



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
Μ.Δ.Ε.: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ
ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ
(LC-ESI/MS) ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ**

Αναλυτική εργασία διπλώματος ειδίκευσης

Κωνσταντίνος Ζέρβας
Φαρμακοποιός, ΕΚΠΑ
Αθήνα,
Δεκέμβριος 2017

*"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου
Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα."
(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ
ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (LC-ESI/MS) ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ
ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Μιχαήλ Κουπάρης Καθηγητής
Ειρήνη Παντερή Καθηγήτρια
Ευάγγελος Γκίκας Επικ. Καθηγητής

Δεκέμβριος 2017

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών: “Φαρμακευτική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας” την περίοδο 2015-2017.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή, που είχε την ευθύνη της ανάθεσης και επίβλεψης του συγκεκριμένου θέματος. Την ευχαριστώ για την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγηση, τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις αλλά και για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κο Μιχαήλ Κουμπάρη και τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ευάγγελο Γκίκα, για τα σχόλια και τις διορθώσεις τους. Οι προτάσεις τους συνέβαλλαν στη βελτιστοποίηση της εργασίας και της επιστημονικής μου κατάρτισης.

Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για τη βοήθειά τους σε στιγμές που τη χρειάστηκα και τέλος την οικογένεια μου για την αμέριστη στήριξη όλους αυτούς τους μήνες.

Κώστα Ζέρβας (Αθήνα, 5 Νοεμβρίου 2017)

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
Abstract	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS).....	10
1.1 Εισαγωγή.....	10
1.2 Οργανολογία	11
1.3 Πηγές ιοντισμού	13
1.3.1 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης	14
1.3.1.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό	14
1.3.1.2 Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.....	18
1.3.1.3 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης	20
1.4 Αναλυτές Μαζών	21
1.4.1 Γενικά.....	21
1.4.2. Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής μαζών	21
1.5. Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μαζών.....	23
1.5.1. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών δυνόδων	23
1.5.2. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς δυνόδου	23
1.6 Δυνατότητες και εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ- ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ- ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	26
2.1 Εισαγωγή.....	26
2.2 Αρχές αντιμικροβιακής θεραπείας	27
2.3. Γενική θεραπευτική αντιμετώπιση.....	27
2.4 Αντιμυκητιασικά φάρμακα	29
2.4.1 Εισαγωγή	29
2.4.2 Ο ρόλος της εργοστερόλης στη μυκητοστατική δράση.....	30
2.4.3 Φλουκοναζόλη.....	31
2.4.3.2 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά.....	32
2.5 Αντιπρωτοζωικά φάρμακα	33
2.5.1 Εισαγωγή	33
2.5.2 Θεραπευτική αντιμετώπιση	34
2.5.3 Μετρονιδαζόλη	36
2.5.3.1 Μηχανισμός	36

2.5.3.2 Φαρμακοκινητική-μεταβολισμός-απέκκριση	37
2.5.3.3 Ανεπιθύμητες ενέργειες	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ ΠΟΡΩΔΟΥΣ ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ	39
3.1 Εισαγωγή.....	39
3.2 Μηχανισμός χρωματογραφικής συγκράτησης σε στήλες PGC	40
3.3 Χρησιμότητα στηλών PGC	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ ΚΑΙ ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LC-ESI/MS ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ	45
4.1 Εισαγωγή.....	45
4.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία.....	50
4.2.1 Σύστημα LC/ESI-MS.....	50
4.2.2 Σύστημα υγροχρωματογραφίας	51
4.2.3 Φασματοόμετρο Μαζών	51
4.2.4 Προκατεργασία Δείγματος	52
4.3 Αντιδραστήρια - Διαλύτες	52
4.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης.....	53
4.4.2 Διαλύματα εργασίας.....	54
4.5 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC	55
4.5.1 Επιλογή στατικής φάσης.....	55
4.5.2 Επιλογή κινητής φάσης	58
4.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών	64
4.7 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC/MS	68
4.8 Εφαρμογή της μεθόδου RP HPLC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων Μετρονιδαζόλη, και Φλουκοναζόλη, σε ανθρώπινο πλάσμα.....	71
4.8.1 Ανθρώπινο πλάσμα	71
4.8.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου προετοιμασίας του βιολογικού δείγματος.....	72
4.9 Αξιολόγηση της μεθόδου.....	77
4.9.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας.....	77
4.9.2 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας	87
4.9.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης.....	90
4.9.4 Επίδραση υποστρώματος	91
4.9.5 Ανάκτηση της μεθόδου LC-ESI/MS	92
4.9.6 Έλεγχος ειδικότητας	93
4.9.7 Μελέτη σταθερότητας.....	95
4.10 Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού της μετρονιδαζόλης, και της φλουκοναζόλης σε δείγματα πλάσματος ασθενών	99

4.11 Συμπεράσματα.....	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Φλουκοναζόλη είναι ένας καλά ανεκτός αντιμυκητιασικός παράγοντας, η οποία χορηγείται για τη θεραπεία των συστηματικών μυκητιάσεων. Η μετρονιδαζόλη είναι μικτής δράσης αμοιβαδοκτόνο εκλογής για τη θεραπεία των αμοιβαδικών λοιμώξεων. Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου LC-ESI/MS σε στήλη πορώδους γραφίτοποιημένου άνθρακα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φλουκοναζόλης και της μετρονιδαζόλης σε ανθρώπινο πλάσμα. Οι αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο (ροπινιρόλη) διαχωρίζονται χρωματογραφικά σε αναλυτική στήλη Porous Graphitised Column (125,0 x 2,1mm i.d., 5µm), με ισοκρατική έκλυση και ταχύτητα ροής 0,25 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από 55% ακετονιτρίλιο σε νερό και περιέχει 0,1% μυρμηκικό οξύ. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών επιτυγχάνεται με ανίχνευση θετικών ιόντων μέσω ηλεκτροψεκασμού με τη μέθοδο SIM. Η περιοχή γραμμικότητας της μεθόδου κυμαίνεται από 0,1 έως 15 µg/mL. Η μέθοδος θα εφαρμοστεί στην ανάλυση κλινικών δειγμάτων από ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν κάποια από τα μελετούμενα φάρμακα, ώστε να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα της σε φαρμακοκινητικές και λοιπές κλινικές μελέτες.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υγροχρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: μετρονιδαζόλη, φλουκοναζόλη, στήλες PGC, ανθρώπινο πλάσμα, ποσοτικοποίηση

Abstract

Fluconazole is used in the treatment of systemic fungal infections while metronidazole is a mixed-effect selective amoxicide for the treatment of amoebic infections. A reversed phase LC/ESI-MS method was developed and fully validated for the quantification of metronidazole and fluconazole in human plasma.

The separation of the analytes occurred using a PGC analytical column under isocratic elution. Porous graphitized carbon columns shows a highly ordered crystalline structure with large bands of delocalized electrons, so that the retention mechanism is a mixture of hydrophobic and electronic interactions and is very different from that observed with silica-based bonded phases and nonpolar copolymers. A run time of less than 10 min for each sample made it possible to analyze a large number of biological samples per day. For the method development, human plasma samples spiked with the analytes undergoes protein precipitation with acetonitrile and filtration using regenerated cellulose filters, which enables injection into the LC-ESI/MS system. The method can be used to support a wide range of clinical studies.

SUBJECT AREA: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

KEYWORDS: metronidazole, fluconazole, PGC columns, Human plasma, quantification

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)

1.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πιο σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και στηρίζεται στην παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση από ένα δείγμα (στερεό, υγρό ή αέριο) και στην ανάλυση αυτών με βάση το λόγο μάζα προς ηλεκτρικό φορτίο (mass to charge ratio, m/z).^{1,2} Σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές η φασματομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα ^{3,4}. Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων βρίσκει σήμερα εφαρμογή σε ένα ευρύ επιστημονικό πεδίο.

Στην επιστήμη της Φαρμακευτικής η τεχνική της φασματομετρίας μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα τόσο για τη διερεύνηση και επαλήθευση της δομής νέων μορίων κατά τη συνθετική πορεία, όσο και για την ανίχνευση προσμίξεων κατά τον έλεγχο ποιότητας φαρμακευτικών πρώτων υλών και φαρμακευτικών προϊόντων. Επιπλέον βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμάκων σε βιολογικά υλικά επιτρέποντας τη χρησιμοποίηση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος. Η υψηλή εξειδίκευση και η μεγάλη ευαισθησία της την καθιστούν πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση και επιβεβαίωση της λήψης απαγορευμένων ουσιών από αθλητές κατά τον έλεγχο φαρμακοδιέγερσης. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η χρησιμοποίηση της φασματομετρίας μαζών στη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτό⁵, στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων αλλά και στη διάγνωση ασθενειών.⁶

Ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών χρωματογραφικές τεχνικές (GC και LC) οδήγησε στην ανάπτυξη των συνδυασμένων αναλυτικών τεχνικών GC/MS

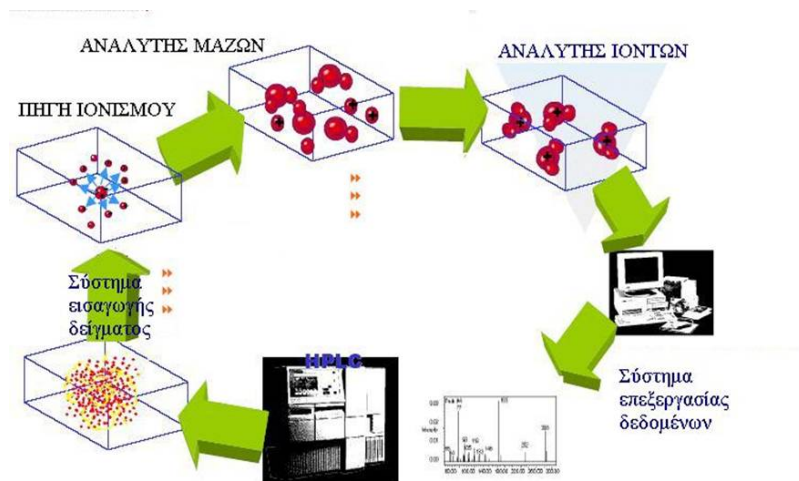
και LC/MS που χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ προσδιορισμός φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά).⁷

1.2 Οργανολογία

Τρεις διαφορετικές διεργασίες περιλαμβάνονται στο φασματόμετρο μαζών: η παραγωγή, η ανίχνευση των ιόντων, τα οποία προέρχονται από την αέρια φάση και ο διαχωρισμός τους, ανάλογα με τον λόγο μάζας προς το φορτίο τους (m/z).

Κάθε φασματόμετρο αποτελείται από τα εξής ακόλουθα βασικά τμήματα:

1. σύστημα εισαγωγής δείγματος,
2. πηγή ιοντισμού.
3. αναλυτή μαζών,
4. ανιχνευτή.



Σχήμα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός φασματομέτρου μαζών

Για τα φασματόμετρα μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για τη διατήρηση της πίεσης σε χαμηλά επίπεδα (10^{-4} έως 10^{-

⁸ Torr) σε όλα, σχεδόν, τα τμήματα του οργάνου. Η εφαρμογή υψηλού κενού συμβάλει αποτελεσματικά στην είσοδο των παραγόμενων ιόντων στον ανιχνευτή, χωρίς να αλληλεπιδρούν με άλλα αέρια μόρια και να υφίστανται περαιτέρω θραυσματοποίηση, αλλά και στην προστασία της επιφάνειας, τόσο της πηγής ιοντισμού του αναλυτή, όσο και του ανιχνευτή από τη διάβρωση που μπορεί να επέλθει, λόγω των ατμών και η οποία δύναται να μειώσει την ικανότητα του φασματομέτρου να σχηματίζει, να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ιόντα.^{8,9}

Μετά την εισαγωγή του δείγματος στη συσκευή της MS, τα μόρια του δείγματος πρέπει να ιοντιστούν, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και η ανίχνευσή τους. Οι πηγές ιοντισμού διακρίνονται στις πηγές αέριας φάσης, στις οποίες προηγείται η εξαέρωση του δείγματος από τον ιοντισμό του, όπως οι πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, (electron impact, EI) και οι πηγές χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, CI) και στις πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα μετατρέπεται απ' ευθείας σε ιόντα στην αέρια κατάσταση (πηγές ιοντισμού πεδίου, εκρόφησης πεδίου, ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας, Matrix-Assisted Desorption/Ionization, MALDI, εκρόφησης πλάσματος, Plasma Desorption, PD), βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας, (Fast Atom Bombardment, FAB) και ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, (Electrospray Ionization, ESI).¹⁰

Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, η φασματοφωτομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα. Στην φαρμακευτική χρησιμοποιείται, ευρύτατα, τόσο για την διερεύνηση και επαλήθευση της δομής νέων μορίων κατά την συνθετική πορεία και την εξακρίβωση της δομής νέων δραστικών συστατικών πολλών δρογών, όσο και για την ανίχνευση προσμίξεων κατά τον έλεγχο ποιότητας φαρμακευτικών

πρώτων υλών και φαρμακευτικών προϊόντων. Παράλληλα, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμάκων σε βιολογικά υγρά, επιτρέποντας την χρησιμοποίηση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος.

1.3 Πηγές ιοντισμού

Η πηγή ιοντισμού είναι το τμήμα εκείνο του φασματομέτρου μαζών, στο οποίο λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός ιόντων του αναλυτή, τα οποία θα διαχωριστούν στην πορεία στον αναλυτή μαζών, με βάση τον λόγο τους μάζα προς φορτίο (m/z). Στην φασματοφωτομετρία μαζών χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών ιοντισμού. Στις περισσότερες από αυτές, τα ουδέτερα μόρια του αναλύτη διεγείρονται και με την αποβολή ενός ηλεκτρονίου μετατρέπονται στην κατιονική ρίζα $[M^+]$, ενώ σε άλλες τεχνικές ιοντισμού λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις ιόντων - μορίων που οδηγούν στο σχηματισμό ιόντων προσθήκης $[M+H^+]$.

Οι τεχνικές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται στην φασματομετρία μαζών ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες:

1. Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact Ionization, EI)
2. Χημικός ιοντισμός (Chemical Impact Ionization, CI)
3. Ιοντισμός με εκρόφηση (Desorption Ionization, DI)
4. Ιοντισμός με εκνέφωση (Nebulization Ionization)
5. Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API)

1.3.1 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

Στην περίπτωση αυτή, ο σχηματισμός ιόντων πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, γεγονός που καθιστά τον ιοντισμό αποτελεσματικότερο κατά 10³ - 10⁴ φορές, σε σύγκριση με τον ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI). Ο ιοντισμός του δείγματος πραγματοποιείται απευθείας στην υγρή φάση, ώστε να καθίσταται δυνατή η ανάλυση θερμοευαίσθητων αναλυτών.

Οι σημαντικότερες τεχνικές ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση είναι :

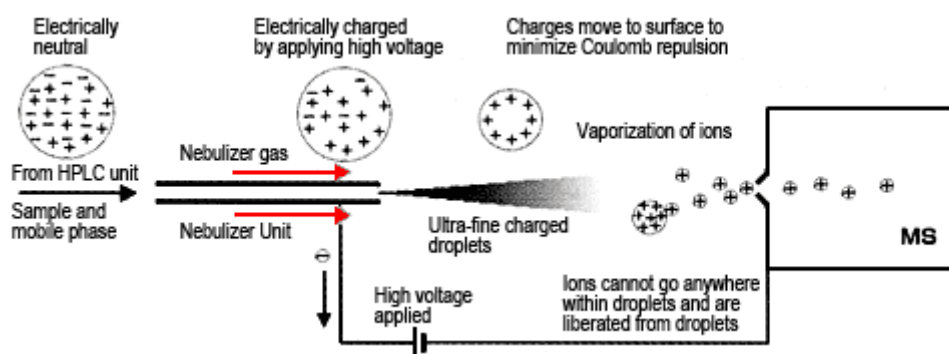
1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)¹¹,
2. Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)¹²,
3. Ιοντισμός με δέσμη φωτονίων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI).

1.3.1.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electron-spray ionization, ESI) ή, αλλιώς, ιοντισμός με ηλεκτροδιάχυση, βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία ένα υγρό, το οποίο ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων Volts, διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα εισάγεται στο σύστημα μέσω ενός γειωμένου τριχοειδούς σωλήνα, παράλληλα και εξωτερικά του οποίου βρίσκεται σωλήνας, μέσα στον οποίο διαδιβάζεται το αέριο εκνέφωσης (nebulizing gas, N₂) για τη δημιουργία σταγονιδίων στην άκρη του τριχοειδούς. Η εφαρμογή δυναμικού της τάξης των 3,5 - 5 KV οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο οδηγεί στο διαχωρισμό και τη συσσώρευση των θετικών ή των

αρνητικών φορτίων στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα. Η συσσώρευση αυτή, η οποία εξαρτάται από το πρόσημο της τάσης που εφαρμόζεται στον τριχοειδή σωλήνα (θετικός ιοντικός ηλεκτροψεκασμός, ESI+, αρνητικός ιοντικός ηλεκτροψεκασμός, ESI-), οδηγεί στο σχηματισμό του “κώνου” του Taylor (μέρος του διαλύματος με συσσωρευμένο φορτίο που προεξέχει από τον τριχοειδή σωλήνα).

Με την αύξηση του δυναμικού, ο κώνος ξεπερνά το σημείο εξισορρόπησης της πίεσης, λόγω απωστικών δυνάμεων μεταξύ των ιόντων και της επιφανειακής τάσης και υφίσταται σχάση, με αποτέλεσμα την παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων (Σχήμα 1.4 - 1.5). Τα σταγονίδια αυτά φέρουν την περίσσεια φορτίου που βρισκόταν στην επιφάνεια κώνου και περιέχουν τα ιόντα που θα παραχθούν ύστερα, από περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη, με εφαρμογή αερίου εξάτμισης και υψηλής θερμοκρασίας θαλάμου.



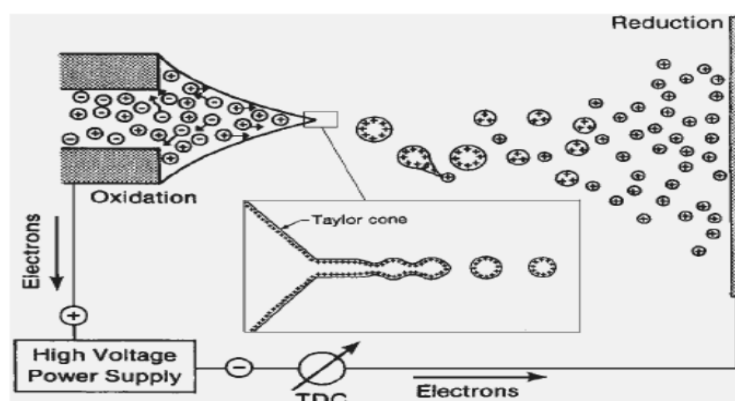
Σχήμα 1.2: Αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή ιόντων.

Η συνεχής εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί στη συρρίκνωση των σωματιδίων και, συνεπώς, στην αύξηση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των ιόντων, τόσο ώστε να υφίστανται σχάση, με αποτέλεσμα να παράγονται μικρότερα

σωματίδια. Αυτά, τα νέα μικρότερα σταγονίδια, συρρικνώνονται και υφίστανται περαιτέρω σχάση, έως ότου το κάθε σταγονίδιο να περιέχει μόνο ένα ιόν και έτσι, με την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη, να παράγονται ιόντα στην αέρια φάση.

Η παραγωγή ιόντων στον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό¹³ μπορεί να θεωρηθεί ότι διαιρείται σε τρία βήματα:

- Δημιουργία ηλεκτρικά φορτισμένου αερολύματος.
- Σταδιακή, συνεχόμενη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων.
- Απελευθέρωση πλήρως αποδιαλυμένων αερίων ιόντων.



Σχήμα 1.3: Απεικόνιση της δημιουργίας του κώνου Taylor και των φορτισμένων σταγονιδίων.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό προκαλεί το σχηματισμό μεμονωμένων, φορτισμένων, μικρών μορίων, όπως επίσης και τον σχηματισμό πολλαπλά φορτισμένων ιόντων σε μεγαλομόρια. Στην περίπτωση αυτή, το φάσμα μαζών αντιστοιχεί σε στατιστική κατανομή διαδοχικών κορυφών χαρακτηριστικών των πολλαπλά φορτισμένων μοριακών ιόντων που λαμβάνονται από πρωτονίωση $[M+zH]^{z+}$, χωρίς να συμμετέχουν διαστάσεις και θραυσματοποιήσεις. Λαμβάνοντας πολλαπλά φορτισμένα ιόντα βελτιώνεται η ευαισθησία της τεχνικής και καθίσταται εφικτή η ανάλυση μορίων υψηλού

μοριακού βάρους με αναλυτές μικρού εύρους μαζών, δεδομένου ότι το φασματόμετρο μετρά τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και γίνεται με σκοπό την ενίσχυση του σήματος και την ταυτόχρονη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών, σε περίπτωση συνδιασμού LC - MS. Συνήθως, χρησιμοποιούνται πρωτικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, σε κατάλληλη αναλογία με υπερκάρθαρο νερό. Απρωτικοί διαλύτες, όπως διμεθυλοσουλφοξείδιο ή τετραϋδροφουράνιο σε νερό, χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν την διαλυτότητα ορισμένων αναλυτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται και πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα ($\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$, $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$), με σκοπό την βελτίωση του σήματος και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών.

Η τεχνική ESI είναι, ήπια τεχνική ιοντισμού. Τα φάσματα μαζών περιέχουν, κυρίως, το μοριακό ιόν και μικρό ποσοστό θραυσμάτων. Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων δίνει την δυνατότητα υπολογισμού του μοριακού βάρους ενώσεων, χωρίς περιορισμό και την ανάλυση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων.

Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Συνδιάζεται εύκολα, τόσο με την υγροχρωματογραφία, όσο και με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

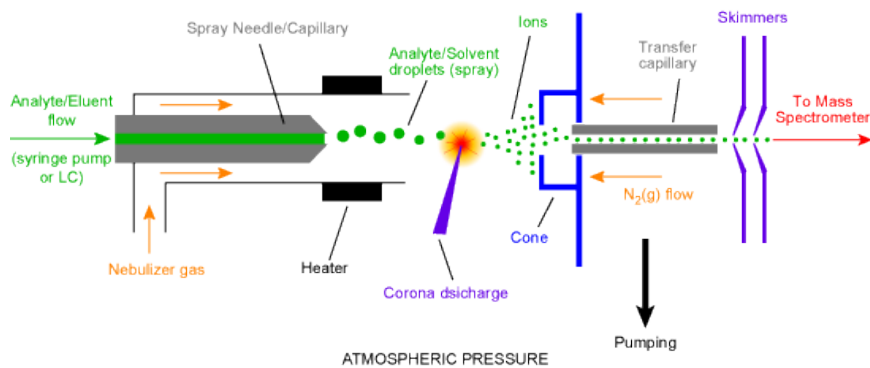
Μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί η χαμηλή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και η ασυμβατότητα με κλασικές χρωματογραφικές στήλες και ταχύτητα ροής μεγαλύτερη από 0.5 mL/min. Επίσης, πρέπει να αποφεύγονται υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στην κινητή φάση, διότι μπορεί να οδηγήσουν σε

καταστολή του λαμβανόμενου σήματος (ion suppression) καθώς και στον σχηματισμό ιόντων προσθήκης (adduct ions).

1.3.1.2 Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

Η τεχνική αυτή βασίζεται στον χημικό ιοντισμό, μέσω αντιδράσεων ιόντων-μορίων ή αντιδράσεων σύλληψης ηλεκτρονίων που λαμβάνει χώρα σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (105 Pa). Τα σχηματιζόμενα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών μέσω μιας οπής διαμέτρου, συνήθως 100μm.

Στην πηγή ιοντισμού δεν εφαρμόζεται δυναμικό. Η νεφελοποίηση και, τελικά, η εξαέρωση του δείγματος, στην περίπτωση αυτή, επιτυγχάνονται με τον συνδιασμό αερίου νεφελοποίησης (N₂) και θέρμανσης. Στο άκρο του τριχοειδούς του APCI, ακίδα αποφόρτισης με δυναμικό 2,5 – 3,0 kV, προκαλεί τον ιοντισμό των μορίων του αναλύτη, σύμφωνα με τον ακόλουθο μηχανισμό: Μερική αποφόρτιση της ακίδας προκαλεί ιοντισμό και ηλεκτρική εκκένωση της ατμόσφαιρας που περιλαμβάνει ατμούς του αζώτου, του διαλύτη και του αναλύτη. Τα μόρια του εξαερωμένου διαλύτη ιοντίζονται και αντιδρούν χημικά με τα εξαερωμένα μόρια του αναλύτη (συνδιασμός συγκρούσεων και μεταφοράς φορτίου). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία πρωτονιομένων μορίων. Στην τεχνική αυτή ο αναλύτης θα πρέπει να είναι πτητικός και σταθερός σε υψηλές θερμοκρασίες.



Σχήμα 1.4: Απεικόνιση μηχανισμού χημικού ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Με την τεχνική APCI επιτυγχάνονται ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης, λόγω της αυξημένης αποτελεσματικότητας των αντιδράσεων μεταξύ ιόντων – μορίων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλύτες με μοριακό βάρος μικρότερο από 2000 amu, καθώς και αναλυτών υψηλής ή μέτριας πολικότητας. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη για την ανάλυση ουσιών με χαρακτήρα π-δέκτη, όπως αμίνες και για την ανίχνευση τόσο θετικών, όσο και αρνητικών ιόντων. Τα λαμβανόμενα φάσματα μαζών παρέχουν πληροφορίες για το μοριακό βάρος των αναλυτών. Συνδιάζεται εύκολα με συστήματα υγροχρωματογραφίας, καθώς είναι συμβατή με ταχύτητες ροής κινητής φάσης 0,2 – 2,0 mL/min. Σε αρκετά φασματοόμετρα μαζών το σύστημα APCI συνδιάζεται επιτυχώς με συστήματα ανάλυσης ESI, οπότε ανάλογα με τις ιδιότητες των αναλυτών και της απαιτήσεως της ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια από τις δύο πηγές ιοντισμού. Σημαντικό επίσης είναι να αναφερθεί ότι με την τεχνική APCI συχνά επιτυγχάνεται καλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την τεχνική ESI.

Η τεχνική αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση θερμοευαίσθητων αναλυτών καθώς αυτές διασπώνται στις υψηλές θερμοκρασίες λειτουργίας της πηγής ιοντισμού. Επίσης δεν ενδείκνυται για αναλύτες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 2000 amu, λόγω του σχηματισμού πολλαπλά φορτισμένων

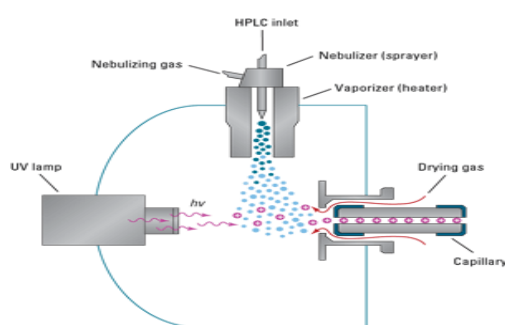
ίωντων. Μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί τέλος και η αύξηση του θορύβου κυρίως σε χαμηλές τιμές m/z .

1.3.1.3 Ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

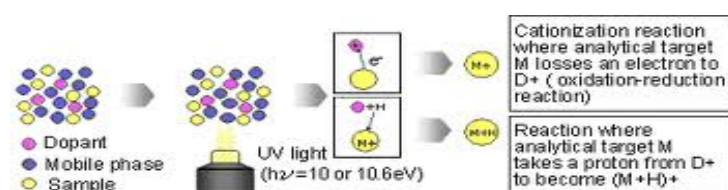
Αποτελεί παραλλαγή της τεχνικής APCI, όπου την θέση της ακίδας αποφορτίσεως έχει πάρει λυχνία υπεριώδους – ορατού, η οποία βομβαρδίζει με φωτόνια είτε το αντιδραστήριο αέριο, dopant (ακετόνη ή τολουόλιο) (Dopant APPI), είτε τον αναλύτη (Direct APPI), (σχήμα 1.5α,β).¹⁴

Dopant APPI : ο αναλύτης ιοντίζεται έμμεσα, με βομβαρδισμό του αντιδραστηρίου αερίου με φωτόνια, σχηματίζονται ιόντα του αντιδραστηρίου αερίου, τα οποία με την σειρά τους δημιουργούν φορτισμένα συσσωματώματα του αντιδραστηρίου- αερίου, τα οποία συγκρούονται με τα μόρια των αναλυτών και τα ιονίζουν.

Direct APPI : ο αναλύτης ιοντίζεται με άμεσο βομβαρδισμό του με δέσμη φωτονίων.



α.



β.

Σχήμα 1.5: α. Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιοντισμού APPI.
β. Απεικόνιση μηχανισμού ιοντισμού APPI σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Αποτελεί νεότατη τεχνική ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Συνδιάζεται με συστήματα LC-MS και έχει εφαρμοστεί για την ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους, φυσικών προϊόντων και συνθετικών οργανικών μορίων.

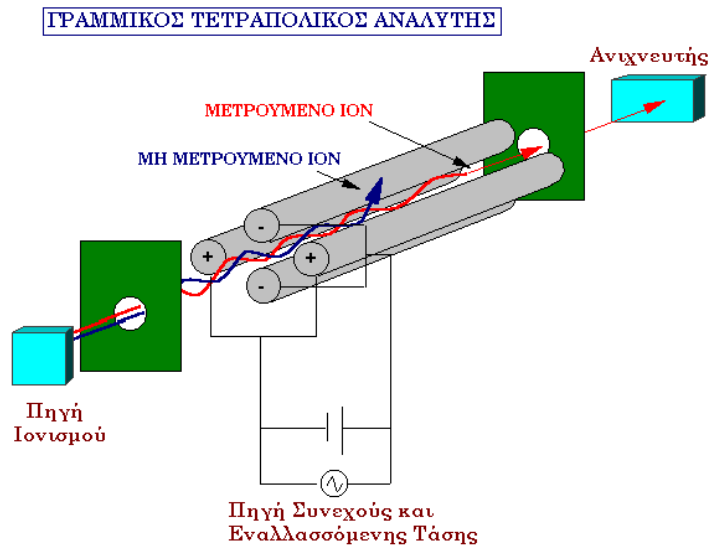
1.4 Αναλυτές Μαζών

1.4.1 Γενικά

Τα ιόντα, μετά τον σχηματισμό τους στην πηγή ιοντισμού, επιταχύνονται με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, ευθυγραμμίζονται και κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Ο αναλυτής μαζών είναι το τμήμα εκείνο στο οποίο τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση τον λόγο μάζα προς φορτίο (mass to charge ratio m/z). Ο διαχωρισμός αυτός είναι απαραίτητος ώστε το μετρούμενο ιονικό ρεύμα στον ανιχνευτή των ιόντων, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z .

1.4.2. Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής μαζών

Πολλές εφαρμογές στη φασματομετρία μαζών δε χρειάζονται υψηλή διαχωριστικότητα. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν αναλυτές μαζών που είναι μικρότεροι, φθηνότεροι και σε μικρότερη διαχωριστική ικανότητα απ' ότι οι αναλυτές μαγνητικού τομέα. Το τετραπολικό φασματόμετρο μαζών είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος αναλυτής μαζών στη φασματομετρία μαζών, όπου τα ιόντα διαχωρίζονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Έχει τη δυνατότητα γρήγορης σάρωσης, σαρώνοντας χρωματογραφικές κορυφές σε πραγματικό χρόνο και χρησιμοποιείται ευρέως στη συνδυασμένη τεχνική LC-MS και σε άλλες, σε μια ποικιλία βιομηχανικών διεργασιών.



Σχήμα 1.6: Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής μαζών

Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους κυκλικής ή ιδανικά υπερβολικής, διατομής που είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη δέσμη των διερχόμενων ιόντων και συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους διαγωνίως. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσης που περιέχει μια συνεχή (U) και μια εναλλασσόμενη (V συνωτ) υψίσυχνη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων συνιστώσα.

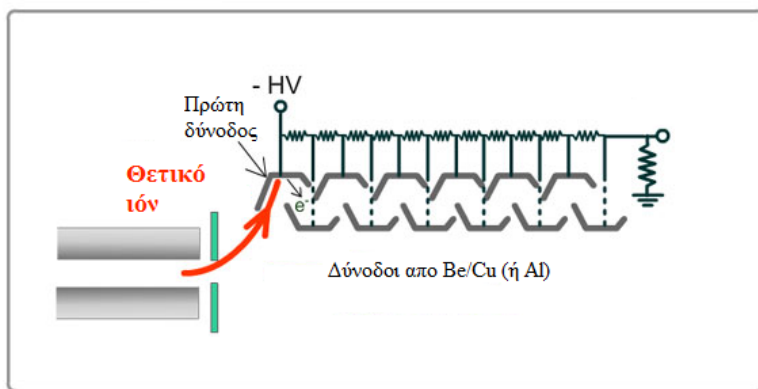
Για δεδομένες τιμές U, V και ω μόνο ιόντα με ορισμένη τιμή λόγου m/z ακολουθούν σταθερή τροχιά, εξέρχονται από τον αναλυτή και φτάνουν στον ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εμφανίζουν ασταθείς τροχιές, προπίπτουν στις ράβδους και αποφορτίζονται. Με τον τρόπο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί σα «φίλτρο»

1.5. Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μαζών

Στη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούνται ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (electron multipliers) των οποίων η αρχή βασίζεται στη μέτρηση των ηλεκτρικών φορτίων των ιόντων.¹⁵

1.5.1. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών δυνόδων

Αποτελούνται από πολλές δυνόδους. Τα θετικά ιόντα που προκύπτουν μετά τον αναλυτή μαζών, βομβαρδίζουν μια κάθοδο από Βηρύλλιο και Χαλκό (Be/Cu) και πρόσφατα από Αλουμίνιο (Al) και ελευθερώνουν ηλεκτρόνια τα οποία επιταχυνόμενα μέσω μιας σειράς δυνόδων από το ίδιο υλικό προκαλούν ένα «καταρράκτη» ηλεκτρονίων.

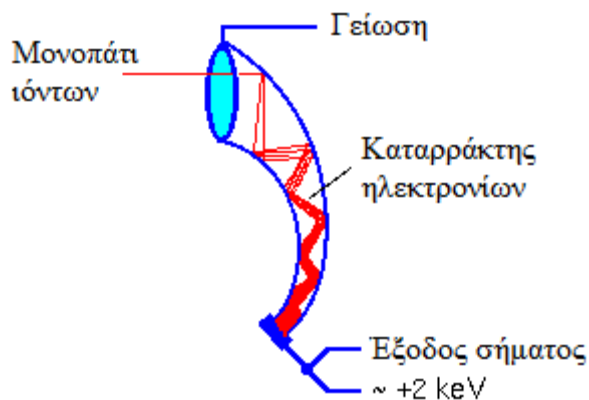


Σχήμα 1.12: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων.

Ο ανιχνευτής αυτός είναι πολύ ευαίσθητος και έχει ενίσχυση ρεύματος μέχρι 10^8 .¹⁶

1.5.2. Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς δυνόδου

Έχουν το σχήμα τρομπέτας, είναι από γυαλί με προσθήκη μολύβδου και κατά μήκος τους εφαρμόζεται ένα δυναμικό περίπου 2 kV.



Σχήμα 1.13: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής συνεχούς δυνόδου.

Τα ιόντα προσκρούουν στην επιφάνεια κοντά στην είσοδο και τα εκτοξευόμενα ηλεκτρόνια προκαλούν έναν καταρράκτη ηλεκτρονίων από τις συγκρούσεις με τα τοιχώματα, κατευθυνόμενα στο θετικό ηλεκτρόδιο, όπως φαίνεται στο σχήμα 12. Οι ανιχνευτές αυτοί έχουν ενίσχυση της τάξης των 10^5 - 10^8 και χρησιμοποιούνται κυρίως στην έξοδο των τετραπολικών αναλυτών, όπως και στους αναλυτές μαγνητικού τομέα.

1.6 Δυνατότητες και εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών

Από το φάσμα μαζών προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση μιγμάτων οργανικών ενώσεων και μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος μιας ένωσης. Η μέθοδος προσφέρεται για τη διερεύνηση μηχανισμών αντιδράσεων και για μελέτες ιχνηθέτησης με τη χρήση σταθερών ισοτόπων. Επίσης μελετώνται με τη φασματομετρία μαζών πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους και φυσικά προϊόντα αφού προηγουμένως υποστούν πυρόλυση και δημιουργηθούν προϊόντα αποσύνθεσής τους τα οποία και εξετάζονται. Μίγματα που περιέχουν έως και 30 ενώσεις μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σε συγκεντρώσεις των συστατικών τους έως και

0,001 mol με ακρίβεια $\pm 0,05$ έως ± 1 %. Για συστατικά που περιέχονται σε μεγάλα ποσοστά η ακρίβεια της μεθόδου είναι μικρότερη.

Οι συζευγμένες φασματομετρικές μέθοδοι, όπως GC-MS, LC-MS, MS-MS έχουν δώσει πολύ μεγαλύτερες δυνατότητες στην ανάλυση πολύπλοκων οργανικών μιγμάτων, λόγω του διαχωρισμού των ουσιών και των χαμηλών ορίων ανίχνευσης που επιτυγχάνονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ- ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ-ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1 Εισαγωγή

Στον υγιή άνθρωπο ένας μικροοργανισμός μπορεί να παρασιτεί στο δέρμα ή να εισέλθει στο πεπτικό και να πολλαπλασιασθεί (αποικίες) χωρίς να προκαλεί νόσο. Ανάλογα με το μικροοργανισμό ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να αντιδράσει παράγοντας αντισώματα. Σε αυτή τη τελευταία περίπτωση έχουμε την εκδήλωση της λοίμωξης.

Το αποτέλεσμα της λοίμωξης μπορεί να είναι ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων και η εμφάνιση συμπτωμάτων τοπικών (π.χ.απόστημα, εντόπιση στον οφθαλμό, στο δέρμα κ.λ.π.) ή γενικευμένων, οπότε έχουμε εμφανή ή κλινική λοίμωξη. Η εξέλιξη της εμφανούς λοίμωξης μπορεί να είναι δραματική με αποτέλεσμα αναπηρία ή θάνατο ή μπορεί να είναι η ίαση (με θεραπεία ή και χωρίς θεραπεία) και η εκρίζωση του μικροβίου ή η παραμονή του στον οργανισμό χωρίς να προκαλεί συμπτώματα (φορέας). Στις περιπτώσεις που ο ανθρώπινος οργανισμός αντιδρά και καταστρέφει το μικρόβιο ή έστω το μικρόβιο επιβιώνει χωρίς να εξαπλωθεί στον οργανισμό, δεν υπάρχουν συμπτώματα και η λοίμωξη είναι αφανής ή υποκλινική καθιστώντας τον άνθρωπο πάλι απλό φορέα (παροδικά ή μόνιμα).

Τα δύο μέρη του ανοσολογικού συστήματος είναι

- η κυτταρική ανοσία (Τ-λεμφοκύτταρα) και
- η χυμική ανοσία (Β- λεμφοκύτταρα).

Τα Τ-λεμφοκύτταρα προέρχονται από το θύμο αδένα και τα Β-λεμφοκύτταρα από το μυελό των οστών. Άλλα κύτταρα που συμμετέχουν είναι τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα δενδριτικά/ Langerhans κ.ά. Όταν τα Τ κύτταρα έλθουν σε επαφή με ξένο αντιγόνο πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε μνημονικά κύτταρα. Σε νέα επαφή με το ίδιο αντιγόνο η απάντηση του ανοσολογικού συστήματος είναι ταχεία εξουδετερώνοντας το παθογόνο μικροοργανισμό.

Η κύρια λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων είναι η παραγωγή αντισωμάτων. Αυτό απαιτεί τη διαφοροποίηση τους σε πλασματοκύτταρα, η οποία γίνεται με τη βοήθεια λεμφοκινών που παράγονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Διαταραχές της λειτουργίας των Β-κυττάρων οδηγούν σε μείωση της χυμικής ανοσίας.

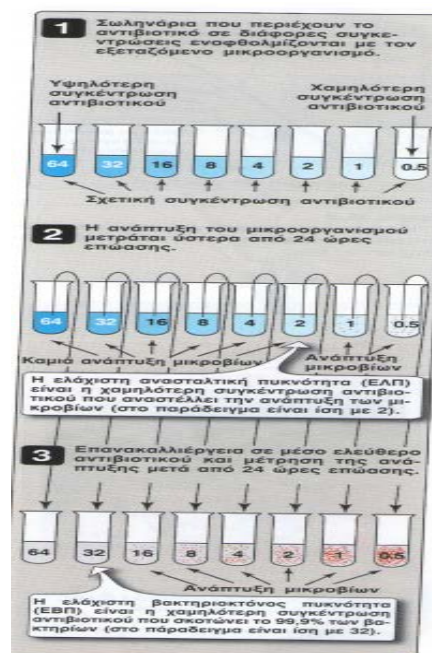
2.2 Αρχές αντιμικροβιακής θεραπείας

Η αντιμικροβιακή θεραπεία εκμεταλλεύεται τις βιοχημικές διαφορές που υπάρχουν μεταξύ μικροοργανισμών και ανθρώπων. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία των λοιμώξεων λόγω της επιλεκτικής τοξικότητάς τους, δηλαδή της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν τον εισβάλλοντα μικροοργανισμό χωρίς να βλάπτουν τα κύτταρα του ξενιστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η επιλεκτική τοξικότητα παραμένει σχετική και όχι απόλυτη και προϋποθέτει τον έλεγχο της συγκέντρωσης του φαρμάκου ώστε να εξουδετερώνει τον μικροοργανισμό όντας καλά ανεκτή από τον ξενιστή.

2.3.Γενική θεραπευτική αντιμετώπιση

Για την επιλογή του καταλληλότερου αντιμικροβιακού παράγοντα πρέπει να γνωρίζει κανείς :

1. Την ταυτότητα του μικροοργανισμού, δηλαδή τα χαρακτηριστικά του
2. Την ευαισθησία του σε συγκεκριμένο φάρμακο, πχ μέσω προσδιορισμού βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσεως, ελάχιστης ανασταλτικής και βακτηριοκτόνου πυκνότητας. (σχήμα 2.1)
3. Τη θέση της λοίμωξης, πχ αιματοεγκεφαλικός φραγμός.
4. Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή όπως ανοσοποιητικό σύστημα, νεφρική δυσλειτουργία, ηπατική δυσλειτουργία, κακή αιμάτωση, ηλικία, εγκυμοσύνη, θηλασμός.
5. Η ασφάλεια του φαρμάκου, δηλαδή τα εγγενή χαρακτηριστικά του.
6. Το κόστος της θεραπείας.



Σχήμα 2.1 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας και ελάχιστης βακτηριοκτόνου πυκνότητας ενός αντιβιοτικού¹⁷

Σε όλα τα παραπάνω βέβαια πρέπει να αναφέρουμε και τη πιθανότητα για εμπειρική χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, όταν δε γνωρίζουμε τον υπεύθυνο μικροοργανισμό σε μια λοίμωξη και δεν υπάρχει δυνατότητα

εργαστηριακής ανίχνευσης του ή εν αναμονή των μικροβιολογικών εξετάσεων ανίχνευσης του μικροοργανισμού, για να μη χάνεται πολύτιμος χρόνος.

Δυστυχώς συχνά συμβαίνει κακή χρήση ή και κατάχρηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων διότι ο γιατρός θέλει να καλύψει τον ασθενή από πιθανά αίτια, επειδή δεν είναι βέβαιος για τον υπεύθυνο μικροοργανισμό (π.χ. ιογενής βρογχίτιδα ή αμυγδαλίτιδα) ή ακόμη επειδή θέλει να συμπεριλάβει ευρύ φάσμα μικροβίων. Επίσης συχνά ο ασθενής πιέζει το γιατρό να του δώσει αντιβιοτικό επειδή θέλει να είναι σίγουρος και ακόμη επειδή η επίσκεψη στο ιατρείο συνδέεται από τον ασθενή με τη χορήγηση κάποιου φαρμάκου.

2.4 Αντιμυκητιασικά φάρμακα

2.4.1 Εισαγωγή

Η συχνότερα απαντώμενη μυκητίαση είναι η οφειλόμενη στη *Candida* (σχήμα 2.2) η οποία μπορεί να εντοπίζεται τοπικά (δέρμα, βλεννογόνοι) ή να είναι συστηματική.



Σχήμα 2.2 Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της *Candida*

Η στοματική καντιντίαση οφείλεται συνήθως σε αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, γλυκοκορτικοειδή, κυτταροστατικά ή άλλα ανοσοκατασταλτικά. Παρουσιάζεται επίσης σε διαβητικούς και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

Άλλες εντοπισμένες καντιντιάσεις είναι η βαλανοποσθίτιδα, η αιδιοκολπίτιδα, η παρωνυχία, η καντιντίαση δέρματος πτυχών (μηρογεννητικές, κάτω από τους μαστούς, μεσοδακτύλιες πτυχές, μεσογλουτιαία αύλακα), ή χρόνια δερματοβλεννογόنيος. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο πάσχων από μυκητιασική λοίμωξη έρχεται αντιμέτωπος με χρονίζουσες ή δυσάρεστες υποτροπές. Συχνότερα πρόκειται για γυναίκες με υποτροπιάζουσα κολπική μυκητίαση ή μυκητίαση ονύχων ή κάτω άκρων. Άλλες συστηματικές μορφές μυκητιασικής λοίμωξης είναι η καντιντιασική οισοφαγίτιδα, η πνευμονία, και η γενικευμένη καντιντίαση. Άλλες μυκητιάσεις είναι η κρυπτοκόκκωση (ιδιαίτερα σε ασθενείς με AIDS), η ιστοπλάσμωση, η βλαστομύκωση, κοκκιδιομύκωση κ.ά.

Για τη θεραπεία των μυκητιασικών λοιμώξεων χρησιμοποιούνται τα πολυενικά αντιμυκητικά φάρμακα αμφοτερικίνη Β και νυστατίνη, οι ιμιδαζόλες, κετοконаζόλη, κλοτριμαζόλη, μικοναζόλη, εκοναζόλη, ισοконаζόλη, σουλκοναζόλη, τιοконаζόλη, οι τριαζόλες ιτρακοναζόλη, φλουκοναζόλη, τριακοναζόλη, και διάφορα άλλα όπως η φλουκυτοσίνη (φθοριομένη πυριμιδίνη), η γκριζεοφουλβίνη, και η αλλυλαμίνη τερβιναφίνη. Τα αντιμυκητικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με πολλά άλλα φάρμακα με κλινικό αποτέλεσμα συχνά σημαντικό.

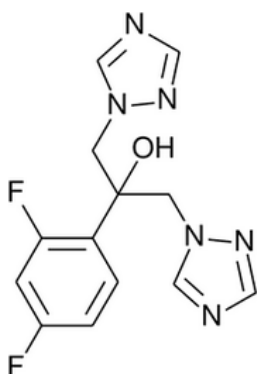
2.4.2 Ο ρόλος της εργοστερόλης στη μυκητοστατική δράση

Η εργοστερόλη είναι μια στερόλη, από την οποία αποτελείται κυρίως η μεμβράνη των μυκήτων. Σχηματίζεται με απομεθυλίωση της λανοστερόλης μέσω της C-14 α-απομεθυλάσης, ενός ενζύμου του συστήματος P450 του κυτοχρώματος. Έτσι μέσω της σύνθεσής της η δομή και λειτουργία της

μεμβράνης αποκτά μια φυσιολογική υπόσταση, επιτρέποντας την κυτταρική αύξηση των μυκήτων.

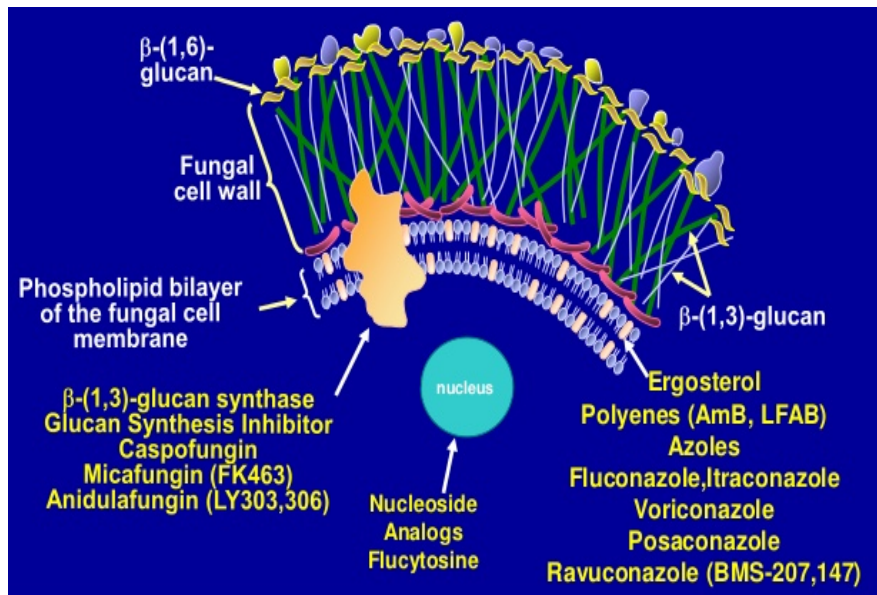
2.4.3 Φλουκοναζόλη

Η φλουκοναζόλη, είναι ένα φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των τριαζολών, αναστέλλοντας τη σύνθεση της εργοστερόλης. Η χημική δομή της παρουσιάζεται στο σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3 Χημική δομή Φλουκοναζόλης

Δρα μέσω της αναστολής της απομεθυλίωσης της λανοστερόλης. Έτσι μέσω της αναστολής της σύνθεσής της η δομή και λειτουργία της μεμβράνης διαταράσσεται, εμποδίζοντας την κυτταρική αύξηση των μυκήτων (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.3 Τρόπος δράσης της φλουκοναζόλης

2.4.3.2 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά

Απορρόφηση

Μετά απ' τη λήψη του φαρμάκου, οι μέγιστες συγκεντρώσεις (C_{max}) της φλουκοναζόλης στο πλάσμα επιτυγχάνονται σε διάστημα από 1 έως 2 ώρες.¹⁸ Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητά της φλουκοναζόλης είναι περίπου 2 έως 3%. Σταθερά επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα επιτυγχάνονται μέσα σε 5 έως 10 ημέρες με ημερήσια χορήγηση 50-400 mg. Η απορρόφηση της δεν εξαρτάται από την οξύτητα του στομάχου όπως άλλα τριαζολικά φάρμακα.

Κατανομή

Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, ο μέσος όγκος κατανομής σε σταθερή κατάσταση προσεγγίζει εκείνον του νερού στο ανθρώπινο σώμα, αποκαλύπτοντας ότι η φλουκοναζόλη κατανέμεται εκτεταμένα στον εξωαγγειακό χώρο. Ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση, η πρόσδεση της φλουκοναζόλης στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι χαμηλή (11-12%).

Μεταβολισμός και απέκκριση

Ο μεταβολισμός της φλουκοναζόλης είναι ιδιαιτέρως χαμηλός. Η απέκκριση της γίνεται κυρίως μέσω των νεφρών και οι δόσεις πρέπει να μειώνονται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Ο μέσος χρόνος ημιζωής είναι 30 με 40 ώρες ενώ το 10% περίπου της δόσης ανακτάται στα ούρα μετά από χορήγηση από το στόματος.

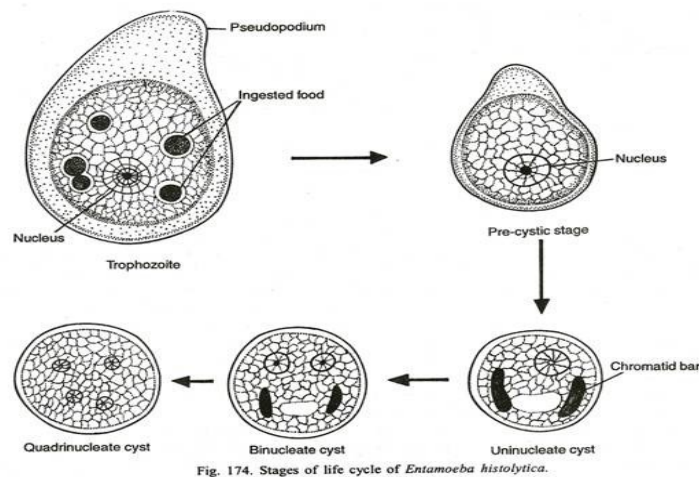
Αλληλεπιδράσεις – Αντενδείξεις

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της φλουκοναζόλης σχετίζονται με την πιθανότητα αναστολής των κυτοχρωμάτων P450 τα οποία μεταβολίζουν άλλα φάρμακα όπως κυκλοσπορίνη, βαρφαρίνη, τολβουταμίδη, φαινυτοΐνη. Κάποιες φορές μπορεί να προκαλέσει ναυτία, εμετό είτε εξανθήματα. Όπως και οι άλλες αζόλες θα πρέπει να αποφεύγεται κατά την κύηση.

2.5 Αντιπρωτοζωικά φάρμακα

2.5.1 Εισαγωγή

Η αμοιβάδα είναι πρωτόζωο (*Entamoeba histolytica*) το οποίο μπορεί να ενοικεί στο παχύ έντερο χωρίς να προκαλεί νόσο (χρόνιοι φορείς) ή να προκαλέσει οξεία δυσεντερία ή χρόνια διάρροια ή και να προσβάλλει το ήπαρ αιματογενώς (απόστημα ήπατος) και σπανιότερα άλλα όργανα (πνεύμονες, εγκέφαλο κ.ά.). Προσβάλλει ετησίως 50.000.000 άτομα περίπου με 50.000-100.000 θανάτους (σε τροπικές κυρίως περιοχές). Η αμοιβάδα υπάρχει σε δύο μορφές τους τροφοζώιτες και την κυστική μορφή (σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4 Τροφοζώιτες και κυστική μορφή της αμοιβάδας.

Οι τροφοζώιτες καταστρέφονται στο όξινο pH του στομάχου καθώς και στο περιβάλλον. Η κυστική μορφή της αμοιβάδας είναι ανθεκτική στο όξινο pH του στομάχου και αντέχει για εβδομάδες έως και μήνες στο περιβάλλον (έδαφος, νερό). Μεταδίδεται μέσω των κοπράνων (μολυσμένη τροφή, χέρια κ.λ.π.). Μόνο οι κύστεις είναι μολυσματικές.

2.5.2 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η αμοιβάδωση μπορεί να είναι οξεία ή και χρόνια, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν διάφορες βαθμίδες ασθενείας, από απουσία συμπτωμάτων μέχρι ήπια διάρροια και κεραυνοβόλο δυσεντερία.

Η διάγνωση τίθεται με την απομόνωση της *E. histolytica* σε πρόσφατα κόπρανα. Η θεραπεία απευθύνεται όχι μόνο στους ασθενείς με οξεία νόσο αλλά και στους ασυμπτωματικούς φορείς, διότι το λανθάνον πρωτόζωο μπορεί να προκαλέσει μελλοντικές λοιμώξεις στον φορέα και να αποτελέσει πηγή μόλυνσης για άλλους ανθρώπους.

A. Βιολογικός κύκλος της Entamoeba Histolytica

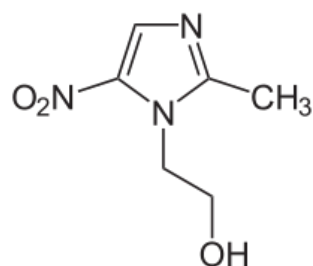
Από τις δύο μορφές της *E.Histolytica* οι κύστες είναι αυτές που μπορούν να επιβιώσουν έξω από το σώμα, οι ευαίσθητοι αλλά διεισδυτικοί τροφοζώιτες δεν επιζούν εκτός σώματος. Οι κύστες εισέρχονται στον οργανισμό με την πρόσληψη νερού ή τροφών μολυσμένων από κόπρανα και φθάνουν στο έντερο, όπου απελευθερώνουν τους τροφοζώιτες. Οι τροφοζώιτες πολλαπλασιάζονται και είτε διεισδύουν και δημιουργούν εξελκώματα στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου είτε απλώς διατρέφονται με τα εντερικά βακτήρια. Οι τροφοζώιτες που βρίσκονται μέσα στο έντερο μετακινούνται αργά προς το ορθό, όπου επανέρχονται στη μορφή της κύστης και αποβάλλονται με τα κόπρανα. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού τροφοζωιτών μέσα στο τοίχωμα του παχέος εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική λοίμωξη.

B. Ταξινόμηση των αμοιβαδοκτόνων φαρμάκων

Τα αμοιβαδοκτόνα χαρακτηρίζονται ως συστηματικά και μικτά ανάλογα με την περιοχή δράσης του καθενός. Τα αμοιβαδοκτόνα του εντερικού αυλού δρουν στα παράσιτα που βρίσκονται μέσα στον αυλό του εντέρου, ενώ τα συστηματικά φάρμακα είναι δραστικά κατά των αμοιβάδων που βρίσκονται μέσα στο εντερικό τοίχωμα και το ήπαρ. Τα μικτά αμοιβαδοκτόνα είναι αποτελεσματικά τόσο για την εντερική όσο και για τη συστηματική μορφή της νόσου, αν και οι συγκεντρώσεις στον εντερικό αυλό είναι πολύ χαμηλές για μονοθεραπεία.

2.5.3 Μετρονιδαζόλη

Η μετρονιδαζόλη είναι το μικτής δράσης αμοιβαδοκτόνο εκλογής για τη θεραπεία των αμοιβαδικών λοιμώξεων. Η χημική δομή της μετρονιδαζόλης παρουσιάζεται στο σχήμα 2.5.

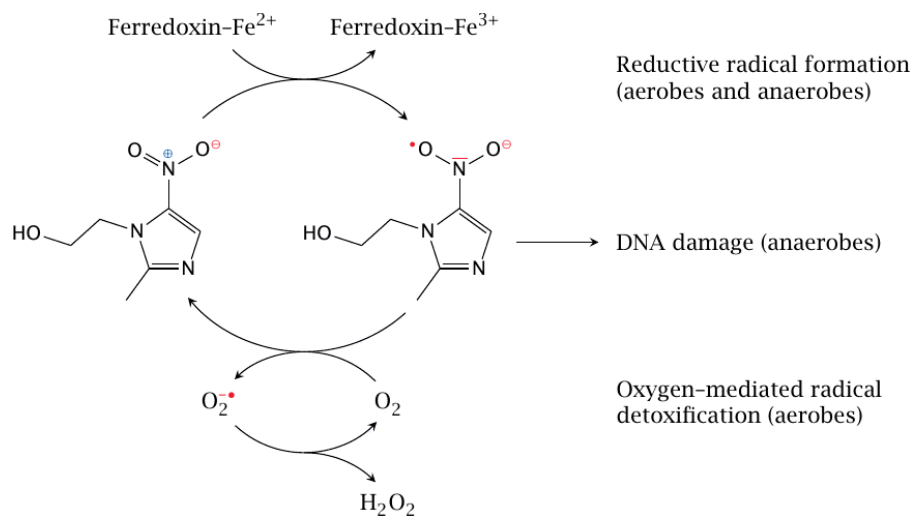


Σχήμα 2.5 Χημική δομή της μετρονιδαζόλης

Φονεύει τους τροφοζώιτες της *E.histolytica*, ενώ παράλληλα αποτελεί το φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας που προκαλείται από τον αναερόβιο gram-θετικό βάκιλλο *Clostridium difficile*, ενώ επίσης είναι αποτελεσματική στη θεραπεία εγκεφαλικών αποστημάτων από αυτούς τους οργανισμούς.

2.5.3.1 Μηχανισμός

Ορισμένα αναερόβια παρασιτικά πρωτόζωα διαθέτουν πρωτεΐνες χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, οι οποίες μοιάζουν με τη φερροδοξίνη, μεταφέρουν ηλεκτρόνια και συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες απόσπασης ηλεκτρονίων.



Σχήμα 2.6 Μηχανισμός δράσης της μετρονιδαζόλης

Η νιτρο-ομάδα της μετρονιδαζόλης μπορεί να γίνει δέκτης ηλεκτρονίων και να σχηματίσει ανηγμένες κυτταροτοξικές ενώσεις που συνδέονται με τις πρωτεΐνες και το DNA και προκαλούν το θάνατο των κυττάρων (σχήμα 2.6).

2.5.3.2 Φαρμακοκινητική-μεταβολισμός-απέκκριση

Η μετρονιδαζόλη απορροφάται πλήρως και ταχέως μετά από *per os* χορήγηση. Κατανέμεται επαρκώς σε όλους τους ιστούς και τα υγρά του σώματος. Θεραπευτικά επίπεδα μπορούν να βρεθούν στα κοιλικά υγρά, στο σπέρμα, στο σάλιο, στο γάλα, και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ο μεταβολισμός εξαρτάται από την ηπατική οξείδωση της πλάγιας αλύσου της μετρονιδαζόλης από μία οξειδάση μικτής λειτουργίας που ακολουθείται από γλυκουρονίδωση. Συνεπώς, η ταυτόχρονη χορήγηση επαγωγών αυτού του ενζυμικού συστήματος, όπως η φαινοβαρβιτάλη, αυξάνει το ρυθμό μεταβολισμού. Αντιστρόφως τα φάρμακα που αναστέλλουν αυτό το σύστημα, όπως η σιμετιδίνη παρατείνουν το χρόνο ημίσειας ζωής του φαρμάκου στο πλάσμα. Το φάρμακο συναθροίζεται σε

ασθενείς με σοβαρή ηπατική νόσο. Το αρχικό φάρμακο και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται στα ούρα.

2.5.3.3 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι αυτές που σχετίζονται με τη γαστρεντερική οδό: ναυτία,εμετός,αίσθημα δυσφορίας στο επιγάστριο και κοιλιακές κράμπες. Συχνά εμφανίζεται μια δυσάρεστη μεταλλική γεύση.Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν τη στοματική μονιλίαση (στοματική μόλυνση από ζυγομύκητες) και σπάνια νευροτοξικά προβλήματα, όπως ζάλη, ίλιγγος και αιμωδίες ή παραισθήσεις στο περιφερικό νευρικό σύστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ ΠΟΡΩΔΟΥΣ

ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

3.1 Εισαγωγή

Η αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία (RP-HPLC), λόγω της ευελιξίας της, είναι αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως στην τεχνική HPLC. Το πληρωτικό υλικό των στηλών που είναι κατάλληλες για RP-HPLC έχει συνήθως ως βάση την πηκτική πυριτίας. Η μειωμένη σταθερότητα της πηκτικής πυριτίας σε ακραίες τιμές pH της κινητής φάσης αλλά και η παρουσία ελεύθερων επιφανειακών ομάδων σιλανόλης οδηγεί σε περιορισμούς στη χρήση της. Για τη διεύρυνση της κλίμακας της τιμής του pH της κινητής φάσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, αναπτύχθηκαν νεότερα πληρωτικά υλικά, ένα από τα οποία είναι τα πληρωτικά υλικά από πορώδη γραφίτοποιημένο άνθρακα.

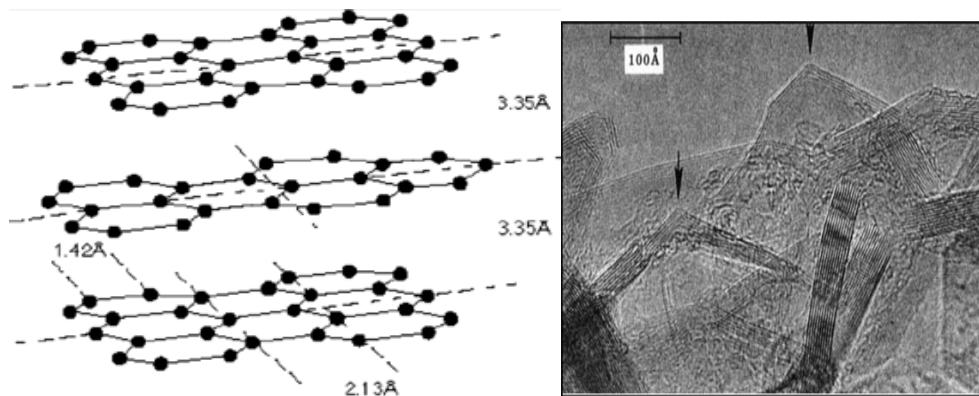
Ο ενεργός άνθρακας έχει χρησιμοποιηθεί ως προσροφητικό υλικό στην κλασική υγροχρωματογραφία από τη δεκαετία του '60 κυρίως λόγω της υψηλής σταθερότητάς του σε ευρεία κλίμακα τιμών pH κινητής φάσης αλλά και της ουδετερότητάς του^{19,20}. Το 1982 ωστόσο η Knox μαζί με συνεργάτες δημοσιοποίησαν μια μέθοδο κατασκευής ενός πορώδους υαλώδους μη γραφίτοποιημένου άνθρακα με την απαιτούμενη φυσική και χημική σταθερότητα²¹. Χρησιμοποιήθηκε πηκτική πυριτίας ως υπόστρωμα και όταν το μεσοπορώδες ανθρακοειδές προϊόν γραφίτοποιήθηκε επιπλέον χρησιμοποιώντας θερμοκρασίες άνω των 2000°C ένα κρυσταλλικό προϊόν χωρίς μικροπόρους αποκτήθηκε. Αυτή η διαδικασία οδήγησε σε μια σπουδαία ανακάλυψη για τη παραγωγή στηλών PGC σε χρήση υγρής χρωματογραφίας.

Το 1988 η διαδικασία κατασκευής στηλών PGC η οποία αναπτύχθηκε αρχικά στη μονάδα Wolfson του πανεπιστημίου του Εδιμβούργου μεταφέρθηκε στο Thermo Hypersil-Keystone. Η εταιρεία επιπλέον βελτιστοποίησε την απόδοση των στηλών κατασκευάζοντας στήλες PGC με διάμετρο σωματιδίων 5 μm το 1994.

3.2 Μηχανισμός χρωματογραφικής συγκράτησης σε στήλες PGC

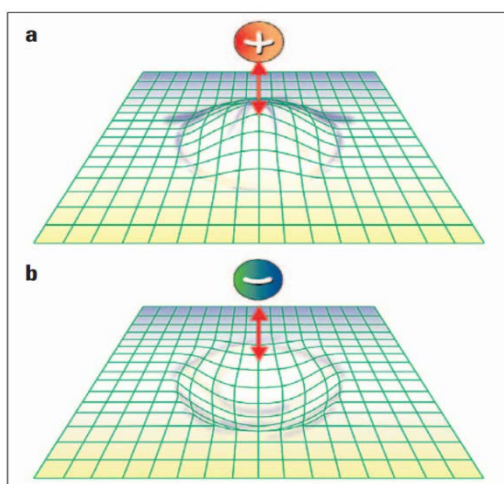
Ο όρος "γραφιτοποιημένος άνθρακας" αναφέρεται σε άνθρακα που έχει θερμανθεί στην περιοχή των 3000°C σε κλίβανο γραφιτοποίησης. Ο βαθμός γραφιτοποίησης ενός τέτοιου άνθρακα κυμαίνεται από σχεδόν άμορφα υλικά σε τέλειους τρισδιάστατους κρυστάλλους γραφίτη.

Υπάρχουν τρεις διακριτές δομές άνθρακα οι οποίες μπορούν να ονομαστούν ως "γραφιτοποιημένες" και έχουν καλώς καθορισμένες κρυσταλλικές δομές. Η πρώτη δομή, η δομή "Bernal" (Σχήμα 3.1 α), είναι αυτή του τέλειου τρισδιάστατου γραφίτη, που αποτελείται από φύλλα ατόμων άνθρακα ,με υβριδισμό sp^2 , οργανωμένα σε εξάγωνα, ακολουθώντας την σειρά ABABAB•••. Αυτή η δομή ονομάζεται "εξαγωνικός γραφίτης". Οι συνδέσεις μεταξύ των διαφορετικών φύλλων γίνονται με δεσμούς van der Waals. Η δομή αυτή χαρίζει στο πληρωτικό υλικό ακαμψία και μηχανική σταθερότητα. Υπάρχει μία πιο σπάνια δομή τρισδιάστατου γραφίτη, η δομή "Lipson-Stokes", με μόνη διαφορά ότι τα φύλλα άνθρακα ακολουθούν την σειρά ABCABC•••. Αυτή ονομάζεται "ρομβοεδρικός γραφίτης".

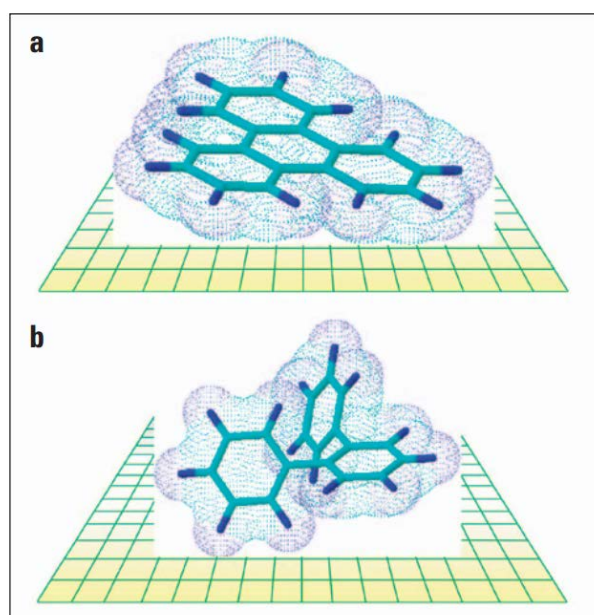


Σχήμα 3.1 α) Δομή δύο διαστάσεων του γραφίτη, β) εικόνα του πορώδους γραφίτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Στη στατική φάση πορώδους γραφίτη (PGC) η συγκράτηση των αναλυτών εξαρτάται από τη σχήμα και τη γεωμετρία του μορίου του αναλύτη που καθορίζει την επαφή του με το πληρωτικό υλικό και τις χαρακτηριστικές ομάδες του αναλύτη που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με αυτό. Η συγκράτηση οφείλεται σε υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (σχήμα 3.2). Δε μειώνεται και συχνά αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας των αναλυτών (PREG –polar retention effect on graphite), σε αντίθεση με στήλες τροποποιημένης πυριτίας με την πρόσδεση αλκυλίων. Επίσης, η συγκράτηση είναι ισχυρή για μη πολικούς αναλύτες. Επειδή η επιφάνεια της στατικής φάσης είναι επίπεδη και ομογενής η συγκράτηση επίπεδων μορίων είναι πιο ισχυρή (σχήμα 3.3). Τα πληρωτικά αυτά υλικά είναι ικανά να διαχωρίσουν γεωμετρικά ισομερή και διαστεροϊσομερή. Παρουσιάζουν σταθερότητα σε ολόκληρη την κλίμακα τιμών του pH, σε υψηλές θερμοκρασίες και ποικίλους διαλύτες^{22,23,24,22}.



Σχήμα 3.2 Σχηματική απεικόνιση της συγκράτησης ενός πολικού αναλύτη στον οποίο **α)** θετικό, **β)** αρνητικό φορτίο αλληλεπιδρά με τη στήλη, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρικά επαγόμενου διπόλου στην επιφάνεια του γραφίτη



Σχήμα 3.3 Αποτέλεσμα στη συγκράτηση ενός αναλύτη βάσει της στεροχημείας του παρατηρώντας ένα **α)** επίπεδο, **β)** μη επίπεδο μόριο.

3.3 Χρησιμότητα στηλών PGC

Κύρια πλεονεκτήματα της στατικής φάσης PGC έναντι των στατικών φάσεων χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως που βασίζονται στην πηκτή διοξειδίου του πυριτίου είναι²³:

- η ομοιογενής επιφάνεια και η απουσία ενεργών θέσεων που οφείλονται στην παρουσία των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης και συχνά οδηγούν σε δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις
- η σταθερότητά της σε όλο το εύρος pH, επιτρέποντας τη χρησιμοποίηση μεγάλης ποικιλίας κινητών φάσεων χωρίς προβλήματα υδρόλυσης ή διαλυτοποίησης
- η ικανότητά της να διαχωρίζει διαστερεοϊσομερείς, γεωμετρικά ισομερείς και εναντιομερείς ενώσεις και
- η δυνατότητα χρησιμοποίησής της τόσο σε χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, όσο και σε χρωματογραφία κανονικής φάσεως

Σ' αντίθεση με τις συνήθεις στατικές φάσεις, στην περίπτωση των στατικών φάσεων PGC, δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί η συγκράτηση μιας ουσίας με βάση την εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης και να σχηματιστεί μια εκλουστική σειρά διαλυτών. Η επίδραση του οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης εξαρτάται από το είδος των αναλυόμενων ουσιών.

Σε στατική φάση C8 και C18 η μετρονιδαζόλη και η φλουκοναζόλη λόγω της πολικότητας τους εμφάνισαν πολύ μικρούς χρόνους συγκράτησης και εκλούονταν πολύ κοντά στο μέτωπο του διαλύτη, όπου εκλούονται συγχρόνως και τα συστατικά του πλάσματος. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με την επιλογή της στατικής φάσης PGC, στην οποία οι παραπάνω ουσίες παρουσίασαν ικανοποιητική συγκράτηση. Το φαινόμενο αυτό της συγκράτησης πολικών

ουσιών είναι γνωστό ως “φαινόμενο πολικής κατακράτησης στο γραφίτη” (Polar Retention Effect on Graphite, PREG) και σχετίζεται με την ικανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων με ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων ή αρωματικά ηλεκτρόνια και της επιφάνειας του γραφίτη με ένα μηχανισμό μεταφοράς του ηλεκτρονιακού ζεύγους στο γραφίτη.

Τελικά μπορούμε να συμπαιράνουμε ότι οι στήλες PGC χρησιμοποιούνται συχνά για την επίλυση προβλημάτων που προκύπτουν κατά την εφαρμογή μεθόδων υγρής χρωματογραφίας με πληρωτικά υλικά αντιστρόφου φάσης, όπως στις περιπτώσεις πολικών ιονιζόμενων μορίων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα υδρόφιλα πεπτίδια για την ανάλυση των οποίων βρίσκουν εφαρμογή πληρωτικά υλικά πορώδους γραφίτη-πορημένου άνθρακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΙΔΑΖΟΛΗΣ ΚΑΙ ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LC-ESI/MS ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΠΟΡΩΔΟΥΣ ΓΡΑΦΙΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

4.1 Εισαγωγή

Η μετρονιδαζόλη είναι ένα παράγωγο του νιτροϊμιδαζολίου που εμφανίζει μηχανισμό μικτής δράσης εναντίων των αναερόβιων πρωτοζώων, ενώ συγκαταλέγεται ανάμεσα στα 10 πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στις ΗΠΑ. Εισήχθει αρχικά ως φάρμακο κατά της τριχομονάδωσης στην Ευρώπη από τους Cozar και Julou ²⁴. Από τότε οι εφαρμογές της έχουν πολλαπλασιαστεί και είναι πλέον η βασική θεραπεία κατά του ελικοβακτηρίου του πυλωρού, της τριχομονάδωσης, της νόσου του Crohn, της γαρδίασης, gram αρνητικών βακτηρίων κλπ²⁵. Για να εμφανίσει τη δραστηριότητα εναντίων των μικροβιακών κυττάρων πρέπει να αποβάλλει τη νιτροομάδα της, η οποία επιτυγχάνεται σε αναερόβιες συνθήκες²⁶. Η αποβολή της νιτροομάδας του 5 νιτροϊμιδαζολίου οδηγεί στο σχηματισμό τοξικών παραγώγων τα οποία αλληλεπιδρώντας με το DNA σκοτώνουν τα κύτταρα-στόχους. Οι πρωτοζωικές λοιμώξεις είναι συνήθεις σε ανθρώπους που ζουν σε υπανάπτυκτες τροπικές και υποτροπικές χώρες, όπου οι υγειονομικές συνθήκες, η εφαρμογή των κανόνων υγιεινής και ο έλεγχος των ενδιάμεσων ξενιστών είναι ανεπαρκής. Ωστόσο με την αύξηση των ταξιδιών ανά τον κόσμο οι πρωτοζωικές νόσοι όπως η ελονοσία, η αμοιβάδωση, η τριχομονάδωση δεν περιορίζονται πλέον σε συγκεκριμένες περιοχές.

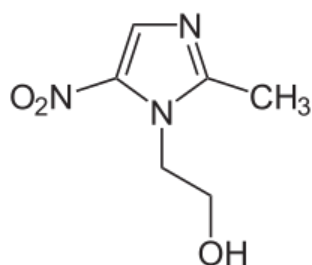
Οι μυκητιάσεις είναι λοιμώδεις ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες και έχουν χρόνιο χαρακτήρα . Πολλές κοινές μυκητιάσεις είναι επιφανειακές και αφορούν μόνο στο δέρμα, αλλά επίσης μπορούν να αφορούν εισχωρήσεις μυκήτων βαθιά στο δέρμα και να προκαλούν υποδόριες λοιμώξεις. Σε αντίθεση με τα βακτήρια οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Έχουν κυτταρικά τοιχώματα στερεά τα οποία περιέχουν χιτίνη. Η κυτταρική μεμβράνη των μυκήτων περιέχει εργοστερόλη αντί για χοληστερόλη που απαντάται στις μεμβράνες των θηλαστικών. Αυτά τα χημικά χαρακτηριστικά είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη των λεγόμενων αντιμυκητιασικών φαρμάκων. Η φλουκοναζόλη είναι φάρμακο εκλογής για τον *Cryptococcus neoformans*, την καντινταμία, την κοκκιδιοειδομυκητίαση²⁷, την ιστοπλάσμωση, ενώ χρησιμοποιείται και προληπτικά ώστε να μειώσει τις μυκητιασικές λοιμώξεις σε δέκτες μοσχευμάτων μυελού των οστών ^{28,29}. Χημικά εντάσσεται στη κατηγορία των τριαζολών και δρα αναστέλλοντας την C-14 α-απομεθυλάση η οποία είναι ένζυμο του συστήματος P450 του κυτοχρώματος, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την απομεθυλίωση της λανοστερόλης προς εργοστερόλη.

Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει κάποιες εφαρμογές στον ποσοτικό προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης ή της φλουκοναζόλης σε βιολογικά υγρά^{30,31}. Η φλουκοναζόλη έχει προσδιοριστεί σε ανθρώπινο πλάσμα με την τεχνική LC-MS/MS σε εύρος συγκεντρώσεων 0,1 έως 10 µg/mL³². Όσον αφορά τη μετρονιδαζόλη έχει προσδιοριστεί ποσοτικά σε ανθρώπινο πλάσμα ταυτόχρονα με ρανιτιδίνη με την τεχνική LC-MS/MS, και με χρήση ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (HPLC-DAD)³³. Η μετρονιδαζόλη έχει προσδιοριστεί με την τεχνική LC-MS/MS σε πλάσμα βοοειδών μαζί με άλλες ενώσεις της κατηγορίας των νιτροϊμιδαζολινών.³⁴ Εντούτοις δεν υπάρχει αναφορά για τη χρήση στήλης

αντίστροφης φάσης με πληρωτικό υλικό από πορώδη γραφίτοποιημένου άνθρακα στον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους σε ανθρώπινο πλάσμα.

Στόχος της εργασίας είναι η ανάπτυξη και η αξιολόγηση μεθόδου υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (LC-ESI/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης και της φλουκοναζόλης σε ανθρώπινο πλάσμα. Η μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των φαρμάκων σε ανθρώπινο πλάσμα που έχει ληφθεί από θηλάζουσες μητέρες και τα πειραματικά αποτελέσματα θα συνδιαστούν με αντίστοιχες μετρήσεις των φαρμάκων σε μητρικό γάλα.

Οι χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στο σχήμα 4.1.



Μετρονιδαζόλη,

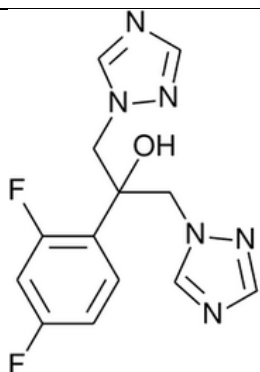
Ακριβής μάζα: 171,15

Μοριακός τύπος: C₆H₉N₃O₃

Log P= -0,02

pka =15,44

pka = 3,09



Φλουκοναζόλη

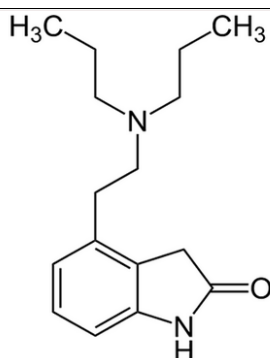
Ακριβής μάζα: 306,2708

Μοριακός τύπος: C₁₃H₁₂F₂N₆O

Log P=0,4

pka: 12,71

pka:2,56



Ροπινιρόλη,

Ακριβής μάζα: 260,375

Μοριακός τύπος: C₁₆H₂₄N₂O

Log P= 2,70

pka: 13,24

Σχήμα 4.1: Χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου (ροπινιρόλη).

Εδώ και καιρό στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς κυριαρχεί η χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως καθώς αποτελεί μια ιδιαίτερη οικονομική τεχνική διαχωρισμού αναλυτών. Η κινητή φάση είναι αρκετά πολική με αυξημένη τη χρήση του νερού σε αυτή με αποτέλεσμα τον περιορισμό των οργανικών διαλυτών. Εκτός της οικονομικής και οικολογικής διάστασης της RP-HPLC, στις κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται για τη χρωματογραφία αυτού του είδους είναι εφικτή η μεταβολή αρκετών παραμέτρων όπως η αλλαγή της

τιμής του pH, η αλλαγή του % ποσοστού του οργανικού τροποποιητή προσδίδοντας πολλές επιλογές στο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Την τελευταία εικοσαετία έχουν αναπτυχθεί νεότερα πληρωτικά υλικά για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με αποτέλεσμα να υπάρχει πληθώρα στατικών φάσεων για RP-HPLC ανάλογα με τη φύση των αναλυτών. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε στήλη πορώδους γραφίτοποιημένου άνθρακα (Porous Graphitized Carbon, PGC) με την εμπορική ονομασία Hypercarb. Κύρια πλεονεκτήματα της στατικής φάσης PGC έναντι των στατικών φάσεων χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως που βασίζονται στην πηκτή διοξειδίου του πυριτίου είναι :

- ❖ η ομοιογενής επιφάνεια και η απουσία ενεργών θέσεων που οφείλονται στην παρουσία των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης και συχνά οδηγούν σε δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις,
- ❖ η σταθερότητά της σε όλο το εύρος pH, επιτρέποντας τη χρησιμοποίηση μεγάλης ποικιλίας κινητών φάσεων χωρίς προβλήματα υδρόλυσης ή διαλυτοποίησης,
- ❖ η ικανότητά της να διαχωρίζει διαστεροϊσομερείς, γεωμετρικά ισομερείς και εναντιομερείς ενώσεις και
- ❖ η δυνατότητα χρησιμοποίησής της τόσο σε χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, όσο και σε χρωματογραφία κανονικής φάσεως.

Στην εργασία μελετήθηκε αναλυτικά η χρωματογραφική συμπεριφορά της μετρονιδαζόλης και της φλουκοναζόλης στη στήλη PGC και έγινε προσπάθεια η αναλύτες να συγκρατηθούν ικανοποιητικά από τη στήλη και να διαχωριστούν από τα συστατικά του βιολογικού υλικού (ανθρώπινο πλάσμα). Επιπλέον η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της

(γραμμικότητα, γραμμική περιοχή, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ακρίβεια, ειδικότητα), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος.

4.2 Εξοπλισμός - Οργανολογία

4.2.1 Σύστημα LC/ESI-MS

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των αναλυτών είναι της εταιρείας Thermo μοντέλο AQA (Manchester, UK). Ο ιοντισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης (ESI). Το φασματόμετρο μαζών διαθέτει απλό γραμμικό τετραπολικό αναλυτή μαζών και φωτοπολλαπλασιαστή ως ανιχνευτή των ιόντων.

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρείας SpectraSeries, μοντέλο P100 (SP ThermoSeparation products, UK) και από σύστημα έγχυσης Rheodyne 7725i με βρόχο εισαγωγής δείγματος 20 μ L. Το άζωτο που χρησιμοποιήθηκε ως αέριο αποδιαλύτωσης και νεφελοποίησης, παράχθηκε από γεννήτρια της εταιρείας Domnick Hunter (Gateshead, England) μοντέλο Nitrox-N2 UHPLC-MS 12E.

Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Xcalibur (ver 1.2).

4.2.2 Σύστημα υγροχρωματογραφίας

Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη με πληρωτικό υλικό από πορώδη γραφίτοποιημένο άνθρακα με την ονομασία Hypercarb PGC και με διαστάσεις 125,0 x 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 5μm, της εταιρείας Thermo. Προστήλη Prevail C18 5 μm της εταιρείας Alltech Associates, Inc. με διαστάσεις 7,5 x 4,6 mm για να προστατευθεί η χρωματογραφική στήλη και να παραταθεί ο χρόνος χρήσης της.

Η κινητή φάση αποτελείται από μείγμα ακετονιτριλίου/νερού σε αναλογία 55/45, με προσθήκη 0,1% μυρμηκικού οξέος. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ισοκρατική έκλυση και η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,25 mL/min. Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και ο χρόνος της ανάλυσης για κάθε ένεση ήταν 5 λεπτά.

4.2.3 Φασματόμετρο Μαζών

Για τον προσδιορισμό των αναλυτών επιλέχθηκε η παραγωγή και ανίχνευση των θετικά φορτισμένων μοριακών ιόντων, $[M+H]^+$, της μετρονιδαζόλης, της φλουκοναζόλης, και της ροπινιρόλης (εσωτερικό πρότυπο).

Οι παράμετροι που αφορούν τη βέλτιστη λειτουργία της πηγής ιοντισμού ήταν οι εξής: τάση τριχοειδούς 4,7 kV, θερμοκρασία 200°C, δυναμικό πηγής (AQA max) 20 V. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM).

4.2.4 Προκατεργασία Δείγματος

Η τεχνική που επιλέχθηκε για τον καθαρισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου από τα συστατικά του πλάσματος ήταν εκείνη της κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή φυγοκέντρου της εταιρείας Hettich μοντέλο Universal 32R, και για τη διήθηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν φιλτράκια Regenerated Cellulose. Η απαραίτητη απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρα νάϊλον μεγέθους πόρων 0,45 μm.

4.3 Αντιδραστήρια - Διαλύτες

Για την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ακετονιτρίλιο και μεθανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
- Τριφθοροξικό οξύ, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Merck.
- Διαιθυλαμίνη, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Sigma Aldrich.
- Μυρμηκικό αμμώνιο αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Acros Organics.
- Μυρμηκικό οξύ, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Sigma – Aldrich.
- Νερό απεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με τη συσκευή Synergy UV, της εταιρείας Merck-Millipore.

4.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Διάλυμα παρακαταθήκης φλουκοναζόλης (Α) : Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,0051g φλουκοναζόλης καθαρότητας 100,5 % και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Κατόπιν προστέθηκαν 6 mL ακετονιτριλίου και ακολούθησε διάλυση σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη. Προκύπτει έτσι διάλυμα φλουκοναζόλης συγκέντρωσης 500μg/mL.

Διάλυμα παρακαταθήκης μετρονιδαζόλης (Β): Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,0050 g μετρονιδαζόλης και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Κατόπιν προστέθηκαν 2 mL νερού και ακολούθησε διάλυση σε λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι χαραγής με ακετονιτριλίο. Προκύπτει έτσι διάλυμα μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης 500 μg/mL.

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης Α και Β προκύπτουν τα μεικτά διαλύματα παρακαθήκης Γ, Δ και Ε, σύμφωνα με τον πίνακα 4.1, όπου περιέχουν μετρονιδαζόλη και φλουκοναζόλη.

Πίνακας 4.1: Μεικτά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης

Αρχικό Διάλυμα	Όγκος (μl)	Διαλύτης	Τελικός Όγκος (mL)	Τελική Συγκέντρωση (μg/mL)
Δ/μα παρακαταθήκης Γ				
Δ/μα παρακαταθήκης Α	50	Ακετονιτριλίο	10	2,5
Δ/μα παρακαταθήκης Β	50			2,5
Δ/μα παρακαταθήκης Δ				
Δ/μα παρακαταθήκης Α	100	Ακετονιτριλίο	10	5
Δ/μα παρακαταθήκης Β	100			5
Δ/μα παρακαταθήκης Ε				
Δ/μα παρακαταθήκης Α	1000	Ακετονιτριλίο	10	50
Δ/μα παρακαταθήκης Β	1000			50

Πρότυπο διάλυμα εσωτερικού προτύπου: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,005 g εσωτερικού προτύπου (ροπινιρόλης) ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα

συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, από το οποίο, ύστερα από σειρά αραιώσεων, προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αμέσως μετά την παρασκευή τους μεταφέρονται σε σκουρόχρωμα φιαλίδια και φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4°C όπου παραμένουν σταθερά για 2 μήνες τουλάχιστον.

4.4.2 Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης Γ, Δ, και Ε σε ακετονιτρίλιο, παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας σε εύρος συγκεντρώσεων 0,1 έως 15 $\mu\text{g/mL}$.

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν, εκ νέου, κάθε δεύτερη βδομάδα και φυλάσσονταν στο ψυγείο στους 4°C.

Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή των συγκεντρώσεών τους, έτσι ώστε ο εμβολιασμός του πλάσματος να γίνεται σε κάθε περίπτωση με ίση ποσότητα προτύπου διαλύματος, ώστε όλα τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος να περιέχουν το ίδιο ποσοστό διαλύτη, στο οποίο είναι διαλυμένοι οι αναλύτες, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος για την καμπύλη βαθμονόμησης:

Τα διαλύματα πλάσματος για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα από τα διαλύματα εργασίας σε ακριβώς 150 μL ανθρώπινο πλάσμα οπότε προκύπτουν τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος των αναλυτών. Τα εμβολιασμένα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε

εύρος συγκεντρώσεων 0,1 έως 15 $\mu\text{g/mL}$ και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης και για τις μελέτες σταθερότητας.

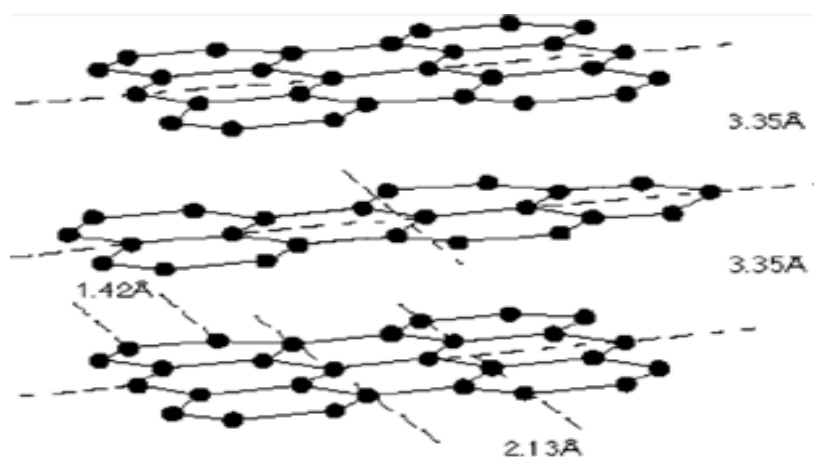
Εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (Quality Control samples):

Για την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0,1, 2,5 και 15 $\mu\text{g/mL}$. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν από διαφορετικές ζυγίζεις προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών.

4.5 Βελτιστοποίηση συστήματος HPLC

4.5.1 Επιλογή στατικής φάσης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε στατική φάση από πορώδη γραφίτοποιημένο άνθρακα. Η στατική αυτή φάση αποτελείται από διάφορα φύλλα γραφίτη που σχηματίζουν άτομα άνθρακα, υβριδισμού sp^2 , εξαγωνικά τοποθετημένα και συνδεδεμένα με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι συνδέσεις μεταξύ των διαφορετικών φύλλων γίνονται με δεσμούς van der Waals. Η δομή αυτή χαρίζει στο πληρωτικό υλικό ακαμψία και μηχανική σταθερότητα.

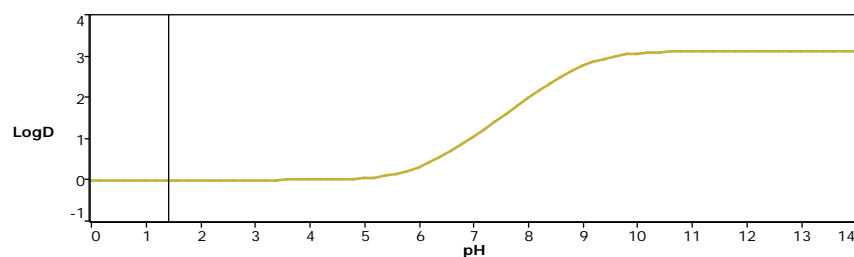
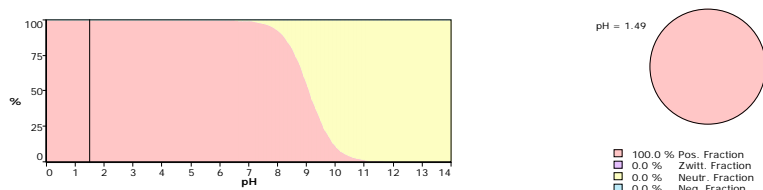


Σχήμα 4.2: Δομή δύο διαστάσεων του γραφίτη

Στη στατική φάση πορώδους γραφίτη (PGC) η συγκράτηση των αναλυτών εξαρτάται από το σχήμα και τη γεωμετρία του μορίου του αναλύτη που καθορίζει την επαφή του με το πληρωτικό υλικό και τις χαρακτηριστικές ομάδες του αναλύτη που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με αυτό.

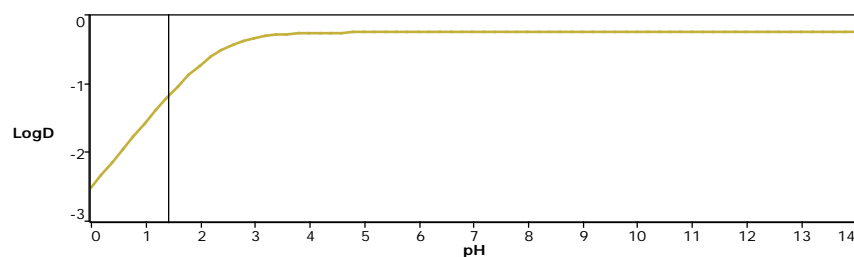
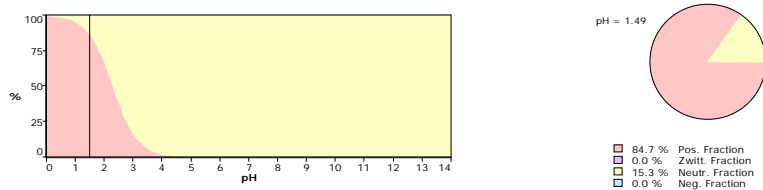
Χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα ADME boxes, ελήφθησαν πληροφορίες για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών, σχήμα 4.4, και του εσωτερικού προτύπου, σχήμα 4.3, με σκοπό την επιλογή των χρωματογραφικών συνθηκών και τη βελτιστοποίησή τους.

Ροπινιρόλη (εσωτερικό πρότυπο)

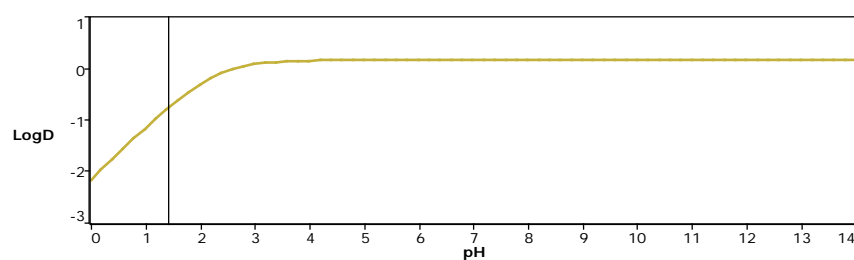
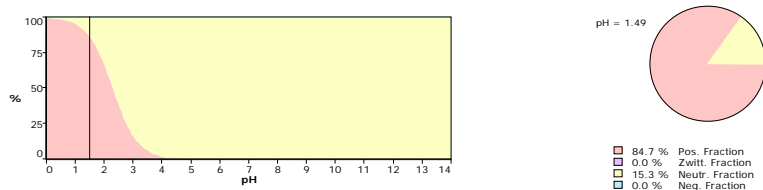


Σχήμα 4.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ροπινιρόλης

Μετρονιδαζόλη



Φλουκοναζόλη



Σχήμα 4.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μετρονιδαζόλης και της φλουκοναζόλης

Είναι φανερό ότι η μετρονιδαζόλη και η φλουκοναζόλη είναι πολικές ενώσεις και θετικά φορτισμένες σε τιμή $pH < 3$, και είναι υδρόφιλες ενώσεις. Το εσωτερικό πρότυπο (ροπινιρόλη) είναι επίσης θετικά φορτισμένο σε τιμή $pH < 3$, όμως είναι

λιπόφιλη ένωση καθώς η LogD είναι θετική σε όλο το εύρος των τιμών pH. Στη στήλη PGC η συγκράτηση οφείλεται σε υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και συχνά αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας των αναλυτών, σε αντίθεση με τις στήλες τροποποιημένης πηκτής πυριτίας. Επιπλέον η συγκράτηση είναι ισχυρή για μη πολικούς αναλύτες. Με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών αναμένεται ικανοποιητική συγκράτηση για τους αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο στη στήλη PGC.

4.5.2 Επιλογή κινητής φάσης

Για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης ελήφθησαν υπόψη αρκετοί παράγοντες όπως: οι αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο να μην εκλούονται μαζί με κάποιο από τα συστατικά του πλάσματος που πιθανόν εμφανίζει παρόμοια ιόντα με αυτούς, αλλά και ο χρόνος έκλουσής τους να μην είναι πολύ μεγάλος. Η παρουσία άλατος είναι απαραίτητη κατά τη διαδικασία κατακρήμνησης πρωτεϊνών του πλάσματος.

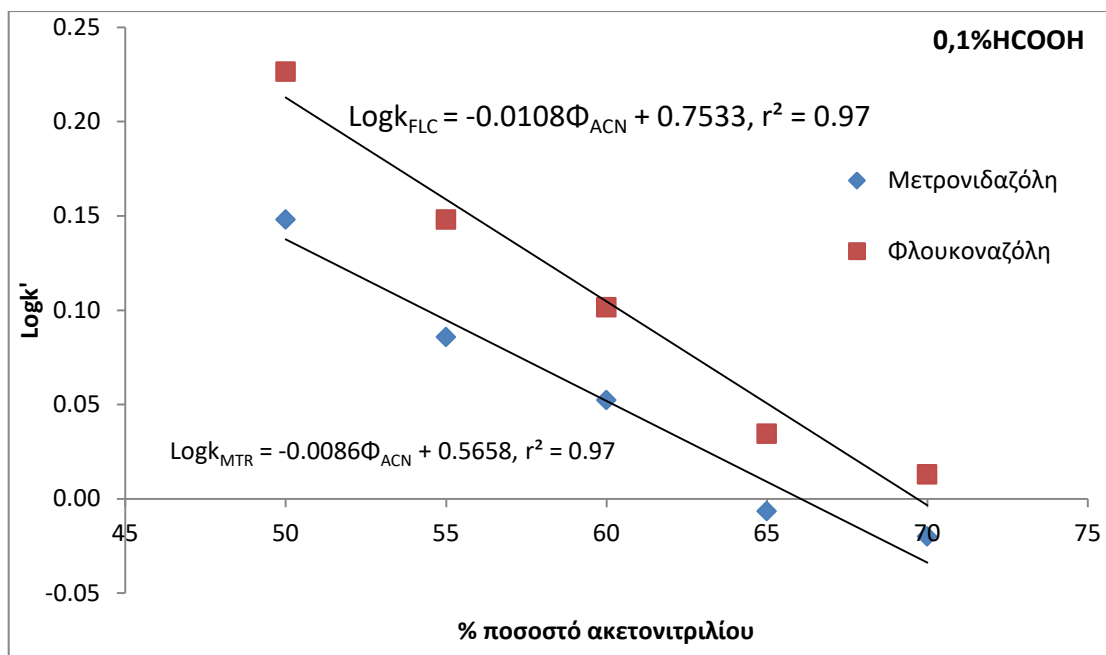
Έτσι ελέγχθηκε η βέλτιστη ποσότητα άλατος στην κινητή φάση ώστε να συνδυαστεί με το LC-MS, κρίθηκε απαραίτητος ο συμβιβασμός μεταξύ ποσοστού οργανικού τροποποιητή και νερού στην κινητή φάση με σκοπό να είναι συμβατή με το σύστημα LC-MS.

Με σκοπό να διερευνηθεί η συμπεριφορά των αναλυτών στην αναλυτική στήλη PGC πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύνθεσης της κινητής φάσης στη συγκράτηση τους και στο μετρούμενο σήμα από το φασματόμετρο μαζών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβάλλοταν ένας παράγοντας ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να προσδιοριστούν

οι βέλτιστες αρχικές χρωματογραφικές συνθήκες προτού γίνει η βελτιστοποίηση των συνθηκών σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος.

Ως οργανικοί τροποποιητές αρχικά δοκιμάσθηκαν το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Παρατηρήσαμε ότι η χρήση της μεθανόλης προκαλεί αύξηση του θορύβου στο σύστημα LC-ESI/MS και για αυτό κρίθηκε ακατάλληλη για την παρούσα μελέτη. Επιλέχθηκε η χρήση α-κετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή και πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταβάλλοντας το % ποσοστό του ακετονιτριλίου σε εύρος 50 έως 75% και χρησιμοποιώντας 0,1 % μυρμηκικό οξύ στην κινητή φάση. Οι μελέτες έγιναν με σκοπό να διερευνηθεί η βέλτιστη τιμή του παράγοντα χωρητικότητας k , με σκοπό τη μείωση του χρόνου ανάλυσης.

Στο σχήμα 4.5 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των τιμών $\text{Log}k'$ των αναλυτών σε σχέση με το % ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση μετά από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων εργασίας που περιείχαν μετρονιδαζόλη και φουκοναζόλη.



Σχήμα 4.5 Γραφική παράσταση της επίδρασης του %ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης στο $\text{Log}k'$ των αναλυτών

Το ακετονιτρίλιο είναι διαλύτης με ισχυρή εκλουστική ισχύ στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Αύξηση του % ποσοστού του ακετονιτριλίου προκαλεί γραμμική ελάττωση του χρόνου συγκράτησης των αναλυτών μέχρι το ποσοστό 70%, γεγονός που υποδηλώνει μηχανισμό κατανομής.

Σε μελέτες με κινητή φάση όπου το ποσοστό του ακετονιτριλίου ήταν μεγαλύτερο του 70% παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της συγκράτησης. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στα διαφορετικά είδη αλληλεπιδράσεων (υδρόφοβες, στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) που συμμετέχουν στο μηχανισμό συγκράτησης σε μια στήλη PGC. Η πειραματική αυτή επιβεβαίωση των Nemeth-Kiss γνωστή σήμερα και ως : the polar retention effect on graphite (PREG) παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον. Η επίδραση του % ποσοστού του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης στο σήμα των αναλυτών παρουσιάζεται σε μεταγενέστερο στάδιο της παρούσης εργασίας.

Κατόπιν μελετήθηκε η επίδραση του είδους του οξέος στην κινητή φάση, για τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν HCOOH και τριφθοροοξικού οξέος (TFA). Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη HCOOH στην κινητή φάση βελτιώνει τη συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής της μετρονιδαζόλης και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε για τις επόμενες μελέτες. Επιπλέον το TFA προκαλεί σημαντική μείωση του σήματος στο φασματόμετρο μαζών.

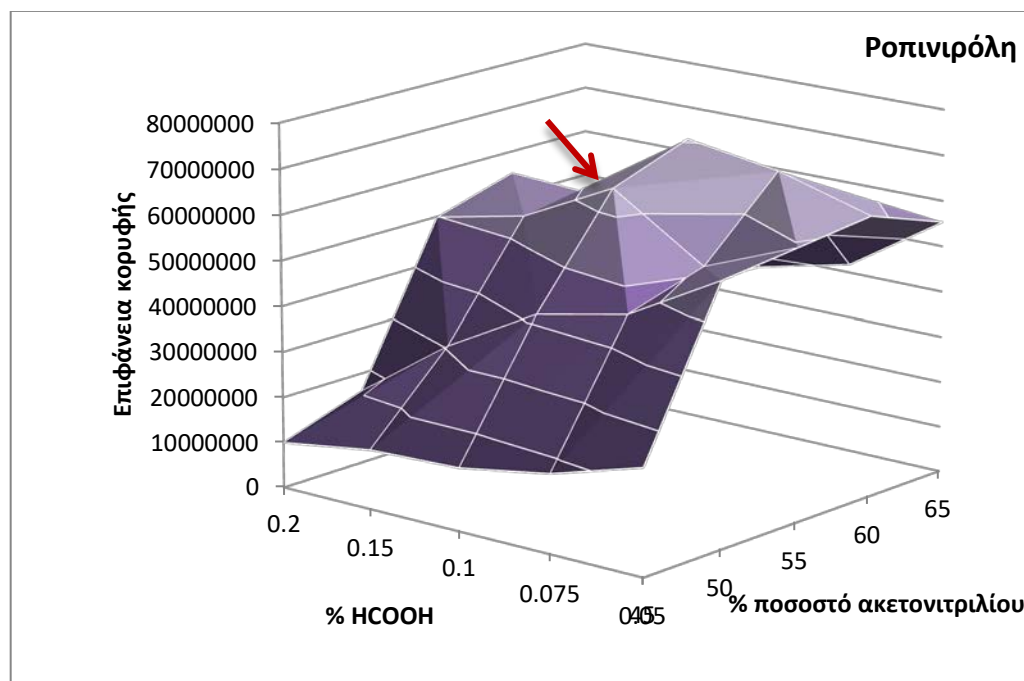
Με βάση τις παραπάνω μελέτες επιλέχθηκε η χρήση ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή και μυρμηκικού οξέος ως πρόσθετο στην κινητή φάση για την τελική βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών παρουσία βιολογικού υλικού.

Σε αυτά τα πειράματα ακολουθήθηκε η μέθοδος της μεταβολής ενός παράγοντα κάθε φορά, με διατήρηση σταθερών των υπόλοιπων παραγόντων. Τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος παρασκευάστηκαν με βελτιστοποιημένη μέθοδο εκχύλισης η οποία θα αναφερθεί παρακάτω στα πλαίσια αυτής της διατριβής.

Αναλυτικά οι συνθήκες οι οποίες μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- ✓ 45% ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ με εύρος από 0,050% έως 0,200%.
- ✓ 50% ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ με εύρος από 0,050% έως 0,200%.
- ✓ 55% ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ με εύρος από 0,050% έως 0,200%.
- ✓ 60% ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ με εύρος από 0,050% έως 0,200%.
- ✓ 65% ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ με εύρος από 0,050% έως 0,200%.

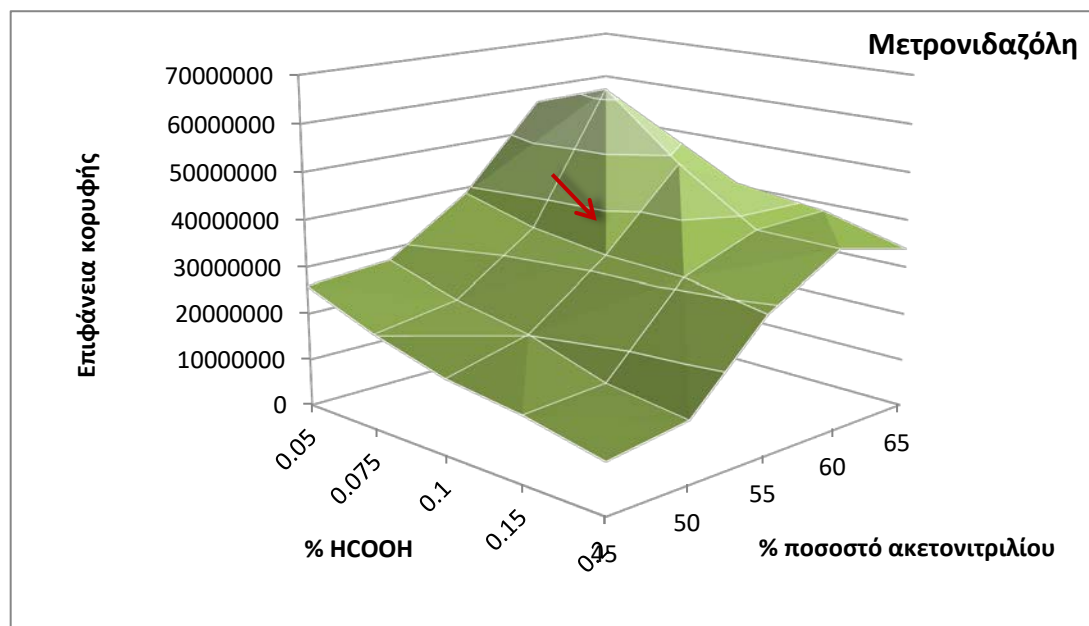
Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζεται το τρισδιάστατο διάγραμμα επιφανείας της μεταβολής του σήματος (επιφάνεια κορυφής) του εσωτερικού προτύπου με τις αντίστοιχες μεταβολές της κινητής φάσης.



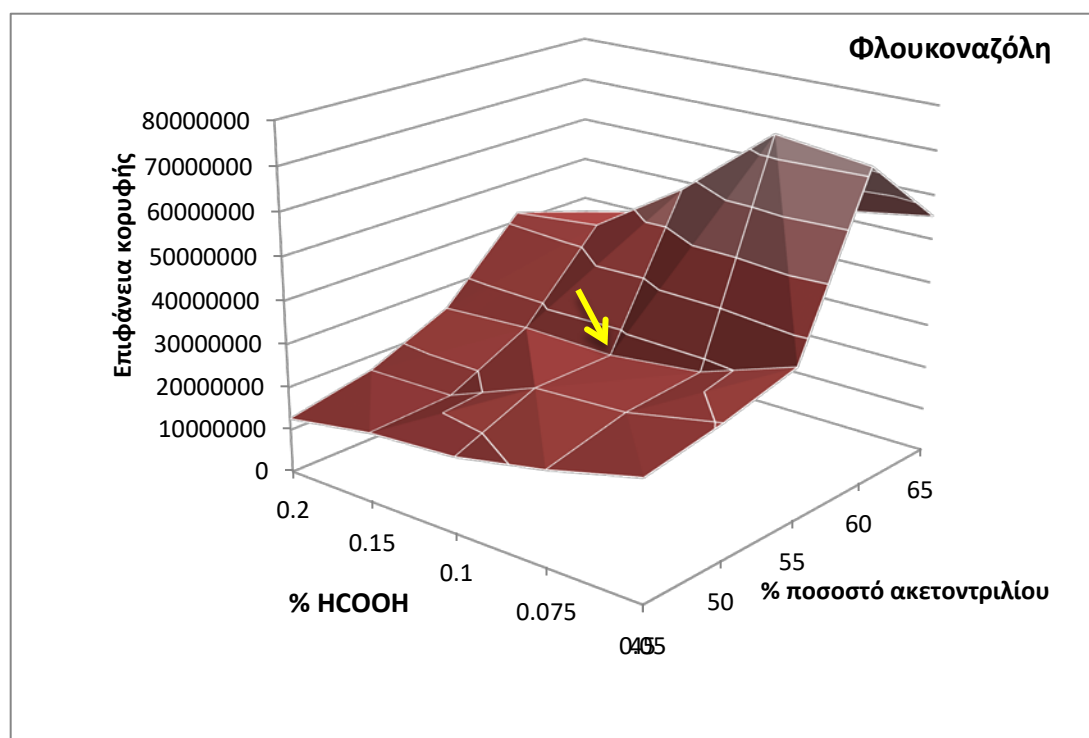
Σχήμα 4.6 Μεταβολή παραγόμενου σήματος στο φασματόμετρο μαζών για τη ροπινιρόλη (εσωτερικό πρότυπο) κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου παρουσία βιολογικού υλικού (ανθρώπινο πλάσμα).

Στα σχήμα 4.7A και 4.7B παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα διαγράμματα επιφανείας της μεταβολής του σήματος (επιφάνεια κορυφής) της μετρονιδαζόλης και της φλουκοναζόλης, αντίστοιχα, με τις αντίστοιχες μεταβολές της κινητής φάσης.

A



B



Σχήμα 4.7 Μεταβολή παραγόμενου σήματος στο φασματόμετρο μαζών για τη μετρονιδαζόλη (A) και τη φλουκοναζόλη (B) κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου παρουσία βιολογικού υλικού (ανθρώπινο πλάσμα).

Όπως είναι φανερό αύξηση του % ποσοστό ακετονιτριλίου προκαλεί αύξηση του σήματος. Ωστόσο, ως βέλτιστο επιλέχθηκε το ποσοστό 55% με 0,1% μυρμηκικό οξύ στην κινητή φάση καθώς συνδιάζει ικανοποιητικό σήμα και για τους δύο αναλύτες, σύντομο χρόνο ανάλυσης και διαχωρισμό των αναλυτών από τα συστατικά του ανθρώπινου πλάσματος.

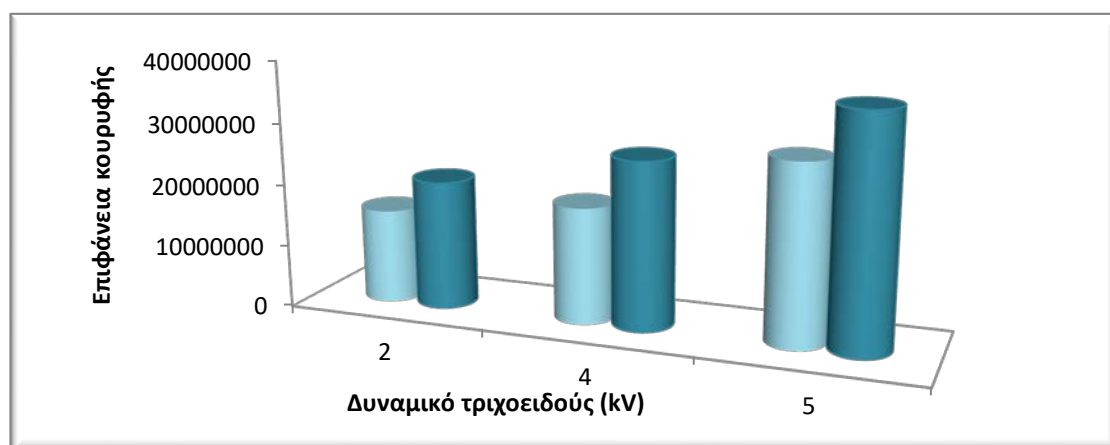
Από τη μελέτη της επίδρασης του % ποσοστού μυρμηκικού οξέος σε κινητή φάση με 55% ακετονιτρίλιο, διαπιστώθηκε ότι η συγκράτηση των αναλυτών δεν μεταβάλλεται σημαντικά, επιλέχθηκε ως βέλτιστο ποσοστό η τιμή 0,1% καθώς σε αυτή βελτιώνεται η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

4.6 Βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών. Για τις μελέτες αυτές εισήχθησαν με απευθείας έκχυση στο φασματόμετρο μαζών διαλύματα συγκέντρωσης 50 µg/mL μετρονιδαζόλης, φλουκοναζόλης και ροπινιρόλης. Οι ουσίες ενίονται απευθείας στην κινητή φάση με χρήση βρόχου 20 µL και η ροή εισαγωγής τους στο φασματόμετρο μαζών ήταν 0,25 mL/min. Για τον ιοντισμό των αναλυτών στο φασματόμετρο μαζών επιλέχθηκε η τεχνική του ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης (electrospray ionization, ESI). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού (ESI probe temperature), η τάση του τριχοειδούς (capillary voltage), το δυναμικό της πηγής ιοντισμού (cone voltage, AQAmx), ο χρόνος (time) και το span.

Η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίστηκε στους 220 °C, στη μικρότερη δηλαδή δυνατή τιμή που αντιστοιχεί σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,25 mL/min έτσι, ώστε να αποφευχθεί πιθανή θερμοδιάσπαση των αναλυόμενων ουσιών.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 4.8, η τάση του τριχοειδούς επηρεάζει σημαντικά το μετρούμενο σήμα των αναλύτων στο φασματομέτρο μαζών. Βρέθηκε ότι η τιμή 5,0 kV ενίσχυσε σημαντικά το λαμβανόμενο σήμα. Στις επόμενες μελέτες επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η τιμή 4,8 kV ώστε να μην είμαστε οριακά στην ανώτερη τιμή.



■ METRONIDAZOLE
■ FLUCONAZOLE

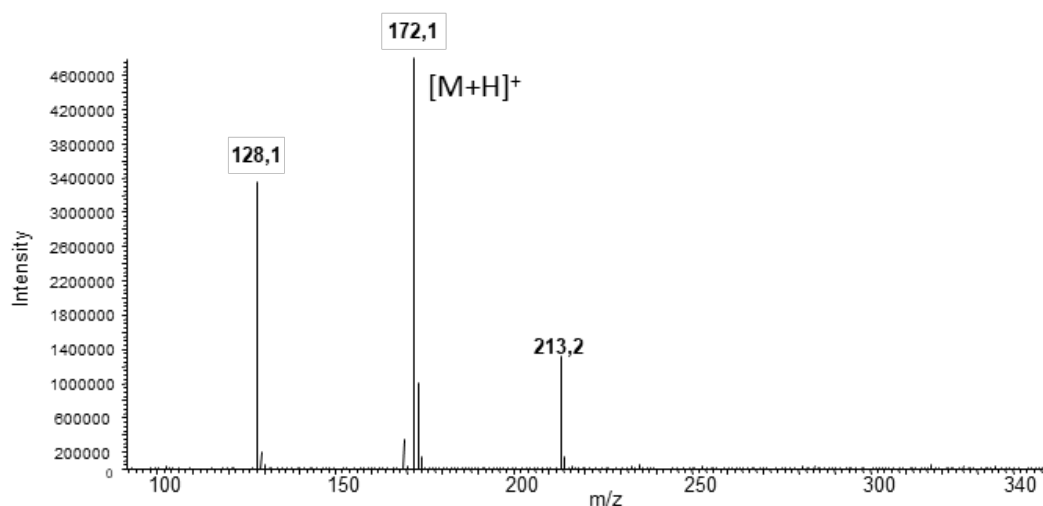
Σχήμα 4.8 Λαμβανόμενο σήμα σε σχέση με τη τάση του τριχοειδούς

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε ο παραγόντας mass span, η δυνατότητα δηλαδή του φασματομέτρου μαζών να καταγράφει ένα πολύ μικρό εύρος μαζών γύρω από το επιλεγμένο ιόν και επιλέχθηκε η τιμή 0,15 ως βέλτιστη, λόγω οριακά καλύτερου λαμβανόμενου σήματος.

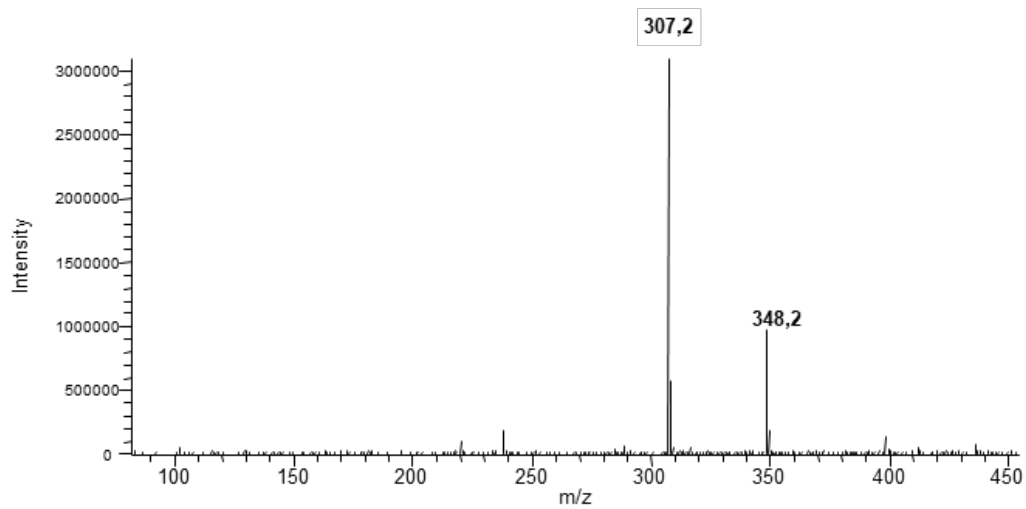
Κατόπιν μελετήθηκε ο παράγοντας dwell time (χρόνος απόκρισης). Οι τιμές που μελετήθηκαν ήταν οι 0,1, 0,2 0,3 0,5. Οι διαφορές και εδώ δεν ήταν σημαντικές

επιλέχθηκε ωστόσο η τιμή 0,1 λόγω οριακά μεγαλύτερου λαμβανόμενου σήματος

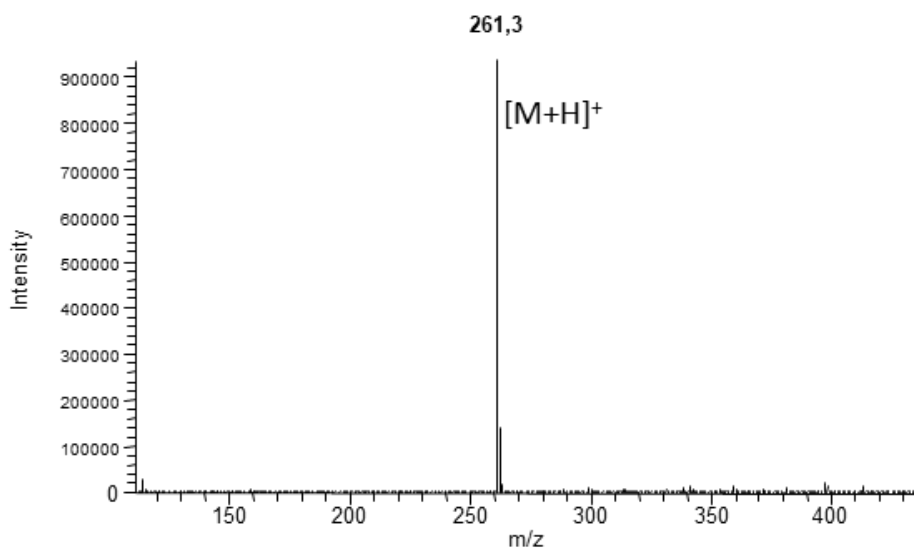
Τέλος παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη αφθονία των θετικά φορτισμένων ιόντων των αναλυτών εμφανίστηκε όταν το δυναμικό της πηγής(AQA max) ρυθμίστηκε στα 20V, καθώς προσπάθεια αύξησης της τάσης στα 30V επέφερε αύξηση της θραυσματοποίησης και συνεπακόλουθη μείωση της αφθονίας των πρωτονιομένων μοριακών ιόντων. Ως εκ τούτου, η τάση της πηγής ιοντισμού ρυθμίστηκε στην τιμή 20V, όπου τα μοριακά ιόντα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αφθονία και δεν παρατηρείται σχηματισμός θυγατρικών ιόντων. Τα φάσματα μαζών των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 4.9 Φάσμα μαζών της μετρονιδαζόλης σε συνθήκες esi (+).



Σχήμα 4.10 Φάσμα μαζών της φλουκοναζόλης σε συνθήκες esi (+).



Σχήμα 4.11 Φάσμα μαζών της ροπινιρόλης σε συνθήκες esi (+).

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται η μέθοδος SIM που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση της

τεχνικής παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM), η οποία εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

Πίνακας 4.2: Μέθοδος μέτρησης με την τεχνική της παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (SIM mode) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης, της φλουκοναζόλης, και της ροπινιρόλης (IS) με LC-ESI/MS.

Χρονικό παράθυρο (λεπτά)	Αναλύτης	Πολικότητα	Τάση πηγής (V)/τάση τριχοειδούς (Kv)	Επιλεγμένα ιόντα (m/z)	Mass Span/dwell time
0-6	Μετρονιδαζόλη	+ve	20/4,8	[M+H] ⁺ : 172,1 128,1	0,15/0,3
0-6	Φλουκοναζόλη	+ve	20/4,8	[M+H] ⁺ : 307,2 308,2	0,15/0,3
0-6	Ροπινιρόλη	+ve	20/4,8	[M+H] ⁺ : 261,3	0,15/0,3

Συγκεκριμένα, η ανίχνευση της μετρονιδαζόλης γίνεται με παρακολούθηση του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος, [M+H]⁺, σε τιμή m/z 172,1, και του ιόντος σε τιμή m/z 128,1, της φλουκοναζόλης με παρακολούθηση του ιόντος σε τιμή m/z 308,2 και του πρωτονιομένου μοριακού ιόντος, [M+H]⁺, σε τιμή m/z 307,2. Για το εσωτερικό πρότυπο ως ιόν παρακολούθησης επιλέχθηκε το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν [M+H]⁺, σε τιμή m/z 261,3. Η παρακολούθηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστά παράθυρα επιλεγμένων ιόντων (SIM) σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με την επικρατέστερη κορυφή αυτών με σημαντικά πλεονεκτήματα όπως ενίσχυση του σήματος και της ευαισθησίας.

4.7 Βέλτιστες συνθήκες συστήματος LC/MS

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης τόσο του υγροχρωματογραφικού συστήματος, όσο και του φασματομέτρου μαζών

καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών:

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης 5 λεπτά, ο βρόχος εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 μL .

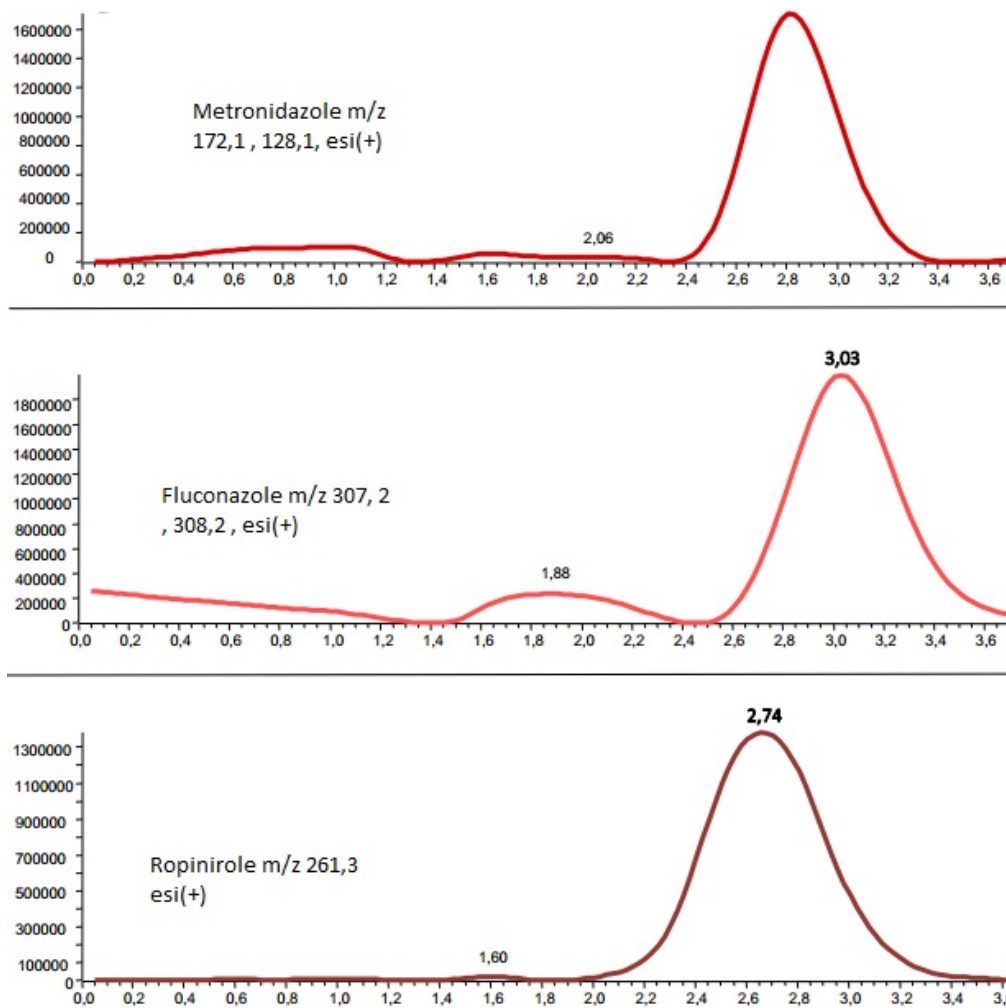
Στατική Φάση: Χρωματογραφική στήλη PGC, 125x2,1, μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm .

Κινητή Φάση: Μείγμα ακετονιτριλίου : νερού σε αναλογία 55 : 45 v/v, που περιείχε μυρμηκικό οξύ σε ποσοστό 0,1%.

Ταχύτητα ροής: 0,25 mL/min

Ανιχνευτής: Φασματόμετρο μαζών ρυθμισμένο να μετρά με την τεχνική SIM τα μοριακά ιόντα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που παράγονται με θετικό ιονισμό και μηχανισμό ηλεκτροδιάχυσης. Η πηγή ιοντισμού λειτουργούσε σε θερμοκρασία 220 $^{\circ}\text{C}$, η τάση (AQAmx) της πηγής ρυθμίστηκε στα 20 V, ενώ το δυναμικό του τριχοειδούς στα 4,8 kV, με τους παράγοντες mass span και time ρυθμισμένους στα 0,1 και 0,3 αντίστοιχα

Στο σχήμα 4.12 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό ιοντικό χρωματογράφημα που προήλθε από την ανάλυση δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με 2,5 $\mu\text{g/mL}$ από τους αναλύτες και 2,5 $\mu\text{g/mL}$ εσωτερικού προτύπου. Το χρωματογράφημα ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος LC-MS με την τεχνική Παρακολούθησης Προεπιλεγμένου Ιόντος (SIM), σε διαφορετικά χρονικά παράθυρα (πίνακας 4.2).



Σχήμα 4.12: Ιοντικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με μέση συγκέντρωση των αναλυτών, $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, και $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ εσωτερικού προτύπου.

Με τις παραπάνω συνθήκες οι χρόνοι εκλουσης για την μετρονιδαζόλη, τη φλουκοναζόλη, είναι 2,81, και 3,03 λεπτά, αντίστοιχα, ενώ το εσωτερικό πρότυπο (ροπινιρόλη) εκλούεται στα 2,74 λεπτά.

4.8 Εφαρμογή της μεθόδου RP HPLC-ESI/MS στον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων Μετρονιδαζόλη, και Φλουκοναζόλη, σε ανθρώπινο πλάσμα.

4.8.1 Ανθρώπινο πλάσμα

Το αίμα είναι ένα ιξώδες υγρό που αποτελείται από κύτταρα και πλάσμα και είναι ίσο με το 1/13 του βάρους του σώματος. Τα κύτταρα που αποτελούν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, διακρίνονται σε :

- θρομβοκύτταρα, εμπύρηννα κύτταρα, προερχόμενα από λεμφοκύτταρα,
- αιμοπετάλια, ατρακτοειδή θραύσματα κυττάρων του μυελού των οστών που συμβάλουν στην πήξη του αίματος,
- ερυθροκύτταρα, που παράγονται από τον ερυθρό μυελό των οστών και διακινούν την αιμοσφαιρίνη, η οποία με τη σειρά της μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και
- λευκά αιμοσφαίρια, κοκκιώδη και ακοκκιώδη, τα οποία κατά κύριο λόγο προστατεύουν τον οργανισμό από τους μικροοργανισμούς, σχηματίζοντας αντισώματα και ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα.

Το πλάσμα αποτελεί μέρος του εξωκυττάριου υγρού του σώματος. Είναι το υπερκείμενο κιτρινωπό υγρό, που λαμβάνεται μετά από προσθήκη αντιπηκτικού και φυγοκέντρηση του αίματος, ώστε να καθιζήσουν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος.

Η ανάγκη εύρεσης συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των αναλυτών στο πλάσμα γίνεται κατανοητή αν αναλογιστεί κανείς την

πολυπλοκότητα των συστατικών που το απαρτίζουν. Πολυάριθμες ενώσεις όπως πρωτεΐνες (λευκωματίνες, ινωδογόνο, σφαιρίνες), ορμόνες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, θρεπτικές ουσίες είναι πιθανό να παρεμποδίζουν την αναλυτική διαδικασία. Στην παρούσα έρευνα έγινε επιτυχής προσδιορισμός των ενώσεων παρουσία των υπόλοιπων συστατικών του πλάσματος χωρίς να παρουσιάζονται σημαντικές παρεμποδίσεις.

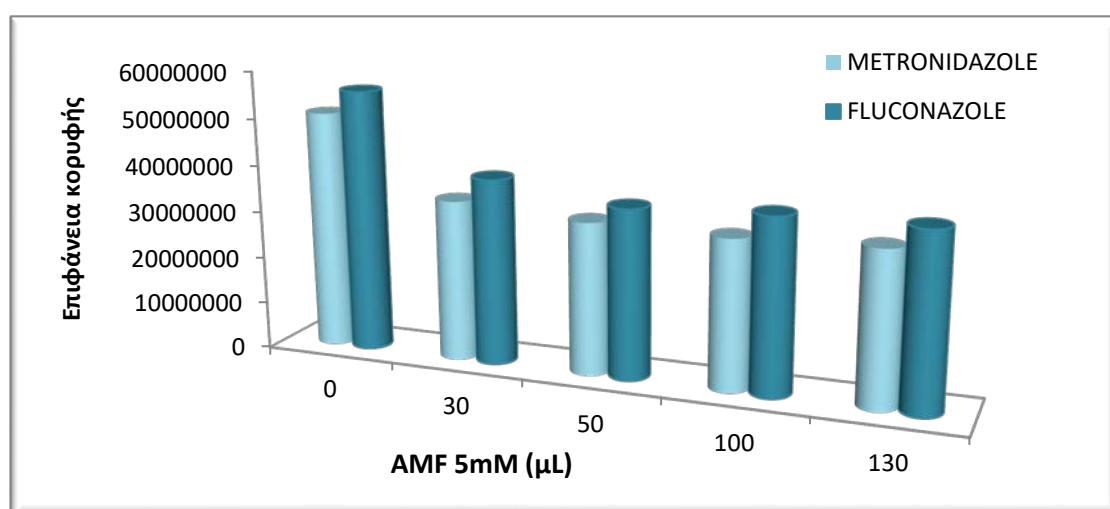
4.8.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου προετοιμασίας του βιολογικού δείγματος

Αρχικά πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική έρευνα για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου κατεργασίας δείγματος. Λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα από άλλες παραπλήσιες έρευνες αλλά και των χρονικών και οικονομικών περιορισμών καταλήξαμε στην επιλογή της άμεσης ένεσης του βιολογικού δείγματος μετά από κατακρήμιση πρωτεϊνών και διήθηση. Η τεχνική της κατακρήμισης των πρωτεϊνών είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος κατεργασίας για τα περισσότερα βιολογικά υγρά, που συνεπάγεται καταβύθιση των πρωτεϊνών του πλάσματος, του ορού ή του δείγματος των ιστών σε μορφή λευκού ιζήματος καθώς οι αναλύτες λαμβάνονται από το υπερκείμενο υγρό και είναι έτοιμοι προς ανάλυση.

Η επιλογή του διαλύτη κατεργασίας του βιολογικού δείγματος παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς διαπιστώσαμε ότι μεταβάλλεται η χρωματογραφική συμπεριφορά (χρόνοι ανάλυσης), αλλά και η μορφή των χρωματογραφικών κορυφών των αναλυτών ανάλογα με το % ποσοστό του βιολογικού δείγματος (πλάσμα) στο μίγμα της ένεσης. Η προσθήκη του μυρμηκικού αμμωνίου κρίθηκε αναγκαία, καθώς βελτίωνε σημαντικά τη μορφή

της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη. Με σκοπό να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες κατεργασίες, σχεδιάστηκε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου και της επίδρασης της αναλογίας του ακετονιτριλίου με το μυρμηκικό αμμώνιο στη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του μυρμηκικού αμμωνίου στη μέθοδο προετοιμασίας του βιολογικού δείγματος. Στο σχήμα 4.13 παρουσιάζεται η επίδραση του όγκου (μL) 5mM μυρμηκικού αμμωνίου που χρησιμοποιείται στην προεργασία του βιολογικού δείγματος στην επιφάνεια κορυφής των αναλυτών. Για τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν 0, 30, 50, 100 και 130 μL υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου 5mM για την προεργασία του δείγματος. Παρατηρούμε ότι το ισχυρότερο σήμα το παίρνουμε χωρίς καθόλου άλας όπως αναμενόταν άλλωστε, ενώ αυξανόμενου του όγκου του άλατος που προστίθεται μειώνεται το λαμβανόμενο σήμα. Τελικά επιλέχθηκαν τα 30 μL υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου 5mM.

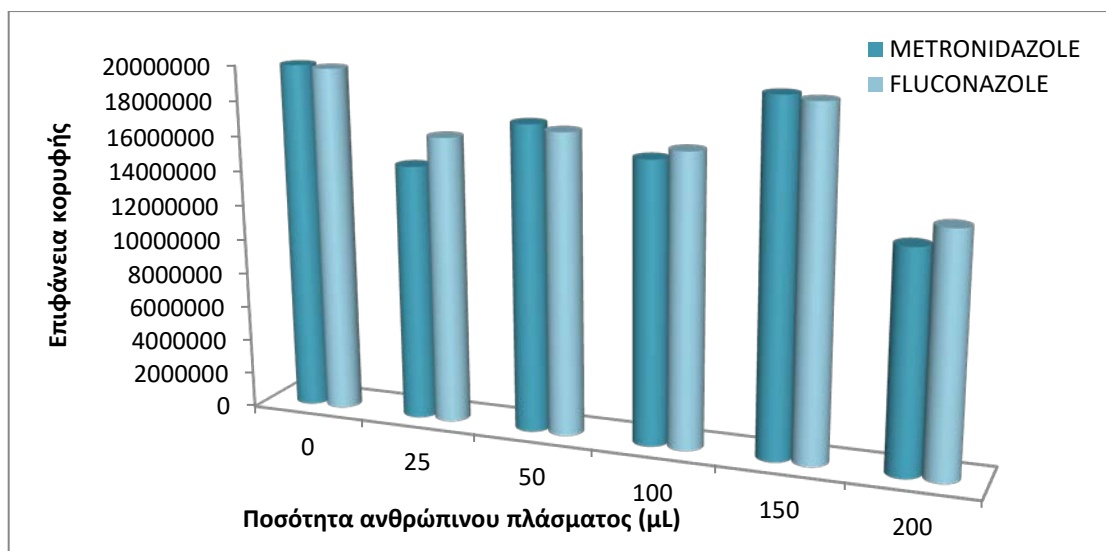


Σχήμα 4.13 Γραφική παράσταση της επίδρασης του όγκου (μL) 5mM μυρμηκικού αμμωνίου που χρησιμοποιείται στην προεργασία του βιολογικού δείγματος στην επιφάνεια κορυφής των αναλυτών

Κατόπιν αναλυτικά, μελετήθηκαν οι ακόλουθες αναλογίες διαλυμάτων με σκοπό την κατεργασία του βιολογικού δείγματος:

1. 25 μL πλάσμα + 25 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 845 μL ακετονιτρίλιο + 30 μL AMF. \rightarrow Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
2. 50 μL πλάσμα + 50 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 820 μL ακετονιτρίλιο + 30 μL AMF \rightarrow Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
3. 100 μL πλάσμα + 100 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 720 μL ακετονιτρίλιο + 30 μL AMF \rightarrow Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
4. 150 μL πλάσμα + 150 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 620 μL ακετονιτρίλιο + 30 μL AMF \rightarrow Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση
5. 200 μL πλάσμα + 200 μL διάλυμα εργασίας + 50 μL IS + 520 μL ακετονιτρίλιο + 30 μL AMF \rightarrow Φυγοκέντρηση, διήθηση και μετά ένεση

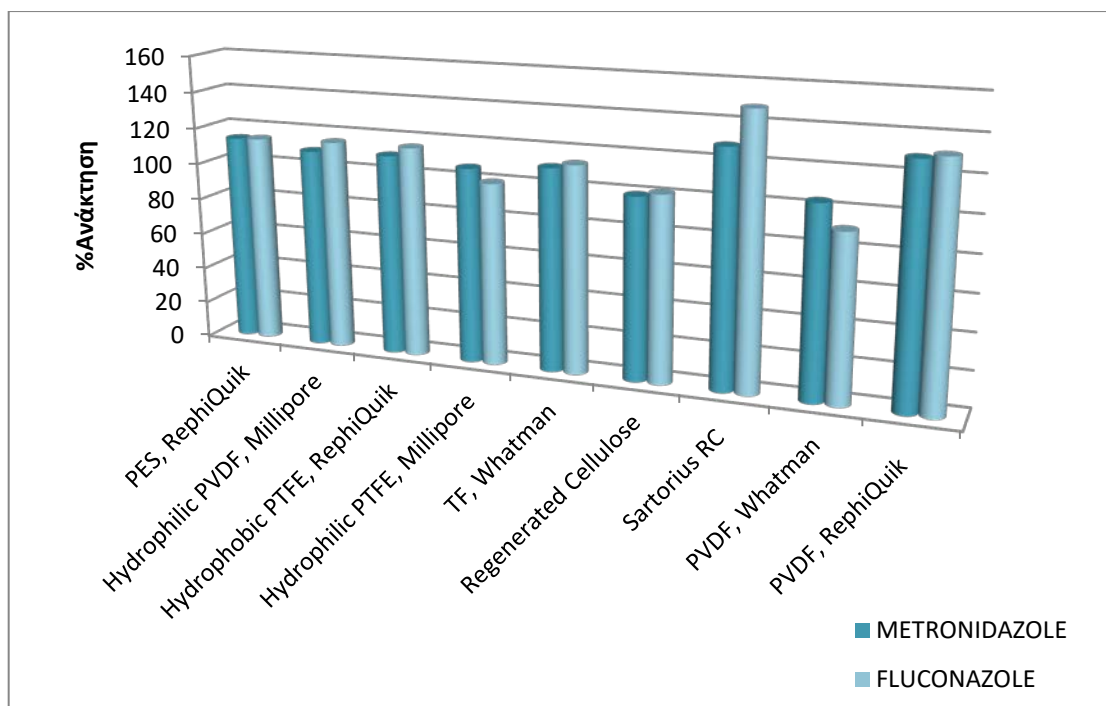
Παρατηρήθηκε ότι η επιλογή 4 ήταν η ιδανικότερη κυρίως λόγω καλύτερου σήματος (σχήμα 4.14), ενώ δε παρατηρήθηκε κάποια συνέκλουση με συστατικά του πλάσματος. Αύξηση του όγκου του βιολογικού πέρα από στα 200 μL προκαλεί μείωση του σήματος λόγω αύξησης του φαινομένου της ιοντικής καταστολής από τα συστατικά του πλάσματος.



Σχήμα 4.14 Διάγραμμα λαμβανόμενου σήματος ως προς όγκο του βιολογικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε κατά την προεργασία του δείγματος

Όσον αφορά τους χρόνους συγκράτησης και τη συμμετρία των λαμβανομένων χρωματογραφικών κορυφών δε παρατηρήθηκε κάποια αξιόλογη μεταβολή.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν πειράματα Όσον αφορά την επιλογή των φίλτρων για τη διήθηση του για την επιλογή των κατάλληλων φίλτρων διήθησης πριν την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα LC-ESI/MS. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όλα την ίδια μέρα, με χρήση δειγμάτων τα οποία παρασκευάστηκαν εκείνη την ημέρα. Παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος αναλυτών και εσωτερικού προτύπου σε συγκεντρώσεις 2,5 μg/mL και δείγματα αναλυτών και εσωτερικού προτύπου στα οποία όμως αντί για 150 μL πλάσματος προστέθηκαν 150 μL νερού. Η ανάκτηση υπολογίστηκε από το λόγο του σήματος που λήφθηκε μετά την ένεση των εμβολιασμένων με τους αναλύτες και εσωτερικό πρότυπο δειγμάτων προς το σήμα των δειγμάτων που δεν περιείχαν βιολογικό υλικό. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στο σχήμα 4.15.



Σχήμα 4.15 Ραβδογράμματα ανάκτησης ως προς χρησιμοποιούμενα φίλτρα διήθησης σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος

Από το παραπάνω σχήμα γίνεται φανερό ότι η καλύτερη ανάκτηση επιτεύχθει με χρήση των φίλτρων regenerated cellulose.

Αναλυτικά η βέλτιστη πορεία κατεργασίας του βιολογικού υλικού περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Σε ακριβώς 150 μL πλάσματος προστίθενται 150 μL μικτού δείγματος εργασίας των αναλυτών, 50 μL διαλύματος ροπινιρόλης (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 30 μL διαλύματος άλατος 5mM AMF και 620 μL ακετονιτριλίου. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex για ένα λεπτό, φυγοκέντρηση στους 25°C και στις 16000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά. Ακολουθεί παραλαβή του υπερκείμενου υγρού, διήθηση με μικροφίλτρα και εισαγωγή στο σύστημα LC-MS.

4.9 Αξιολόγηση της μεθόδου

4.9.1 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τρεις καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάζονται σε 3 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες σε περίοδο τεσσάρων εβδομάδων. Χρησιμοποιούνται τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος που παρασκευάζονται με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε. Κάθε ένα από αυτά τα δείγματα ενίεται 3 φορές στο σύστημα LC-MS. Σε κάθε μέτρηση υπολογίζονται οι λόγοι των επιφανειών των κορυφών του κάθε αναλύτη προς την επιφάνεια της κορυφής της ροπινιρόλης. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή του λόγου των επιφανειών καθώς και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών από τη θεωρητική τιμή.

Τα αποτελέσματα για κάθε μία από τις τρεις σειρές μετρήσεων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4.3 Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος με την τεχνική RPLC-ESI/MS			
Συγκέντρωση (μg/ mL)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειών x 100 _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση (μg/mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,1	0,0159	0,101	0,8
	0,0203	0,102	1,5
	0,0163	0,111	6,4
0,2	0,0367	0,212	5,8
	0,0398	0,199	-0,4
	0,0354	0,201	0,3
0,5	0,0905	0,499	-0,2
	0,0962	0,481	-3,9
	0,0896	0,470	-6,4
2,5	0,4564	2,451	-1,9
	0,5298	2,64	5,9
	0,4961	2,47	-1,1
5	0,9052	4,847	-3,1
	1,017	5,08	1,6
	1,061	5,25	5,1
10	1,721	9,201	-8,0
	1,878	9,38	-6,2
	1,828	9,04	-9,6
15	3,024	16,16	7,7
	3,098	15,47	3,2
	3,225	15,93	6,2

Από τα αποτελέσματα των καμπυλών βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης είναι φανερό ότι στη συγκέντρωση του LLOQ το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα (%Er) ήταν μικρότερο του 6,4%, και εντός των προδιαγραφών του EMEA ($\pm 20\%$ στο

LOQ), για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της καμπύλης βαθμονόμησης μικρότερο του $\pm 8,0\%$, εντός των προδιαγραφών του EMEA ($\pm 15\%$).

Πίνακας 4.4 Πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή των τριών καμπυλών βαθμονόμησης της φλουκοναζόλης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος με την τεχνική RPLC-ESI/MS

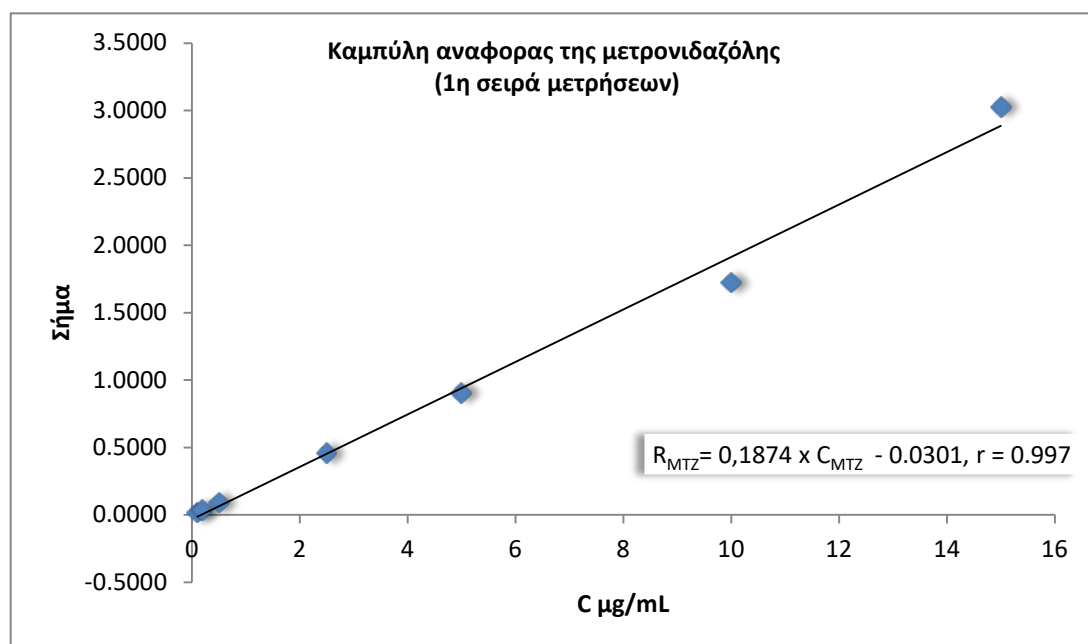
Συγκέντρωση (μg/ mL)	Μέση τιμή του λόγου επιφανειών x 100 _(n=2)	Πειραματική Συγκέντρωση (μg/mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
0,1	0,0192	0,094	-6,5
	0,0171	0,089	-10,7
	0,0172	0,105	5,4
0,2	0,0412	0,204	1,8
	0,0393	0,197	-1,3
	0,0325	0,182	-8,1
0,5	0,1122	0,559	11,8
	0,1161	0,571	14,1
	0,0978	0,521	3,3
2,5	0,4845	2,42	-3,0
	0,5442	2,65	6,0
	0,5102	2,62	4,8
5	0,9969	4,99	-0,2
	1,0076	4,90	-1,9
	0,8957	4,59	-8,3
10	1,864	9,33	-6,7
	1,967	9,56	-4,4
	1,824	9,32	-6,8
15	3,152	15,79	5,3
	3,162	15,37	2,5
	3,164	16,21	7,7

Από τα αποτελέσματα των καμπυλών βαθμονόμησης της φλουκοναζόλης είναι φανερό ότι στη συγκέντρωση του LLOQ το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα (%Er) ήταν μικρότερο του 10,7%, και εντός των προδιαγραφών του EMEA ($\pm 20\%$ στο

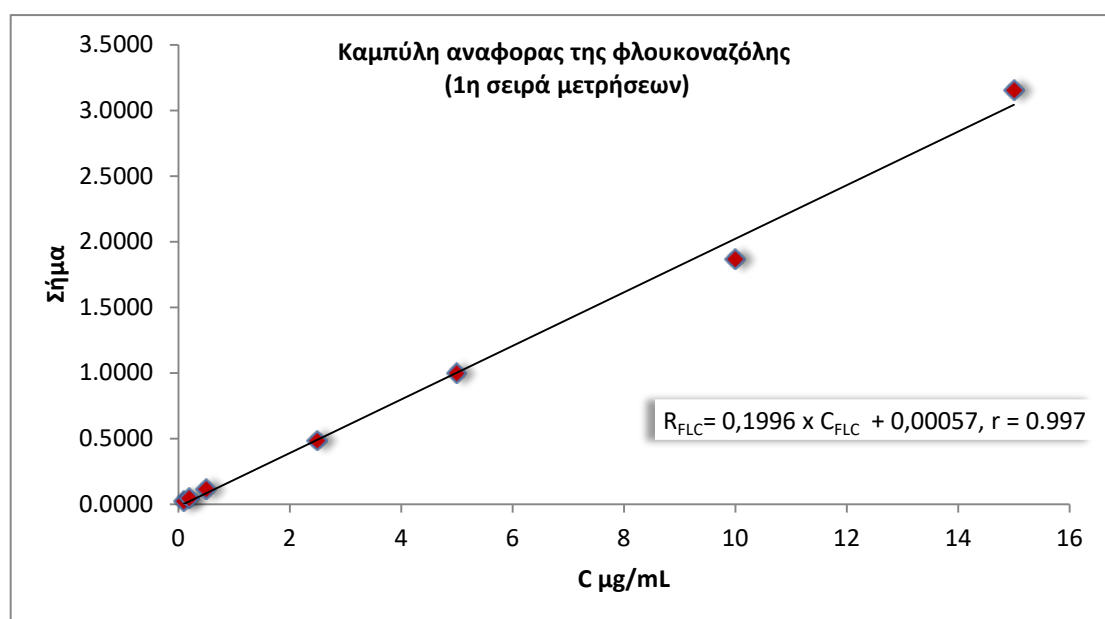
LOQ), για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της καμπύλης βαθμονόμησης μικρότερο του 14,1 %, εντός των προδιαγραφών του EMEA ($\pm 15\%$).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα γραφικών παραστάσεων με τις καμπύλες βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης, και της φλουκοναζόλης που προέκυψαν μετά από ανάλυση της πρώτης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος παρουσιάζεται στο σχήμα 4.16.

A



B



Σχήμα 4.16: Χαρακτηριστικό παράδειγμα γραφικών παραστάσεων με τις καμπύλες βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης (A) και της φλουκοναζόλης (B) που προέκυψαν μετά από ανάλυση της πρώτης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS ver. 13.0. Σε όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης εφαρμόζεται ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, ως συντελεστής στατιστικού βάρους χρησιμοποιείται ο όρος $w=1/y$ (όπου y είναι ο λόγος των επιφανειών πολλαπλασιαζόμενος με τον αντίστοιχο αριθμητικό όρο). Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5.

Για κάθε μία υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης r , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης βαθμονόμησης S_r , η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου καθώς και η τυπική απόκλιση της κλίσης. Επιπλέον πραγματοποιείται στατιστικός έλεγχος των καμπυλών βαθμονόμησης για να ελεγχθεί αν ο σταθερός όρος για κάθε καμπύλη είναι διάφορος ή όχι του μηδενός. Για το σκοπό, αυτό εφαρμόζεται η δοκιμασία Student (T-test). Όπως παρατηρούμε στον πίνακα για τις καμπύλες των αναλυτών, $t_{\text{πειρ}} < t_{\text{θεωρητικού}} = 2,36$. Ο όρος t_p αντιστοιχεί στη θεωρητική τιμή της δοκιμασίας για $f=n-2=5$ βαθμούς ελευθερίας (df) και στάθμη εμπιστοσύνης 95 % (σύμφωνα με τους πίνακες two - tailed t- test). Επομένως, η τιμή του σταθερού όρου για όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης δε διαφέρει σημαντικά από το μηδέν.

Στους Πίνακες 4.5 και 4.6 που ακολουθούν, παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης του αναλύτη για κάθε εργαστηριακή ημέρα. Παρατηρούμε ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα και για την προσδιοριζόμενη ουσία και για τις τρεις σειρές μετρήσεων. Για όλες τις καμπύλες βαθμονόμησης ο συντελεστής

συσχετίσεως (correlation coefficient, r) για τη μετρονιδαζόλη και τη φλουκοναζόλη είναι μεγαλύτερος από 0,997.

Πίνακας 4.5 Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης της μετρονιδαζόλης και της φλουκοναζόλης, σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος με την τεχνική RPLC-ESI/MS.

Αναλύτης	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg/mL)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r ^b	Τυπική απόκλιση		S _r ^c	α/S _α ^d
				Κλίσης	Τομής		
Μετρονιδαζόλη	0,1-15	$R_{Mnd} = 0,1874 \times C_{Mnd} + 0,0031$	0,997	0,0060	0,0078	0,077	0,38
		$R_{Mnd} = 0,2002 \times C_{Mnd} + 0,000046$	0,9991	0,0042	0,0057	0,051	0,008
		$R_{Mnd} = 0,2028 \times C_{Mnd} - 0,0053$	0,997	0,0068	0,0085	0,084	0,62
Φλουκοναζόλη	0,1-15	$R_{Flu} = 0,1996 \times C_{Flu} + 0,00057$	0,998	0,00501	0,0068	0,062	0,083
		$R_{Flu} = 0,2058 \times C_{Flu} - 0,0013$	0,9991	0,0037	0,0048	0,045	0,27
		$R_{Flu} = 0,1961 \times C_{Flu} - 0,0035$	0,997	0,0067	0,0087	0,084	0,401

^a Λόγοι του εμβαδού κορυφής της μετρονιδαζόλης, R_{Mnd}, και της φλουκοναζόλης, R_{Flu}, σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου (ροπινιρόλη) έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης, R_{Mnd}, και της φλουκοναζόλης, R_{Flu}

^b Συντελεστής Συσχέτισης.

^c Τυπικό σφάλμα της μεθόδου, ^d Πειραματική τιμή του t, η θεωρητική τιμή του t σε P= 0,05 και f = n-2 = 7 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,36.

Πίνακας 4-6 Μέση τιμή των αποτελεσμάτων της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών με την τεχνική RPLC-ESI/MS

Αναλύτης	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg/mL)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r ^b	Τυπική απόκλιση		S _r ^c	α/S _α ^d
				Κλίσης	Τομής		
<i>Μέση τιμή των καμπυλών βαθμονόμησης</i>							
Μετρονιδαζόλη	0,1-15	$R_{Mnd} = 0,1968 \times C_{Mnd} + 0,0057$	$\geq 0,997$	0,0082	0,0013	$\leq 0,084$	$\leq 0,38$
Φλουκοναζόλη	0,1-15	$R_{Vls} = 0,2005 \times C_{Flu} + 0,0051$	$\geq 0,997$	0,0049	0,0016	$\leq 0,084$	$\leq 0,40$

^aΛόγοι του εμβαδού κορυφής της μετρονιδαζόλης, R_{Mnd}, και της φλουκοναζόλης, R_{Flu}, σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου (ροπιριρόλη) έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης, R_{Mnd}, και της φλουκοναζόλης, R_{Flu}.

^bΣυντελεστής Συσχέτισης.

^cΤυπικό σφάλμα της μεθόδου, d Πειραματική τιμή του t, η θεωρητική τιμή του t σε P= 0,05 και f = n-2 = 7 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,36.

4.9.2 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη. Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα (%Er). Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και επικύρωσή των μεθόδων.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within day ή intra day accuracy and precision), όσο και δια των ημερών (between days ή inter day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (quality control samples) που παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4 και τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) στα 0,1, 2,5 και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν πέντε δείγματα σε κάθε σειρά ανάλυσης (εργαστηριακή ημέρα). Τελικά σε κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν από πέντε μετρήσεις σε τρεις εργαστηριακές ημέρες (15 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο).

Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD), ενώ ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό

σφάλμα (%E_r). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Microsoft Excel. Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται οι πειραματικά υπολογιζόμενες τιμές συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη και οι τιμές των παραπάνω στατιστικών παραμέτρων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Πίνακας 4-7 Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου RPLC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης και φλουκοναζόλης σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος

Αναλύτης	Συγκέντρωση (μg/mL)		
	0,1	2,5	15
Μετρονιδαζόλη			
Σειρά 1 (mean ± sd)	0,0958 ± 0,0037	2,367 ± 0,093	15,70 ± 0,48
Σειρά 2 (mean ± sd)	0,0956 ± 0,0019	2,458 ± 0,027	15,11 ± 0,22
Σειρά 3 (mean ± sd)	0,0949 ± 0,0028	2,61 ± 0,13	15,39 ± 0,75
Ολική Μέση Τιμή	0,0954	2,48	15,40
RSD(%) ^{Εντός της ημέρας} ^a	2,8	5,4	3,6
RSD(%) ^{Δια των ημερών}	2,9	3,4	3,1
Ολική Ακρίβεια % Er ^b	-4,6	-0,9	2,7
Φλουκοναζόλη			
Σειρά 1 (mean ± sd)	0,0963 ± 0,0043	2,423 ± 0,047	15,51 ± 0,34
Σειρά 2 (mean ± sd)	0,1031 ± 0,0031	2,37 ± 0,11	14,82 ± 0,42
Σειρά 3 (mean ± sd)	0,0951 ± 0,0047	2,443 ± 0,046	15,22 ± 0,71
Ολική Μέση Τιμή	0,0981	2,41	15,18
RSD(%) ^{Εντός της ημέρας} ^a	5,3	3,1	3,7
RSD(%) ^{Δια των ημερών}	4,8	2,7	3,2
Ολική Ακρίβεια % Er ^b	-1,9	-3,5	1,1

^a Για τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης one way Anova.

^b% σχετικό αναλυτικό σφάλμα = ((ολική μέση τιμή προστ/μενης συγκέντρωσης- τιμή προστ/μενης συγκέντρωσης)/ (τιμή προστιθέμενης συγκέντρωσης) x 10

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η εντός της ημέρας η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται για τη μετρονιδαζόλη μεταξύ των τιμών 2,8 έως 5,4 και για τη φλουκοναζόλη από 3,1 έως 5,3. Η μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση για τη μετρονιδαζόλη κυμαίνεται από 2,9 έως 3,4 και για τη φλουκοναζόλη από 2,7 έως 4,8. Τέλος, η ορθότητα της μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα βρέθηκε να κυμαίνεται από -4,6 έως 2,7 για τη μετρονιδαζόλη και από -3,5 έως 1,1 για τη φλουκοναζόλη.

4.9.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του ICH Topic Q2B. Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$LOD = 3,3 \frac{Sa}{b}$$

όπου SD είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης βαθμονόμησης στον άξονα των y , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης (standard deviation of the y -intercept) και b είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης (slope).

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$LOQ = 10 \frac{Sa}{b}$$

όπου SD είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης βαθμονόμησης στον άξονα των y , δηλαδή η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης

βαθμονόμησης (standard deviation of the y-intercept) και b είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης (slope). Οι εξισώσεις με τις οποίες υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν βάση των 5 χαμηλότερων συγκεντρώσεων των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών δηλαδή των συγκεντρώσεων 0,1 0,2 0,5 2,5 και 5 $\mu\text{g/mL}$. Για τη μετρονιδαζόλη το όριο ανίχνευσης βρέθηκε ότι είναι 0,02 $\mu\text{g/mL}$ και το όριο ποσοτικοποίησης 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Για τη φλουκοναζόλη το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ότι είναι 0,03 $\mu\text{g/mL}$ και το όριο ποσοτικοποίησης στα 0,09 $\mu\text{g/mL}$.

4.9.4 Επίδραση υποστρώματος

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά τη χρησιμοποίηση των συστημάτων LC-MS αποτελεί το φαινόμενο ιοντικής καταστολής (ion suppression) που παρατηρείται στην τεχνική της φασματομετρία μαζών και κυρίως σε συστήματα με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και αφορά στην καταστολή του σήματος του αναλύτη από ουσίες του υποστρώματος που συνεικλούνται και εισέρχονται ταυτόχρονα με αυτόν στην πηγή ιοντισμού και μπορεί να οδηγήσει σε δραστική μείωση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου, με κίνδυνο ακόμα την εσφαλμένη εξαγωγή ψευδώς-αρνητικού αποτελέσματος. Η ένταση του φαινομένου μπορεί να διαφέρει από το ένα δείγμα στο άλλο.³⁵

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η επίδραση του υποστρώματος σε κάθε αναλύτη συγκρίνοντας το σήμα που λαμβάνεται μετά την ανάλυση κατεργασμένου λευκού δείγματος πλάσματος, το οποίο εμβολιάστηκε με τους αναλύτες μετά την κατεργασία, με το σήμα του αναλύτη σε διάλυμα αντίστοιχης συγκεντρώσεως παρασκευασμένο σε διαλύτη ανασύστασης όπως περιγράφηκε στην ενότητα 4.8.2. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων για κάθε

αναλύτη 2,5, 5, 10 και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ όπως επίσης και για το εσωτερικό πρότυπο (ροπινιρόλη) σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Υπολογίσθηκε ο παράγοντας υποστρώματος (matrix factor) από το λόγο της απόκρισης (εμβαδόν κορυφής) της κάθε ουσίας στα δείγματα πλάσματος εμβολιασμένα μετά την κατεργασία προς την απόκριση της κάθε ουσίας στα εμβολιασμένα διαλύματα σε διαλύτη ανασύστασης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 4.8. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι δεν υπάρχει σημαντική καταστολή του σήματος στο φασματόμετρο μαζών με την προτεινόμενη RPLC-ESI/MS μέθοδο.

4.9.5 Ανάκτηση της μεθόδου LC-ESI/MS

Για τον έλεγχο της ανάκτησης της πορείας κατεργασίας, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων 2,5, 5, 10 και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, όπως επίσης και για το εσωτερικό πρότυπο (ροπινιρόλη) σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ταυτόχρονα, κατεργάσθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και αναλύθηκαν δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος (προερχόμενα από διαφορετικές πηγές) τα οποία εμβολιάσθηκαν μετά την κατεργασία με τους αναλύτες σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων 2,5, 5, 10 και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Η ανάκτηση του αναλύτη υπολογίζεται από το λόγο της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα πλάσματος που έχει υποστεί την εκχυλιστική διαδικασία προς την επιφάνεια της κορυφής του ίδιου αναλύτη στο δείγμα πλάσματος που έχει εμβολιαστεί με τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο μετά την κατεργασία.

Στον πίνακα 4.8 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης της πορείας κατεργασίας δείγματος.

Πίνακας 4.8 Αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης της ιοντικής καταστολής και υπολογισμός της ανάκτησης της πορείας κατεργασίας δείγματος.

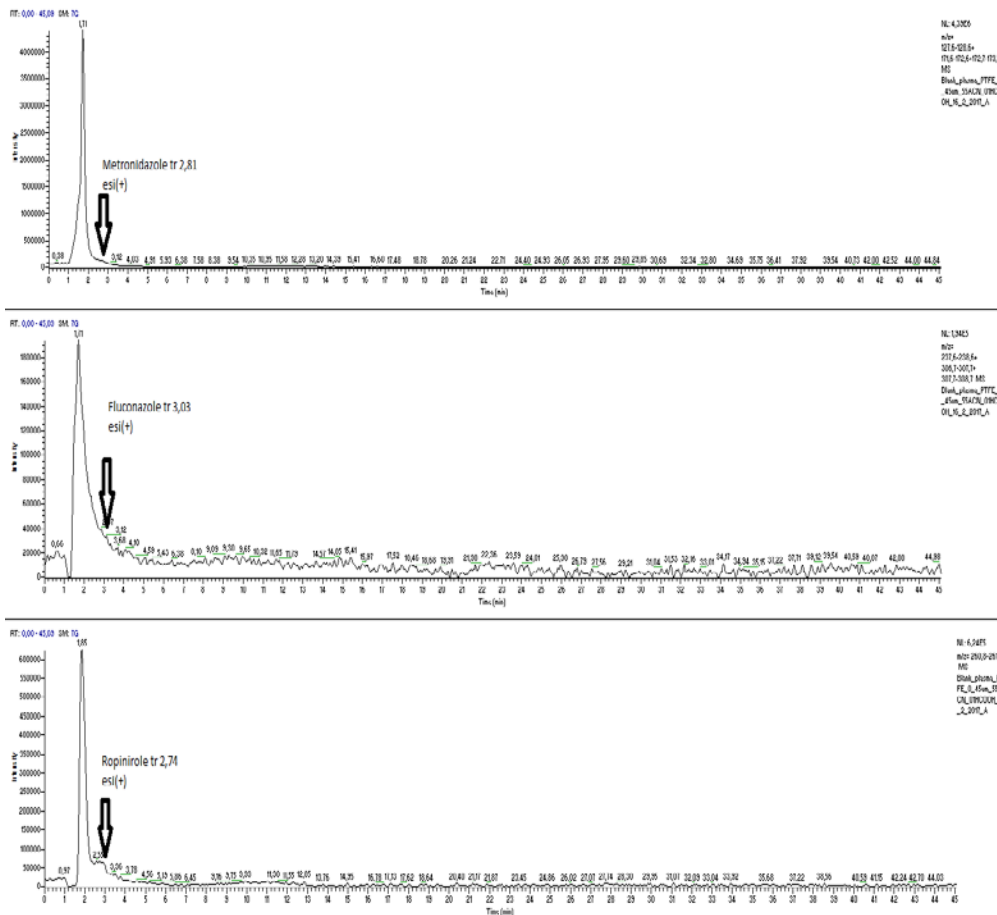
Αναλύτης				
Επίπεδα συγκεντρώσεως (μg/mL)				
Μετρονιδαζόλη				
	2,5	5	10	15
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	97,3 ± 4,8	98,0 ± 3,6	91,5 ± 2,8	97,4 ± 1,5
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	98,9 ± 2,6	90,4 ± 7,3	98,3 ± 2,5	96,7 ± 1,1
Φλουκοναζόλη				
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	87,1 ± 3,9	92,1 ± 3,2	91,5 ± 1,2	93,2 ± 0,1
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	84,4 ± 2,0	78,5 ± 8,7	76,9 ± 4,6	83,4 ± 0,06
Ροπινιρόλη				
	2,5			
% Ανάκτηση (mean ± s.d.) _{n=3}	99,7 ± 1,3			
% Παράγοντας υποστρώματος (mean ± s.d.) _{n=3}	94,4 ± 2,0			

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η μετρονιδαζόλη ανακτάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 91,5%, η φλουκοναζόλη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 91,5%, και αυτό το, επί τοις εκατό, ποσοστό ανάκτησής του είναι ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση και παραμένει σταθερό σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων της καμπύλης βαθμονόμησης. Επιπλέον το εσωτερικό πρότυπο ανακτάται σε ποσοστό 99,7%.

4.9.6 Έλεγχος ειδικότητας

Μετά από ανάλυση τριών λευκών δειγμάτων πλάσματος, από τρεις διαφορετικές πηγές, δεν παρατηρήθηκαν στα ιοντικά χρωματογραφήματα συνεκλουσθείσες κορυφές με εμβαδό μεγαλύτερο από το 20% του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη στο όριο ανίχνευσης. Για το εσωτερικό πρότυπο το αντίστοιχο εμβαδό ήταν 5%.

Ο χρόνος της ανάλυσης ανέρχεται στα 5 λεπτά και στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών δεν παρατηρείται έκλυση των συστατικών του πλάσματος. Η ανάλυση του τυφλού δείγματος πραγματοποιήθηκε μέχρι τα 37 λεπτά προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων που μπορεί να εκκλύονται μετά τα 5 λεπτά.



Σχήμα 4.17 Χρωματογράφημα μαζών που προκύπτει από την ανάλυση τυφλού δείγματος πλάσματος.

4.9.7 Μελέτη σταθερότητας

Η σταθερότητα των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου, σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος, μελετήθηκε υπό διάφορες συνθήκες αποθήκευσης. Η σταθερότητα ενός φαρμάκου σε βιολογικό υγρό είναι συνάρτηση των χημικών ιδιοτήτων του, των συνθηκών αποθήκευσης και του βιολογικού υγρού στο οποίο βρίσκεται το φάρμακο. Οι διαδικασίες εκτίμησης της σταθερότητας θα πρέπει να αποτιμούν τη σταθερότητα του αναλύτη κατά τη συλλογή και το χειρισμό του δείγματος, μετά από μεγάλη περίοδος φύλαξης, και μετά από συνεχείς κύκλους ψύξης - απόψυξης.

Δείγματα πλάσματος εμβολιάστηκαν με κατάλληλα διαλύματα εργασίας ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα που ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα να είναι 2,5, 4,6 και 15 µg/mL για τον κάθε αναλύτη. Για κάθε μια από τις μελετούμενες συνθήκες φύλαξης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 3 δείγματα ανά συγκέντρωση.

Μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα (long-term stability), δηλαδή μετά από αποθήκευση των εμβολιασμένων δειγμάτων για μια εβδομάδα στους -20 °C, για δύο εβδομάδες στους -20 °C, για τρεις εβδομάδες στους -20 °C και για τέσσερις βδομάδες στους -20 °C. Για την εκτίμηση της σταθερότητας μαζί με τα δείγματα που είχαν παραμείνει στην κατάψυξη κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν πρόσφατα παρασκευασμένα εμβολιασμένα δείγματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της σταθερότητας μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης - απόψυξης, κατά τους οποίους τα δείγματα ψύχονται στους -20 °C και κάθε 7 ημέρες αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και επανακαταψύχονται. Μελετήθηκε η σταθερότητα των

αναλυτών μετά από έναν, δύο και τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων. Μαζί με τα δείγματα που ακολούθησαν τους κύκλους ψύξης - απόψυξης, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν πρόσφατα παρασκευασμένα εμβολιασμένα δείγματα και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματά τους.

Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα ελέγχου σταθερότητας (stability samples) υπολογίστηκαν συγκρίνοντας το λόγο της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη προς την επιφάνεια της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (area ratio) που προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στις εκάστοτε συνθήκες φύλαξης (4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 1, 2, 3 και 4 εβδομάδες στους -20 °C και 1, 2 και 3 κύκλους ψύξης/απόψυξης) με τον αντίστοιχο λόγο επιφανειών που λαμβάνεται μετά από χρωματογραφική ανάλυση φρέσκων εμβολιασμένων δειγμάτων της αντίστοιχης συγκέντρωσης. Κάθε ένας από τους αναλύτες μπορεί να θεωρηθεί σταθερός στο βιολογικό δείγμα εάν η συγκέντρωσή του δε διαφέρει περισσότερο από $\pm 20\%$ της αρχικής.

Στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας, όπου παρατίθενται για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου σταθερότητας, οι τυπικές αποκλίσεις αυτών και η % διαφορά από τα αντίστοιχα φρέσκα δείγματα (%Er), η οποία υπολογίζεται ως εξής:

για τις μελέτες σταθερότητας σε μεγάλο χρονικό διάστημα:

$$\%Er = 100 \times (C_{n \text{ εβδομάδες στους } -20^{\circ}\text{C}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$

για τις μελέτες σταθερότητας ψύξης – απόψυξης:

$$\%Er = 100 \times (C_{n \text{ κύκλους ψύξης / απόψυξης}} - C_{\text{φρέσκου δείγματος}}) / C_{\text{φρέσκου δείγματος}}$$

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.9 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρωπίνου πλάσματος και σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.

Αναλύτης Συνθήκες αποθήκευσης/χρόνος								
Επίπεδα συγκέντρωσης	φρέσκα δείγματα	-20°C/ 7 ημέρες		φρέσκα δείγματα	-20°C/ 14 ημέρες		-20°C/ 1 κύκλος ψύξης/απόψυξης	
μg/mL	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E _r ^a	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E _r ^a	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E _r ^a
<i>Μετρονιδαζόλη</i>								
2,5	2,41 ± 0,13	2,39 ± 0,19	-0,7	2,42 ± 0,12	2,43 ± 0,24	0,4	2,29 ± 0,33	-5,3
4,6	4,49 ± 0,14	4,55 ± 0,21	1,5	4,37 ± 0,66	4,61 ± 1,85	5,5	4,51 ± 0,24	3,2
15	15,58 ± 0,49	15,6 ± 0,41	0,13	15,51 ± 0,33	14,6 ± 1,6	-5,8	14,7 ± 0,24	-5,2
<i>Φλουκοναζόλη</i>								
2,5	2,54 ± 0,12	2,52 ± 0,27	-0,4	2,52 ± 0,23	2,43 ± 0,77	-3,5	2,41 ± 0,22	-4,4
4,6	4,36 ± 0,23	4,44 ± 0,37	-1,8	4,51 ± 0,12	4,45 ± 0,14	-1,3	4,34 ± 0,28	-3,8
15	15,21 ± 0,53	14,61 ± 1,05	-4,0	15,1 ± 0,34	14,91 ± 0,88	-1,3	14,6 ± 1,7	-3,3

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.10 Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.										
Αναλύτης		Συνθήκες αποθήκευσης/χρόνος								
Επίπεδα συγκέντρωσης	φρέσκα δείγματα	-20°C/ 21 ημέρες		-20°C/ 2 ^{ος} κύκλος ψύξης/απόψυξη		φρέσκα δείγματα	-20°C/ 28 ημέρες		-20°C/ 3 ^{ος} κύκλος ψύξης/απόψυξη	
μg/mL	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E_r	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E_r^a	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E_r^a	Μέση τιμή ± s.d. (n=3)	%E_r^a
<i>Μετρονιδαζόλη</i>										
2,5	2,51 ± 0,22	2,62 ± 0,49	4,4	2,62 ± 0,22	4,4	2,63 ± 0,11	2,52 ± 0,14	-4,2	2,63 ± 0,51	-4,6
4,6	4,82 ± 0,29	4,72 ± 0,19	-2,1	4,62 ± 0,11	-4,1	4,74 ± 0,31	4,61 ± 0,61	-2,7	4,74 ± 0,33	-1,2
15	14,4 ± 0,62	14,12 ± 0,12	-1,9	15,1 ± 1,1	4,9	14,1 ± 1,8	15,01 ± 0,61	6,4	14,1 ± 1,2	-3,4
<i>Φλουκοναζόλη</i>										
2,5	2,72 ± 0,45	2,51 ± 0,47	-0,4	2,82 ± 0,95	3,7	2,59 ± 0,57	2,43 ± 0,63	-6,5	2,41 ± 0,75	-7,3
4,6	4,61 ± 0,14	4,43 ± 0,24	-3,9	4,72 ± 1,06	2,4	4,62 ± 0,81	4,63 ± 0,95	0,2	4,74 ± 0,36	2,6
15	15,22 ± 0,64	15,7 ± 1,1	-3,1	15,3 ± 1,2	0,5	15,9 ± 1,3	15,73 ± 0,83	-1,3	15,41 ± 0,91	-3,0

^a %σχετικό τυπικό σφάλμα =(ευρεθείσα συγκέντρωση- θεωρητική συγκέντρωση)/(θεωρητική συγκέντρωση) χ 100

Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στους Πίνακες 4.9 και 4.10 συμπεραίνεται ότι οι πειραματικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα ελέγχου της σταθερότητας μετά από 7 μέρες στους -20°C δε διαφέρουν περισσότερο από $\pm 4\%$ από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των πρόσφατα εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος, μετά από 14 ημέρες όχι περισσότερο από $\pm 5,8\%$, μετά από 21 ημέρες όχι περισσότερο από $\pm 4,4\%$ και μετά από 28 ημέρες όχι περισσότερο από $\pm 6,5\%$.

Τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος μετά από 1 κύκλο ψύξης/απόψυξης δε διαφέρουν περισσότερο από $\pm 5,3\%$, μετά από 2 κύκλους ψύξης/απόψυξης παρουσιάζεται μια διαφορά $\pm 4,9\%$ και μετά από 3 κύκλους ψύξης/απόψυξης δε διαφέρουν περισσότερο από $\pm 7,3\%$.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να θεωρηθεί ότι οι αναλύτες σε εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος μπορούν να θεωρηθούν σταθεροί, για 28 ημέρες στους -20 °C και μετά από 3 κύκλους ψύξης/απόψυξης (28 ημέρες στους -20°C), χωρίς σημαντική αποικοδόμηση. Αυτό αποτελεί χρήσιμη πληροφορία για το χειρισμό και την αποθήκευση των κλινικών δειγμάτων.

4.10 Εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού της μετρονιδαζόλης, και της φλουκοναζόλης σε δείγματα πλάσματος ασθενών

Με σκοπό να αξιολογηθεί η προτεινόμενη LC-ESI/MS μέθοδος για κλινική χρήση, η αναλυτική διαδικασία εφαρμόστηκε στην ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινου πλάσματος που συλλέχθηκαν από θηλάζουσες μητέρες που λάμβαναν θεραπεία με μετρονιδαζόλη και αναλύθηκαν επιπλέον δείγματα γυναικών που λάμβαναν φλουκοναζόλη. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σύριγγες που περιείχαν νατριούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό και αμέσως μετά τη λήψη, ανακινήθηκαν ελαφρά και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 στροφές για 14 λεπτά και σε θερμοκρασία 25°C. Τα βιολογικά δείγματα

αποθηκεύτηκαν στους -20°C και αναλύθηκαν εντός 2 εβδομάδων από το χρόνο αποθήκευσής τους με την προτεινόμενη μέθοδο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.11 .

Πίνακας 4.11 Κλινικά δεδομένα ασθενών στις οποίες χορηγήθηκαν μετρονιδαζόλη ή φλουκοναζόλη				
Κωδικός ασθενή / Ηλικία (χρόνια)	Χρόνος από τη χορήγηση (hr)	Φάρμακο /δόση i.v. ,mg	C (μg mL ⁻¹) Mean ± sd _(n=3)	Συγχορηγούμενα φάρμακα
<i>Θηλάζουσες γυναίκες οι οποίες έλαβαν μετρονιδαζόλη μετά από καισαρική τομή</i>				
Ανθρώπινο πλάσμα				
P1 / 28	1	Metronidazole iv, 500mg × 3	11,91 ± 0,18	Cefoxitin /1000 × 2× 2 days
P2/ 38	2	Metronidazole iv, 500mg × 3	8,78 ± 0,19	Cefoxitin /1000 × 2× 2 days, paracetamol iv,1000 mg × 1 lornoxicam tb 4mg, 1 × 1
P3/ 26	2	Metronidazole iv, 500 mg × 3	11,07 ± 0,11	Paracetamol tb 500 mg, 1 × 1, Ergometrine iv, 0.2mg ×1 Cefoxitin /1000 × 2× 2 days
<i>Γυναίκες οι οποίες έλαβαν μετρονιδαζόλη ή φλουκοναζόλη</i>				
Ανθρώπινο πλάσμα				
P4/57	4	Metronidazole iv, 500 mg × 3	13,3 ± 1,1	Levothyroxine 62 μg, Cefoxitin /1000 × 2× 2 days, bemirarine 2500 units, ipratropium bromide inh. 20 mg, budesonide inh. 0,5 mg
P5/61	4,5	Fluconazole caps, 200 mg × 2 × 2	6,74 ± 0,16	Omeprazole iv 40 mg, furosemide iv 10 mg, levocetirizine tb 5 mg, meropenem iv 500 mg, vancomycin iv 1000 mg, quetiapine tb 100mg, biperiden tb 2mg, bemiparine sodium 2500 units, haloperidol tb 150 mg, lactulose 13,34 gr, acetylcysteine 1,2 gr, gastrografin (66+10)mg.
P6/24	2	Metronidazole iv, 500mg × 3	10,3 ± 2,1	Cefuroxime/ 1500mg × 3 × 3 days parecoxib iv, 40 mg × 2, pantoprazole iv, 40 mg × 1

Τα δείγματα της μετρονιδαζόλης βρέθηκαν όλα εντός της C_{max} συγκέντρωσης της μετρονιδαζόλης μετά από βιβλιογραφική έρευνα³⁶ η οποία μετά από του στόματος χορήγηση σε δόση 500 mg είναι 10,7 μg/mL. Οι τρεις ασθενείς με συγκέντρωση μετρονιδαζόλης μεταξύ 11 μg/mL και 12 μg/mL έκαναν λήψη μετρονιδαζόλης ενδοφλεβίως αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα της. Μάλιστα η ώρα δειγματοληψίας

ήταν από μία ώρα έως μία ώρα και 10 λεπτά μετά τη λήψη, χρονικό διάστημα που συμπίπτει και με την T_{max} της ουσίας.

Τέλος όσον αφορά το δείγμα P5 που περιείχε φλουκοναζόλη η C_{max} της φλουκοναζόλης μετά από λήψη 400 mg oral σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα ³⁷ ανέρχεται σε 6,72 $\mu\text{g/mL}$ με την T_{max} να επιτυγχάνεται μετά από 1 με 2 ώρες περίπου. Ο συγκεκριμένος ασθενείς έδωσε δείγμα 4μιση ώρες μετά τη λήψη του φαρμάκου γεγονός το οποίο εξηγεί και τη ευρεθείσα συγκέντρωση πολύ κοντά στη C_{max} καθότι η φλουκοναζόλη έχει χρόνο ημίσειας ζωής περί των 30 με 31 ωρών και αρκετά αργή κάθαρση.

4.11 Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος επιτρέπει τον αξιόπιστο και εκλεκτικό ποσοτικό προσδιορισμό της μετρονιδαζόλης, και της φλουκοναζόλης σε ανθρώπινο πλάσμα με χρήση εσωτερικού προτύου (ροπινιρόλη).

Ο διαχωρισμός των αναλυτών επιτυγχάνεται με υδροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως ισοκρατικής έκλουσης σε στήλη πορώδη γραφίτοποιημένου άνθρακα. Ο χρόνος της ανάλυσης δεν υπερβαίνει τα 5 λεπτά. Η ανίχνευση των προσδιοριζόμενων αναλυτών πραγματοποιείται με φασματομετρία μαζών προσδίδοντας στη μέθοδο υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Η μέθοδος περιλαμβάνει μια απλή πορεία εκχύλισης μέσω κατακρύμνησης των πρωτεϊνών για την προκατεργασία του δείγματος.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος και βρέθηκε γραμμική, ακριβής

και επαναλήψιμη. Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε σε 0,09 µg/mL για τη μετρονιδαζόλη και 0,06 µg/mL για τη φλουκοναζόλη. Όλα τα παραπάνω καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για κλινικές και φαρμακοκινητικές μελέτες ή και μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ¹ E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry*, 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2007.
- ² J.B. Fenn, Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4(7) (1993) 524–535.
- ³ Θ.Π. Χατζηγιάννου, Μ.Α. Κουππάρη, *Ενόργανη Ανάλυση*, 3η Έκδοση, Αθήνα 2000.
- ⁴ Ε. Παντερή, Μ. Παρίση-Πούλου, *Σημειώσεις Προχωρημένης Φαρμακευτικής Ανάλυσης*, Αθήνα 2015.
- ⁵ I.C. Guerrero, O. Kleine, *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*, *Bioscience Reports*, 25 (2005) 71–93.
- ⁶ G.A. Nagana Gowda and Danijel Djukovic, *Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges*, *Methods Mol Biol.* 1198 (2014) 3–12.
- ⁷ G. Loos, A. Van Schepdael, D. Cabooter *Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis* *Phil. Trans. R. Soc. A* 374 (2016) 20150382. DOI: 10.1098/rsta.2015.0382
- ⁸ J. Reinders, U. Lewandrowski, J. Moebius, *Challenges in mass spectrometry-based proteomics*, *Proteomics*, 4 (2004) 3686-3703.
- ⁹ R.M. Smith, *Understanding Mass Spectra*, 2nd Ed. John Wiley & Sons 2004.
- ¹⁰ E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry*, 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2007.
- ¹¹ H.D. Dewald, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation and Applications*, *J. Chem. Ed.*, 76 (1999) 33-39.
- ¹² T.R. Covey, B.A. Thomson, B.B. Schneider, *Atmospheric pressure ion sources*, *Mass Spectrom. Rev.*, 28(6) (2009) 870–897.
- ¹³ I.A. Kaltashov, R.R. Abzalimov, *Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure?*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19(9) (2008) 1239–1246.
- ¹⁴ D.B. Robb, M.W. Blades, *State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS*, *Anal. Chim. Acta*, 627(1) (2008) 34–49.
- ¹⁵ D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκης, 2005.
- ¹⁶ D.L. Hoffmann, D.A. Richards, T.R. Elliott, P.L. Smart, C.D. Coath and C.J. Hawkesworth, *Characterisation of secondary electron multiplier nonlinearity using MC-ICPMS*, *Int. J. Mass Spectrom.*, 244 (2005) 97-108.
- ¹⁷ R. A. Harvey, P.C. Moore, *Φαρμακολογία* 3η έκδοση, 2007
- ¹⁸ www.fda.com/fluconazole

-
- ¹⁹ J.H. Knox, K.K. Unger, H. Mueller, Prospects for Carbon as Packing Material in High-Performance Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 6 (1983) 1-36.
- ²⁰ R. Leboda, A. Lodyga, B. Charnas, *Materials Chemistry and Physics*, 55 (1998) 1-29.
- ²¹ M. T. Gilbert, J. H. Knox, B. Kaur, *Chromatographia*, 16 (1982) 138-146.
- ²² R. Singhal, V.N. Mochalin, M.R. Lukatskaya, G. Friedman, Y. Gogotsia, Separation and liquid chromatography using a single carbon nanotube *Sci Rep.* 2 (2012) 510.
- ²³ I. Panderi, Porous graphitized carbon columns in Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Chromatography*, Second Edition Volume 2, Edited by Jack Cazes, Marcel Dekker Ed. (2005) 1334-1345.
- ²⁴ C. Cosar, L. Julou, Activitiè de l'(hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole (8.823R.P.) vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*, *Ann. Pasteur*, 96, (1959) 238-241. Pasteur
- ²⁵ C.D. Freeman, N.E. Klutman, K.C. Lamp, Metronidazole. A therapeutic review and update, *Drugs*, 54 (1997) 679-708.
- ²⁶ D.I. Edwards. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Br J Vener Dis*, 56 (1980) 285-290.
- ²⁷ N. Longley, C. Muzoora, K. Taseera, J. Mwesigye, J. Rwebembera, A. Chakera, E. Wall, I. Andia, S. Jaffar, T.S. Harrison, Dose Response Effect of High-Dose Fluconazole for HIV-Associated Cryptococcal Meningitis in Southwestern Uganda. *Clinical Infectious Diseases*, 47(12) (2008) 1556-1561.
- ²⁸ J.N. Owens, J.W. Skelley, J.A. Kyle, The Fungus Among Us: An Antifungal Review, *US Pharm.*, 35(8) (2010) 44-56.
- ²⁹ S. M. Grant, S.P. Clissold, Fluconazole. *Drugs*, 39(6) (1990) 877-916.
- ³⁰ Z. Safaei, E. Alipour, A. Shafaati, A. Zarghp, Determination Of Fluconazole In Human Plasma By Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, *Acta Pol Pharm*, (2015) 227-233.
- ³¹ L.A. Decosterd, B. Rochat, B. Pesse, T. Mercier, F. Tissot, N. Widmer, O. Marchetti, Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of Fluconazole, Itraconazole, Hydroxyitraconazole, Posaconazole, Voriconazole, Voriconazole-N-Oxide, Anidulafungin, and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12) (2010) 5303-5315.
- ³² D. Wu, K.C. Wade, D.J. Paul, J.S. Barrett, A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of fluconazole in human plasma and its application in infants with *Candida* infections, *Ther. Drug Monit.*, 31(6) (2009) 703-709.
- ³³ M. Silva, S. Schramm, E. Kano, C.H. dos Reis Serra Development and Validation of a HPLC-MS-MS Method for Quantification of Metronidazole in Human Plasma, *J. Chromatogr Sci.* 47(9) (2009) 781-784.

³⁴ M. Cronly, P. Behan, B. Foley, E., Malone, L. Regan, Development and validation of a rapid method for the determination and confirmation of 10 nitroimidazoles in animal plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 877, (2009) 1494-1500.

³⁵ A. Ekdahl, M. C. Johansson, M. Ahnoff, Tracing and separating plasma components causing matrix effects in hydrophilic interaction chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 923– 924 (2013) 83– 91.

³⁶ C. de C Bergamaschi, L.A. Berto, P.C. Venâncio, K. Cogo, M. Franz-Montan, R.H. Motta, M.P. Santamaria, F.C. Groppo, Concentrations of metronidazole in human plasma and saliva after tablet or gel administration *J. Pharm. Pharmacol.* 66(1) (2014) 40-47.

³⁷ <https://www.drugs.com/pro/fluconazole.html>