0,1% μ.ο.	Βανκομυκίνη	10,7	2014	[7]
§2	LC-MS/MS	A1-3, A2-1, A2-2,3, A2-4,5	Πλάσμα	ΚΠ	Cadenza HS-C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Σουλφαμεθοξαζόλη	6,5	2016	[6]
	LC-MS/MS	A1-3, A2-1, A2-2,3, A2-4,5	Πλάσμα	ΚΠ	Acquity UPLC BEH C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Δαπτομυκίνη	10	2016	[24]
	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη	Ορός	ΚΠ	Targa C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Τείκοπλανίνη	3,3	2001	[10]
§3	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη	Πλάσμα	ΚΠ	Inertsil ODS-3	A: Υδ. 0,1% ο.ο. B: 0,1% ο.ο. ακετονιτρίλιο	-	5	2002	[25]
§4	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη Πολυμυξίνη B1,B2,E1,E2	Πλάσμα	ΚΠ	Jupiter C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Fibrinopeptide B	5	2010	[26]
§5	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη	Ορός	ΚΠ	Fortis C8	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. μεθανόλη	Βανκομυκίνη-γλυκίνη-Ο-μεθυλεστέρας	21	2013	[27]
	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη	Πλάσμα	ΚΠ	ΑΦ Ζεύγους ιόντων	A: νερό B: ακετονιτρίλιο Γ: υπερφθοροπεντανοϊκό οξύ 200 mM/ 130 mM ο.α.	Καναμυκίνη	7,5	2014	[28]
§6	LC-MS/MS	Βανκομυκίνη	Πλάσμα & Οστό, Λίπος	ΚΠ & PBS-εκχύλιση	Luna C18	A: Υδ. 0,05% μ.ο. B: μεθανόλη	αμινοπτερίνη	6	2014	[29]

§7	LC-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη & 7ενώσεις	Νερό	Ε.Σ.Φ. HLB	Zorbax XDB-C18	A: Υδ. 1% ο.ο. B: ακετονιτρίλιο	Ενροφλοξασίνη	27	2006	[30]
§8	(LC×LC)-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη Δαπτομυκίνη & 9ενώσεις	Πλάσμα	ΚΠ	Kinetex PFP	Σύστημα 4 διαλυτών	Λεβοφλοξασίνη- ¹³ C-δ3 Imatinib-d8	5	2013	[31]
§9	LC-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη Δαπτομυκίνη & 8ενώσεις	Ολικό αίμα Πλάσμα	Προσρόφηση-εκρόφηση	ACE C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	-	10	2013	[32]
§10	LC-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη & 15ενώσεις	Πλάσμα	ΚΠ	Atlantis dC18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Μοξιφλοξασίνη-δ5 & Ριφαμπίνη-δ3	13	2015	[33]
§11	LC-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη Ενροφλοξασίνη	Ιστοί ή Πλάσμα κότας	Όξινη εκχύλιση	Kinetex PFP	0,1% μ.ο. σε ακετονιτρίλιο/νερό (60/40 κ.ο.)	Σιπροφλοξασίνη-δ8	8,5	2015	[34]
§12	LC-MS/MS	Σιπροφλοξασίνη	Πλάσμα	Ε.Υ.Υ. χλωροφόρμι ο	C18	0,2% μ.ο. σε νερό-μεθανόλη (10/90 κ.ο.)	Οφλοξασίνη	3	2016	[18]
§13	LC-MS/MS	Δαπτομυκίνη	Αμνιακό υγρό Πλάσμα Ούρα	ΚΠ	Phenomenex Synergi C18	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Λιδοκαΐνη	13,5	2010	[35]
§14	LC-MS/MS	Δαπτομυκίνη	Πλάσμα	ΚΠ	C18 Hypersil Gold	A: Υδ. 0,1% μ.ο. B: 0,1% μ.ο. ακετονιτρίλιο	Ρεσερπίνη	11	2011	[36]
§15	LC-MS/MS	Κεφουροξίμη	Πλάσμα Ορός	ΚΠ	SB-CN	24% Ακετονιτρίλιο σε υδ. διάλυμα 5 mM μ.ο.	Κεφοταξίμη	10	2004	[13]
§16	LC-MS/MS	Κεφουροξίμη	Πλάσμα αίματος ζώου	ΚΠ	Zorbax SB-C18	Μεθανόλη/1mM ο.α. σε νερό (14/86 ο.κ.ο.)	-	5	2010	[37]
§17	LC-MS/MS	Κεφουροξίμη	Πλάσμα	Ε.Σ.Φ. HLB	LiChrosphere® 60 RP Select B	Ακετονιτρίλιο/ 5 mM δ/τος οξ.αμμωνίου/καθαρού οξ. Οξέος (70:30:0,02 ο.κ.ο.)	Κεφοξιτίνη	1,5	2010	[38]
	LC-MS/MS	Κεφουροξίμη	Πλάσμα	ΚΠ	Zorbax SB-Aq	Μεθανόλη/0,05% μ.ο. σε νερό (42 : 58 ο.κ.ο.)	Ταζομπακτάμη	8	2014	[39]
§18	HPLC-UV	Κεφοξιτίνη	Φαρμακευτικό Διάλυμα έγχυσης	-	C18	Νερό/ακετονιτρίλιο/καθαρό ο.ο. (800:190:10)	-	22	2012	[12]

Ε.Σ.Φ.-εκχύλιση Στερεάς Φάσης
ΚΠ-Καταβύθιση Πρωτεϊνών
μ.ο.- μυρμηκικό οξύ
ο.ο.-οξικό οξύ

§1 Η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε με το άθροισμα των εμβαδών των πέντε συστατικών προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου.

§2 Οι ερευνητές αναφέρουν ότι είναι προτιμότερη η ποσοτικοποίηση όλων των συστατικών της τεϊκοπλανίνης και γίνεται καλύτερη συσχέτιση των αποτελεσμάτων συγκρίνοντάς τα με τα αποτελέσματα της ανοσοχημικής ανάλυσης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί συσσώρευση των συστατικών A2-4 και A2-5, κατά την παρακολούθηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα, λόγω της λιποφιλικότητάς τους[6].

§3 Η καταβύθιση των πρωτεϊνών γίνεται με διάλυμα υδατικού τριχλωροοξικού οξέος 10% και μεθανόλη σε αναλογία όγκων 2:1.

§4 Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σχετικά με την εισαγωγή τριχλωροοξικού οξέος κατά την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες και διαπιστώθηκε βελτίωση των κορυφών και του χρόνου συγκράτησης με την αύξηση του ποσοστού του οξέος. Ο λόγος αποδόθηκε στο σχηματισμό ζευγών ιόντων τα οποία επιτρέπουν την καλύτερη αλληλεπίδραση του συστατικού με τη στατική φάση.

§5 Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε παραγωγοποιημένο μόριο της προσδιοριζόμενης ένωσης, ως θυγατρικό ιόν το m/z 1306 και τριχλωροοξικό οξύ για την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Σε όλη την υπόλοιπη βιβλιογραφία το θυγατρικό ιόν της βανκομυκίνης είναι το m/z 144.

§6 Η μέθοδος ξεπέρασε τις προσδοκίες των προγενέστερων κάνοντας απευθείας έγχυση του δείγματος σε C18 υβριδική στήλη. Η τελευταία μέθοδος ενδείκνυται για κλινικές εφαρμογές σε αναλύσεις ρουτίνας για την παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας ενός φαρμάκου (TDM-therapeutic drug monitoring).

§7 Ως στήλη εκχύλισης σε στερεά φάση χρησιμοποιείται η Oasis HLB της Waters και προκύπτει ότι το βασικό περιβάλλον παρέχει καλύτερες ανακτήσεις, ενώ η μεθανόλη αποτελεί καλύτερο μέσο έκλουσης συγκριτικά με την ακετόνη και το ακετονιτρίλιο.

§8 Χρησιμοποιείται διπλό σύστημα στατικών φάσεων. Η πρώτη στήλη (POROS) προσροφά τα συστατικά και αποβάλλει παρεμποδίσεις (άλατα, πρωτεΐνες). Τα

συστατικά με αντίθετη ροή εκλούνται προς τη δεύτερη στήλη, προκειμένου να αποβληθούν οι ισοβαρείς μεταβολίτες των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών γίνεται με εξαπλάσιο όγκο ακετονιτριλίου-μεθανόλης 50% κ.ο. και πρόσθετο αντιδραστήριο το υπερχλωρικό οξύ (0,1%).

§9 Η προκατεργασία του δείγματος έγινε με ίνα μικροεκχύλισης στερεάς φάσης επικαλυμμένη με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές. Είναι η μοναδική αναφορά με ανάπτυξη μεθόδου σε ολικό αίμα.

§10 Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκαν δύο ισοτοπικά επισημασμένες ενώσεις με άτομα δευτερίου, από το σύνολο των 15 ενώσεων. Η αναφορά αυτή παρουσιάζει δύο μεθόδους, η πρώτη μέθοδος προσδιορίζει πολικές ενώσεις και η καταβύθιση γίνεται με μεθανόλη σε όξινο περιβάλλον, για καλύτερη ανάκτηση, και η δεύτερη μέθοδος προσδιορίζει τις λιγότερο πολικές, όπως είναι η σιπροφλοξασίνη. Η καταβύθιση στη δεύτερη περίπτωση γίνεται με ακετονιτρίλιο.

§11 Τα αντιβιοτικά εκχυλίζονται από τον ιστό είτε με επώαση σε μεθανόλη με 0,1% μ.ο. (πλάσμα, μυϊκό, νεφρικό και ηπατικό ιστό), για 15 λεπτά στους 5 °C, είτε ανακίνηση στον ίδιο διαλύτη (δέρμα και λίπος) για 10 λεπτά. Για τον καθαρισμό του δείγματος έγινε εκχύλιση στερεάς φάσης (Strata-X πολυμερικό υλικό αντίστροφης φάσης, της Phenomenex), όπου στο στάδιο της έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες της κινητής φάσης με πρόσθετο αντιδραστήριο το EDTA. Από προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι το αντιδραστήριο αυτό βοηθάει στη χρωματογραφική ανάλυση, παρέχοντας καλοσχηματισμένες κορυφές[40]. Η εκχύλιση στερεάς φάσης συγκρίθηκε με εκχύλιση υγρού-υγρού και διαπιστώθηκε ότι η πρώτη ήταν πιο αποτελεσματική.

§12 Παρόλο που αντίστοιχη μέθοδος είχε δημοσιευθεί στο παρελθόν, θεωρήθηκε αναγκαίο να αναπτυχθεί μια πιο ευαίσθητη, ταχεία και ακριβής μέθοδος ανάλυσης. Γίνεται αναφορά για την ιδιότητα της σιπροφλοξασίνης να ιονίζεται αμφότερα, με αποτέλεσμα να μη βοηθούν οι κλασικές και φθηνές μέθοδοι προκατεργασίας, όπως είναι οι εκχυλίσεις υγρού-υγρού και στερεάς φάσης. Τελικά, η προκατεργασία του δείγματος αφορά σε εκχύλιση υγρού-υγρού με χλωροφόρμιο και οι όγκοι του δείγματος και του διαλύτη είναι μεγάλοι.

§13 Η καταβύθιση των πρωτεϊνών στο πλάσμα γίνεται σε όξινο με υδροχλωρικό οξύ περιβάλλον και μεθανόλη. Τα άλλα δύο υποστρώματα δεν απαιτούν ιδιαίτερη προκατεργασία. Βρέθηκε ότι η ιδανική αναλογία όγκων οργανικού διαλύτη προς όγκο δείγματος είναι τρία προς ένα. Εξαιτίας του υψηλού ποσοστού δέσμευσης της δαπτομυκίνης στις πρωτεΐνες (90%), παρουσιάζεται χαμηλή ανάκτηση του αντιβιοτικού. Με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος, πριν την εισαγωγή του οργανικού διαλύτη, υποστηρίζεται η αποδέσμευση και αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό ανάκτησης.

§14 Είναι η δεύτερη αναφορά που συναντάται η χρήση πολυωνυμικής εξίσωσης παλινδρόμησης κατά την έκφραση της καμπύλης αναφοράς της δαπτομυκίνης.

§15 Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα πλάσματος, αλλά εφαρμόστηκε και σε υπόστρωμα ορού, ελέγχθηκε η πιστότητα και η ακρίβεια της εναλλακτικής μεθόδου και η διαφοροποίηση των αναλύσεων των δύο μεθόδων στην ίδια μέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο μέθοδοι είναι εξίσου αξιόπιστες.

§16 Η καταβύθιση των πρωτεϊνών γίνεται με 12% υπερχλωρικό οξύ σε ακετονιτρίλιο. Χρησιμοποιείται πολυωνυμική εξίσωση παλινδρόμησης, ωστόσο υπάρχουν αναφορές που χρησιμοποιούν το γραμμικό μοντέλο.

§17 Η εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση σε 1500 στροφές για ένα λεπτό. Δοκιμάζονται διάφορα πρωτόκολλα προκατεργασίας του δείγματος (διάφοροι διαλύτες καταβύθισης των πρωτεϊνών, εκχύλιση υγρού-υγρού) και καταλήγουν στην εκχύλιση στερεάς φάσης με στήλη Oasis HLB. Η ελάττωση του pH πριν την προκατεργασία του δείγματος βοηθάει στην αποσύνδεση από τις πρωτεΐνες και παρέχει καλύτερες ανακτήσεις.

§18 Για τον προσδιορισμό της κεφοξιτίνης δε βρέθηκε καμία πρόσφατη μέθοδος ανάλυσης σε βιολογικό υπόστρωμα.

Συνοπτικά, πιο συχνά χρησιμοποιείται χρωματογραφικό σύστημα αντίστροφης φάσης και η στατική φάση είναι επικαλυμμένη με δεκαόκτυλο ομάδες άνθρακα. Για τις κινητές φάσεις συναντάται ο συνδυασμός ακετονιτριλίου-νερού με 0,1 % μυρμηκικό οξύ, σε βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης. Το υπόστρωμα του δείγματος στο οποίο αναπτύσσονται οι περισσότερες μέθοδοι είναι το πλάσμα

αίματος, για τον προσδιορισμό όλων των αντιβιοτικών στα οποία στοχεύει η παρούσα εργασία, ωστόσο δεν υφίσταται μελέτη που να προσδιορίζονται όλες οι εν λόγω ουσίες ταυτόχρονα. Σε δείγματα παράγωγα του αίματος η προκατεργασία γίνεται συνήθως με καταβύθιση των πρωτεϊνών. Η ελάττωση του pH βοηθά στην αποδέσμευση από τις πρωτεΐνες, παρέχοντας καλύτερες ανακτήσεις, και επαναληψιμότητα και ακρίβεια στον προσδιορισμό των ουσιών. Τελικά, αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες αναλυτικές πολύ-μέθοδοι των αντιβιοτικών με σύγχρονες τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί σε περιβαλλοντικά δείγματα, ωστόσο, αποκλίνουν σημαντικά από αυτές σε βιολογικά υποστρώματα και για το λόγο αυτό εξαιρέθηκαν από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση.

ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία δέκα χρόνια, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά αποτελεί αναλυτική τεχνική αναφοράς, για την Παρακολούθηση της Θεραπευτικής Συγκέντρωσης Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring) σε κλινικά και τοξικολογικά εργαστήρια.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδου υπερυψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας σε σειρά (UHPLC-MS/MS) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντιβιοτικών ουσιών, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες ως προς τη χημική τους δομή. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι η τεϊκοπλανίνη και η βανκομυκίνη που ανήκουν στα γλυκοπεπτίδια, το λιποπεπτίδιο δαπτομυκίνη, οι κεφαλοσπορίνες κεφοξίτη και κεφουροξίμη, και η φθοροκινολόνη σιπροφλοξασίνη. Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα αίματος και οροαιματηρού υγρού. Μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος ανάλυσης είναι ιδανική για να χρησιμοποιηθεί στη ρουτίνα ενός κλινικού και τοξικολογικού εργαστηρίου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα αίματος και οροαιματηρού υγρού από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε συνδεσμοπλαστική επέμβαση πρόσθιου χιαστού συνδέσμου, ενώ προηγουμένως τους χορηγήθηκε προφυλακτική ενδοφλέβια δόση αντιβιοτικού φαρμάκου. Το αποτέλεσμα του ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων είναι καθοριστικής σημασίας, για την εξέλιξη της θεραπευτικής πορείας των ασθενών. Για το σκοπό αυτό θα πρέπει η μέθοδος ανάλυσης να αναδειχθεί αξιόπιστη, μέσα από μια σειρά δοκιμών ελέγχου σύμφωνων με τις οδηγίες ελεγκτικών φορέων όπως ο FDA και ο EMEA.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

14. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS

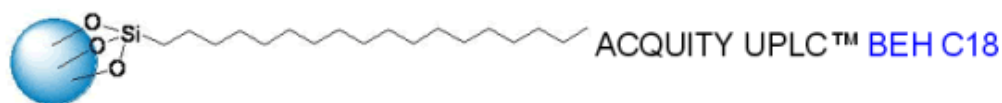
14.1 ΟΡΓΑΝΟ & ΣΤΗΛΗ

Το όργανο ανάλυσης ήταν κατηγορίας UHPLC-MS/MS, με ροή υγρού της τάξης των $\mu\text{L}/\text{min}$ σε χρωματογραφικό σύστημα Acquity UHPLC-Class System και φασματογράφο μάζας Xevo TQD. Εταιρία παραγωγής είναι η Waters Corporation και χώρα προέλευσης η Μιλφόρδη στην πολιτεία της Μασαχουσέτης των Η.Π.Α..



Εικόνα 2.1. Το όργανο Xevo TQD της Waters Co.

Η χρωματογραφική στήλη ήταν ACQUITY UPLC™ BEH C18 (150mm×2,1mm, i.d. 1,7 μm) της Waters Corporation (Μιλφόρδη, Μασαχουσέτης). Για την προστασία της στήλης από μεγαλομόρια και ενώσεις που ελαττώνουν το χρόνο ζωής της, χρησιμοποιήθηκε η προστήλη BEH C18 Van Guard (5mm×2,1mm, i.d. 1,7 μm) της Waters Corporation (Μιλφόρδη, Μασαχουσέτης).



Εικόνα 2.2. Η στατική φάση της στήλης της αναλυτικής μεθόδου.

14.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Συσκευή	Μοντέλο	Εταιρία/Χώρα
Πιπέτες (μL)	TIPOR-V+	Orange Scientific
Γεννήτρια αζώτου		Domnick hunter
Συσκευή ανάδευσης	Vortex	Fison Scientific Equipment
Συσκ. Παραγωγής υπερήχων	Misonix XL Sonicator Ultrasonic Cell Processor	
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας ± 0,0001 g	Kern and Sohn GmbH	
Φυγόκεντρος	Pro-Research	Centurion Scientific Ltd
Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού 18 MΩ/cm	Millipore Direct-QR 3	Billerica MA, ΗΠΑ

14.3 ΥΛΙΚΑ

Αναλώσιμο	Εταιρία	Πόλη, Χώρα Παραγωγής
Φιαλίδια PTFE 1,5 mL	Eppendorf	Schnelldorf, Germany
Ακετονιτρίλιο βαθ. Καθ/τας LC/MS	Scharlau Chemie S.A.	Βαρκελώνη, Ισπανία
Μεθανόλη βαθ. Καθ/τας LC/MS	Fisher Scientific International, Inc.	Hampton, NH, USA
Μυρμηκικό Οξύ Καθ/τας 98-100% Riedel-de HaenR	Sigma-Aldrich	Steinheim, Γερμανία
Zinacef	GlaxoSmithKline A.B.E.E.	
Mefoxil	Vianex A.E.	
Voncon	Pharmaserve - Lilly A.E.B.E.	
Targocid	Vianex A.E.	
Cubicin	Merck Sharp & Dohme Ltd	
Ciproxin	Bayer Hellas A.B.E.E.	
Vibramycin	Pfizer Hellas A.E.	

14.4 ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Το λογισμικό που συντονίζει τη λειτουργία του φασματογράφου μάζας και του χρωματογραφικού συστήματος είναι το MassLynx 4.1 της Waters Co. Το πρόγραμμα επεξεργασίας των δεδομένων που λαμβάνονται μετά τον ανιχνευτή μάζας είναι το TargetLynx 4.1 της ίδιας εταιρίας. Ενώ, παρότι το πρόγραμμα αυτό παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης των δεδομένων μέχρι το τελικό αποτέλεσμα της

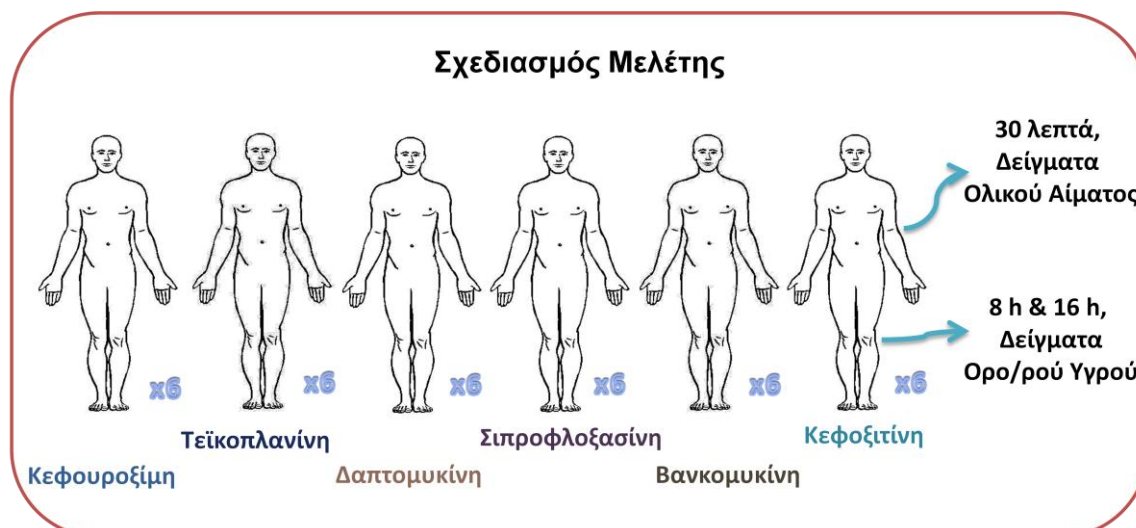
συγκέντρωσης στο δείγμα, έγινε επιπρόσθετη επεξεργασία των δεδομένων στο Microsoft Excel 2007.

14.5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ & ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η μελέτη αφορά στη συλλογή δεδομένων σχετικά με τα επίπεδα αντιβιοτικών ουσιών που χορηγούνται προφυλακτικά, πριν από συνδεσμοπλαστική επέμβαση Πρόσθιου Χιαστού Συνδέσμου. Οι ασθενείς έλαβαν μια δόση (bolus) προεγχειρητικής προφυλακτικής αντιβίωσης 20 λεπτά πριν να εφαρμοσθεί (φουσκώσει) η ίσχαιμος περιέδεση. Πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια χορήγηση του αντιβιοτικού διάρκειας 30 λεπτών (μίας ώρας για τη βανκομυκίνη). Τα είδη των βιολογικών δειγμάτων που λήφθηκαν είναι ολικό αίμα και παροχέτευθέν οροαιματηρό υγρό με την εξής σειρά:

- 1) Δείγμα ολικού αίματος από τα άνω άκρα τριάντα λεπτά μετά από τη χορήγηση του αντιβιοτικού.
- 2) Δείγμα παροχέτευθέντος οροαιματηρού υγρού από την παροχέτευση της άρθρωσης του γόνατος 8 ώρες μετά την επέμβαση. Ενώ, η παροχέτευση εφαρμόζεται αμέσως μετά την επέμβαση.
- 3) Δείγμα παροχέτευθέντος οροαιματηρού υγρού από την παροχέτευση της άρθρωσης του γόνατος 16 ώρες μετά την επέμβαση.

Τα βιολογικά δείγματα που προέκυψαν από τη μελέτη ήταν 36 δείγματα ολικού αίματος και 72 δείγματα οροαιματηρού υγρού. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο 424 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο, στη Θεσσαλονίκη. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C στην κατάψυξη μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους.



Σχήμα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση του σχεδιασμού μελέτης με τα δύο κύρια είδη δειγμάτων, για τα οποία ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη και η επικύρωση της μεθόδου ανάλυσης.

14.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ & ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Τα αρχικά διαλύματα τόσο των προσδιοριζόμενων ουσιών όσο και του εσωτερικού προτύπου παρασκευάστηκαν σε διάλυμα αναλογίας όγκων 1:1 νερό/μεθανόλη, με στόχο την αποθήκευσή τους, στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, για ένα έτος τουλάχιστον. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ήταν 1, 2 και 8 mg/mL, για το εσωτερικό πρότυπο, τη σιπροφλοξασίνη και τα υπόλοιπα πέντε αντιβιοτικά, αντίστοιχα. Οι έξι προσδιοριζόμενες ουσίες κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες συγκεντρώσεων με βάση τα θεραπευτικά και τα τοξικά τους επίπεδα. Το μητρικό πρότυπο διάλυμα παρασκευάστηκε με ανάμιξη καθορισμένων όγκων από τα αρχικά διαλύματα προς τελικό όγκο σύστασης περίπου 1/9 μεθανόλη προς υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1% και τα ακόλουθα οκτώ προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις με ανάλογο όγκο υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέος. Τα 9 πρότυπα εργασίας παρασκευάζονταν ημερησίως προς αποφυγή του σφάλματος που θα εισήγαγε η πιθανή υδρόλυση/αποδόμηση των ουσιών. Αυτά τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την επιβάρυνση λευκού υποστρώματος και την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης εννέα σημείων, με υποοκταπλάσια τελική συγκέντρωση στο προς ανάλυση υγρό. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα επίπεδα συγκέντρωσης των ενώσεων στα τελικά πρότυπα διαλύματα.

Πίνακας 2.1. Οι συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων στα πρότυπα διαλύματα.

ng/mL					Ολική Τεικοπλανίνη	Δαπτομυκίνη	Κεφοξιτίνη	Βανκομυκίνη	Σιπροφλοξασίνη	Κεφουροξίμη
Πρότυπο	A3-1	A2-1	A2- 2,3	A2- 4,5						
9	264	592	4688	2456	8000	16000	3200	16000	640	3200
8	132	296	2344	1228	4000	8000	1600	8000	320	1600
7	66	148	1172	614	2000	4000	800	4000	160	800
6	33	74	586	307	1000	2000	400	2000	80	400
5	17	37	293	154	500	1000	200	1000	40	200
4	8,3	18,5	146,5	76,8	250	500	100	500	20	100
3	4,1	9,3	73,3	38,4	125	250	50	250	10	50
2	2,1	4,6	36,6	19,2	62,5	125	25	125	5	25
1	1,0	2,3	18,3	9,6	31,3	62,5	12,5	62,5	2,5	12,5

14.7 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Παράλληλα με τα πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν επιπλέον τρία δείγματα στα επίπεδα συγκεντρώσεων 3, 5 και 8, με σκοπό τη χρήση τους για τον έλεγχο της ποιότητας της μεθόδου (δείγματα ελέγχου ποιότητας).

14.8 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ

Το φασματόμετρο μάζας χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία SRM (ή MRM), όπου παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος (ή ομάδα αντιδράσεων). Αρχικά παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα (μεθανόλη/νερό 1:1 κ.ό.) χαμηλής συγκέντρωσης (1 μg/mL). Κάθε ένα χρησιμοποιείται για τη λήψη δεδομένων για τις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης θραυσματοποίησης. Στο σύστημα φασματογραφικής μάζας υπάρχουν ειδικές θέσεις υποδοχής του διαλύματος αυτού, και η αλληλουχία ενεργειών είναι η εξής: πλύση-γέμιση του βρόγχου-έγχυση. Όλες οι λειτουργίες ελέγχονται από ειδική καρτέλα ελέγχου των παραμέτρων του οργάνου (πίνακας 2.2). Από τη στιγμή της έγχυσης ξεκινά η ανίχνευση ιόντων από το φασματογράφο μάζας και η οπτική

τους αναπαράσταση με τη μορφή κορυφών. Αρχικά ελέγχεται η περιοχή m/z , όπου αναμένεται το μητρικό ιόν ($[M + 1]^+$ ή $[M - 1]^-$ για το θετικό και τον αρνητικό ιονισμό, αντίστοιχα) και βελτιστοποιείται το δυναμικό του κώνου. Στη συνέχεια, με δοκιμές δυναμικών ενέργειας θραύσης γίνεται εύρεση του βέλτιστου θυγατρικού ιόντος και της βέλτιστης ενέργειας θραύσης αυτού. Στον πίνακα 2.3, παρουσιάζονται οι βελτιστοποιημένες τιμές όλων των παραμέτρων που αναφέρθηκαν.

Η λήψη σήματος μπορεί να παρατηρείται και στα δύο είδη ιονισμού, γι αυτό απαιτείται προσοχή και συστηματικός έλεγχος των εντάσεων των κορυφών. Για παράδειγμα, η απόκριση της κεφουροξίμης στον αρνητικό ιονισμό είναι περίπου πέντε φορές πιο υψηλή από ότι στο θετικό ιονισμό, καθώς η ένωση περιέχει μία καρβοξυλική ομάδα που ιονίζεται εύκολα με την απώλεια ενός πρωτονίου. Έτσι επιλέχθηκε ο αρνητικός ιονισμός για την κεφουροξίμη. Για τις ενώσεις τείκοπλανίνη, δαπτομυκίνη και βανκομυκίνη επιλέχθηκε το ιόν $[M + 2]^{+2}$ γιατί ως διπλοφορτισμένα ιόντα παρουσιάζουν ισχυρότερη απόκριση.

Πίνακας 2.2. Συνθήκες καρτέλας προεπιλογής παραμέτρων στην πηγή και στον φασματογράφο μάζας.

Θερμοκρασία πηγής (Source Temperature)	350 °C
Δυναμικό τριχοειδούς (Cone Voltage)	3,5 kV
Δυναμικό κώνου (Cone Voltage)	30 V
Ροή αερίου κώνου (Cone Gas Flow)	50 L/h
Ροή αερίου εξάτμισης (Desolvation Gas Flow)	650 L/h
Ενέργεια θραύσης (Collision energy)	18 V

Πίνακας 2.3. Παράμετροι φασματομετρικής ανάλυσης των προσδιοριζόμενων ουσιών.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ							
Προσδιοριζόμενη Ένωση		Μοριακό Βάρος	Δυναμικό Κώνου (V)	Ενέργεια Θραύσης (V)	Μητρικό Ιόν	Θυγατρικό Ιόν	Λειτουργία Ιονισμού
Τείκοπλανίνη	A2-1	1877,6	27	15	939,7	314,0	+
	A2-2,3	1879,7	25	12	940,5	316,5	+
	A2-4,5	1893,7	28	12	947,8	330,4	+
	A3-1	1564,3	26	25	783,2	204,3	+
Δαπτομυκίνη		1619,7	26	25	811,0	313,0	+
Σιπροφλοξασίνη		331,4	40	38	332,0	231,0	+
Κεφοξιτίνη		427,5	15	8	426,2	156,2	-
Βανκομυκίνη		1449,3	28	16	725,7	144,2	+
Κεφουροξίμη		424,4	23	8	423,0	318,0	-
Δοξυκυκλίνη		444,4	30	18	445,1	428,2	+

14.9 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ & ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ-ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Βιβλιογραφικά βρέθηκε ότι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών ήταν αυτό με ακετονιτρίλιο και νερό με 0,1 % μυρμηκικό οξύ. Επίσης, μια καλή επιλογή στατικής φάσης είναι η στήλη BEH C18 της Waters, καθώς παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό και μικρούς χρόνους ανάλυσης. Η βελτιστοποίηση του προγράμματος έκλουσης είναι απαραίτητη για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των ενώσεων και παρέχει κορυφές με σχήμα καμπύλης Gauss. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δοκιμές για την εύρεση του καταλληλότερου προγράμματος έκλουσης των ουσιών (πίνακας 2.4), με βέλτιστο αυτό που δίνεται στον πίνακα 2.5. Παράλληλα, ελέγχθηκαν παράμετροι όπως η

ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία της στήλης. Οι τελικές συνθήκες δίνονται στον πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.4. Δοκιμές για τη βελτιστοποίηση του προγράμματος έκλουσης.

Κινητές φάσεις: A: νερό + 0,1% Μυρμηκικό οξύ B: ακετονιτρίλιο + 0,1% Μυρμηκικό οξύ			
		Θετικά	Αρνητικά
1	100%A ισοκρατική για 0,5λεπ. Από 85/15 σε 20/80 σε 2λεπ. Από 20/80 σε 100%B σε 1,5λεπ. 100%B ισοκρατική για 1,5λεπ. Για 5,5λεπ. εξισορρόπηση στις αρχικές συνθήκες	# Η βανκομυκίνη σε μεγαλύτερο χρόνο συγκράτησης # Οι υπόλοιπες είναι καλές	# 11 λεπ. συνολικός χρόνος
2	Από 85/15 σε 20/80 σε 2λεπ. Μετά σε 100%B σε 1,5λεπ. Ισοκρατική 1,5λεπ. Για 5λεπ. εξισορρόπηση στις αρχικές συνθήκες.	# Διαχωρίζεται καλύτερα η A3-1	# Η κορυφή της βανκομυκίνης βρίσκεται σε πολύ μικρό χρόνο συγκράτησης # Η κορυφή της σιπροφλοξασίνης εμφανίζει σπασίματα
3	Από 90/10 σε 20/80 σε 2λεπ. Μετά 100%B σε 1,5λεπ. Ισοκρατική για 1,5λεπ. Για 5λεπ. εξισορρόπηση στις αρχικές συνθήκες.	# Ικανοποιητικός διαχωρισμός εκτός της βανκομυκίνης	# διεύρυνση της κορυφής της βανκομυκίνης
4	Από 95/5 σε 20/80 σε 2λεπ. Μετά 100%B σε 1,5λεπ. Ισοκρατική για 1,5λεπ. Για 5λεπ. εξισορρόπηση στις αρχικές συνθήκες.	# Ικανοποιητικός διαχωρισμός # Οξείες κορυφές	

Πίνακας 2.5. Τελικό πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης

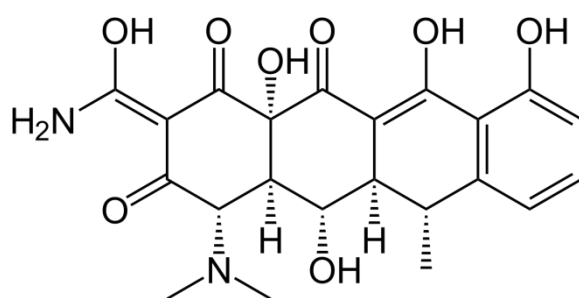
Χρόνος	Πρόγραμμα Βαθμωτής Έκλουσης
0-2,0 λεπτά	95/5 => 20/80 (A/B)
2,0-3,5 λεπτά	80% B => 100% B
3,5-5,0 λεπτά	100% B
5,0-10 λεπτά	95/5 (A/B)

Πίνακας 2.6. Συνθήκες στο χρωματογραφικό σύστημα.

Αναλυτική στήλη	ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1.7μm, 2.1mm × 150mm
Εκλουστικό σύστημα (κινητές φάσεις)	A: Νερό (+0,1% μυρμηκικό οξύ) B: Ακετονιτρίλιο (+0,1% μ.ο.)
Πίεση	~6500-8800 psi
Ταχύτητα ροής	0,350 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	50 °C
Θερμοκρασία χώρου αυτόματου δειγματολήπτη	10 °C
Όγκος έγχυσης δείγματος	5 μL

14.10 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Η καλύτερη λύση για τη χρήση εσωτερικού προτύπου είναι οι ισοτοπικά επισημασμένες ενώσεις. Για την τεϊκοπλανίνη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες και επειδή ανήκει στην ίδια κατηγορία αντιβιοτικών ενώσεων με την βανκομυκίνη, η δεύτερη έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο σε κάποιες μεθόδους ανάλυσης ή το αντίστροφο[10]. Παράλληλα, έχουν γίνει μελέτες για την αντικατάσταση της βανκομυκίνης με κάποια άλλη ένωση και παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά αποκλίσεων κατά τη μέτρηση της επαναληψιμότητας[7]. Η καλύτερη λύση εισαγωγής εσωτερικού προτύπου θεωρείται η εισαγωγή δευτεριωμένων ενώσεων, οι οποίες υπάρχουν για τη βανκομυκίνη, τη δαπτομυκίνη, την κεφοξιτίνη, την κεφουροξίμη και τη σιπροφλοξασίνη, αλλά αυξάνουν κατά πολύ το κόστος της ανάλυσης. Έτσι, επιλέχθηκε η δοξυκυκλίνη, η οποία διαθέτει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα προσδιοριζόμενα αντιβιοτικά και υψηλό ποσοστό δέσμευσης στις πρωτεΐνες (>90%), ενώ ανήκει σε άλλη κατηγορία αντιβιοτικών και κλινικών εφαρμογών.



Σχήμα 2.2. Η χημική δομή του εσωτερικού προτύπου Δοξυκυκλίνη.

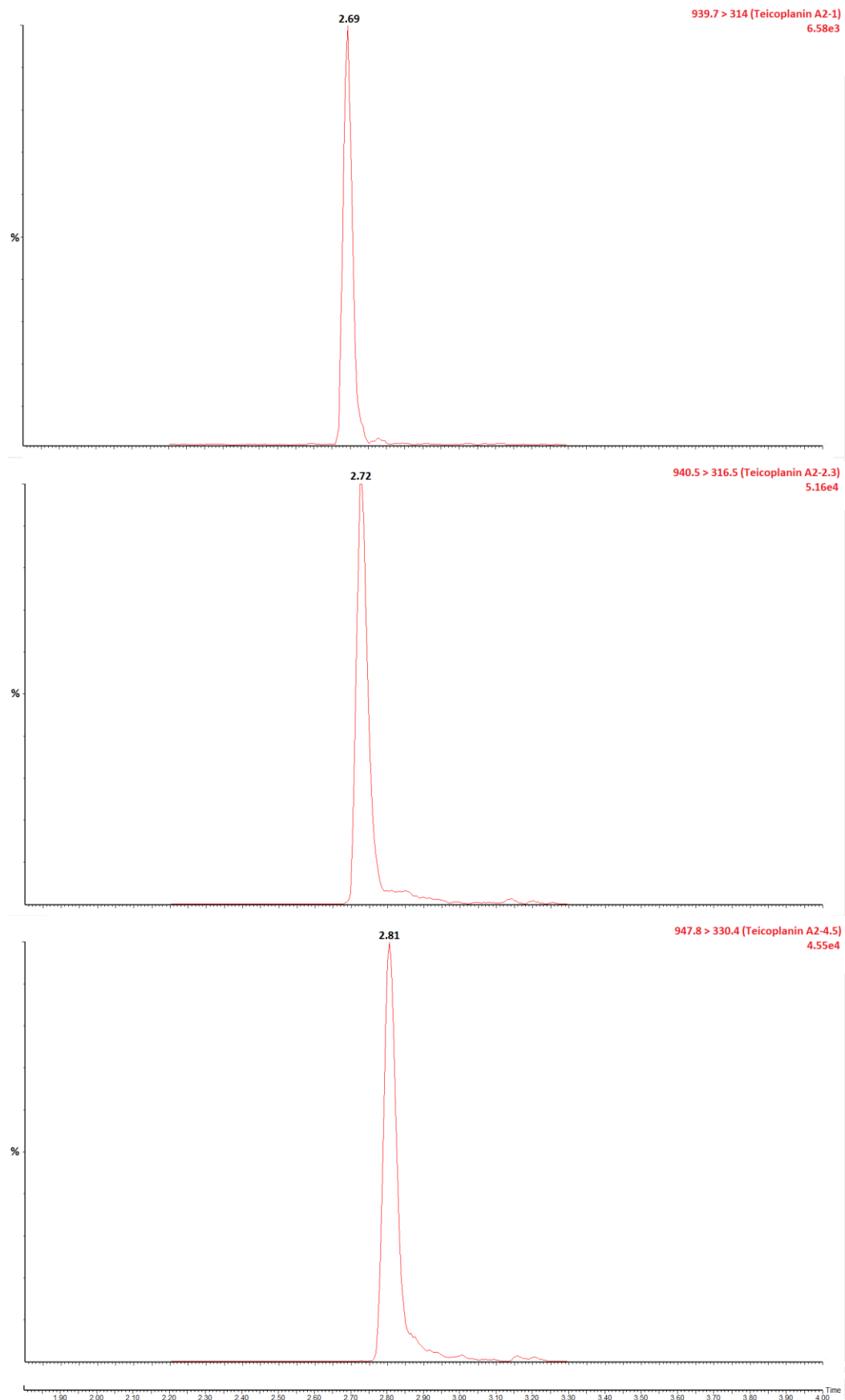
14.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ & ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝΤΟΣ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟΥ ΥΓΡΟΥ

Αρχικά διαπιστώθηκε ότι υπήρχε ανομοιογένεια μεταξύ των δειγμάτων του παροχетеυθέντος οροαιματηρού υγρού, καθώς κάποια περιείχαν θρόμβους και ήταν πιο πυκνά σε σχέση με άλλα (ενδεικτική διαφορά μάζας: 400 mg στα 150 μ L δείγματος), που ήταν διαυγή (ορός) και περιείχαν λιγότερη ποσότητα ολικού αίματος, ακόμη και όταν επρόκειτο για τον ίδιο ασθενή.

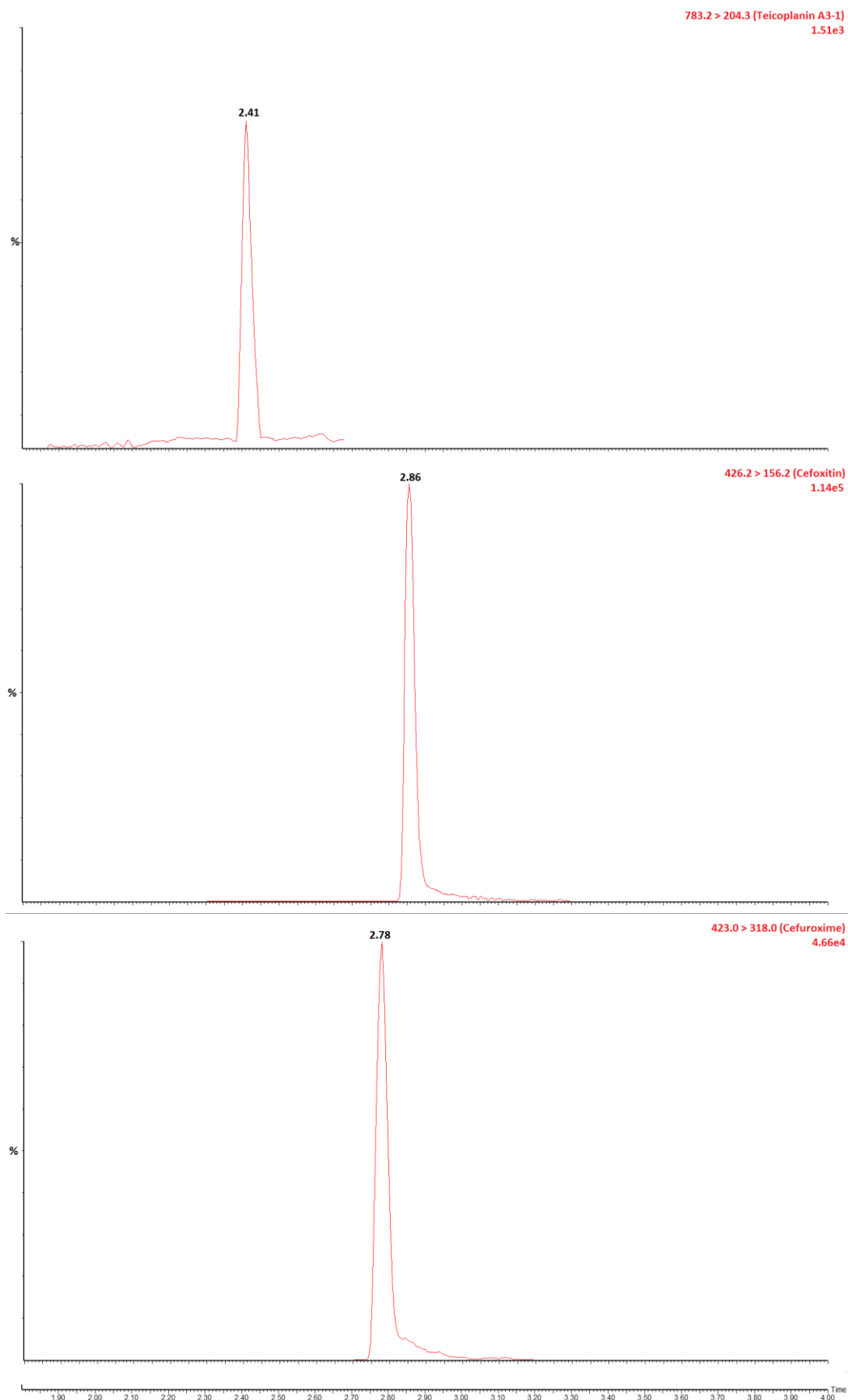
Όσον αφορά στην αναλογία δείγματος προς οργανικό διαλύτη, στην αρχή δοκιμάστηκε η αναλογία 150/250, καθώς το συγκεκριμένο δείγμα συλλέγεται σε μεγάλη ποσότητα. Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε ότι υπάρχει η δυνατότητα περεταίρω αραιώσης, με κριτήριο την ευαισθησία της μεθόδου, αντικαταστάθηκε το 1/3 του όγκου του δείγματος με ανάλογο όγκο υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέος 0,1%, με απώτερο στόχο την αύξηση του ποσοστού ανάκτησης των ενώσεων και την εξομάλυνση της διαφοροποίησης των δύο υποστρωμάτων. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα στάδια της βέλτιστης προκατεργασίας με χρονική σειρά. Το διάλυμα εσωτερικού προτύπου (δοξουκυκλίνης) ήταν υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1 %, ενώ η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου ήταν 500 ng/mL.

Πίνακας 2.7. Στάδια προκατεργασίας των δειγμάτων με χρονική σειρά.

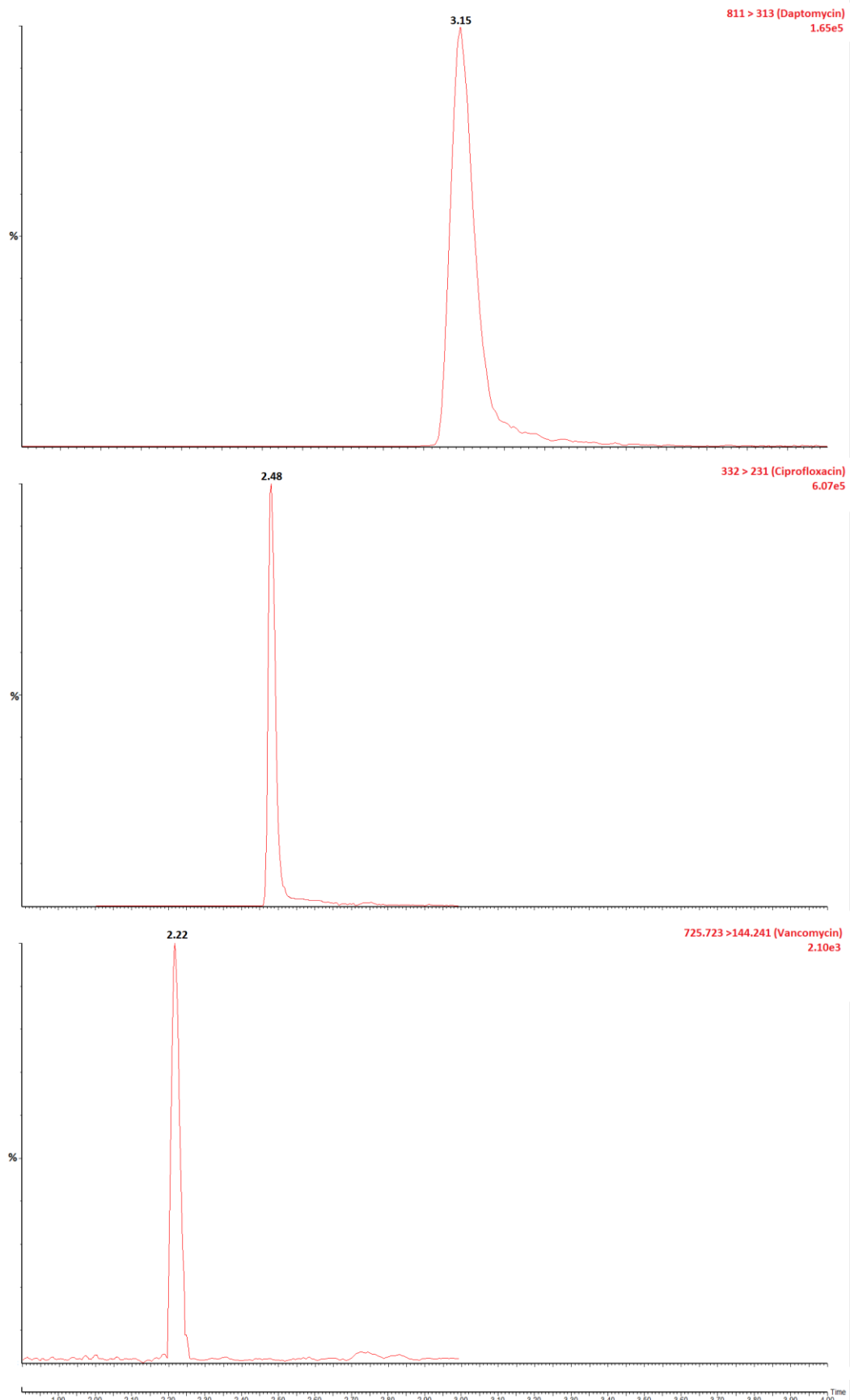
Στάδια προκατεργασίας	Χρόνος
100 μ L δείγματος μεταφέρονται σε φιαλίδιο erpendorf των 1,5 mL	
Προσθήκη 50 μ L 0,1 % υδατικού δ/τος μυρμηκικού οξέος	
Ανακίνηση	0,5 λεπτά
Προσθήκη 250 μ L παγωμένου ακετονιτριλίου	
Ανακίνηση	1 λεπτό
Φυγοκέντρωση (18 °C, 6300 x g)	4 λεπτά
Ανάμιξη 100 μ L υπερκείμενου υγρού με 100 μ L δ/τος εσ. προτύπου	
Εισαγωγή σε ειδικά φιαλίδια του οργάνου	



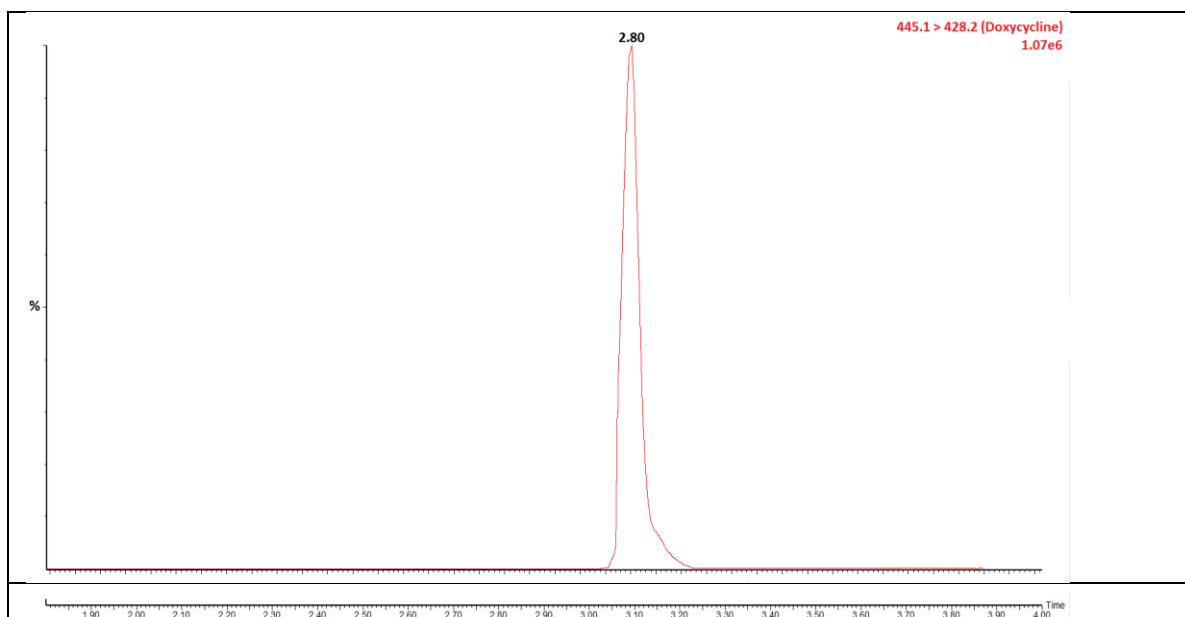
Σχήμα 2.3. Χρωματογραφήματα των ισομορφών της τεϊκοπλανίνης σε δείγμα αίματος στις συγκεντρώσεις του 5^{ου} σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 2.1).



Σχήμα 2.4. Χρωματογραφήματα της ισομορφής A3-1, της κεφοξιτίνης και της κεφουροξίμης σε δείγμα αίματος στις συγκεντρώσεις του 5^{ου} σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 2.1).



Σχήμα 2.5. Χρωματογραφήματα της δαπτομυκίνης, της σιπροφλοξασίνης και της βανκομυκίνης σε δείγμα αίματος στις συγκεντρώσεις του 5^{ου} σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης, πίνακας 2.1).



Σχήμα 2.6. Χρωματογραφήματα της δοξυκυκλίνης (εσωτερικό πρότυπο) σε δείγμα αίματος.

15. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

Προκειμένου για την επικύρωση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε μια σειρά αναλύσεων διάρκειας δύο εβδομάδων. Μελετήθηκαν συνολικά δέκα παράμετροι επικύρωσης.

15.1.1 Ακρίβεια και Πιστότητα

Η μελέτη της πιστότητας χωρίζεται στη μελέτη της επαναληψιμότητας και τη μελέτη της ενδιάμεσης πιστότητας και εκφράζεται με την εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση. Από την άλλη, η μελέτη της ακρίβειας και της ενδιάμεσης ακρίβειας της μεθόδου εκφράζεται με την εκατοστιαία ανάκτηση.

Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν όλα τα πρότυπα διαλύματα, και τα δείγματα ελέγχου ποιότητας (χαμηλής, μέσης και υψηλής συγκέντρωσης), τα οποία αναλύθηκαν πέντε φορές το καθένα. Η σειρά όλων των προτύπων βαθμονόμησης αναλύθηκε πριν και μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων και στη συνέχεια η τυπική τους απόκλιση. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε στις επόμενες τρεις ημέρες.

Ενδιάμεση Πιστότητα

Για την ενδιάμεση πιστότητα έγινε χρήση των δεδομένων των αναλύσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας για τις τέσσερις ημέρες. Έτσι, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων που βρέθηκαν στις τέσσερις ημέρες που προηγήθηκαν και η τυπική απόκλιση αυτών. Ο εκατοστιαίος λόγος της σχετικής τυπικής απόκλισης εξέφρασε την ενδιάμεση πιστότητα.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια είναι ο εκατοστιαίος λόγος της μέσης τιμής της πειραματικής συγκέντρωσης προς τη θεωρητική και υπολογίστηκε για κάθε μία από τις τέσσερις ημέρες των αναλύσεων στα δείγματα ελέγχου ποιότητας.

Ενδιάμεση Ακρίβεια

Για την ενδιάμεση ακρίβεια έγινε χρήση των δεδομένων των αναλύσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας για τις τέσσερις ημέρες. Έτσι, υπολογίστηκε η μέση εκατοστιαία ανάκτηση των τεσσάρων ημερών.

Εξίσωση υπολογισμού ακρίβειας:

$$\% \text{Ανάκτηση} = \frac{\text{Πειραματική τιμή συγκέντρωσης}}{\text{θεωρητική τιμή συγκέντρωσης}} \times 100$$

Εξίσωση υπολογισμού πιστότητας:

$$\% \Sigma \chi. \text{ Τυπική Απόκλιση} = \frac{\text{Τυπική Απόκλιση Συγκέντρωσης}}{\text{Μέση Συγκέντρωση}} \times 100$$

15.1.2 Ανάκτηση Εκχύλισης, Επίδραση Υποστρώματος

Η σειρά των αναλύσεων για τον υπολογισμό της ανάκτησης της εκχύλισης και της επίδρασης υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, καλύπτοντας όλο το εύρος της γραμμικής περιοχής της εκάστοτε καμπύλης βαθμονόμησης. Πρακτικά, έγινε χρήση των τριών δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Παρακάτω δίνονται συνοπτικά οι πειραματικές διαδικασίες συνοδευόμενες από τις εξισώσεις υπολογισμού της κάθε παραμέτρου.

A: Επιμόλυνση του δείγματος πριν την καταβύθιση των πρωτεϊνών

B: Επιμόλυνση του υπερκείμενου υγρού, μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών

Γ: Πρότυπο διάλυμα ίδιας αναλογίας διαλυτών με τα A και B

Αν θεωρήσουμε ότι τα A, B και Γ παριστούν την απόκριση του οργάνου σε κάθε περίπτωση, τότε ισχύουν οι εξισώσεις:

$$\text{Παράγοντας Υποστρώματος} = \frac{B}{\Gamma}$$

$$\% \text{Ανάκτηση} = \frac{A}{B} \times 100$$

Επιπλέον, για την ολοκλήρωση της μελέτης της επίδρασης υποστρώματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση πλήρους σάρωσης στο ίδιο υγρό (MQC) που αναλύθηκε για τον υπολογισμό του παράγοντα υποστρώματος. Η σάρωση έγινε για m/z από 50 έως 500, σε θετικό και αρνητικό ιονισμό, με δυναμικό κώνου 30 V και -23 V αντίστοιχα.

15.1.3 Δυνατότητα Αραίωσης του Δείγματος

Επιμολυσμένο δείγμα αίματος με τα επίπεδα συγκεντρώσεων του υψηλότερου προτύπου αραιώθηκε προς υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις, με ανάλογο όγκο λευκού δείγματος αίματος. Μια παρόμοια μελέτη έγινε με αραιώση επιμολυσμένου δείγματος αίματος με λευκό δείγμα ορού προς υποδιπλάσια συγκέντρωση, με σκοπό να μελετηθεί η αραιώση του οροαιματηρού υγρού.

15.1.4 Carry Over, Εκλεκτικότητα

Η μελέτη του φαινομένου “carry over” πραγματοποιήθηκε με ανάλυση λευκού δείγματος αμέσως μετά την ανάλυση του υψηλότερου προτύπου και επανάληψη της διαδικασίας αυτής για τουλάχιστον δύο φορές. Επίσης, επαναληπτικές μετρήσεις προέκυψαν από τα πραγματικά δείγματα, όπου το κάθε δείγμα μιας ένωσης αποτελούσε λευκό δείγμα για τις υπόλοιπες πέντε. Έτσι, προέκυψαν πολλά δεδομένα σχετικά με την εκλεκτικότητα της μεθόδου.

15.1.5 Γραμμικότητα της Καμπύλης βαθμονόμησης & LOD, LOQ

Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης εκφράζεται από το συντελεστή προσδιορισμού της. Όλα τα σημεία της καμπύλης βαθμονόμησης αναλύθηκαν τέσσερις φορές το κάθε ένα και μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης

υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους, για κάθε μία από τις επαναληπτικές μετρήσεις. Η εξίσωση παλινδρόμησης και ο συντελεστής προσδιορισμού υπολογίστηκαν μέσω επιλογής στο Microsoft Excel 2007.

Ο υπολογισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης βασίστηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση της καμπύλης, όπου ο λόγος σήματος προς θόρυβο ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 10.

Εξίσωση υπολογισμού LOD:

$$LOD = LOQ/3,3$$

15.1.6 Σταθερότητα

Η σταθερότητα εκφράζεται με την εκατοστιαία ανάκτηση. Τα δείγματα που αναλύθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν δείγματα ελέγχου ποιότητας επιμολυσμένα σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων. Το πρώτο ζεύγος δειγμάτων αφαιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, το δεύτερο αναλύθηκε την ίδια ημέρα και το τρίτο παρέμεινε στην κατάψυξη για δύο εβδομάδες. Φρέσκα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε κάθε περίπτωση και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε κατά τα γνωστά, προκειμένου να γίνει δυνατή η σύγκριση των συγκεντρώσεων του δείγματος δοκιμής με το φρέσκο δείγμα.

Σχετικές με τη σταθερότητα των ενώσεων ήταν και κάποιες επιπρόσθετες δοκιμές. Η μία αφορούσε σε κύκλους ψύξης-απόψυξης, όπου τα δείγματα ελέγχου ποιότητας αναλύθηκαν πριν και μετά την ψύξη τους με επανάληψη της διαδικασίας. Η άλλη αφορούσε σε αναλύσεις δειγμάτων που παρέμειναν πολλές ώρες στο δειγματολήπτη ή στο ψυγείο.

Η σταθερότητα του εσωτερικού προτύπου ελέχθηκε σε συνθήκες συντήρησης του διαλύματος (αυτές αφορούν στο χρόνο παρασκευής των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο) και σε συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων στον αυτόματο δειγματολήπτη. Στην περίπτωση του εσωτερικού προτύπου η ανάκτηση αποδόθηκε με το πηλίκο των εμβαδών.

16. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

16.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

16.1.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων & Καμπύλη βαθμονόμησης

Οι καμπύλες βαθμονόμησης βασίστηκαν στο λόγο του εμβαδού του προτύπου επιμολυσμένου δείγματος προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου (δοξοκυκλίνη). Η γραμμικότητα ήταν ικανοποιητική και οι συντελεστές προσδιορισμού κυμάνθηκαν από 0,997 έως 0,999, για το σύνολο των ενώσεων.

Για κάποιες από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, απο τα 9 σημεία της καμπύλης βαθμονόμησης, το πρώτο ή το ένατο εισήγαγαν σφάλμα στη γραμμικότητα και δε χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή της εξίσωσης παλινδρόμησης. Τα σημεία της καμπύλης αναλύθηκαν πριν και μετά τη σειρά των πραγματικών δειγμάτων και προκειμένου για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο καμπυλών. Το εύρος των συγκεντρώσεων που δύναται να ποσοτικοποιηθούν καλύπτει τα ανώτατα θεραπευτικά επίπεδα, με εξαίρεση τις ενώσεις κεφουροξίμη και κεφοξιτίνη. Ωστόσο, τόσο τα ανώτατα θεραπευτικά, όσο και τα τοξικά επίπεδα μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με αραιώση του δείγματος με ανάλογο όγκο λευκού υποστρώματος, έως και δέκα φορές.

16.1.2 Προκατεργασία δειγμάτων αίματος και οροαιματηρού υγρού

Η αραιώση με υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,1 % εφαρμόστηκε κατά την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων και κατά τη διαδικασία επιβάρυνσης του δείγματος με γνωστή συγκέντρωση προτύπου [6]. Το στάδιο της αραιώσης με το διάλυμα εσωτερικού προτύπου είναι απαραίτητο, καθώς προσομοιάζει τη σύσταση του διαλύματος με τη σύσταση της κινητής φάσης.

16.2 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

16.2.1 Ακρίβεια και Πιστότητα

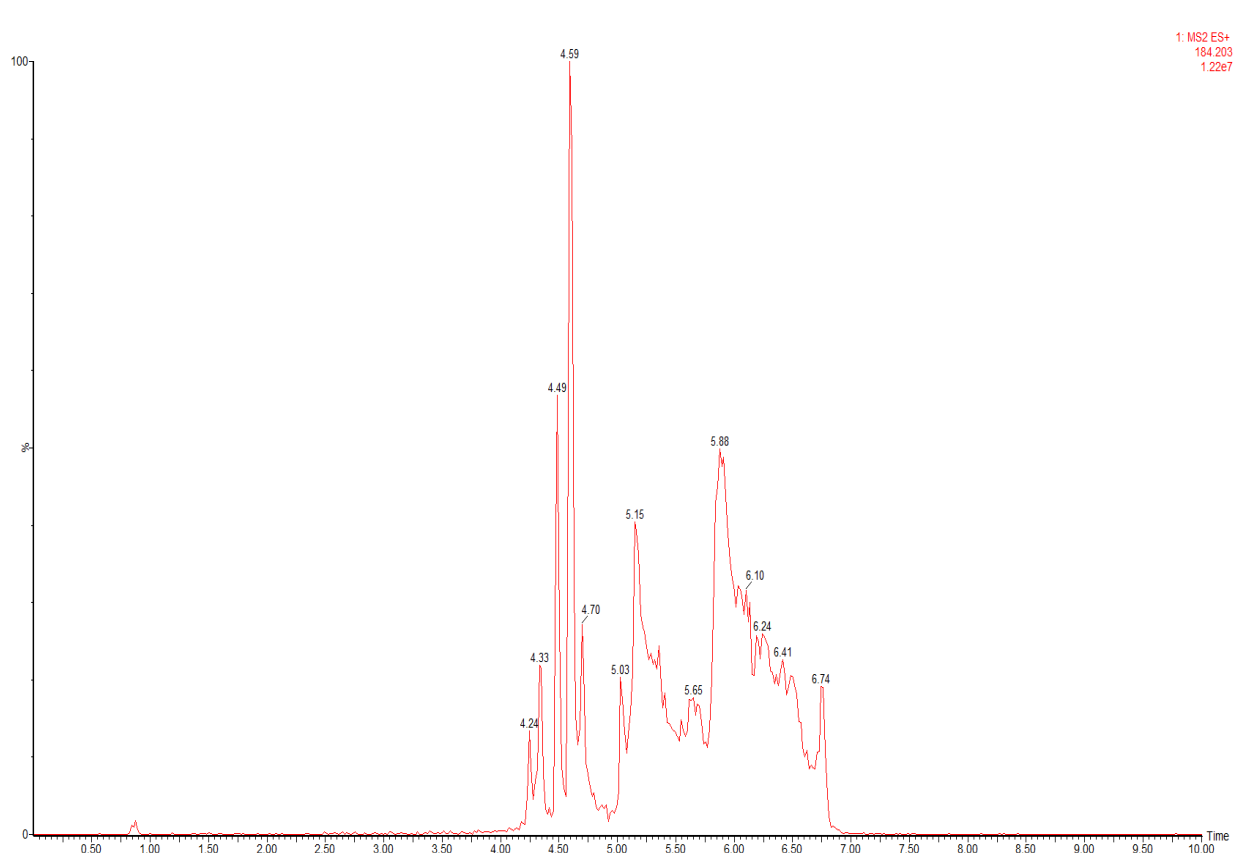
Τόσο η ακρίβεια όσο και η πιστότητα της μεθόδου βρέθηκαν εντός των ορίων $\pm 15 \%$ (ή $\pm 20 \%$ για τις ελάχιστες συγκεντρώσεις), που έχουν τεθεί από ελεγκτικούς φορείς, όπως ο FDA των ΗΠΑ και ο ΕΜΕΑ της Ευρωπαϊκής Ένωσης [41],[42]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 2.22 και 2.23.

16.2.2 Ανάκτηση Εκχύλισης, Επίδραση Υποστρώματος

Από τη μελέτη της ανάκτησης της εκχύλισης, η οποία παρουσιάζεται στον πίνακα 2.8, προέκυψε ότι τα αντιβιοτικά με έντονη την ιδιότητα της σύνδεσης σε πρωτεΐνες, όπως η τεϊκοπλανίνη και η βανκομυκίνη εμφανίζουν χαμηλή ανάκτηση, ωστόσο η ποσοτικοποίηση με τη χρήση καμπύλης βασισμένης σε υπόστρωμα είναι εφικτή, καθώς η ανάκτηση είναι παρόμοια και σταθερή για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι είναι απαραίτητη η χρήση επιμολυσμένου υποστρώματος για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς ο στόχος είναι η παράλληλη ανάλυση όλων των ενώσεων.

Όσον αφορά στην επίδραση από το υπόστρωμα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι παρακολούθησης των φωσφολιπιδίων, καθώς είναι γνωστό ότι τα φωσφολιπίδια του αίματος είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο αυτό. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν σάρωση πρόδρομου ιόντος, σάρωση ουδέτερης απόκλισης, θραυσματοποίηση στην πηγή και παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης. Η σάρωση πρόδρομου ιόντος στο θετικό ιονισμό παρέχει το ιόν m/z 184, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της φωσφατιδυλοχολίνης, της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης και της σφιγγομυελίνης[21]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, εξάγοντας το χρωματογράφημα του ιόντος με m/z 184 από το χρωματογράφημα συνολικού φορτίου (TIC) σε μια ανάλυση πλήρους σάρωσης επαληθεύτηκε το αποτέλεσμα της απώλειας της επίδρασης του υποστρώματος, το οποίο προέκυψε από τον υπολογισμό του παράγοντα υποστρώματος (Σχήμα 2.7 και πίνακας 2.8). Η μελέτη αυτή είναι απαραίτητη σε ταχείες μεθόδους ανάλυσης, καθώς υπάρχει πιθανότητα συσώρευσης των λιπιδίων στη στήλη και η σταδιακή επίδρασή τους κατά αύξουσα σειρά ανάλυσης

των δειγμάτων σε μια μέρα. Στο σχήμα 2.7 είναι εμφανές ότι τα φωσφολιπίδια εκκλύονται στο στάδιο «καθαρισμού» του βαθμωτού προγράμματος έκλουσης, που ορίστηκε μετά τα 3,5 λεπτά, όταν η έκλυση όλων των προσδιοριζόμενων ουσιών έχει ολοκληρωθεί. Στο στάδιο αυτό, ο μεγαλύτερος όγκος της κινητής φάσης αποτελείται από οργανικό διαλύτη. Με όλα τα παραπάνω, θεωρούμε ότι το υπόστρωμα δεν επηρεάζει το ποσοτικό τελικό αποτέλεσμα σε βαθμό που να κρίνεται αναξιόπιστη η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού.



Σχήμα 2.7. Εξαγωγή του χρωματογραφήματος του ιόντος με m/z 184 από το χρωματογράφημα ολικού φορτίου πλήρους σάρωσης.

Πίνακας 2.8. Αποτελέσματα δοκιμών επίδρασης υποστρώματος και ανάκτησης εκχύλισης (οι τιμές που δίνονται στον πίνακα είναι οι μέσοι όροι 2 αποτελεσμάτων).

		Παράγοντας Υποστρώματος			%Ανάκτηση Εκχύλισης		
Προσδιοριζόμενη Ένωση		HQC	MQC	LQC	HQC	MQC	LQC
Τείκοπλανίνη	A2-1	0,96	0,98	0,97	43	39	38
	A2-2,3	0,94	0,88	0,89	45	48	46
	A2-4,5	0,93	1,05	0,98	51	46	47
	A3-1	1,13	1,10	1,12	35	36	38
Δαπτομυκίνη		1,11	1,13	1,12	97	86	94
Σιπροφλοξασίνη		1,03	1,06	1,11	72	68	68
Κεφοξιτίνη		0,91	0,96	1,05	87	92	90
Βανκομυκίνη		1,01	0,93	0,96	52	54	51
Κεφουροξίμη		0,96	0,98	0,91	85	79	82
Δοξυκυκλίνη		-	0,98	-	-	-	-

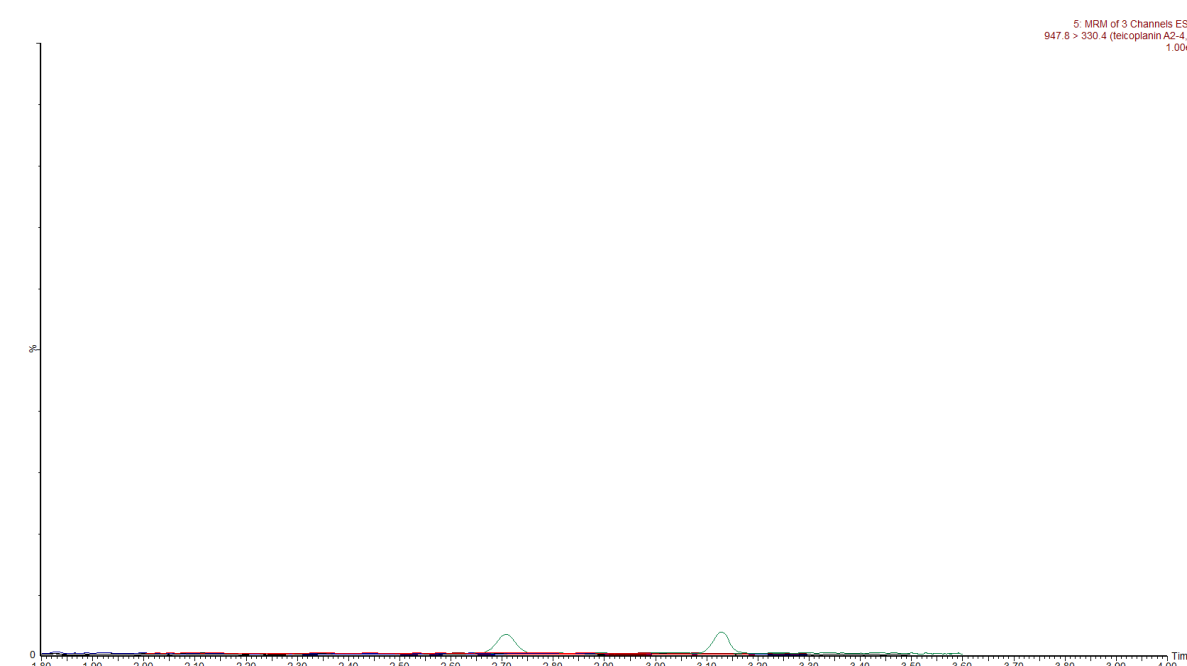
16.2.3 Δυνατότητα Αραίωσης του Δείγματος

Από τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτή η πολλαπλάσια αραίωση του δείγματος με λευκό υπόστρωμα έως και δέκα φορές, χωρίς να μειωθεί η ακρίβεια της μέτρησης. Αυτή η πληροφορία είναι χρήσιμη στις περιπτώσεις όπου το δείγμα έχει πολύ υψηλή συγκέντρωση και απαιτείται αραίωση προκειμένου για την ανάλυσή του. Επιπρόσθετα, από την αραίωση του αίματος με ίσο όγκο ορού προέκυψαν οι προβλεπόμενες συγκεντρώσεις. Έτσι, το μόνο πιθανό σφάλμα κατά την ανάλυση του οροαιματηρού υγρού εισάγεται από το χρόνο παραμονής στο δοχείο συλλογής.

16.2.4 Carry Over, Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα είναι μια παράμετρος που εξαρτάται από την τεχνική της ανάλυσης και το είδος του οργάνου. Ένα πολύ καλό παράδειγμα για την ανάδειξη των ικανοτήτων της οργανολογίας που χρησιμοποιήθηκε είναι η τείκοπλανίνη. Τα συστατικά της τείκοπλανίνης διαχωρίστηκαν, αναλύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ξεχωριστά, για πρώτη φορά, το 2013, από τον Tsai και τους συνεργάτες του, με ανάλογο σύστημα ανάλυσης [23]. Οι ισομορφές A2-2 και A2-3 έχουν την ίδια μάζα και παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα στη χημική τους δομή, με αποτέλεσμα να μη διαχωρίζονται ούτε από το φασματογράφο μάζας, αλλά ούτε και από το χρωματογραφικό σύστημα. Το ίδιο συμβαίνει και για το ζεύγος ισομερών A2-4 και A2-5. Επομένως, αυτές είναι οι μόνες ενώσεις για τις οποίες η μέθοδος δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα, εφόσον από τις πειραματικές δοκιμές προέκυψε ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση από ενδογενείς ενώσεις για κανένα από τα δείγματα. Εξάλλου, στη συγκεκριμένη μελέτη κάθε δείγμα ασθενούς αποτελούσε λευκό δείγμα για τις πέντε από τις έξι ενώσεις.

Από τη μελέτη του φαινομένου carry over προέκυψε ότι δεν υπάρχει σημαντική μεταφορά ποσότητας ουσίας μεταξύ των αναλύσεων. Κορυφές εμφανίστηκαν μόνο στην περίπτωση της A2-2,3 και της δαπτομυκίνης, όμως ήταν πολύ μικρότερες αυτών του LOQ των ενώσεων(βλ. παράρτημα).

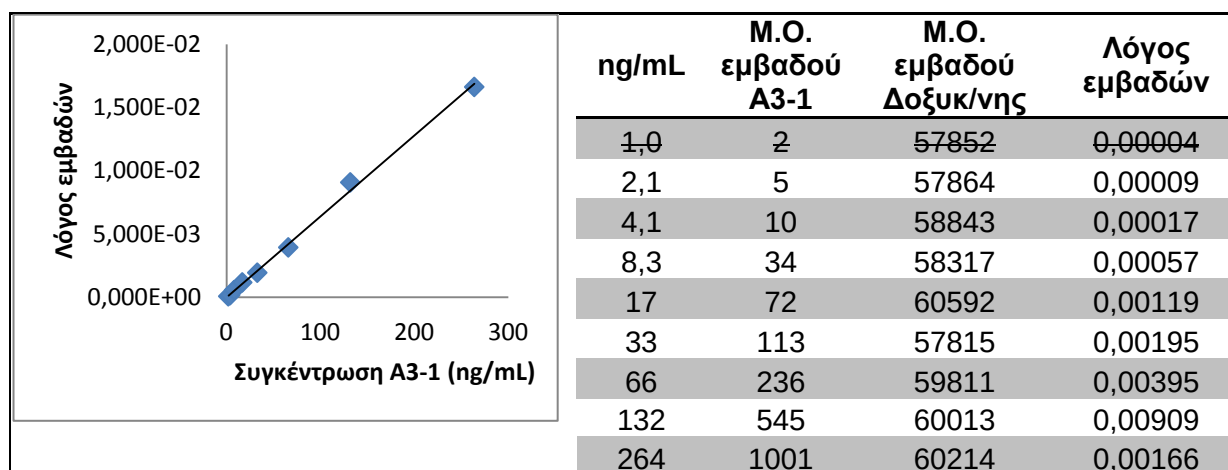


Σχήμα 2.8. Χρωματογραφήματα σε αλληλεπικάλυψη για όλες τις προσδιοριζόμενες ουσίες, από ανάλυση λευκού δείγματος αμέσως μετά την ανάλυση του υψηλότερου προτύπου. Οι κορυφές ανήκουν στην ισομορφή A2-2,3 και την δαπτομυκίνη.

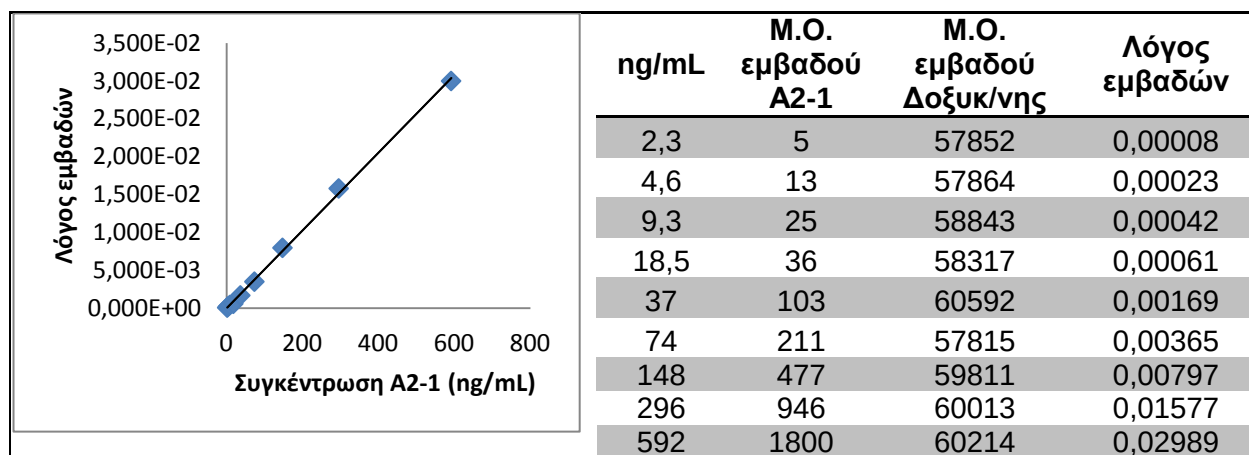
16.2.5 Γραμμικότητα της Καμπύλης βαθμονόμησης & LOD, LOQ

Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται οι κλίσεις και οι τετμημένες επί την αρχή των αξόνων. Ο υπολογισμός των LOD και LOQ βασίστηκε στο χαμηλότερο επιπέδο συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης. Το LOD ορίστηκε ως ο λόγος της συγκέντρωσης του πρώτου σημείου της καμπύλης βαθμονόμησης με τον αριθμό 3,3. Για τις περισσότερες ενώσεις αυτό το όριο ανίχνευσης αντιπροσωπεύει το πραγματικό (αυτό που παρέχει η οργανολογία), επειδή η καμπύλη ξεκινά από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε κάποιες άλλες, όπως στη βανκομυκίνη και τη δαπτομυκίνη είναι φαινομενικό και ακολουθεί τον ορισμό του ορίου ποσοτικής αποτίμησης.

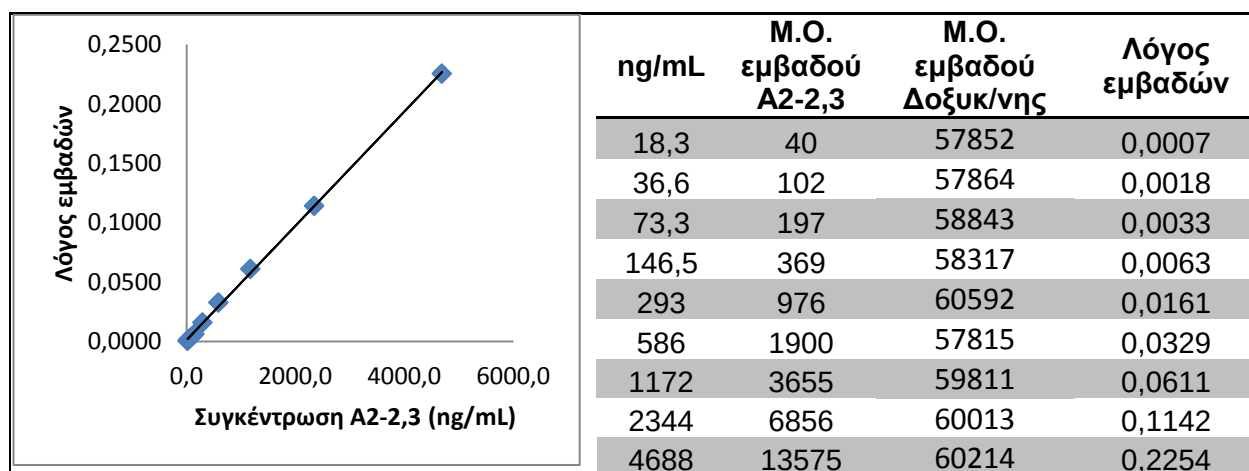
Πίνακας 2.9. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισομορφής A3-1 της τεϊκοπλανίνης.



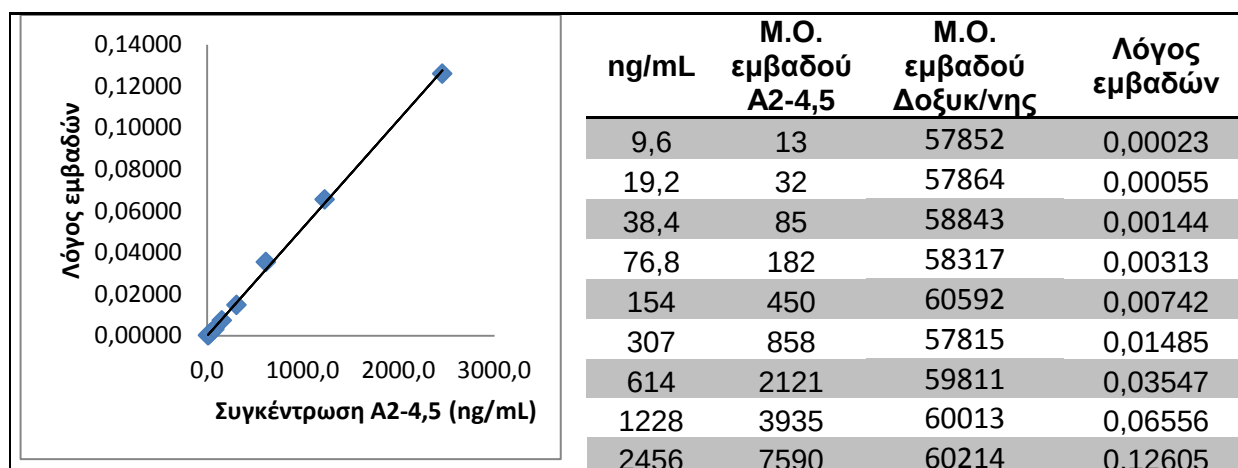
Πίνακας 2.10. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισομορφής A2-1 της τεϊκοπλανίνης.



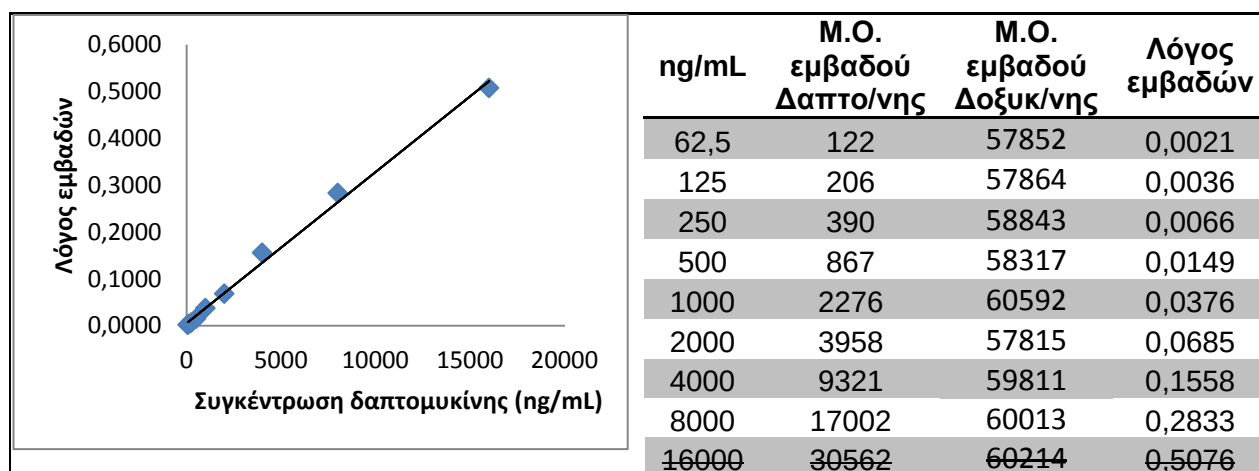
Πίνακας 2.11. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισομορφής A2-2,3 της τεϊκοπλανίνης.



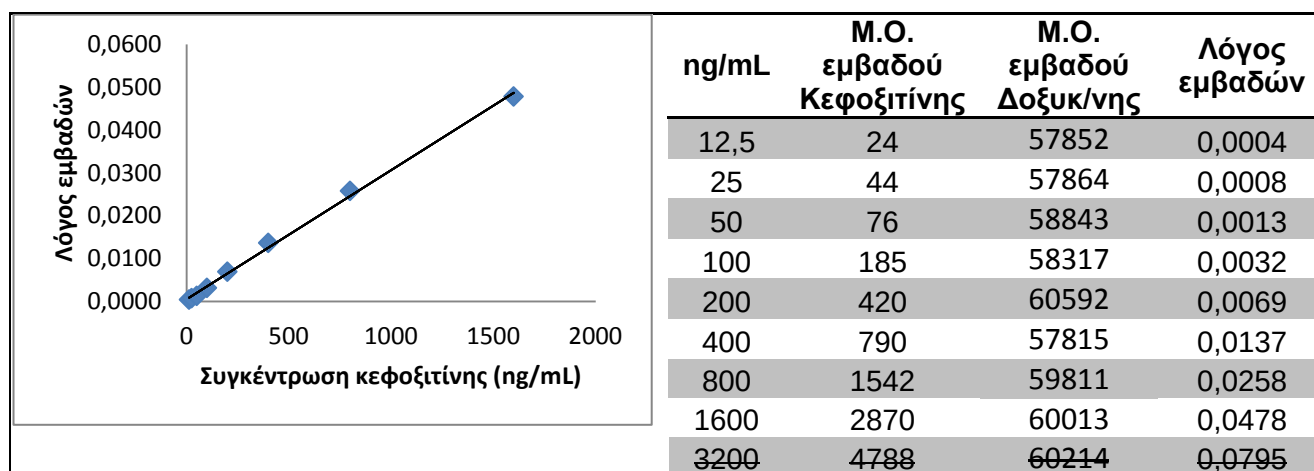
Πίνακας 2.12. Καμπύλη βαθμονόμησης της ισομορφής A2-4,5 της τείκοπλανίνης.



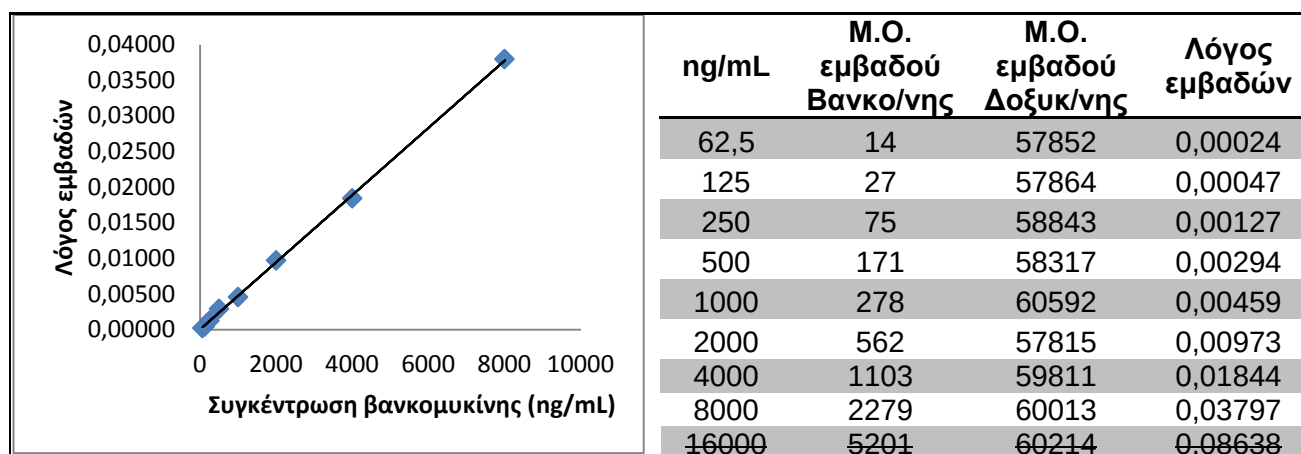
Πίνακας 2.13. Καμπύλη βαθμονόμησης της δαπτομυκίνης.



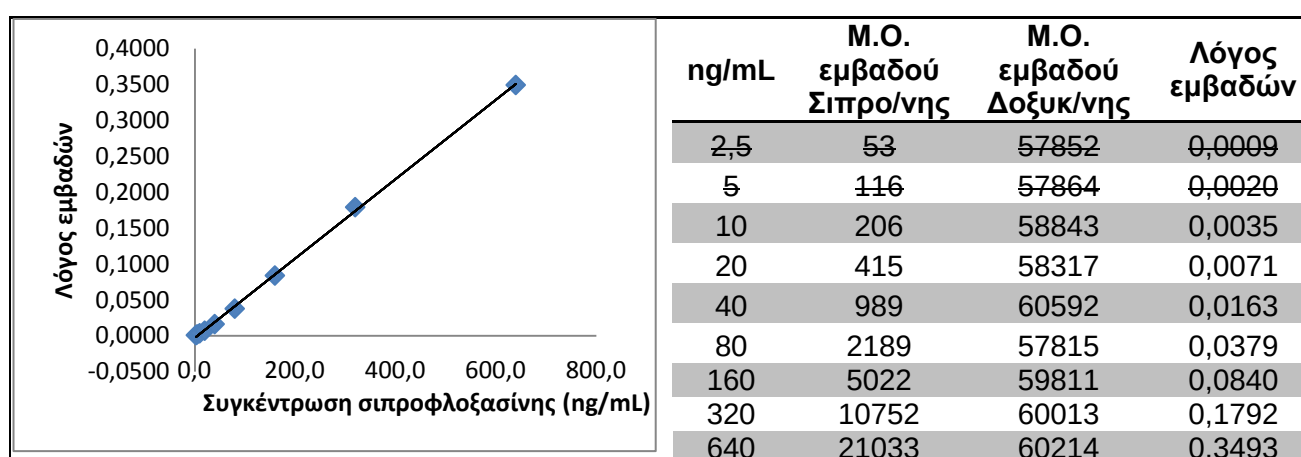
Πίνακας 2.14. Καμπύλη βαθμονόμησης της κεφοξιτίνης.



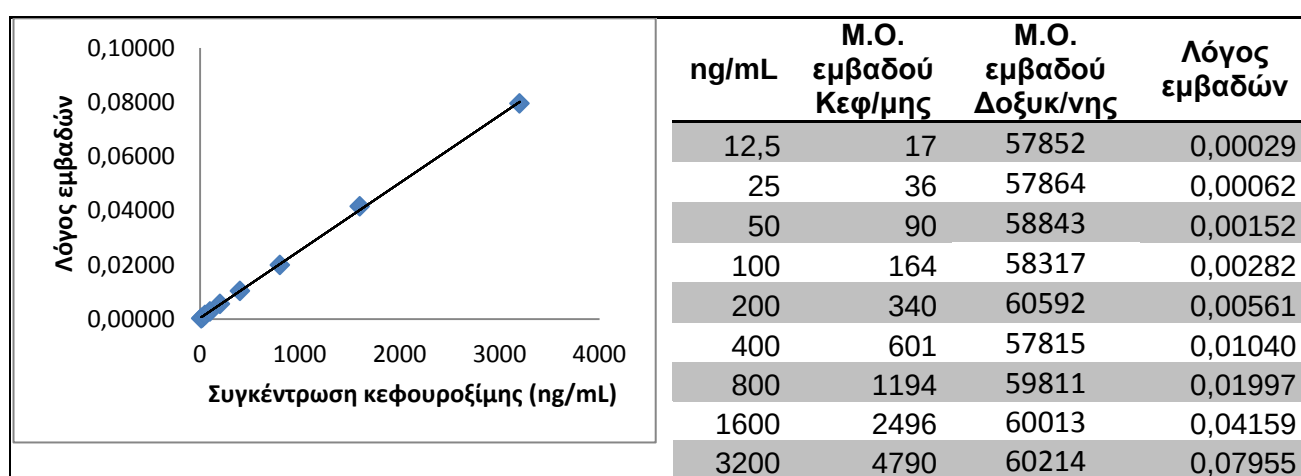
Πίνακας 2.15. Καμπύλη βαθμονόμησης της βανκομικίνης.



Πίνακας 2.16. Καμπύλη βαθμονόμησης της σιπροφλοξασίνης.



Πίνακας 2.17. Καμπύλη βαθμονόμησης της κεφουροξίμης.

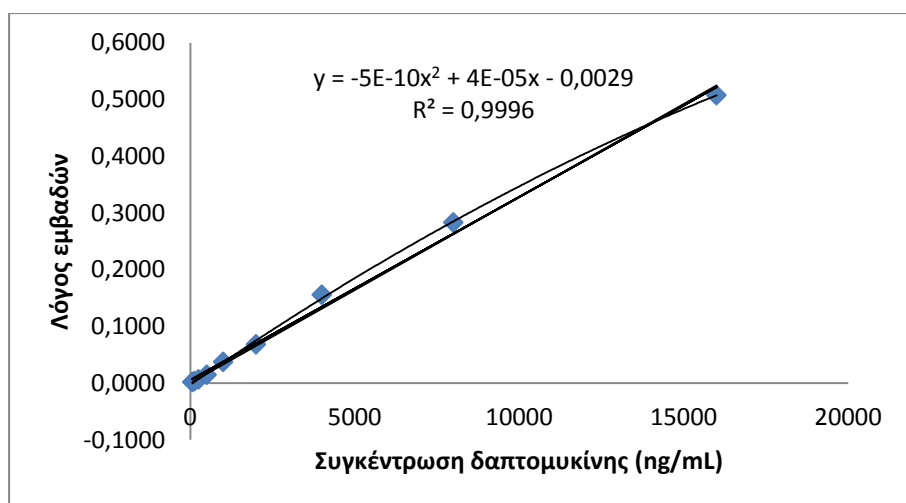


Πίνακας 2.18. Χαρακτηριστικά της καμπύλης βαθμονόμησης.

Προσδ/νη Ένωση		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R ²	Εύρος Γραμμικής Περιοχής (ng/mL)	Μέση κλίση ±Τυπική Απόκλιση	Μέση Τετμημένη επί την Αρχή ± Τυπική Απόκλιση
Τεϊκοπλανίνη	A2-1	0,7	2	0,998	2-550	5,1×10 ⁻⁵	-1,8×10 ⁻⁵
	A2-2,3	5,6	18	0,998	18-4.600	4,9×10 ⁻⁵	0*
	A2-4,5	2,9	10	0,998	10-2.400	5,2×10 ⁻⁵	7,8×10 ⁻⁶
	A3-1	0,6	2	0,997	2-250	6,4×10 ⁻⁵	-1,9×10 ⁻⁶
Ολική Τεϊκοπλανίνη		9,8	32		32-7.800		
Δαπτομυκίνη		18,9	63	0,997	63-8.000	3,6×10 ⁻⁵	-3,6×10 ⁻⁴
Σιπροφλοξασίνη		3,0	10	0,999	10-640	5,6×10 ⁻⁴	-4,0×10 ⁻³
Κεφοξιτίνη		3,8	13	0,997	13-1.600	3,0×10 ⁻⁵	0
Βανκομυκίνη		18,9	63	0,999	63-8.000	4,7×10 ⁻⁶	5,7×10 ⁻⁵
Κεφουροξίμη		3,8	13	0,999	13-3.200	3,0×10 ⁻⁵	0

*Η τετμημένη επί την αρχή των αξόνων ορίστηκε μηδέν εκεί όπου ήταν απαραίτητο η γραμμή τάσης να περνά από την αρχή των αξόνων

Σ' αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η δαπτομυκίνη πιθανόν να προσδιορίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια με τη χρήση πολυωνυμικής εξίσωσης παλινδρόμησης. Στο σχήμα 2.9 είναι φανερό ότι ο συντελεστής προσδιορισμού είναι πιο κοντά στη μονάδα στο εναλλακτικό μοντέλο εξίσωσης[36]. Ωστόσο, εξαιτίας της περιορισμένης εμπειρίας σχετικά με το μοντέλο αυτό, η καμπύλη βαθμονόμησης εκφράστηκε με το συμβατικό. Επιπρόσθετα, ο FDA συνιστά τη μη χρήση πολύπλοκων μοντέλων, ή αιτιολόγησή τους. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για την κεφοξιτίνη.



Σχήμα 2.9. Εναλλακτικό μοντέλο εξίσωσης παλινδρόμησης για τη δαπτομυκίνη.

Πίνακας 2.19. Τα στοιχεία ανάδειξης της ικανότητας ποσοτικής αποτίμησης της μεθόδου. Οι στήλες 4 και 5 αφορούν σε βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα θεραπευτικά και τα τοξικά επίπεδα[43].

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ				
Προσδιοριζόμενη Ένωση	Εύρος Περιοχής Αποτίμησης (ng/mL)	Εύρος Αποτίμησης με αναγωγή* (ng/mL)	Θεραπευτικά Επίπεδα (ng/mL)**	Τοξικά Επίπεδα (ng/mL)**
Τείκοπλανίνη	A2-1	2,3-550		
	A2-2,3	18,3-4.600		
	A2-4,5	9,6-2.400		
	A3-1	2,1-250		
Ολική				
Τείκοπλανίνη	32,3-7.800	258-62.400	10.000-60.000	200.000
Δαπτομυκίνη	62,5-8.000	500-64.000	30.000-110.000	Δ.β.
Σιπροφλοξασίνη	10,0-640	80-5.120	1.400-4.000	11.500
Κεφοξιτίνη	12,5-1.600	100-12.800	30.000-150.000	Δ.β.
Βανκομυκίνη	62,5-8.000	500-64.000	5000-15.000	>50.000
Κεφουροξίμη	12,5-3.200	100-25.600	10.000-180.000	Δ.β.

*Ο παράγοντας αραιώσης είναι 8

**Δυνατότητα αραιώσης του δείγματος μέχρι δέκα φορές, όπου είναι απαραίτητο.

16.2.6 Σταθερότητα

Από τη μελέτη της σταθερότητας σε θερμοκρασία δωματίου για μια ημέρα προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική απώλεια για όλα τα αντιβιοτικά εκτός της σιπροφλοξασίνης, ενώ, μόνο οι δευτερεύουσας σημασίας ισομορφές της τεϊκοπλανίνης (A3-1 & A2-1) φαίνεται να είναι σταθερές. Η σιπροφλοξασίνη δεν εμφανίζει απώλειες σε όλες τις δοκιμασίες της μελέτης. Τα προκατεργασμένα δείγματα μπορούν να συντηρηθούν στο ψυγείο με επιφύλαξη μέχρι 14 ώρες με εξαίρεση τα δείγματα της βανκομυκίνης. Στον αυτόματο δειγματολήπτη μπορούν να συντηρηθούν μέχρι και 48 ώρες, στους 4 °C με εξαίρεση πάλι τα δείγματα της βανκομυκίνης, τα οποία είναι σταθερά μόνο για τις πρώτες 14 ώρες. Επιπρόσθετα, τα δείγματα μπορούν να καταψυχθούν-αποψυχθούν για τουλάχιστον τρεις φορές. Ενώ τελικά, η μελέτη για τη μακροπρόθεσμη συντήρηση των δειγμάτων στους -20 °C, παρουσιάζει σταθερότητα των ενώσεων, για τις πρώτες δύο εβδομάδες ψύξης των δειγμάτων. Όλα τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 2.24.

16.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων αίματος και οροαιματηρού υγρού δίνονται στον πίνακα 2.20 και αναπαρίστανται σχηματικά στο γράφημα 2.10. Στο οροαιματηρό υγρό κάποιες τιμές ακολουθούσαν τα επίπεδα συγκεντρώσεων στο αίμα, με λογική σειρά μείωσης της συγκέντρωσης με το χρόνο, ενώ κάποιες άλλες ήταν πολύ χαμηλές. Ωστόσο, σ' αυτή την περίπτωση, σημαντικό ρόλο παίζει και η σταθερότητα των ενώσεων σε συνθήκες δωματίου, αφού από τη μελέτη της σταθερότητας προέκυψε ότι μεγάλο ποσοστό της βανκομυκίνης αποικοδομείται στις συνθήκες αυτές [44]

Βιβλιογραφικά βρέθηκε μια περίπτωση ασθενούς με βαριά προβλήματα υγείας, που του χορηγήθηκε **δαπτομυκίνη** σε δόση 6 mg/kg/ημέρα και τη δωδέκατη ημέρα χορήγησης, η υψηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα βρέθηκε 39 µg/mL (30 λεπτά μετά τη χορήγηση) και η χαμηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε 14 µg/mL (24 ώρες μετά τη χορήγηση). Οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται

χαμηλές, καθώς οι αντίστοιχες σε υγιή άτομα θα ήταν μεγαλύτερες των 80 µg/mL [36]. Από την άλλη, η ίδια πηγή αναφέρει ότι με τη δόση συντήρησης που χορηγείται σε καθημερινή βάση παρουσιάζεται σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης με την πάροδο του χρόνου. Επομένως, οι συγκεντρώσεις στην εφάπαξ δόση εφόδου αναμένεται να είναι χαμηλότερες των 80 µg/mL. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για τον *staphylococcus aureus* είναι 1 µg/mL και για τον *Enterococcus faecalis* είναι μόλις 4 µg/mL[45].

Οι παρασκευαστές ενός σκευάσματος κεφοξιίνης αναφέρουν ότι η μέγιστη συγκέντρωση της **κεφοξιίνης** στον ορό του αίματος μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 1g διάρκειας 3 λεπτών ήταν 110.5 µg/mL, για χρονική διάρκεια χορήγησης 30 λεπτών ήταν 72 µg/mL, ενώ για χρονική διάρκεια 120 λεπτών ήταν 25 µg/mL [46]. Μια άλλη πηγή αναφέρει εύρος συγκεντρώσεων 22 ± 12 µg/mL, αναφερόμενη σε λήψη δείγματος 1,5 έως και 4 ώρες μετά την έγχυση[47]. Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στο αίμα των ασθενών της παρούσας εργασίας παρότι πραγματοποιήθηκε σύντομη έγχυση και λήψη του δείγματος στο πρώτο μισάωρο, προσομοιάζουν περισσότερο τη δεύτερη περίπτωση.

Για την **τεϊκοπλανίνη**, συγκεντρώσεις στο πλάσμα μικρότερες των 10 µg/mL θεωρούνται ημι-θεραπευτικές, οι συγκεντρώσεις από 10 έως 20 µg/mL είναι ο στόχος όταν ελλοχεύουν Gram-θετικές λοιμώξεις, οι συγκεντρώσεις από 20 έως 60 µg/mL είναι απαραίτητες για σοβαρές λοιμώξεις από σταφυλόκοκκο, ενώ οι μεγαλύτερες των 60 µg/mL θεωρούνται τοξικές[7]. Στην παρούσα μελέτη, όπου ο σταφυλόκοκκος αποτελεί επιπρόσθετο στόχο, τα επίπεδα μπορούν να χαρακτηριστούν ημι-θεραπευτικά (ημι-προφυλακτικά).

Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι η Παρακολούθηση της Θεραπευτικής Συγκέντρωσης της **βανκομυκίνης** είναι χρήσιμη. Στον παρελθόν, προτάθηκε η αποφυγή της κορυφαίας συγκέντρωσης των 50 µg/mL εξαιτίας της εμφάνισης περιστατικών ωτοτοξικότητας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 80 µg/mL. Ένα από τα προβλήματα της μέτρησης της κορυφαίας συγκέντρωσης είναι η σχέση της με το χρόνο δειγματοληψίας. Η συγκέντρωση των 40 µg/mL έχει εντελώς διαφορετική σημασία αν πρόκειται για δείγμα αμέσως μετά τη χορήγηση ή 1 ή 2 ώρες μετά από αυτή. Το εύρος 5-10 µg/mL παρουσιάζει σημαντική

υποστήριξη από τη βιβλιογραφία και αντανακλά στην ανάγκη να βρίσκονται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε επίπεδα μεγαλύτερα της MIC (minimal inhibitory concentration-ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) των οργανισμών. Συγκεντρώσεις μικρότερες της MIC σχετίζονται με αποτυχημένη θεραπεία. Η MIC της βανκομυκίνης είναι σχεδόν 1,5 µg/mL. Η πρωτεϊνική σύνδεση του μορίου είναι περίπου 50 %, με αποτέλεσμα η ελάχιστη απαραίτητη συγκέντρωση να είναι η 3 µg/mL. Συγκεντρώσεις ανατροφοδότησης (trough) μεγαλύτερες των 10 µg/mL έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο νεφροτοξικότητας. Τελικά, το εύρος 5-10 µg/mL φαίνεται να είναι το πιο αξιόπιστο[44],[48].

Εκ νίνο μελέτες έδειξαν ότι περίπου το 34% της συνολικής συγκέντρωσης της **σιπροφλοξασίνης** στο πλάσμα ήταν δεσμευμένο σε πρωτεΐνες. Το ποσοστό αυτό φάνηκε να είναι σταθερό για μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Στους ενήλικες το ποσοστό είναι ελαφρώς μικρότερο (27%) [49]. Οι θεραπευτικές τιμές της σιπροφλοξασίνης σε φυσιολογικούς ανθρώπους που λαμβάνουν ενδοφλέβια δόση 400 mg σε σταθερή κατάσταση είναι 0,5-5 mg/mL [50].

Πραγματοποιήθηκε μελέτη μετεγχειρητικής προφύλαξης με **κεφουροξίμη**, για ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση παράκαμψης στεφανιαίας αρτηρίας (GABG-bypass) και έλαβαν το αντιβιοτικό για μισή έως πέντε και μισή ημέρες, σε συνεχή έγχυση. Το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν από 6,6 έως 58,5, ενώ η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για τον *Staphylococcus aureus* είναι τα 4 µg/mL [51].

Με συνδυασμό των πληροφοριών από τη βιβλιογραφία και των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, σχετικά με τα επίπεδα των συγκεντρώσεων στο αίμα, που μπορούν να προφυλάξουν τους ασθενείς από μετεγχειρητική λοίμωξη προκύπτει ότι η κεφουροξίμη βρέθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα. Η βανκομυκίνη κάλυπτε τις ανάγκες της προφύλαξης, αλλά σε κάποιους ασθενείς τα επίπεδα βρέθηκαν αρκετά υψηλά. Η τείκοπλανίνη κάλυπτε ευρύ φάσμα βακτηριακών λοιμώξεων, ωστόσο σε πολλούς ασθενείς υστερούσε στην προστασία από σταφυλόκκοκο. Η δαπτομυκίνη βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα, αλλά η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) κάποιων βασικών Gram-θετικών μικροοργανισμών είναι πολύ χαμηλότερη. Η σιπροφλοξασίνη βρέθηκε στα θεραπευτικά επίπεδα. Η κεφοξιτίνη βρέθηκε σε χαμηλές και μη προφυλακτικές συγκεντρώσεις. Σε κάθε περίπτωση οι συγκεντρώσεις στο

οροαιματηρό υγρό ήταν χαμηλότερες από αυτές του αίματος, και μόνο σε λίγες περιπτώσεις άγγιζαν τις θεραπευτικές τιμές.

Τελικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι ιατροί είναι αρμόδιοι για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς αυτοί μπορούν να εξάγουν επιπρόσθετα συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο χορήγησης των αντιβιοτικών και τη μελέτη παραγόντων που επιδρούν στο αποτέλεσμα της συγκέντρωσης στο αίμα.

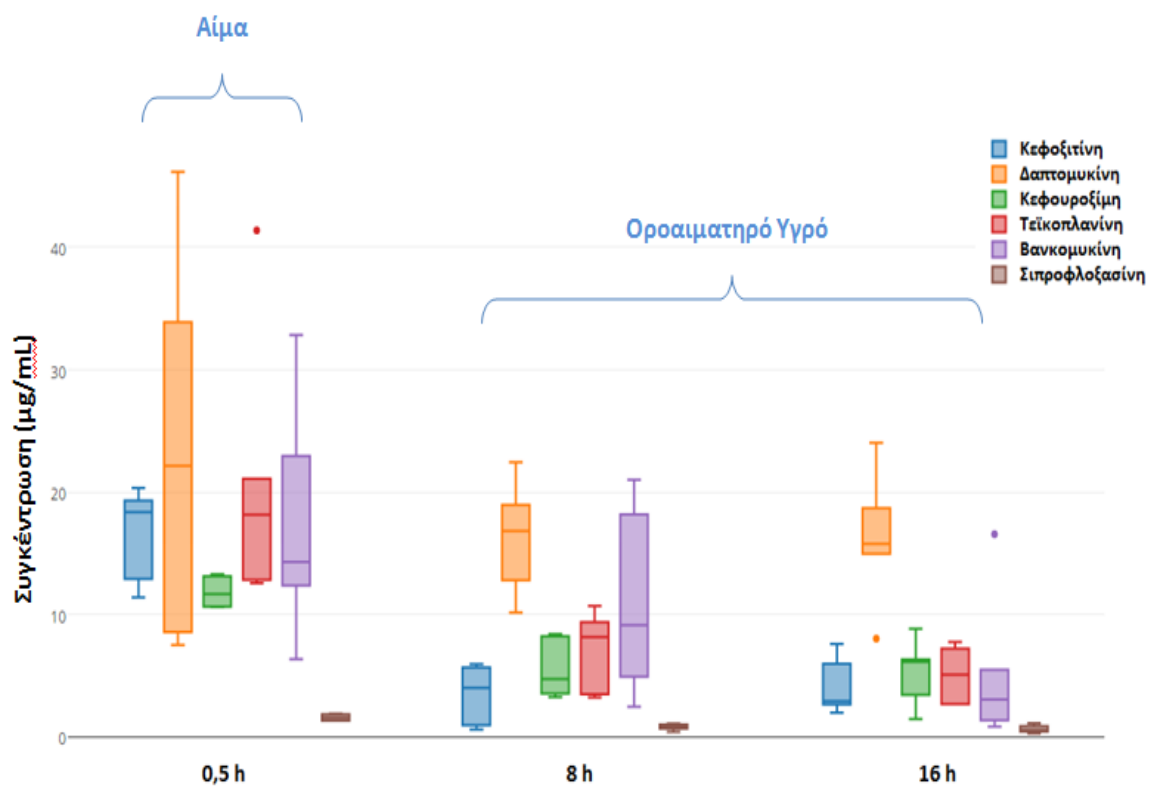
Πίνακας 2.20. Οι συγκεντρώσεις στα δείγματα των ασθενών.

ng/mL		Τείκοπλανίνη	Δαπτομυκίνη	Σπιροφλοξασίνη	Κεφοξίτινη	Βανκομυκίνη	Κεφουροξίμη
Ασθενής	Χρόνος Δειγματοληψίας (ώρες)						
1 ^{ος}	0.5	41385	18957	1303	17509	32841	12319
	8	10680	14952	798	1959	18156	3517
	16	7209	7476	413	579	16554	3412
2 ^{ος}	0.5	12816	33909	1321	19304	13269	13123
	8	7843	16287	993	2413	2437	8824
	16	7743	15753	862	2314	827	5287
3 ^{ος}	0.5	21093	27234	1746	11395	15283	10638
	8	3471	15219	1081	5951	13024	8378
	16	2670	12816	1094	5671	2531	6322
4 ^{ος}	0.5	15486	17088	1869	12890	6341	13283
	8	8544	10146	654	7585	5243	8214
	16	5073	8010	574	5537	1345	6265
5 ^{ος}	0.5	12549	18690	1869	20334	22943	10611
	8	3204	17889	720	5943	21007	3219
	16	2670	8544	453	3139	3556	1449
6 ^{ος}	0.5	20826	46191	1335	19184	12348	10982
	8	9345	24030	403	2675	5465	5977
	16	5073	22428	261	937	4907	4139

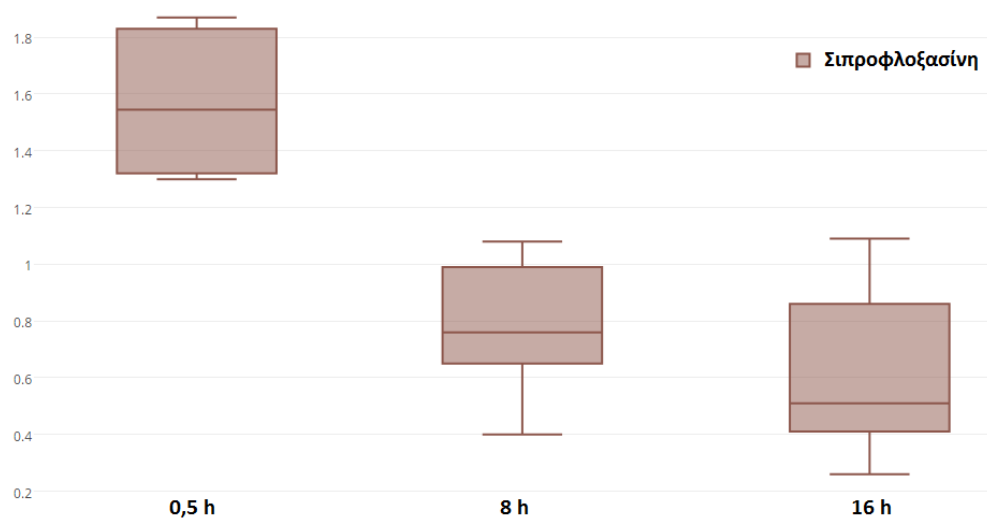
Πίνακας 2.21. Οι συγκεντρώσεις στα δείγματα αίματος και οροαιματηρού υγρού των ασθενών.

Προσδ. Ένωση		Χρόνος Συγκρ. (min)	Αίμα (μg/mL)	Οροαιματηρό Υγρό στις 8ώρες (μg/mL)	Ορο/ρό Υγρό στις 16ώρες (μg/mL)	Θεραπευτικά Επίπεδα (μg/mL)	Τοξικά Επίπεδα (μg/mL)
Τείκοπλανίνη	A2-1	2,69				-	-
	A2-2,3	2,72				-	-
	A2-4,5	2,80				-	-
	A3-1	2,41				-	-
Ολική Τείκοπλανίνη		-	12,82-41,39	3,20-10,68	2,67-7,74	10-60	200
Δαπτομυκίνη		3,14	7,48-46,19	12,82-22,43	8,01-24,03	30-110	Δ.β.
Σιπροφλοξασίνη		2,48	1,30-1,87	0,26-1,08	0,40-1,09	1,4-4,0	11.5
Κεφοξιτίνη		2,86	11,40-20,33	0,58-5,94	1,96-7,59	30-150	Δ.β.
Βανκομυκίνη		2,22	6,34-32,84	5,24-21,01	0,83-16,55	5-15	>50
Κεφουροξίμη		2,78	10,61-13,28	3,22-8,82	1,45-6,32	10-180	Δ.β.

*Δ.β. (Δε βρέθηκε) [43]



α)



β)

Σχήμα 2.10. α) Θηκόγραμμα που αναπαριστά τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων στα δείγματα των ασθενών. β) Μεγέθυνση του θηκογράμματος της σιπροφλοξασίνης.

Πίνακας 2.22. Αποτελέσματα Ακρίβειας και Πιστότητας της μεθόδου σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων.

			ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ & ΑΚΡΙΒΕΙΑ												ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ & ΑΚΡΙΒΕΙΑ			
Ονομαστικές Συγκεντρ. (ng / mL)			Ημέρα 1			Ημέρα 2			Ημέρα 3			Ημέρα 4						
	Προσδ/νη Ένωση		Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μ.Ο. Προηγ/νων Ημερών ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	
125	Τείκοτλανίνη	A3-1	4,4 ± 0,3	7,7	106,7	4,7 ± 0,2	4,4	114,6	4,5 ± 0,1	3,3	109,5	3,9 ± 0,3	7,8	95,4	4,4 ± 0,4	8,7	106,5	
			15,2 ± 0,9	5,7	92,4	15,7 ± 0,6	4,0	94,9	16,0 ± 1,0	6,4	96,7	16,8 ± 1,5	8,8	101,6	15,9 ± 1,1	6,9	96,2	
			132,1 ± 7,3	5,6	100,1	132,1 ± 2,0	1,5	100,1	132,1 ± 6,2	4,7	100,0	132,0 ± 6,6	5,0	100,0	132,1 ± 5,4	4,1	100,1	
		A2-1	8,7 ± 0,9	10,2	94,3	9,3 ± 1,0	11,2	100,1	9,0 ± 1,2	12,8	97,8	8,9 ± 1,0	11,4	96,0	9,0 ± 1,0	10,8	97,1	
500			37,6 ± 2,4	6,4	101,6	37,0 ± 2,7	7,4	100,0	37,3 ± 3,4	9,1	100,7	37,5 ± 2,6	6,8	101,4	37,4 ± 2,5	6,7	100,9	
			295,9 ± 15,1	5,1	100,0	296,0 ± 13,7	4,6	100,0	296,0 ± 13,9	4,7	100,0	295,9 ± 6,0	2,0	100,0	296,0 ± 11,6	3,9	100,0	
		A2-2,3	64,6 ± 3,5	5,5	88,2	65,2 ± 1,6	2,4	89,1	70,3 ± 3,0	4,3	96,0	83,4 ± 5,9	7,1	113,8	70,9 ± 8,5	12,0	96,8	
			302,6 ± 17,1	5,6	103,3	304,1 ± 22,4	7,4	103,8	297,0 ± 2,9	1,0	101,4	279,0 ± 5,7	2,0	95,2	296,1 ± 16,7	5,6	101,1	
		4000		2343,1 ± 45,2	1,9	100,0	2342,9 ± 54,7	2,3	100,0	2343,6 ± 56,3	2,4	100,0	2345,4 ± 9,4	0,4	100,1	2343,7 ± 41,0	1,8	100,0
			A2-4,5	39,6 ± 1,7	4,3	103,1	35,6 ± 2,0	5,6	92,8	33,7 ± 2,8	8,4	87,9	34,9 ± 2,6	7,4	91,0	36,0 ± 3,1	8,6	93,7
			152,2 ± 2,0	1,3	99,1	157,3 ± 11,3	7,2	102,5	159,9 ± 10,1	6,3	104,2	158,3 ± 5,8	3,7	103,1	156,6 ± 7,8	5,0	102,1	
			1228,1 ± 13,8	1,1	100,0	1227,6 ± 96,2	7,8	100,0	1227,4 ± 31,0	2,5	99,9	1227,5 ± 17,0	1,4	100,0	1227,7 ± 44,9	3,7	100,0	
250	Δαπτομυκίνη	280,4 ± 11,0	3,9	112,1	280,2 ± 12,9	4,6	112,1	280,9 ± 28,1	10,0	112,4	243,3 ± 26,7	11,0	97,3	271,2 ± 25,5	9,4	108,5		
1000		916,9 ± 29,0	3,2	91,7	958,2 ± 82,9	8,7	95,8	957,2 ± 68,6	7,2	95,7	1009,3 ± 80,1	7,9	100,9	957,8 ± 69,1	7,2	95,8		
8000		8008,0 ± 785,6	9,8	100,1	8004,0 ± 364,2	4,6	100,1	8004,1 ± 324,2	4,1	100,1	7999,1 ± 923,5	11,5	100,0	8004,1 ± 599,0	7,5	100,1		
10	Σιπροφλοξασίνη	10,4 ± 0,3	2,8	103,5	11,9 ± 0,2	1,9	118,7	10,1 ± 0,2	1,8	101,0	9,8 ± 0,5	5,3	98,1	10,5 ± 0,9	8,3	105,3		
40		39,6 ± 2,3	5,8	99,0	37,4 ± 0,8	2,2	93,5	39,9 ± 1,0	2,6	99,6	40,3 ± 1,3	3,2	100,7	39,3 ± 1,8	4,5	98,3		
320		320,0 ± 19,3	6,0	100,0	320,3 ± 5,2	1,6	100,1	320,0 ± 6,8	2,1	100,0	320,0 ± 8,2	2,6	100,0	320,1 ± 10,9	3,4	100,0		

Πίνακας 2.23. Συνέχεια του πίνακα 2.23.

Ονομαστικές Συγκεντρ. (ng / mL)	Προσδ/νη Ένωση	Ημέρα 1			Ημέρα 2			Ημέρα 3			Ημέρα 4			Μ.Ο. Προηγ/νων Ημερων ± Τυπική Απόκλιση %Σχ. Τυπική Απόκλιση %Ανάκτηση		
		Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση	%Σχ. Τυπική Απόκλιση	%Ανάκτηση			
50	Κεφοξιτίνη	48,6 ± 2,3	4,7	97,2	45,3 ± 3,5	7,7	90,6	44,5 ± 3,1	7,0	89,1	51,5 ± 2,3	4,5	103,1	47,5 ± 3,9	8,2	95,0
200		201,6 ± 8,8	4,4	100,8	206,5 ± 24,3	11,8	103,3	207,6 ± 3,0	1,4	103,8	197,9 ± 13,8	7,0	98,9	203,3 ± 13,5	6,7	101,6
1600		1599,8 ± 32,9	2,1	100,0	1599,4 ± 125,2	7,8	100,0	1599,3 ± 40,1	2,5	100,0	1600,2 ± 86,8	5,4	100,0	1599,7 ± 70,2	4,4	100,0
250	Βανκομυκίνη	283,4 ± 23,0	8,1	113,4	272,1 ± 8,2	3,0	108,8	299,1 ± 7,8	2,6	119,7	244,5 ± 24,1	9,9	97,8	274,8 ± 26,1	9,5	109,9
1000		907,9 ± 28,8	3,2	90,8	969,5 ± 60,0	6,2	96,9	932,0 ± 8,7	0,9	93,2	1007,6 ± 67,8	6,7	100,8	951,5 ± 57,6	6,1	95,4
8000		8008,9 ± 274,9	3,4	100,1	8003,0 ± 234,4	2,9	100,0	8006,6 ± 143,5	1,8	100,1	7999,3 ± 187,9	2,3	100,0	8004,7 ± 199,2	2,5	100,1
50	Κεφουροξίμη	44,5 ± 3,4	7,6	89,1	45,4 ± 3,0	6,7	90,8	44,9 ± 3,7	8,2	89,7	44,1 ± 2,1	4,9	88,3	44,7 ± 2,9	6,5	89,5
200		206,1 ± 23,0	11,2	103,0	206,4 ± 14,8	7,2	103,2	207,1 ± 15,7	7,6	103,6	208,1 ± 13,6	6,5	104,1	206,9 ± 16,0	7,7	103,5
1600		1599,4 ± 40,4	2,5	100,0	1599,4 ± 60,0	3,7	100,0	1599,3 ± 123,1	7,7	100,0	1599,2 ± 103,4	6,5	100,0	1599,3 ± 77,0	4,8	100,0
500	Δοξυκυκλίνη		7,5			7,3			9,9			10,2			10,8	

Πίνακας 2.24. Αποτελέσματα %ανάκτησης σχετικά με τη μελέτη της σταθερότητας.

Ονομαστικές Συγκεντρ. (ng / mL)			Προσδ/νη Ένωση	24 ώρες στους 25 °C	Συντήρηση ψυγείου		Αυτόματος Δειγματολήπτης στους 10 °C			Κύκλοι Ψύξης-Απόψυξης			Κατάψυξη στους -20 °C	
					14 ώρες	24 ώρες	14 ώρες	24 ώρες	48 ώρες	1 ^{ος} Κύκλος	2 ^{ος} Κύκλος	3 ^{ος} Κύκλος	48 ώρες	15 Ημέρες
125	Τείκοπλανίνη	A3-1	106,2	89,0	106,9	113,7	112,0	94,2	90,0	111,3	91,2	90,5	91,9	
			85,1	110,2	104,1	107,5	108,4	110,5	112,0	112,0	101,4	86,4	88,3	
		A2-1	92,0	49,5	58,7	94,0	93,3	95,8	87,2	84,5	87,8	87,0	86,4	
			87,1	94,6	113,2	93,0	109,9	108,5	96,0	96,0	89,5	112,9	94,1	
4000		A2-2,3	63,1	107,9	107,7	107,2	99,0	86,3	114,9	112,8	111,8	90,4	86,5	
			61,6	96,8	112,8	100,5	113,0	91,8	89,2	89,2	96,2	93,0	95,8	
		A2-4,5	57,8	102,8	101,4	110,4	112,4	103,7	97,2	107,8	105,7	96,3	98,9	
			57,7	98,0	107,0	94,6	102,4	92,9	92,0	92,0	99,4	93,2	96,3	
250	Δαπτομυκίνη	57,5	95,0	74,5	89,2	85,3	85,4	88,6	89,3	93,4	93,2	85,6		
8000		48,9	99,9	110,6	95,9	105,5	101,1	101,4	101,4	101,5	86,3	97,0		
10	Σιπροφλοξασίνη	110,1	105,8	109,8	110,7	111,6	113,2	114,6	112,4	113,2	93,6	101,0		
320		88,3	102,2	113,3	106,1	104,1	107,0	99,5	99,5	94,6	113,0	107,7		
50	Κεφοξιτίνη	77,2	89,8	71,4	95,9	86,6	102,5	83,1	83,5	97,3	103,4	95,4		
1600		79,2	100,2	108,8	101,8	102,1	101,2	108,4	108,4	101,2	106,1	90,8		
250	Βανκομυκίνη	24,7	31,1	27,1	93,9	68,7	62,7	98,9	92,0	113,3	89,7	88,5		
8000		16,7	32,8	38,3	85,0	61,3	55,6	104,8	104,8	101,0	86,6	96,4		
50	Κεφουροξίμη	73,8	99,0	77,2	109,3	111,4	110,2	114,3	105,2	109,5	106,0	101,2		
1600		84,4	102,7	109,6	99,9	110,2	102,6	104,5	104,5	95,0	111,9	106,6		
500	Δοξυκυκλίνη	-	89,3	-	95,2	94,8	105,4	-	-	-	-	-		

Κάθε τιμή %ανάκτησης που εμφανίζεται στον πίνακα είναι το αποτέλεσμα του μέσου όρου δύο αναλύσεων

17. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναπτύχθηκε μια μέθοδος ανάλυσης UHPLC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών τεϊκοπλανίνη, δαπτομυκίνη, βανκομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, κεφοξιτίνη και κεφουροξίμη σε δείγματα ολικού αίματος και οροαιματηρού υγρού.

Η μέθοδος αναδείχθηκε αξιόπιστη και οι παράμετροι επικύρωσης απέδωσαν χαρακτηριστικά όπως: γραμμικότητα με R^2 από 0,997 έως 0,999, ευαισθησία με LOD από 0,6 έως 18,9 ng/mL, ακρίβεια μεταξύ 88,2 και 113,2 (119,7 στο LLOQ της βανκομυκίνης και 118,7 στο LLOQ της σιπροφλοξασίνης), πιστότητα μεταξύ 0,4 και 12,8 %, ανάκτηση εκχύλισης από 36 έως 98 % με σταθερή τιμή στην κάθε περίπτωση, απώλεια επίδρασης υποστρώματος (παράγοντας υποστρώματος από 0,91 έως 1,13), με δυνατότητα αραίωσης του δείγματος έως και δέκα φορές, με απώλεια του φαινομένου “carry over” από ανάλυση σε ανάλυση, με ικανοποιητική εκλεκτικότητα, και σταθερότητα που δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της ανάλυσης αρκεί να δοθεί προσοχή στα δείγματα της βανκομυκίνης, τα οποία θα πρέπει να αναλυθούν εντός 14 ωρών από την επεξεργασία τους.

Από την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών που υποβλήθηκαν σε συνδυασμοπλαστική πρόσθιου χιαστού συνδέσμου προέκυψε ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών κεφουροξίμη, βανκομυκίνη, δαπτομυκίνη και σιπροφλοξασίνη μπορούν να προφυλάξουν από απλές βακτηριακές λοιμώξεις έως και σταφυλόκοκκο. Ενώ τα αντιβιοτικά τεϊκοπλανίνη και κεφοξιτίνη απαιτούν επιπρόσθετη διερεύνηση του τρόπου χορήγησης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε οροαιματηρό υγρό των ίδιων ασθενών που λήφθηκε στις 8 και 16 ώρες μετά την επέμβαση, ωστόσο τα επίπεδα συγκεντρώσεων ήταν χαμηλά και ήταν αδύνατη η συσχέτιση των συγκεντρώσεων στο συγκεκριμένο υποστρώματος με την προφύλαξη των ασθενών.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα για αναλύσεις σε ολικό αίμα και είναι κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας σε κλινικά εργαστήρια. Η χρησιμότητα της εφαρμογής της μεθόδου στα δείγματα οροαιματηρού υγρού πιθανόν να αναδειχθεί σε μελλοντικές μελέτες. Ωστόσο

η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης αποτελεί μια καλή προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων αυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ι.Ν. ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΗΣ, ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΗΓΑΣΟΣ 2000, 2004.
- [2] Γ. Π. ΚΑΚΛΑΜΑΝΟΣ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ, 2009.
- [3] Y.V. Zhang, B. Wei, Y. Zhu, Y. Zhang, M.H. Bluth, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory, Clin. Lab. Med. 36 (2016) 635–661. doi:10.1016/j.cll.2016.07.001.
- [4] Γαληνός Οδηγός φαρμάκων, (n.d.). <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/home> (accessed June 26, 2017).
- [5] S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S.M.D. Rizvi, M.A. Kamal, Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment, Saudi J. Biol. Sci. 22 (2015) 90–101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- [6] Direct Injection LC-MS/MS Method for the Determination of Teicoplanin in Human Plasma, PubMed J. (n.d.). <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/26655103/> (accessed June 26, 2017).
- [7] Quantification of teicoplanin in plasma by LC-MS with online sample clean-up and comparison with QMS assay. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445242> (accessed June 26, 2017).
- [8] J. Diana, D. Visky, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, E. Adams, Investigation of vancomycin and related substances by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM. 20 (2006) 685–693. doi:10.1002/rcm.2364.
- [9] M. Rybak, B. Lomaestro, J.C. Rotschafer, R. Moellering, W. Craig, M. Billeter, J.R. Dalovisio, D.P. Levine, Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists, Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm. 66 (2009) 82–98. doi:10.2146/ajhp080434.
- [10] R.T. Cass, J.S. Villa, D.E. Karr, D.E. Schmidt, Rapid bioanalysis of vancomycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using on-line sample extraction and parallel analytical columns, Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM. 15 (2001) 406–412. doi:10.1002/rcm.246.
- [11] G. Gübitz, M.G. Schmid, Chiral Separations: Methods and Protocols, Springer Science & Business Media, 2004.
- [12] R. Revathi, Development of Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Analysis of Cefoxitin Sodium in Sterile Formulation., J. Biomed. Pharm. Res. 1 (2012). <http://jbpr.in/index.php/jbpr/article/view/11> (accessed June 26, 2017).
- [13] Determination of cefuroxime in human serum or plasma by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052582> (accessed June 26, 2017).
- [14] DrugBank, ed., Ciprofloxacin, DrugBank. (2017). <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>.
- [15] Derringer desirability and kinetic plot LC-column comparison approach for MS-compatible lipopeptide analysis - ScienceDirect, (n.d.). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913000956> (accessed June 26, 2017).
- [16] C. Ye, I.-S. Ng, K. Jing, Y. Lu, Direct proteomic mapping of Streptomyces roseosporus NRRL 11379 with precursor and insights into daptomycin biosynthesis, J. Biosci. Bioeng. 117 (2014) 591–597. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.10.021.

- [17] H. Xu, T. Wang, Q. Zhao, Q. Zeng, H. Wang, Y. Xu, X. Zhang, F. Wang, L. Ding, Analysis of Fluoroquinolones in Animal Feed Based on Microwave-Assisted Extraction by LC–MS–MS Determination, *Chromatographia*. 3–4 (2011) 267–274. doi:10.1007/s10337-011-2049-8.
- [18] H. Choudhury, B. Gorain, A. Paul, P. Sarkar, S. Dan, P. Chakraborty, T.K. Pal, Development and Validation of an LC-MS/MS-ESI Method for Comparative Pharmacokinetic Study of Ciprofloxacin in Healthy Male Subjects, *Drug Res.* 67 (2017) 94–102. doi:10.1055/s-0042-116593.
- [19] M. Phegan, J.E. Grayson, C.J. Vertullo, No infections in 1300 anterior cruciate ligament reconstructions with vancomycin pre-soaking of hamstring grafts, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA*. 24 (2016) 2729–2735. doi:10.1007/s00167-015-3558-z.
- [20] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877 (2009) 2224–2234. doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.030.
- [21] F. Janusch, L. Kalthoff, G. Hamscher, S.A. Mohring, Evaluation and subsequent minimization of matrix effects caused by phospholipids in LC-MS analysis of biological samples, *Bioanalysis*. 5 (2013) 2101–2114. doi:10.4155/bio.13.187.
- [22] F.H.Y. Fung, J.C.Y. Tang, J.P.P. Hopkins, J.J. Dutton, L.M. Bailey, A.S. Davison, Measurement of teicoplanin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: development of a novel method, *Ann. Clin. Biochem.* 49 (2012) 475–481. doi:10.1258/acb.2012.011257.
- [23] I.-L. Tsai, H.-Y. Sun, G.-Y. Chen, S.-W. Lin, C.-H. Kuo, Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*. 116 (2013) 593–603. doi:10.1016/j.talanta.2013.07.043.
- [24] O. Begou, A. Kontou, N. Raikos, K. Sarafidis, E. Roilides, I.N. Papadoyannis, H.G. Gika, An ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of teicoplanin in plasma of neonates, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1047 (2017) 215–222. doi:10.1016/j.jchromb.2016.01.042.
- [25] S. N, I. M, P. Yv, G. W, Y. Y, T. K, Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 789 (2003) 211–218. doi:10.1016/S1570-0232(03)00068-0.
- [26] C. Cheng, S. Liu, D. Xiao, J. Hollembaek, L. Yao, J. Lin, S. Hansel, LC-MS/MS method development and validation for the determination of polymyxins and vancomycin in rat plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878 (2010) 2831–2838. doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.037.
- [27] K. König, U. Kobold, G. Fink, A. Leinenbach, T. Dülffer, R. Thiele, J. Zander, M. Vogeser, Quantification of vancomycin in human serum by LC-MS/MS, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 1761–1769. doi:10.1515/cclm-2013-0142.
- [28] Y. Bijleveld, T. de Haan, J. Toersche, S. Jorjani, J. van der Lee, F. Groenendaal, P. Dijk, A. van Heijst, A.W.D. Gavilanes, R. de Jonge, K.P. Dijkman, H. van Straaten, M. Rijken, I. Zonnenberg, F. Cools, D. Nuytemans, R. Mathôt, A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 951–952 (2014) 110–118. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.035.
- [29] M. Zhang, G.A. Moore, S.W. Young, Determination of Vancomycin in Human Plasma, Bone and Fat by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Bioanal. Tech.* 5 (2014). doi:10.4172/2155-9872.1000196.
- [30] N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A.* 1134 (2006) 101–111. doi:10.1016/j.chroma.2006.08.077.
- [31] J.-F. Jourdil, J. Tonini, F. Stanke-Labesque, Simultaneous quantitation of azole antifungals, antibiotics, imatinib, and raltegravir in human plasma by two-dimensional high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 919–920 (2013) 1–9. doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.028.
- [32] Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography–tandem mass spectrometry - ScienceDirect, (n.d.). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023213004820> (accessed June 26, 2017).
- [33] H.-J. Kim, K.-A. Seo, H.-M. Kim, E.-S. Jeong, J.L. Ghim, S.H. Lee, Y.M. Lee, D.H. Kim, J.-G. Shin, Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 9–16. doi:10.1016/j.jpba.2014.08.026.
- [34] S.P.G. Ferrari, K.P.D. Bonassa, M.B. Coelho, C.R. Ferreira, H.F. da Costa, J.L.P. Jara, M.C.V. Miguel, F.G.R. Reyes, M.N. Eberlin, G.P. Nogueira, R.C. Simas, High precision and selectivity for quantitation of enrofloxacin and ciprofloxacin in five chicken tissues using solid phase extraction and ESI LC-MS/MS for application in monitoring residues, *Anal. Methods.* 7 (2015) 3291–3297. doi:10.1039/C4AY02962C.
- [35] H.G. Gika, F. Michopoulos, D. Divanis, S. Metalidis, P. Nikolaidis, G.A. Theodoridis, Daptomycin determination by liquid chromatography-mass spectrometry in peritoneal fluid, blood plasma, and urine of clinical patients receiving peritoneal dialysis treatment, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2191–2197. doi:10.1007/s00216-010-3639-2.
- [36] Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961185> (accessed June 26, 2017).
- [37] High throughput quantification of cefuroxime sodium in cattle plasma by LC/MS/MS, (n.d.). https://www.researchgate.net/publication/230996992_High_throughput_quantification_of_cefuroxime_sodium_in_cattle_plasma_by_LCMSMS (accessed June 26, 2017).
- [38] P. Partani, S. Gurule, A. Khuroo, T. Monif, S. Bhardwaj, Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of cefuroxime in human plasma: application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878 (2010) 428–434. doi:10.1016/j.jchromb.2009.12.025.
- [39] X. Hu, M. Huang, J. Liu, J. Chen, J. Shentu, Simple and Robust Analysis of Cefuroxime in Human Plasma by LC-MS/MS: Application to a Bioequivalence Study, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2014 (2014) e981624. doi:10.1155/2014/981624.
- [40] S. Lee, B. Kim, J. Kim, Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: Optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurements, *J. Chromatogr. A.* 1277 (2013) 35–41. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.047.
- [41] ucm368107.pdf, (n.d.). <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf> (accessed June 26, 2017).
- [42] WC500109686.pdf, (n.d.). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed June 26, 2017).
- [43] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, A. Schmoldt, Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care.* 16 (2012) R136. doi:10.1186/cc11441.

- [44] Specimen collection and processing instructions for VANCOMYCIN RANDOM test, (n.d.). <https://www.geisingermedicallabs.com/catalog/details.cfm?tid=1432> (accessed June 26, 2017).
- [45] J.M. Wenisch, B. Meyer, V. Fuhrmann, K. Saria, C. Zuba, P. Dittrich, F. Thalhammer, Multiple-dose pharmacokinetics of daptomycin during continuous venovenous haemodiafiltration, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 977–983. doi:10.1093/jac/dkr551.
- [46] [hospiracefoxitinsodiuminj.pdf](#), (n.d.). <http://www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/h/hospiracefoxitinsodiuminj.pdf> (accessed June 26, 2017).
- [47] O. Toma, P. Suntrup, A. Stefanescu, A. London, M. Mutch, E. Kharasch, Pharmacokinetics and tissue penetration of cefoxitin in obesity: implications for risk of surgical site infection, *Anesth. Analg.* 113 (2011) 730–737. doi:10.1213/ANE.0b013e31821fff74.
- [48] The therapeutic monitoring of antimicrobial agents, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2014626/> (accessed June 26, 2017).
- [49] H.G. Schaefer, H. Stass, J. Wedgwood, B. Hampel, C. Fischer, J. Kuhlmann, U.B. Schaad, Pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric cystic fibrosis patients., *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 29–34.
- [50] H. Cohen, D.H. Francisco, Twelve-Gram Overdose of Ciprofloxacin with Mild Symptomatology, *Ann. Pharmacother.* 28 (1994) 805–806. doi:10.1177/106002809402800621.
- [51] S.E. Pass, C.I. Miyagawa, D.P. Healy, T.D. Ivey, Serum concentrations of cefuroxime after continuous infusion in coronary bypass graft patients, *Ann. Pharmacother.* 35 (2001) 409–413. doi:10.1345/aph.10174.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΤΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ

Τσακελίδου Ελισάβετ

Παρουσιάζεται μια μέθοδος LC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεϊκοπλανίνης, βανκομυκίνης, δαπτομυκίνης, σιπροφλοξασίνης, κεφοξιτίνης και κεφουροξίμης, σε δείγματα ολικού αίματος και παροχτευθέντος οροαιματηρού υγρού. Η τεϊκοπλανίνη προσδιορίστηκε σαν άθροισμα των έξι συστατικών της. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η δοξυκυκλίνη και πραγματοποιήθηκε πλήρης έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου. Μελετήθηκαν παράμετροι όπως η ακρίβεια, η πιστότητα, η ανάκτηση, η επίδραση υποστρώματος, η γραμμικότητα, η ευαισθησία, το φαινόμενο "carry over", η εκλεκτικότητα, η δυνατότητα αραίωσης του δείγματος και η σταθερότητα. Η μέθοδος αναδείχθηκε ευαίσθητη, ακριβής και επαναλήψιμη, σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA. Είναι η μοναδική μέθοδος που προσδιορίζει τα επίπεδα συγκέντρωσης αντιβιοτικών που ανήκουν σε διαφορετικές θεραπευτικές κατηγορίες, σε ολικό αίμα και οροαιματηρό υγρό, με απλή προκατεργασία δείγματος και χρόνο ανάλυσης μόλις 10 λεπτά. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι κατάλληλη για κλινικές μελέτες παρακολούθησης της θεραπευτικής συγκέντρωσης ενός φαρμάκου. Η εφαρμοσιμότητά της ελέγχθηκε σε δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε επέμβαση αποκατάστασης μετά από ρήξη πρόσθιου χιαστού συνδέσμου.

SUMMARY

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN LC-MS/MS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF ANTIBIOTICS IN WHOLE BLOOD AND DRAINED FLUID

Tsakelidou Elisavet

An LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of teicoplanin, vancomycin, daptomycin, ciprofloxacin, cefoxitin and cefuroxime in whole blood and drained fluid samples is reported. Teicoplanin was determined as sum of its six components. Doxycycline was used as an internal standard and a full validation process was established. The following validation parameters were studied; accuracy, precision, recovery, matrix effect, linearity, sensitivity, carry over, selectivity, dilution integrity and stability. Therefore, method showed to be sensitive, accurate and precise according to FDA recommendations. It's the first method to determine concentration levels of antibiotics from different medicinal classes, in whole blood and drained fluid, with simple sample preparation technique and only 10 min run. This method is suitable for TDM (Therapeutic Drug Monitoring) studies in clinical samples. As a confirmation of the method applicability, the method was applied to samples of patients who underwent ACL reconstruction.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Η εργασία θα παρουσιαστεί με τη μορφή ανακοίνωσης στο 1^ο Συνέδριο Χημείας των Μεταπτυχιακών και Προπτυχιακών Φοιτητών του ΑΠΘ, το οποίο θα διεξαχθεί στη Θεσσαλονίκη, στις 10-11-2017.



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΘΕΝ ΟΡΟΑΙΜΑΤΗΡΟ ΥΓΡΟ

Τσακελίδου Ε.¹, Γκίκα Ε.², Μπισμπινάς Η.³, Γεωργιάδης Δ.³, Καράμπαλης Χ.⁴, Α. Πουλιόπουλος³, Θεοδωρίδης Γ.¹, Ράικος Ν.²

1. Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ελλάδα
2. Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
3. 424 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρουσιάζεται μια μέθοδος LC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεϊκοπλανίνης, βαλκομικίνης, δαπτομικίνης, απροφλοξασίνης, κεφοζιτίνης και κεφουροξίμης, σε δείγματα ολικού αίματος και παρoχeτευθέν οροαίματoυ υγρoύ. Η τεϊκοπλανίνη προσδιορίστηκε σαν θάλασμα των έξι συστατικών της. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η δοξικυκλίνη και πραγματοποιήθηκε πλήρης έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου. Μελετήθηκαν παράμετροι όπως η ακρίβεια, η πιστότητα, η ανάκτηση, η επίδραση υποστρώματος, η γραμμικότητα, η ευαισθησία, το φαινόμενο "carry over", η εκλεκτικότητα, η δυνατότητα αραίωσης του δείγματος και η σταθερότητα. Η μέθοδος αναδείχθηκε ευαίσθητη, ακριβής και επαναληψίμη, σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA. Είναι η μοναδική μέθοδος που προσδιορίζει τα επίπεδα συγκέντρωσης αντιβιοτικών που ανήκουν σε διαφορετικές θεραπευτικές κατηγορίες, σε ολικό αίμα και οροαίματoυ υγρoύ, με απλή προεπεξεργασία δείγματος και χρόνο ανάλυσης μόλις 10 λεπτά. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι κατάλληλη για κλινικές μελέτες παρακολούθησης της θεραπευτικής συγκέντρωσης ενός φαρμάκου. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε επέμβαση αποκατάστασης μετά από ρήξη πρόσθιου χιαστού συνδέσμου.

Σχεδιασμός Μελέτης



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ACQUITY UPLC BEH C18	
Στήλη	2.1mm x 150mm
A: H ₂ O (0.1% υδ. όξος)	
B: ACN (0.1% υδ. όξος)	
Κινητή φάση	~6500:8800 psi
Πίεση	0.350 mL/min
Ταχύτητα ροής	50 °C
Θερμ. Ατμοσφαιρικής στήλης	10 °C
Θερμ. Αυθόρμητου δαμάτη	5.0-10 min
Όγκος έγχυσης	5 μL

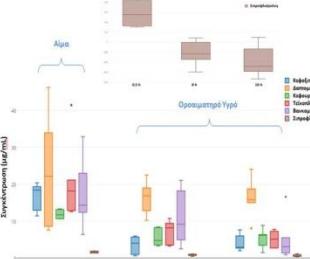


Xevo TQD system (Waters)	
Χρόνος	Δοσ. 100 μL
0-2.0 min	95% B => 20-95 (A/B)
2-3.5 min	20% B => 100%
3.5-5.0 min	100% B
5.0-10 min	95% (A/B)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 1. Αποτελέσματα, θεραπευτικά και τοξικά επίπεδα

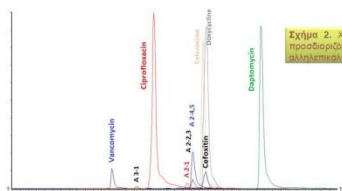
Προσθ. Ένωση	Αιματ. Στοιχ. (μg/mL)	Αίμα (μg/mL)	Οροαίματ. (μg/mL)	Οροαίματ. (μg/mL)	Επίπεδο	Επίπεδο
A2-1	2.03					
A2-2	2.72					
A2-3	2.80					
A2-4	2.41					
Ολική Τεϊκοπλανίνη	12.82-41.38	3.26-16.98	2.87-7.14	16.98	200	
Δαπτομικίνη	3.14	7.43-46.19	12.82-22.43	8.01-24.63	50	Δ.β.
Σπαραφλοξασίνη	2.48	1.30-1.87	0.26-1.08	0.48-1.09	1.4	11.5
Κεφοζιτίνη	2.86	11.40-20.33	0.58-6.94	1.56-7.59	30	Δ.β.
Βαλκομικίνη	2.22	6.34-32.84	5.24-21.01	8.83-16.65	5-15	>50
Κεφουροξίμη	2.78	10.61-13.28	3.22-6.82	1.45-4.32	10	Δ.β.



Σχήμα 1. Οδηγία αποτελεσμάτων

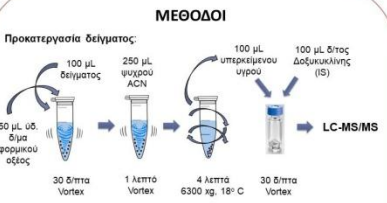
Πίνακας 2. Παράμετροι Φασματογράφου Μάζας και Παράμετροι Επικύρωσης της Μεθόδου

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ MS		ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ	
Προσθ. Ένωση	Μάζα Βάρος	Μάζα Βάρος	Μάζα Βάρος
A2-1	1877.6	27	15
A2-2	1879.7	25	12
A2-3	1880.7	28	12
A2-4	1883.7	28	25
A2-5	1884.3	28	25
Δαπτομικίνη	1619.7	28	25
Σπαραφλοξασίνη	331.4	40	38
Βαλκομικίνη	1449.3	28	16
Κεφοζιτίνη	427.5	15	8
Κεφουροξίμη	424.4	23	8
Δοξικυκλίνη	444.4	30	18



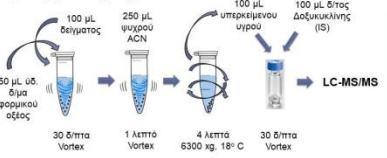
Σχήμα 2. Χρωματογράφημα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε ολικό αίμα

Σημειώσεις: Οι προσθ. ενώσεις παρουσιάζουν σταθερότητα σε όλες τις δοκιμές εκτός αυτής σε θερμοκρασία δαμάτη, ενώ η βαλκομικίνη διασπάται στον αυτόματο δαμάτη μετά την περίοδο 14 ωρών.



ΜΕΘΟΔΟΙ

Προεπεξεργασία δείγματος:



Ακρίβεια, Ενδιάμεση Ακρίβεια: Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας (LQC, MQC & HQC) αναλύθηκαν επανειλημμένα (n = 5), για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες. Η παράμετρος εκφράζεται με την εκατοστιαία ανάκτηση των συγκεντρώσεων.

Επανάληψιμότητα, Ενδιάμεση Πιστότητα: Από τις επαναληπτικές μετρήσεις μέσα στη μέρα και μεταξύ των ημερών υπολογίζεται η σχετική τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων.

Ανάκτηση Εκχύλισης, Επίδραση Υποστρώματος:

A. Εμπύκνωση του δείγματος πριν την καταβύθιση των πρωτεϊνών

B. Εμπύκνωση του υπερκείμενου υγρού, μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών

Γ. Πρότυπο διάλυμα ίδιων αναλογιών διαλυτών με το A και B

Παράγοντας Υποστρώματος = B/A

%Ανάκτηση = A/B x 100

Εμπύκνωση, για τη μελέτη της επίδρασης υποστρώματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση πλήρους σάρωσης για m/z 50-500 και δυναμικό κίνησης 30 V.

Δυνατότητα Αραίωσης του Δείγματος: Το δείγμα HQC αραιώθηκε 10 φορές με όγκο λευκού δείγματος αίματος και αναλύθηκε κατά τα γνωστά. Παρόμοια μελέτη έγινε με λευκό δείγμα ορού.

Carry Over, εκλεκτικότητα: (Λευκά δείγματα αναλύονται αμέσως μετά την ανάλυση του HQC) x 2 επαναλήψεις. Εμπύκνωση, κάθε δείγμα μιας ουσίας αποτελούσε λευκό δείγμα για τις υπόλοιπες πέντε.

Γραμμικότητα & LOD, LOQ: Κάθε σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης αναλύθηκε 4 φορές. Το LOQ ορίστηκε το πρώτο σημείο της καμπύλης, όπου ίσχυε η σχέση S/N ≥ 10 και το LOD υπολογίστηκε ως εξής:

LOD = LOQ/3

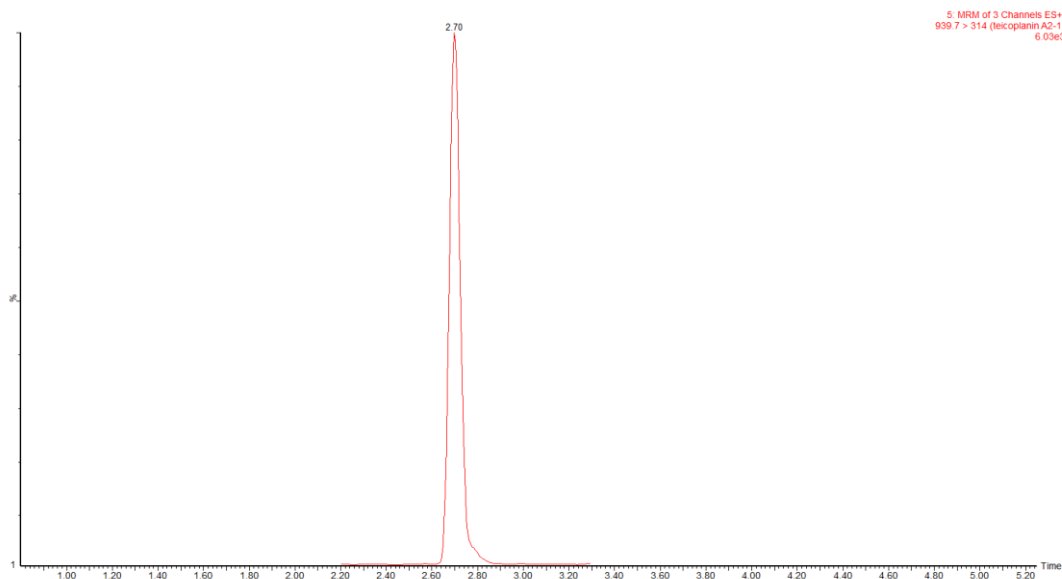
Σταθερότητα: Εκφράζεται με την εκατοστιαία ανάκτηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ως προς τις συγκεντρώσεις φρέσκων δειγμάτων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για: 1. Θερμοκρασιακές συνθήκες δαμάτη ενός 24 ωρου, 2. Συνθήκες στον αυτόματο δαμάτη, 3. Συνθήκες κατάψυξης στους -20 °C και 4. Συνθήκες ψύξης-Απόψυξης

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

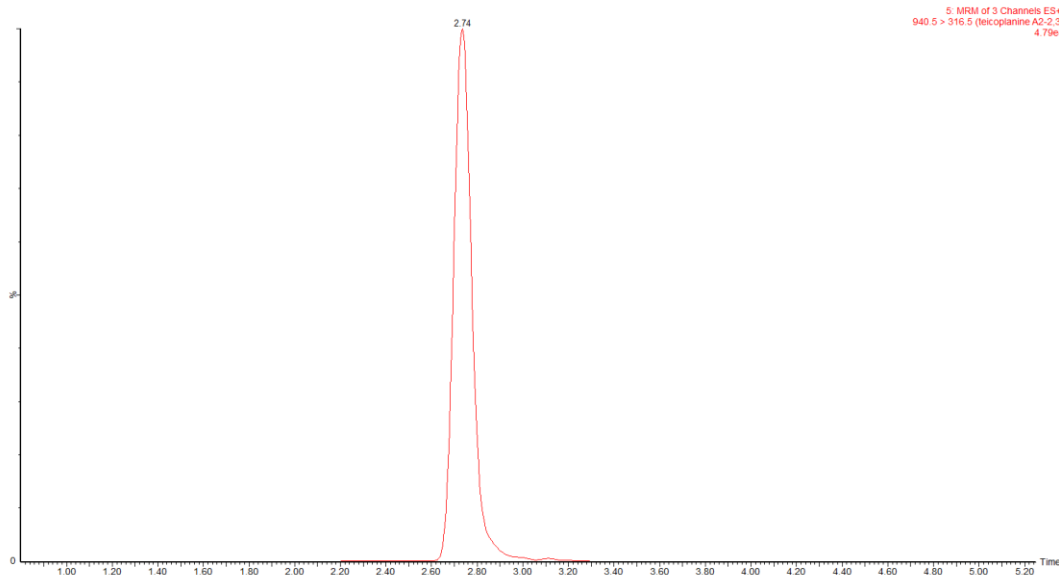
- ✓ Αναπτύχθηκε μια μέθοδος ανάλυσης UHPLC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών τεϊκοπλανίνης, δαπτομικίνης, βαλκομικίνης, απροφλοξασίνης, κεφοζιτίνης και κεφουροξίμης σε δείγματα ολικού αίματος και οροαίματoυ υγρoύ.
- ✓ Η μέθοδος αναδείχθηκε αξιόπιστη και οι παράμετροι επικύρωσης απέδωσαν χαρακτηριστικά όπως: γραμμικότητα με R² από 0,997 έως 0,999, ευαισθησία με LOD από 0,6 έως 18,9 ng/mL, ακρίβεια μεταξύ 88,2 και 113,2, πιστότητα μεταξύ 0,4 και 12,8 %, ανάκτηση εκχύλισης από 36 έως 98 % με σταθερή τιμή στην κάθε περίπτωση, απώλεια επίδρασης υποστρώματος κ.α.
- ✓ Από την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών που υποβλήθηκαν σε συνδυασματική πρόσθου χιαστού συνδέσμου προέκυψε ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών κεφουροξίμης, βαλκομικίνης, δαπτομικίνης και απροφλοξασίνης μπορούν να προφυλάξουν από απλές βακτηριακές λοιμώξεις έως και σταφυλοκοκκo. Ενώ τα αντιβιοτικά τεϊκοπλανίνη και κεφοζιτίνη απαιτούν επιπρόσθετη διερεύνηση του τρόπου χορήγησης.

2. Χρωματογραφήματα σε πρότυπο δείγμα

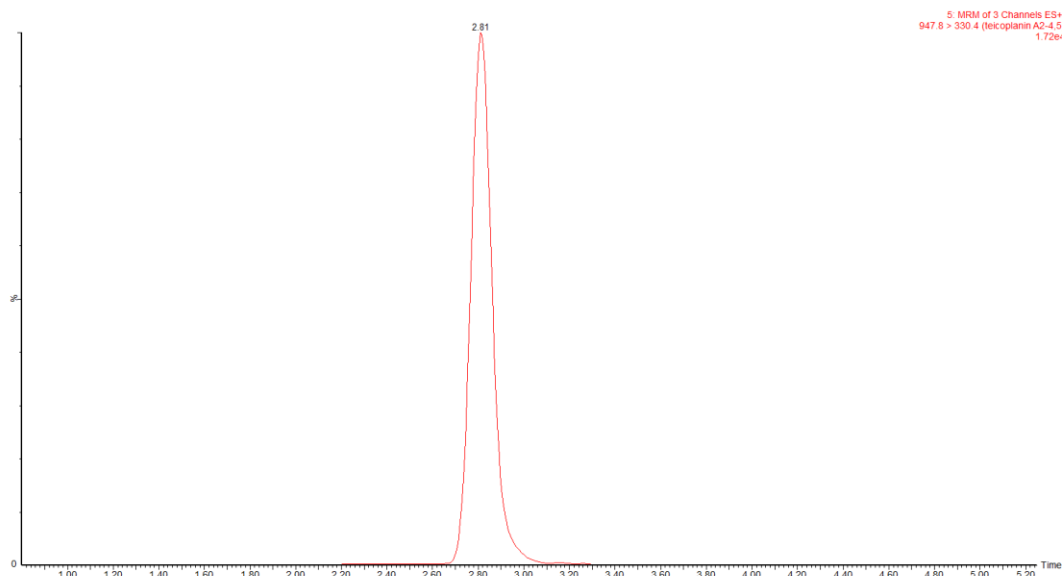
Ακολουθούν τα χρωματογραφήματα όλων των προσδιοριζόμενων συστατικών σε δείγματα οροαιματηρού υγρού ασθενών.



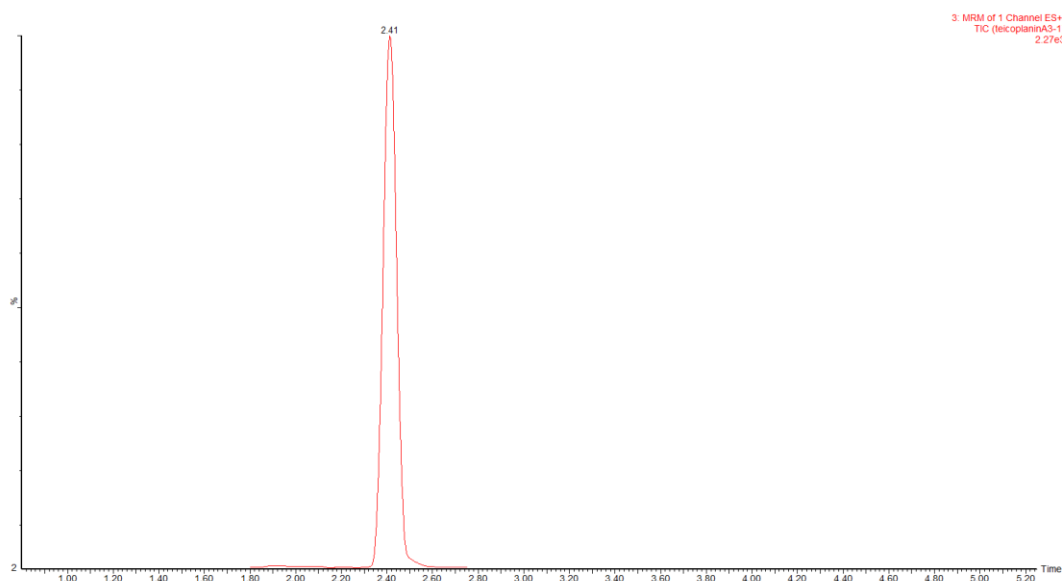
Τυπικό χρωματογράφημα της ισομορφής A2-1 της τείκοπλανίνης (0,79 µg/mL) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμοπερίδεση ενός ασθενούς.



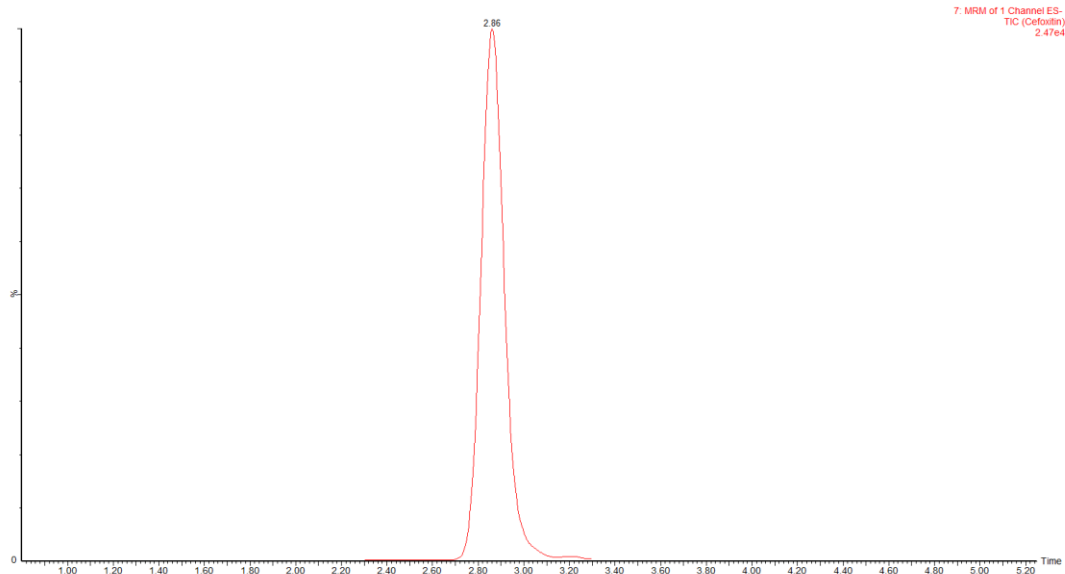
Τυπικό χρωματογράφημα των ισομορφών A2-2,3 της τείκοπλανίνης (6,25 µg/mL) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμοπερίδεση ενός ασθενούς.



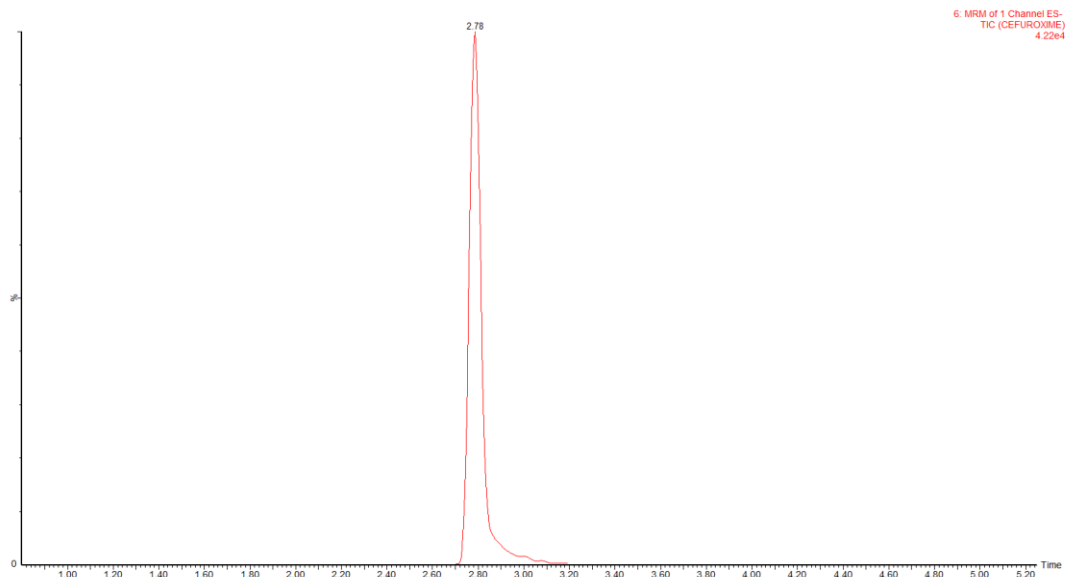
Τυπικό χρωματογράφημα των ισομορφών A2-4,5 της τεϊκοπλανίνης (3,28 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.



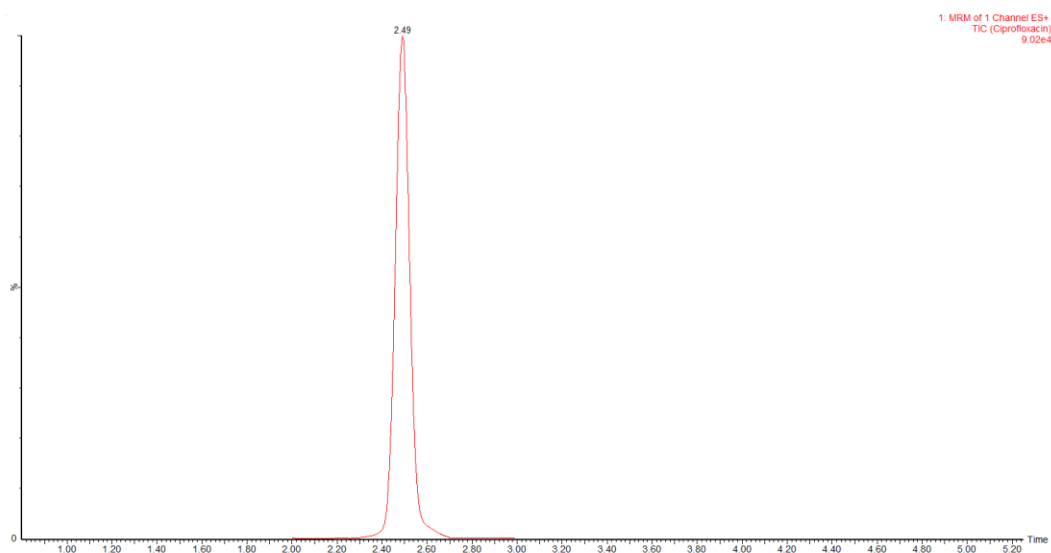
Τυπικό χρωματογράφημα της ισομορφής A3-1 της τεϊκοπλανίνης (0,36 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.



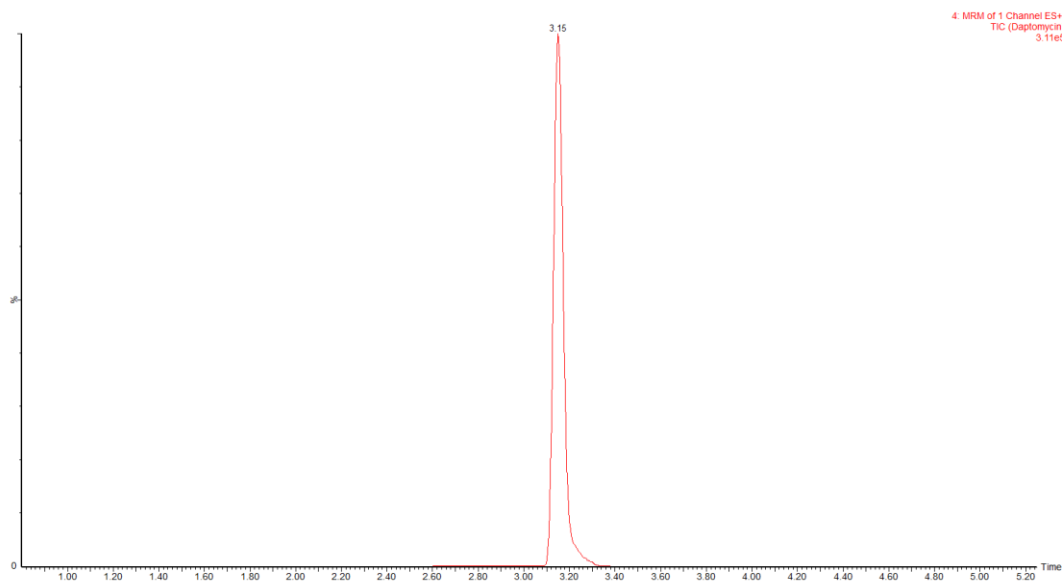
Τυπικό χρωματογράφημα της κεφοξιτίνης (5,95 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.



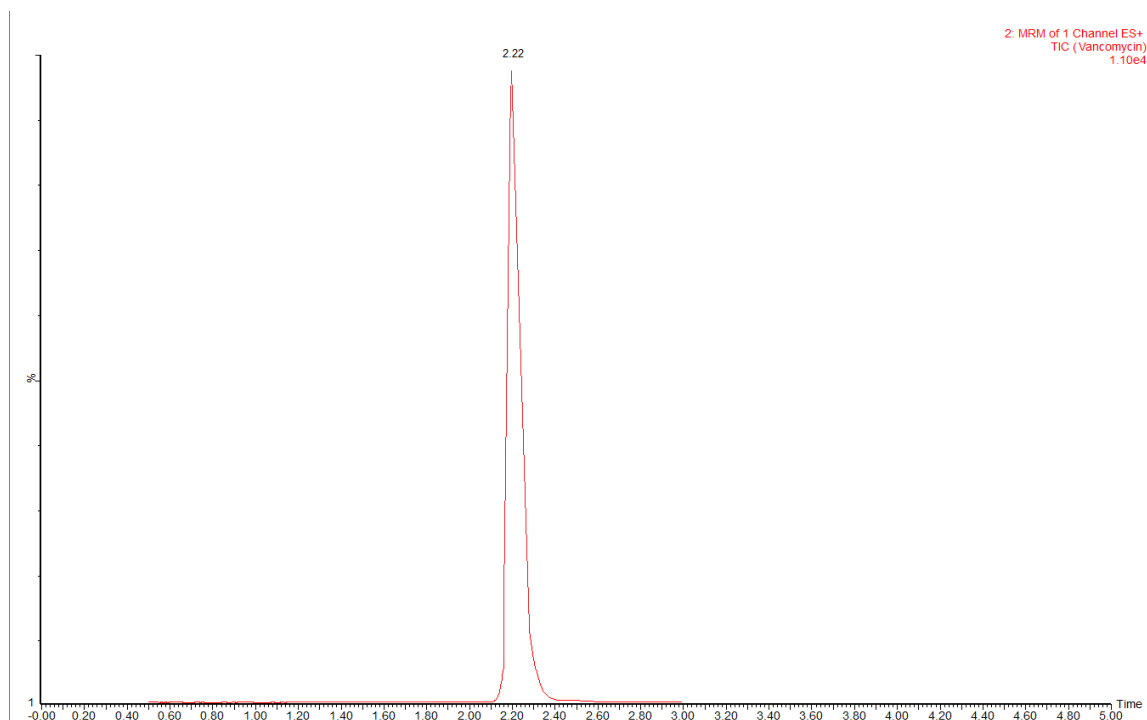
Τυπικό χρωματογράφημα της κεφουροξίμης (8,82 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.



Τυπικό χρωματογράφημα της σιπροφλοξασίνης (1,08 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.

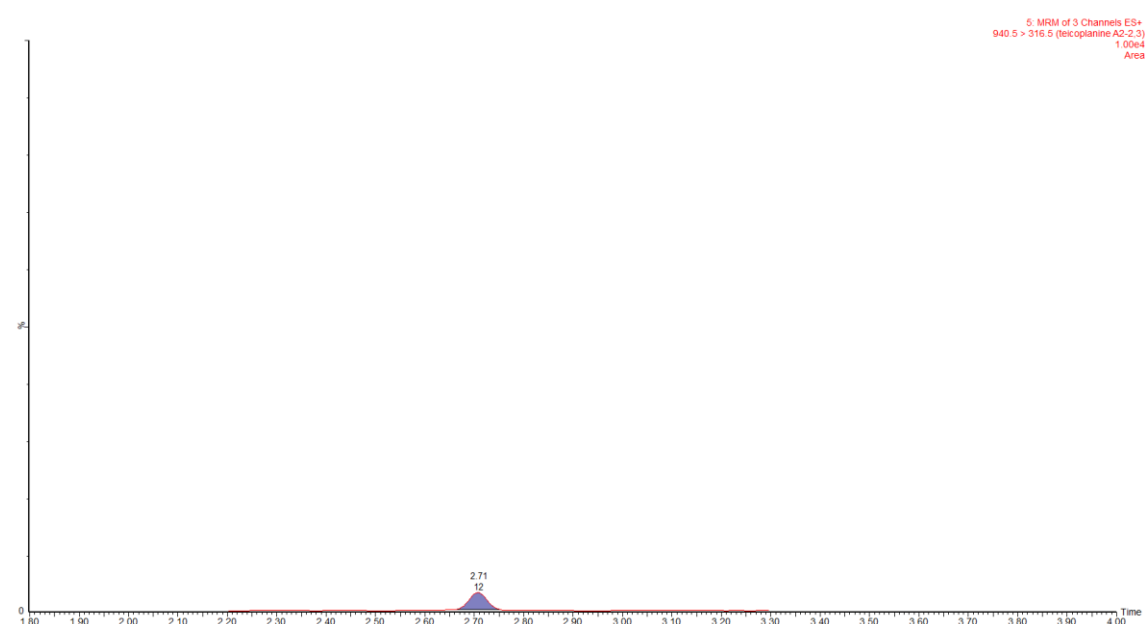


Τυπικό χρωματογράφημα της δαπτομικίνης (24,03 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιμο περίδεση ενός ασθενούς.

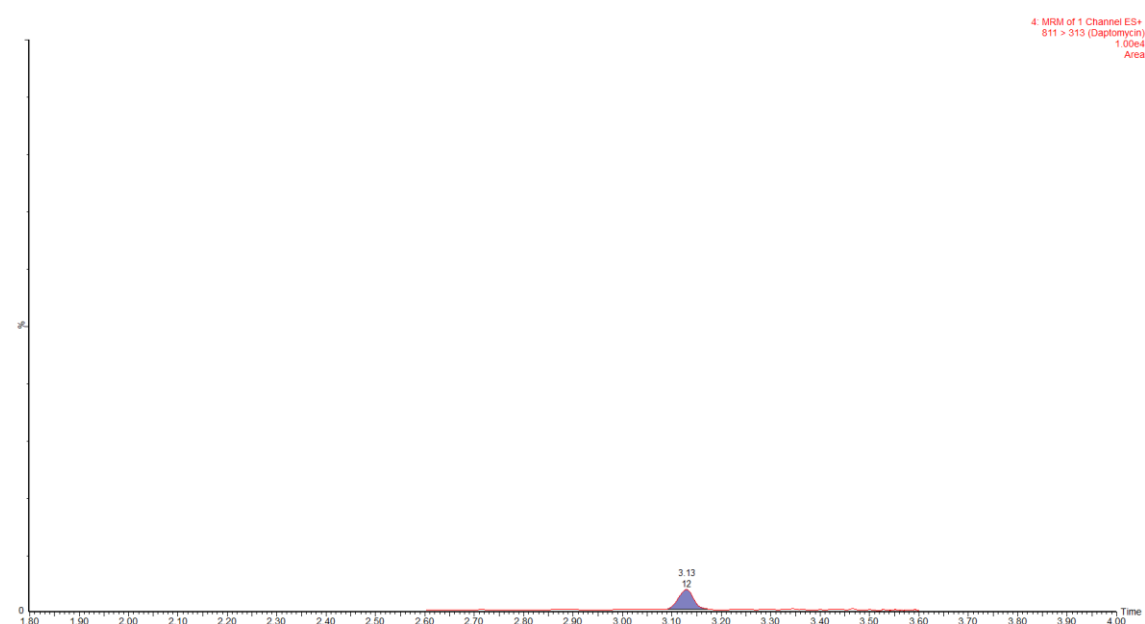


Τυπικό χρωματογράφημα της βανκομυκίνης (21,00 $\mu\text{g/mL}$) στο δείγμα οροαιματηρού υγρού που λήφθηκε στις 8 ώρες μετά την ίσχαιο περίδεση ενός ασθενούς.

3. Χρωματογράφημα της μελέτης του φαινομένου “carry over”



Χρωματογράφημα της A2-2,3 σε λευκό δείγμα που αναλύθηκε αμέσως μετά το υψηλότερο πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης



Χρωματογράφημα της δαπτομυκίνης σε λευκό δείγμα που αναλύθηκε αμέσως μετά το υψηλότερο πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης

