

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

Ευάγγελος Κυριαζόπουλος¹, Σαββίνα Ζαχαράκη¹, Δήμητρα Γεννηματά², Ειρήνη Παντερή¹

¹Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, Αθήνα, email: irenepanderi@gmail.com

²Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο Μπενάκιο Ε.Ε.Σ.

Περίληψη

Οι κεφαλοσπορίνες είναι ημισυνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες ευρέος φάσματος και αποτελούν παράγωγα της φυσικής κεφαλοσπορίνης C, που παράγεται από μύκητα του γένους *Cephalosporium*. Ο μηχανισμός δράσης και οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες είναι πολλαπλές. Ορισμένες κεφαλοσπορίνες μπορούν να χορηγηθούν *per os* αλλά οι περισσότερες χορηγούνται παρεντερικά με ενδομυϊκή ή ενδοφλέβια χορήγηση. Μετά την απορρόφησή τους κατανέμονται ευρέως στο σώμα και ορισμένες, όπως η κεφουροξίμη που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία διέρχονται και από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Είναι πολικές ενώσεις και έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες που έχουμε κάνει ότι η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι ιδανική επιλογή. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος HILIC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κεφαζολίνης, της κεφουροξίμης και της κεφοξιτίνης σε βιολογικά υγρά. Αρχικά τροποποιήθηκε η κινητή φάση ώστε να αυξηθεί το σήμα στο φασμαόμετρο μαζών και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες λειτουργίας του, παράλληλα αναπτύχθηκε μέθοδος κατεργασίας του βιολογικού δείγματος. Ακολούθως η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας των αναλυτών στο βιολογικό υλικό και η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση τους σε δείγματα ασθενών μετά από χορήγηση κεφαλοσπορινών.

Λέξεις κλειδιά: LC-ESI/MS, HILIC, κεφοξιτίνη, κεφουροξίμη, κεφαζολίνη, βιολογικά υγρά

Abstract

Cefalosporines are broad-spectrum semisynthetic antimicrobial factors. The mechanism of action and their pharmacological properties are manifold. There is no doubt that the importance of cephalosporin antibiotics in medicine requires the development of high performance separation methods for their analysis. HILIC chromatography appears to be complementary to reversed-phase chromatography and provides reasonable retention and selectivity for polar compounds. Cephalosporins are highly polar compounds and HILIC chromatography is ideal choice for their analysis. In this study, we developed and validated a HILIC-ESI/MS method for the quantification of cefazolin, cefuroxime and cefoxitin in biological fluids. The method was applied to the determination of these compounds in real samples obtained from patients after the administration of cephalosporin antibiotics.

Keywords: LC-ESI/MS, HILIC, cefoxitin, cefuroxime, cefazolin, biological fluids

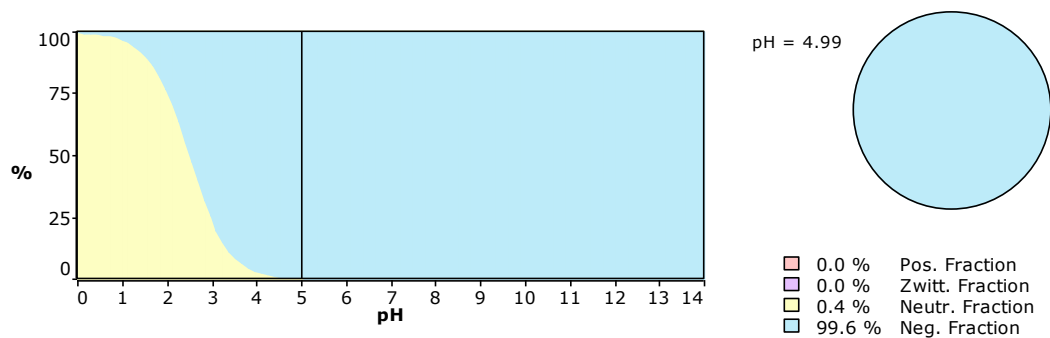
1. Εισαγωγή

Οι κεφαλοσπορίνες είναι β-λακταμικά αντιβιοτικά που λειτουργούν ως αναστολείς της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Παρ' όλο που μοιάζουν δομικά και λειτουργικά με τις πενικιλίνες λόγω της παρουσίας του β-λακταμικού δακτυλίου, είναι περισσότερο ανθεκτικές από τις τελευταίες στις β-λακταμάσες των ανθεκτικών στην πενικιλίνη βακτηρίων. Το γεγονός αυτό καθιστά τις κεφαλοσπορίνες αντιβιοτικά δεύτερης εκλογής για ένα μεγάλο σύνολο λοιμώξεων. Οι κεφαλοσπορίνες ταξινομούνται σε διαφορετικές γενιές με κριτήριο την ευαισθησία των βακτηρίων και την αντοχή στις β-λακταμάσες. Οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η κεφαζολίνη, χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις λοιμώξεων από σταφυλόκοκκους που έχουν την ικανότητα παραγωγής σταφυλοκοκκικής πενικιλιάσης. Οι κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενιάς στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η κεφουροξίμη παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των gram(-) βακτηρίων *Haemophilus influenza* και μερικών στελεχών *Enterobacter aerogenes* και *Neisseria*. Η κεφοξιτίνη ενώ κατατάσσεται στη δεύτερη γενιά κεφαλοσπορινών, αποτελεί εξαίρεση στην κατηγορία και διαθέτει μικρή δραστηριότητα έναντι του *Haemophilus influenza*, αλλά είναι η πλέον ισχυρή ενάντια στον *Bacteroides fragilis* που την καθιστά φάρμακο εκλογής εναντίον γυναικολογικών σηπτικών καταστάσεων. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μίας απλής και γρήγορης μεθόδου προδιορισμού των κεφαλοσπορινών κεφουροξίμη, κεφοξιτίνη και κεφαζολίνη σε ανθρώπινο πλάσμα και ανθρώπινο γάλα.

Ο θηλασμός αποτελεί ένα σημαντικό εφόδιο για την ανάπτυξη και τη διασφάλιση της υγείας των νεογνών. Το μητρικό γάλα προστατεύει τα νεογνά από λοιμώξεις, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης αλλεργιών και τον κίνδυνο εμφάνισης νεογνικού ικτέρου και συμβάλει στην ψυχική ανάπτυξη των νεογνών. Η τεράστια σημασία του θηλασμού καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη μίας λεπτομερούς πολιτικής σχετικά με τη δυνατότητα της μητέρας να συνεχίζει τον θηλασμό παράλληλα με τη χρήση φαρμάκων. Οι κεφαλοσπορίνες θεωρούνται φάρμακα ασφαλή για τα νεογνά και η χρήση τους από θηλάζουσες γυναίκες ενδείκνυται. Ωστόσο απαιτούνται ιδιαίτερες προφυλάξεις στα πρόωρα νεογνά καθώς ο μικρότερος χρόνος ανάπτυξης του εμβρύου έχει ως αποτέλεσμα την ανωριμότητα του ήπατος και των νεφρών. Σε αυτή την περίπτωση η σύνδεση των κεφαλοσπορινών με πρωτεΐνες του πλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε εκτόπιση της χολερυθρίνης από αυτές και την εκδήλωση ικτέρου. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η χορήγηση αντιβιοτικών στη μητέρα μπορεί να καταστρέψει τη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα των νεογνών.

2.1 Μεθοδολογία

Οι κεφαλοσπορίνες είναι υδρόφιλα μόρια και είναι φορτισμένες αρνητικά σε pH μεγαλύτερο του 5.



Σχήμα 1: Διάγραμμα ιοντισμού που λήφθηκε από το υπολογιστικό πρόγραμμα ADME Boxes. Το διάγραμμα είναι ίδιο και για τις τρεις κεφαλοσπορίνες καθώς η δημιουργία του αρνητικού ιόντος οφείλεται στον ιοντισμό μίας όξινης ομάδας του λακταμικού δακτυλίου.

Ο έντονα υδρόφιλος χαρακτήρας τους καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό τους σε βιολογικά υλικά με στήλες αντιστρόφου φάσεως καθώς εκλούνται πολύ νωρίς μαζί με συστατικά του βιολογικού υλικού που συκρατούνται ελάχιστα στη στήλη. Επιπλέον οι σύντομοι χρόνοι έκλουσής τους δεν επιτρέπουν το χρωματογραφικό τους διαχωρισμό. Η αναγκαιότητα απομάκρυνσης του πλήθους των συστατικών του βιολογικού υλικού που εκλούνται νωρίς από τη στήλη οδηγεί τελικά σε χρονοβόρες και επίπονες διαδικασίες απομόνωσης των αναλυτών από το βιολογικό υλικό.

Η χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού που επιλέχθηκε είναι η υδροχρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC) και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε είναι το φασματόμετρο μαζών. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι μικροστήλη ZIC®-HILIC με πληρωτικό υλικό πηκτή πυριτίας που φέρει λειτουργικές ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης.

2.2 Οργανολογία

Σύστημα HPLC

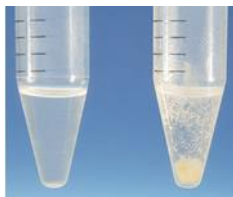
Το σύστημα υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρίας Spectra Physics, μοντέλο SP 8810 και σύστημα εισαγωγής δείγματος της Rheodyne, μοντέλο 7125, με βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL . Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η στήλη ZIC®-HILIC με διαστάσεις 150 x 2.1 και διάμετρο σωματιδίων 5 μm της εταιρίας Merck SeQuant™. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1} .

Φασματόμετρο μαζών

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής των αναλυτών ήταν της εταιρίας Finnigan (Thermo Quest) μοντέλο AQA (Manchester, UK). Ο ιοντισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο για την παραγωγή θετικών ιόντων ESI(+). Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων μαζών έγινε με το λογιστικό πρόγραμμα Xcalibur της εταιρείας IBM (IBM data system). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM).

2.3 Προετοιμασία δειγματος

Η προετοιμασία του δείγματος που ακολουθήθηκε ήταν η διαδικασία της κατακρήμνισης πρωτεϊνών με προσθήκη ακετονιτριλίου και φυγοκέντρηση (σχήμα 2).



Σχήμα 2: Βιολογικό δείγμα μετά από διαδικασία κατακρήμνισης πρωτεϊνών με προσθήκη ακετονιτριλίου

Μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, λήφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα το οποίο διηθήθηκε μέσω μικροφίλτρων για τη διασφάλιση απουσίας αδιάλυτων σωματιδίων και στη συνέχεια εισήχθη απ' ευθείας στη χρωματογραφική στήλη. Η τεχνική αυτή εξασφάλισε μία εξαιρετικά γρήγορη και απλή διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, χωρίς να επιφέρει σημαντική απώλεια ποσοτήτων των αναλυτών.

2.4 Παρακολούθηση προεπιλεγμένων ιόντων

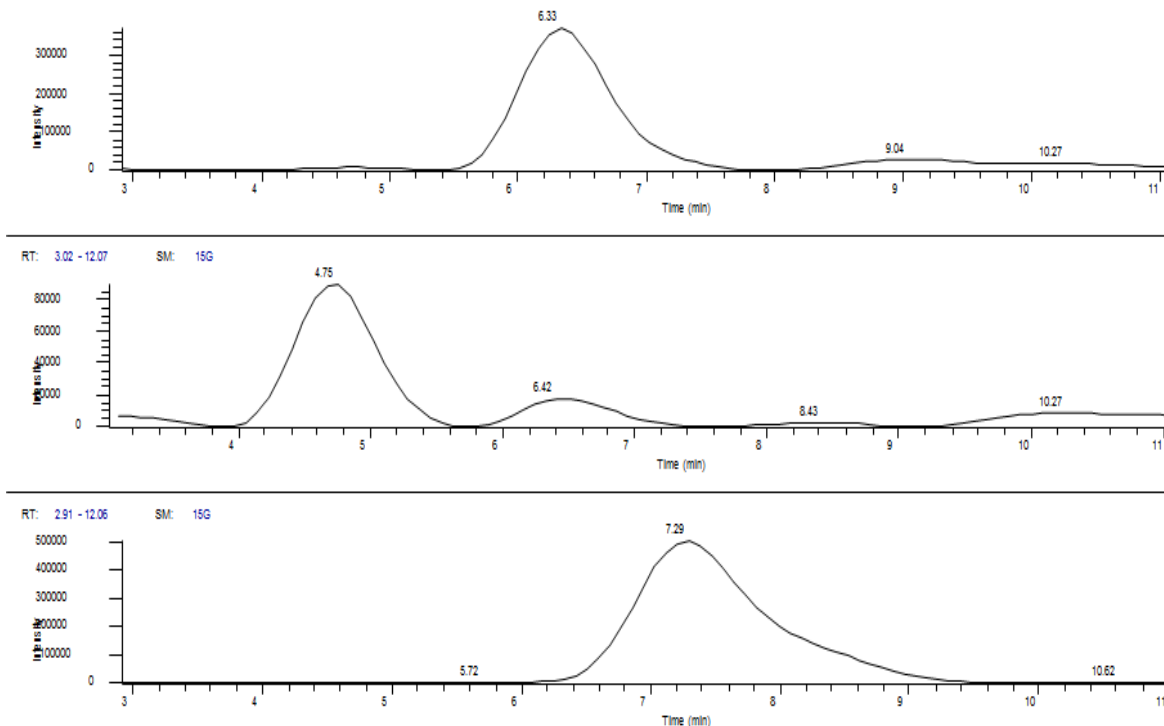
Η ανίχνευση των κεφαλοσπορινών έγινε με παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων από το φασματόμετρο μαζών. Για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των ιόντων των κεφαλοσπορινών αρχικά έγινε έγχυση πυκνών διαλυμάτων κάθε αναλύτη ξεχωριστά και λήφθηκαν φάσματα πλήρους σάρωσης ιόντων. Στη συνέχεια τα μοριακά βάρη των ιόντων που εντοπίστηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση και την παρακολούθηση των αναλυτών κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των μειγμάτων τους.

2.5 Βελτιστοποίηση σήματος στο φασματόμετρο μαζών

Μετά την εκλογή των αναλογιών υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος-ακετονιτριλίου της κινητής φάσης έγινε μελέτη βελτιστοποίησης του σήματος των κεφαλοσπορινών στον ανιχνευτή. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το pH και η συγκέντρωση του άλατος του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης.

2.6 Επικύρωση της μεθόδου

Η αξιολόγηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και μητρικού γάλακτος εμβολιασμένα με τους αναλύτες. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της και για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η γραμμικότητα, η ορθότητα, η πιστότητα και προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της.



Σχήμα 2: Τυπικό χρωματογράφημα κεφαλοσπορινών και εσωτερικού προτύπου. Πρώτο παράθυρο κεφοξιτίνη, δεύτερο παράθυρο κεφουροξίμη, τρίτο παράθυρο κεφαζολίνη

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση δειγμάτων πλάσματος ασθενών μετά από χορήγηση κεφαλοσπορινών.

3. Συμπέρασμα

Κατά την παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μία γρήγορη, απλή, ακριβής εκλεκτική και επαναλήψιμη μέθοδος για τον προσδιορισμό της κεφουροξίμης, της κεφοξιτίνης και της κεφαζολίνης σε ανθρώπινο πλάσμα και σε ανθρώπινο μητρικό γάλα. Η μέθοδος είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του λόγου MP των αναλυτών έτσι ώστε να εξακριβωθεί η ποσότητα των αναλυτών που εκκρίνεται στο μητρικό γάλα.

4. Βιβλιογραφία

1. Hemström P., Irgum K., “Hydrophilic interaction chromatography”, Journal of Separation Science, 29, pp. 1784-1821, 2006.
2. Guo Y., “Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)” Analyst 140, pp. 6452-6466, 2015.
3. Ziska D.S., Ziska S.E. “Drugs and Breastfeeding: Helping the Breast-feeding Mother Evaluate Her Pharmacotherapeutic Options” Drug Topics, 22, pp. 2270-2279, 1996
4. Partani P., Gurule S., Khuroo A., Monif T., Bhardwaj S., “Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of cefuroxime in human plasma: application to a pharmacokinetic study” Journal of Chromatography B 878(3-4), pp. 428-434, 2010.

5. Viberg A., Sandstrom M., Jansson B., "Determination of cefuroxime in human serum or plasma by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry" *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 18, pp. 707-710, 2004.
6. Briscoe S.E., McWhinney B.C., Lipman J., Roberts J.A., Ungerer J.P.J., "A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection" *Journal of Chromatography B* 907, pp. 178-184, 2012.
7. Jin H.E., Jin S.E, Maeng H.J., "Recent bioanalytical methods for quantification of third-generation cephalosporins using HPLC and LC-MS/MS and their applications in pharmacokinetic studies" *Biomedical Chromatography* 28, pp. 1565-1587, 2014.